

Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reatividade vascular em aorta de ratos

Vinícius Bermond Marques

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, maio de 2015

Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reatividade vascular em aorta de ratos

Vinícius Bermond Marques

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em ____ / ____ / 2015 por:

Prof. Dr. Leonardo dos Santos – Orientador, UFES

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli – Coorientador, UFES

Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles, UFES

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier, UFPE

Coordenadora do PPGCF: Prof^a.Dr^a. Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, maio de 2015

Marques, Vinícius Bermond 1991

Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reatividade vascular em aorta de ratos [Vitória] 2015

109 p., 29,7 cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2015)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Leonardo dos Santos

1 Ferro; 2 Aorta; 3 Reatividade vascular; 4 Espécies reativas de oxigênio; 5 Endotélio.

Aos meus queridos pais Aloizio e Sônia, irmãos Geovane e Daniel e
namorada Samantha

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela eterna presença em minha vida. Especialmente por me dar saúde, força e motivação. Obrigado por conduzir e iluminar meu caminho, pela oportunidade de aprender e crescer a cada dia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo. Obrigado Leo por me aceitar como seu aluno e me conduzir durante todas as etapas deste mestrado. Sua orientação foi muito presente, instrutiva, esclarecedora e motivadora. Nossas discussões científicas sempre foram muito construtivas e nelas aprendi muito. Muito obrigado por me orientar.

Ao Prof. Dr. Jones pela orientação, disponibilidade e contribuição com ideias, sugestões e observações científicas, em especial pelos ensinamentos em histologia. A Prof^a. M. SC. Wanize por acreditar em mim e me conduzir ao PPGCF, e ao Prof. Dr. Dalton por me acolher, apresentar e permitir que eu frequentasse o laboratório.

Aos professores do PPGCF, em especial aos do nosso laboratório: Prof^a Dr^a. Ivanita, Prof^a Dr^a. Alessandra, Prof^a Dr^a. Paula e Prof. Dr. Dalton. Obrigado pela disponibilidade, dedicação, apoio e contribuição com ideias, sugestões e observações científicas.

Ao David por me ensinar a realizar os experimentos de hemodinâmica e a Fabiana por me ensinar a montar e testar os anéis na preparação da aorta.

A Tatiani pela amizade, disponibilidade, dedicação e contribuição com ideias e sugestões para realização deste trabalho. Obrigado por estar sempre ao meu lado na realização dos experimentos de reatividade vascular e contribuir tanto para realização dos experimentos.

Ao Rogério pela contribuição com ideias e sugestões e por me ensinar a técnica de imunofluorescência, DHE, entre outras.

Ao Gilson pelas contribuições e disponibilidade para realização de experimentos de biologia molecular.

A Sabrina pela ajuda nos experimentos de pletismografia.

Aos amigos do Laboratório: Ariane, Bruna, Camila, Carolina, Cindy, Daniele, David, Dieli, Edna, Emília, Emilly, Fabiana, Fernanda, Gérsica, Jandinay, João Vitor, Jonaina, karolini, Lorena, Mirian, Marito, Maylla, Paula, Priscila, Renata, Rodrigo,

Samya, Teresa, Thaís e Thiago. Obrigado pela companhia, bons momentos no laboratório e pelo apoio intelectual.

Ao Dr. Anderson por manter o laboratório organizado e pela disponibilidade e eficiência no preparo de material e soluções.

Aos colegas de outros laboratórios pelos bons momentos de convívio e troca de informações e experiências.

Ao laboratório de bioquímica do HUCAM pela dosagem sérica de ferro.

Ao laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins e ao LHMI pelo uso do microscópio para análise histológica.

Aos funcionários do programa pela atenção e prontidão.

Aos meus queridos e amados pais pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim. Obrigado por me ensinar tantas coisas boas e pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos pela amizade, parceria e incentivo.

A minha querida e amada namorada, por estar sempre ao meu lado, me motivando, dando força e muita paz e alegria. Seu apoio foi essencial para conclusão do meu mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. FERRO.....	17
1.1.1. Cinética do ferro no organismo	18
1.1.2. Sobrecarga de ferro	21
1.1.2.1. Efeito da sobrecarga de ferro em diferentes sistemas.....	24
1.1.2.2. Efeito da sobrecarga de ferro no sistema cardiovascular	25
1.2. MÚSCULO LISO VASCULAR.....	28
1.3. ENDOTÉLIO VASCULAR.....	29
1.3.1. Fatores relaxantes derivados do Endotélio	30
1.3.2. Fatores contráteis derivados do Endotélio	31
1.4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	35
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. ANIMAIS E CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS EXPERIMENTAIS.....	38
3.1.1. Ferro sérico	39
3.1.2. Histologia do fígado e aorta após administração crônica de ferro em ratos	40
3.1.3. Peroxidação lipídica no plasma	41
3.2. AVALIAÇÃO PONDERAL E DE CRESCIMENTO.....	41
3.3. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS.....	42
3.3.1. Medida indireta da pressão arterial sistólica em animal acordado	42
3.3.2. Hemodinâmica arterial e ventricular por medida direta em animal anestesiado	43
3.4. MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA.....	43
3.4.1. Avaliação da reatividade vascular <i>in vitro</i>	44
3.4.1.1. Viabilidade da preparação.....	45
3.4.1.2. Protocolos experimentais.....	47
3.4.1.2.1. Resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio.....	47
3.4.1.2.2. Resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	47
3.4.1.2.3. Resposta vasoconstritora à angiotensina II.....	49
3.4.2. Detecção <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico	49
3.4.3. Detecção <i>in situ</i> da quantidade de ânion superóxido	50

3.4.4. Análise <i>in situ</i> da subunidade de membrana (p22^{phox}) da NADPH oxidase.....	50
3.4.5. Atividade da enzima conversora de angiotensina na aorta.....	51
3.4.6. Expressão proteica da Cu/Zn SOD, catalase, nox2 e AT1 na aorta.....	52
3.5. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	54
3.6. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	55
4. RESULTADOS.....	58
4.1. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FERRO 10mg/kg/dia E 100mg/kg/dia EM RATOS.....	58
4.1.1. Conteúdo de ferro nos tecidos e histologia da aorta.....	58
4.1.2. Avaliações ponderal e biométrica.....	60
4.1.3. Acompanhamento da pressão arterial sistólica nos animais acordados.....	61
4.1.4. Reatividade vascular em anéis isolados de aorta em diferentes modelos experimentais de sobrecarga de ferro.....	61
4.1.4.1. Modulação endotelial e pelo NO na resposta contrátil à fenilefrina em anéis isolados de artéria aorta de ratos.....	63
4.2. ESCOLHA DO MODELO A SER ESTUDADO EM DETALHES.....	65
4.2.1. Peso corporal, consumo de ração e características anatômicas macroscópicas no modelo experimental de sobrecarga de ferro em ratos.....	65
4.2.2. Ferro sérico e estresse oxidativo sistêmico no modelo experimental de sobrecarga de ferro em ratos.....	67
4.2.3. Estudo hemodinâmico.....	67
4.2.4. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a função vascular e estudo dos possíveis mecanismos envolvidos.....	68
4.2.4.1. Papel das espécies reativas de oxigênio e sua modulação na resposta contrátil à fenilefrina.....	70
4.2.4.2. Papel do sistema renina-angiotensina local sobre a resposta contrátil à fenilefrina.....	74
4.2.4.3. Papel da via do AA-COX sobre a resposta contrátil à fenilefrina.....	75
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros ponderal e biométricos de ratos dos três grupos experimentais.....	60
Tabela 2. Níveis de ferro e estresse oxidativo circulantes.....	67
Tabela 3. Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares de ratos submetidos e não submetidos à sobrecarga crônica de ferro.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo do ferro e sua regulação pela hepcidina e ferroportina.....	19
Figura 2. O controle dos níveis circulantes de ferro.....	21
Figura 3. Principais fatores endoteliais envolvidos na regulação do tônus vascular.....	29
Figura 4. Via bioquímicas da geração de espécies reativas de oxigênio e metabolismo.....	35
Figura 5. (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm	44
Figura 6. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular <i>in vitro</i>	45
Figura 7. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.....	46
Figura 8. Depósitos de ferro no fígado e aorta após administração crônica de ferro nas duas diferentes doses.....	58
Figura 9. Efeitos da administração crônica de ferro na razão/parede lúmen e espessura de aortas	59
Figura 10. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a pressão arterial.....	61
Figura 11. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica em duas diferentes doses (Fe 10 e Fe 100) sobre a reatividade vascular em aorta.....	62
Figura 12. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica na reatividade vascular à fenilefrina e modulação endotelial.....	63

Figura 13. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a modulação pelo óxido nítrico na reatividade vascular à fenilefrina.....	64
Figura 14. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre aspectos físicos e macroscópicos dos animais e principais órgãos-alvo de depósito de ferro.....	66
Figura 15. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre o ganho de peso corporal e o consumo médio de ração.....	66
Figura 16. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre o papel do NO sobre a modulação do tônus vascular.....	69
Figura 17. Detecção <i>in situ</i> de NO em segmentos de aorta.....	70
Figura 18. Papel de ERO na modulação da reatividade vascular.....	72
Figura 19. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica no conteúdo de proteínas pró-oxidantes e antioxidantes na aorta de ratos.....	73
Figura 20. Papel do sistema renina-angiotensina local na reatividade vascular de aorta.....	74
Figura 21. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a resposta contrátil à angiotensina II em aorta de ratos.....	75
Figura 22. Papel da COX e do tromboxano A ₂ nos efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a reatividade vascular da aorta.....	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

1,4,5 – inositol trifosfato (IP3)
4,5-diaminofluoresceína (DAF-2)
Acetilcolina (ACh)
Ácido araquidônico pela ciclooxigenase (AA-COX)
Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)
Água (H₂O)
Alopurinol (ALO)
Angiotensina II (Angio II)
Ânion superóxido (O₂⁻)
Apocinina (APO)
Ca²⁺ (Ca²⁺)
Capacidade total de ligação do ferro (TIBC)
Catalase (CAT)
Ciclooxigenase (COX)
Cinase da cadeia leve da miosina (MLCK)
c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)
Cloreto de potássio (KCl)
Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES)
Concentração de agonista que produziu metade da R_{max} (EC₅₀)
Concentração intracelular de Ca²⁺ [Ca²⁺]
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Controle (Ct)
Derivadas máximas de pressão intraventricular positiva (+dP/dt_{máx}) e negativa (-dP/dt_{máx})
Diacilglicerol (DAG)
Diferenças na área sob as curvas (dASC)
Dihidroetídio (DHE)
Endotelina (ET)
Endotelina-1 (ET-1)
Endotelina-2 (ET-2)
Endotelina-3 (ET-3)
Endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-)
Enzima conversora de angiotensina (ECA)
Erro padrão da média (EPM)
Espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs)
Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)
Fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)
Fenilefrina (PHE)

Ferro (Fe)
Ferro férrico (Fe^{3+})
Ferro ferroso (Fe^{2+})
Ferroportina (Fpn)
Fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP)
Fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K)
Fosfolipase A2 (PLA2)
Fosfolipase C (PLC)
Fosfolipase D (PLD)
Frequência cardíaca (FC)
Gene relacionado à hemocromatose (HFE)
Glutaciona oxidada (GSSG)
Glutaciona peroxidase (Gpx)
Glutaciona reduzida (GSH)
Graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$)
Grupo sobrecarga de ferro branda (Fe 10)
Grupo sobrecarga de ferro moderada (Fe 100)
Guanilato ciclase solúvel (GCs)
Guanosina trifosfato (GTP)
Hematoxilina e eosina (HE)
Hemocromatose hereditária (HH)
Hipuril-Histidina-Leucina (Hip-His-Leu)
Indometacina (INDO)
Intraperitoneal (i.p)
Isoforma da ciclooxigenase tipo 1 (COX-1)
Isoforma da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2)
Janus quinase (JAK)
Losartan (LOS)
Malondialdeído (MDA)
Mieloperoxidase (MPO)
Minuto (min)
Mitogen-activated protein (MAPKs)
Molar (M)
Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)
Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)
Músculo liso vascular (MLV)
 N^{G} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)
Nitroprussiato de sódio (NPS)
NO sintase (NOS)
O-phataldialdhyde (OPA)

Óxido nítrico (NO)
Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
Peroxinitrito (OONO-)
Porcentagem (%)
Potássio (K⁺)
Pressão arterial diastólica (PAD)
Pressão arterial sistólica (PAS)
Pressão diastólica final intraventricular direita (PDfVD)
Pressão diastólica final intraventricular esquerda (PDfVE)
Pressão sistólica intraventricular direita (PSVD)
Pressão sistólica intraventricular esquerda (PSVE);
Prolina tirosina kinase 2 Ca²⁺ dependente (Pyk2)
Prostaciclina (PGI₂)
Prostaglandinas H₂ e F_{2α} (PGH₂ e PGF_{2α})
Proteína kinase C (PKC)
Proteína kinase dependente de AMPc (PKA)
Proteína transportadora do heme-1 (HCP1)
Radical hidroxila (HO·)
Receptor de angiotensina II do subtipo 1 (AT1)
Receptor de angiotensina II do subtipo 2 (AT2)
Receptor de transferrina (TfR)
Receptor de tromboxano A₂ (TP)
Resposta máxima (R_{máx})
Sensibilidade (-log EC₅₀)
Sistema renina angiotensina (SRA)
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)
Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD)
Tiron (TIR)
Transportador de metal divalente 1 (DMT1)
Tromboxano A₂ (TXA₂)
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Ventrículo direito (VD)
Ventrículo esquerdo (VE)

RESUMO

A sobrecarga de ferro no homem e em modelos animais aumenta o estresse oxidativo e induz cardiomiopatia. Tem sido sugerido que a vasculatura também poderia ser danificada pela sobrecarga de ferro, mas os impactos na reatividade vascular e os mecanismos envolvidos ainda não foram esclarecidos. Este estudo teve como objetivo identificar possíveis alterações na reatividade vascular de aorta de ratos submetidos à sobrecarga de ferro e investigar os mecanismos subjacentes. Os ratos foram randomizados e submetidos a injeções i.p. de ferro dextrano, 10 mg/kg/dia (sobrecarga de ferro branda) ou 100 mg/kg/dia (sobrecarga de ferro moderada), cinco dias por semana durante quatro semanas, e comparados com um grupo que recebeu injeções de solução salina (controle). A pressão arterial sistólica dos animais foi mensurada semanalmente pela pletismografia de cauda. No final do tratamento, os parâmetros de ferro sérico, deposição de ferro tecidual e a reatividade vascular da aorta à fenilefrina, acetilcolina, nitroprussiato de sódio e angiotensina II foi analisada, assim como a reatividade à fenilefrina com desnudação do endotélio e a incubação com L-NAME, tiron, catalase, apocinina, alopurinol, losartan, indometacina ou SQ 29598. Administração crônica de ferro aumentou a saturação da transferrina e níveis de ferro sérico, com deposição significativa no fígado. Além disso, a sobrecarga de ferro moderada aumentou significativamente a resposta vasoconstritora em anéis de aorta, avaliada *in vitro*, e a retirada do endotélio ou a incubação com L-NAME tiveram menor impacto sobre a reatividade vascular do grupo de sobrecarga de ferro, enquanto esses parâmetros não foram alterados no grupo sobrecarga de ferro branda. A sonda óxido nítrico-sensível DAF-2 indicou redução da produção de óxido nítrico na sobrecarga de ferro moderada quando comparado ao controle. A hiperreatividade vascular induzida pela sobrecarga de ferro foi revertida pela incubação com tiron, catalase, apocinina, alopurinol, losartan, indometacina e SQ 29598. Além disso, níveis de malondialdeído foram elevados no plasma; e geração de ânion superóxido e a expressão da subunidade de membrana da NADPH-oxidase (p22phox) foram aumentados na aorta de ratos submetidos à sobrecarga de ferro. Nossos resultados demonstram pela primeira vez que a sobrecarga de ferro crônica está associada à reatividade vascular alterada com perda de modulação endotelial do tônus vascular. Ademais, a sobrecarga de ferro induz disfunção endotelial e reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico provavelmente devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e ativação do sistema renina-angiotensina local e via da cicloxigenase.

Palavras-chave: ferro, aorta, reatividade vascular, espécies reativas de oxigênio, endotélio

ABSTRACT

Iron overload in human and animal models increases oxidative stress and induces cardiomyopathy. It has been suggested that vasculature could be damaged by iron overload as well, but impacts on the vascular reactivity and the mechanisms enrolled have not been understood. In this study we aimed to identify possible changes in vascular reactivity of aorta from iron overloaded rats, investigating the underlying mechanisms. Rats were randomized and treated with iron dextran, i.p., 10mg/Kg/day or 100mg/kg/day five days a week for four weeks and compared to a saline injected group (control). Systolic blood pressure was measured weekly by tail cuff plethysmography. At the end of treatment, the blood iron parameters and iron deposition in tissues was assessed, and the vascular reactivity of the isolated aorta to phenylephrine, acetylcholine, sodium nitroprusside and angiotensin was analyzed in the context of endothelium denudation and incubation with L-NAME, tiron, catalase, apocynin, allopurinol, losartan, indomethacin or SQ 29598. Chronic iron administration increased serum iron and transferrin saturation with significant deposition in the liver. Additionally, high dose iron overload significantly increased the vasoconstrictor response in aortic rings as assessed in vitro, and endothelial denudation or L-NAME incubation have smaller impact on the vascular reactivity of the iron overloaded group, while these parameters have not changed in low dose iron overload group. Nitric oxide sensible fluorescent probe DAF-2 indicated reduced nitric oxide production in moderate iron overload when compared to controls. Iron overload-induced vascular hyperactivity was reversed by incubation with tiron, catalase, apocynin, allopurinol, losartan, indomethacin and SQ 29598. Moreover, malonyldialdehyde was elevated in plasma; and superoxide anion generation and NADPH oxidase membrane-bound subunit (p22phox) expression were increased in aorta from iron-loaded rats. Result demonstrated by the first time that chronic iron overload is associated with altered vascular reactivity with loss of endothelial modulation of the vascular tone. Moreover, the iron loading-induced endothelial dysfunction and reduced nitric oxide bioavailability may be a result of increased production of reactive oxygen species and local renin-angiotensin system and by way of cyclooxygenase activation.

Keywords: iron, aorta, vascular reactivity, reactive oxygen species, endothelium

1. INTRODUÇÃO

O termo sobrecarga de ferro é usado para descrever uma condição resultante do ferro circulante e dos depósitos desse metal em diferentes tecidos, normalmente associada à disfunção desses órgãos. Pode ter causas hereditárias (primárias) ou adquiridas (secundárias), estando presentes não somente sintomas e sinais como fadiga, artralgia e escurecimento da pele, mas também disfunções endócrinas, hepática e cardíaca, que levam a cirrose e a morte súbita por arritmias ou insuficiência cardíaca as maiores causas de mortalidade nesses indivíduos (Siddique & Kowdley, 2012;Oliveira *et al.*, 2014).

A relação entre o acúmulo de ferro e os danos no sistema cardiovascular, especialmente o coração, tem sido proposta desde a década de 1960 (Buja & Roberts, 1971;Schellhammer *et al.*, 1967), sendo atualmente a cardiomiopatia um importante fenótipo a ser pesquisado nas condições de sobrecarga de ferro (Kremastinos & Farmakis, 2011;Murphy & Oudit, 2010). Atualmente não existe nenhum consenso claro sobre a triagem de sobrecarga de ferro na população em geral. Entretanto, a existência de testes de rastreio sensíveis e tratamentos relativamente eficazes, associada a significativa morbidade e mortalidade em pacientes não tratados têm levado à consideração de rastreio da população e formulação de diretrizes para o manejo da sobrecarga de ferro em todo o mundo, incluindo o Brasil, através da Portaria N° 853/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), que regulamenta protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas na sobrecarga de ferro em âmbito nacional.

1.1. FERRO

O ferro é um metal essencial para homeostase celular, devido a sua habilidade de doar e receber elétrons. Participa de diversos mecanismos fisiológicos, dentre eles: síntese de hemoglobina, ligação e transporte de oxigênio através da hemoglobina e mioglobina, reações de oxidação-redução, proliferação celular, síntese de DNA e ação como cofator enzimático na cadeia respiratória mitocondrial.

Pode-se associar a proteínas, como NADPH oxidase e óxido nítrico síntase, participando na catalise de reações metabólicas e reações redox antimicrobianas (Gudjoncik *et al.*, 2014; Ganz, 2013; Dunn *et al.*, 2007).

1.1.1. Cinética do ferro no organismo

A obtenção do ferro é feita através da dieta e pelo reaproveitamento de eritrócitos senescentes (Dunn *et al.*, 2007). Em carnes vermelhas e derivados animais encontra-se na forma heme (mais facilmente absorvida) e em vegetais e grãos, o tipo não heme, que está principalmente na forma férrica (Fe^{3+}) (Grotto, 2010). O ferro é absorvido pelo enterócito no epitélio duodenal, através da proteína transportadora do heme-1 (HCP1) e transportador de metal divalente 1 (DMT1). Para a absorção da forma Fe^{3+} ocorre uma reação de redução, através da redutase férrica, para a forma ferrosa (Fe^{2+}). Após absorção, no meio intracelular certa quantidade de Fe^{2+} é convertida para Fe^{3+} e se liga à ferritina e o restante de Fe^{2+} se liga ao transportador basolateral, a ferroportina, direcionando-se para o sangue para ser convertido em Fe^{3+} pela ação da ferroxidase hefaestina, ligando-se posteriormente à transferrina. O ferro heme é absorvido através do HCP1, e no meio intracelular o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase, e segue o mesmo destino do restante do Fe^{2+} presente do enterócito. O organismo humano absorve cerca de 1–2 mg de ferro por dia em uma dieta normal contendo entre 13–18 mg de ferro (Ganz, 2013; Dunn *et al.*, 2007; Grotto, 2010; Siddique & Kowdley, 2012).

Além da absorção intestinal, a fagocitose e a degradação de hemácias senescentes são uma fonte importante de ferro para o organismo (25–30 mg por dia), quantidade que é suficiente para manter a hematopoese diária. Esse processo é realizado principalmente pelos macrófagos do baço e medula óssea e em menor proporção nas células de Kupffer no fígado, que ocasiona em liberação de ferro e bilirrubina. O ferro pode então ser retido nas moléculas de ferritina no macrófago ou exportado pela ferroportina para circulação (Grotto, 2010).

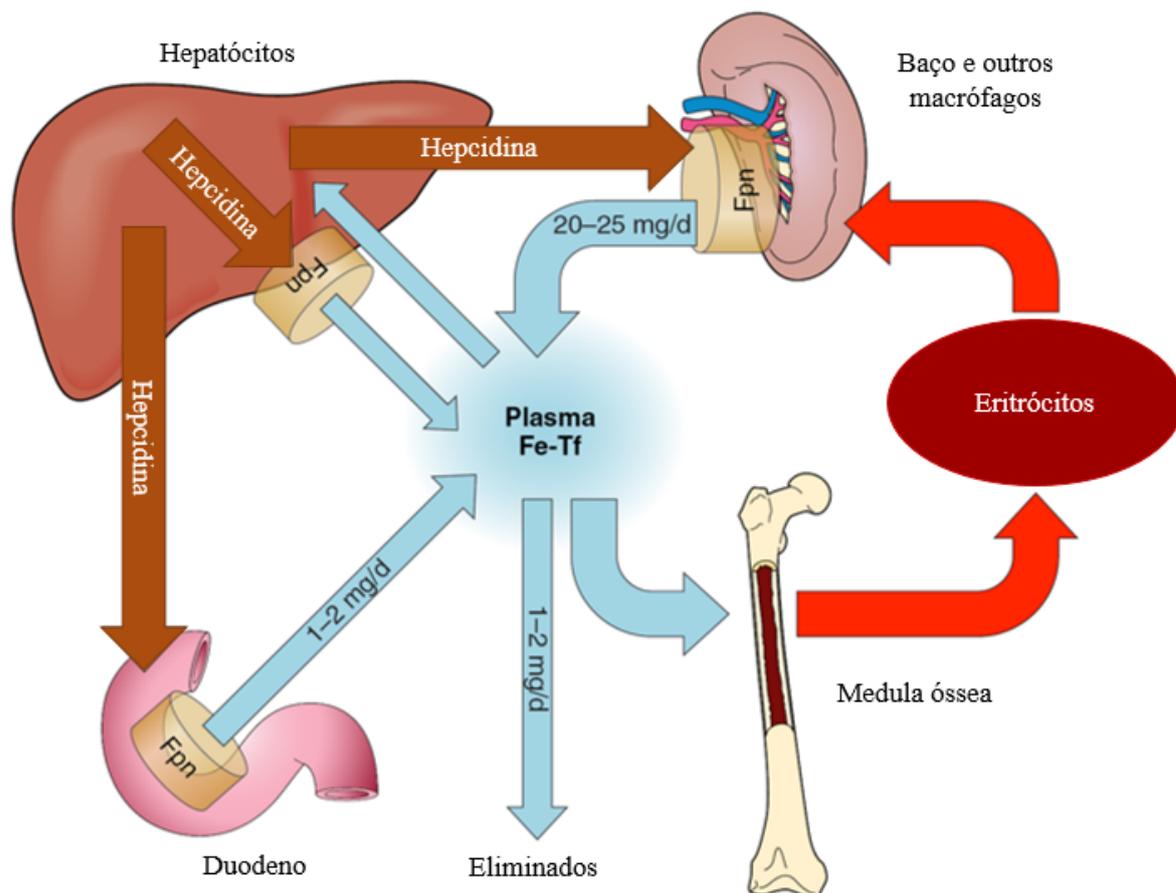


Figura 1. Ciclo do ferro e sua regulação pela hepcidina e ferroportina. Ferro ligado à transferrina é indicado em azul, e ferro nos eritrócitos está em vermelho. A hepcidina controla o fluxo de ferro no plasma, induzindo a endocitose e proteólise da molécula que exporta o ferro, ferroportina (Fpn) (em marrom). Adaptado de Ganz 2013.

A transferrina, molécula transportadora do ferro no organismo, é uma glicoproteína sintetizada no fígado, retina, testículo e cérebro. Possui 2 sítios, e em pH neutro pode transportar até dois átomos de ferro, e além disso o solubiliza, atenua sua reatividade e facilita sua liberação para as células (Grotto, 2010).

Em condições normais, a transferrina no corpo humano tem capacidade de transportar até 12 mg de ferro. Porém, esta capacidade raramente é utilizada, e em geral de 4-6 mg de ferro circulam ligados à transferrina, equivalente a aproximadamente 30-50% de saturação pelo ferro. Quando complexado à transferrina, a internalização do ferro é iniciada pela interação desse complexo a um receptor específico (TfR) presente na superfície da maioria das células (Ponka *et al.*, 1998;Dunn *et al.*, 2007) que levará, após várias etapas, a endocitose do complexo apoTf-TfR-HFE, com posterior liberação do ferro (Dunn *et al.*, 2007;Grotto, 2010;Siddique & Kowdley, 2012).

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

O ferro é eliminado do organismo pelas secreções corpóreas, descamação das células intestinais e epidérmicas ou sangramento menstrual. No entanto, em situações de sobrecarga, como o organismo não possui mecanismos específicos que regulem sua eliminação, o equilíbrio do ferro corporal necessita de especial comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque (Grotto, 2010).

Esta comunicação é estabelecida principalmente pela hepcidina, um hormônio peptídico circulante, sintetizado pelos hepatócitos, e que em níveis aumentados reduz a absorção de ferro, enquanto em níveis diminuídos a aumenta, podendo levar à sobrecarga. Além disso, a interação da hepcidina com a ferroportina controla os níveis séricos de ferro nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos. Com a formação do complexo hepcidina-ferroportina ocorre internalização daquela proteína assim como sua degradação, desta forma o ferro não é externalizado, depositando na forma de ferritina em hepatócitos e macrófagos (Dunn *et al.*, 2007; Ganz, 2013; Grotto, 2010). A expressão da hepcidina é regulada principalmente pelos níveis circulantes de ferro (excesso de ferro na circulação aumenta a expressão, enquanto a anemia e hipóxia diminuem). Além disso, estado inflamatório, transferrina saturada com ferro e vias ativadas pelas moléculas HFE, hemojuvelina e TfR2 também aumentam a expressão da hepcidina (Ganz, 2013; Grotto, 2010). Assim, em situações fisiológicas, o organismo de forma sistêmica consegue manter a homeostase do ferro principalmente pela ação da hepcidina, conforme descrito na figura 1 e 2.

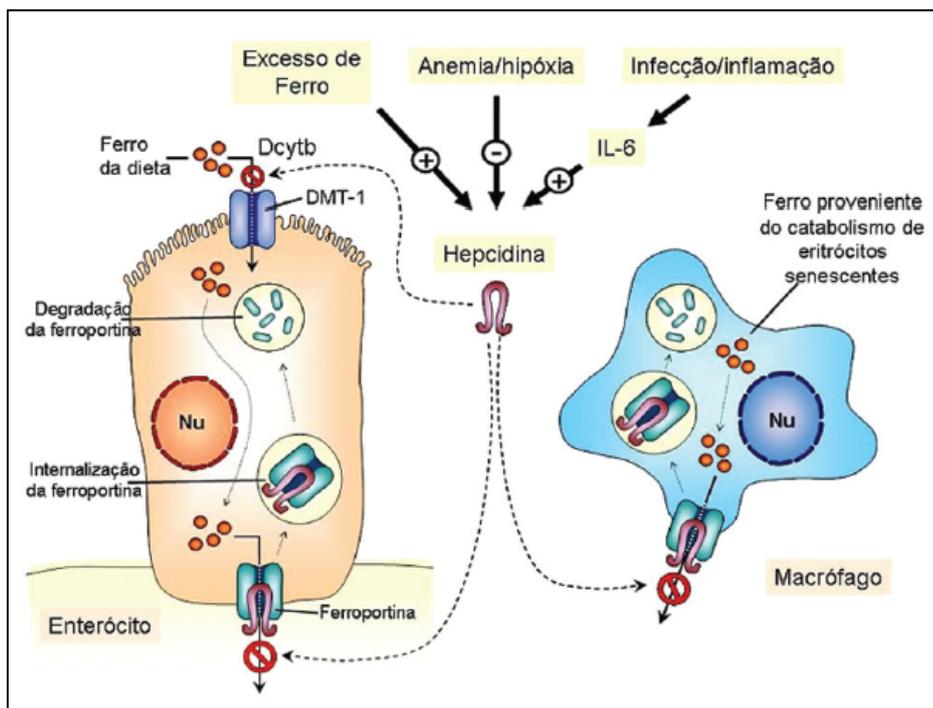


Figura 2. O controle dos níveis circulantes de ferro é feito principalmente pela ação da hepcidina, que ao formar um complexo com a ferroportina leva a sua internalização e degradação. No enterócito o ferro não é exportado para o exterior da célula e a absorção pelo DMT-1 é inibida (figura a esquerda). Nos macrófagos, principalmente do baço e fígado, o ferro fica acumulado em seu interior, diminuindo o ferro disponível para eritropoese. (Grotto, 2010).

1.1.2. Sobrecarga de ferro

Como descrito anteriormente o ferro é um metal essencial para a homeostase celular (Gudjoncik *et al.*, 2014; Ganz, 2013; Dunn *et al.*, 2007), porém desordens de origens primárias ou secundárias podem causar sobrecarga desse metal no organismo, ocasionando em depósitos de ferritina e/ou hemossiderina em vários tecidos (Siddique & Kowdley, 2012), incluindo fígado, baço, coração, artérias, cérebro e macrófagos alveolares (Day *et al.*, 2003; Lou *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2012; Legssyer *et al.*, 2003), contribuindo para lesões importantes nesses sítios.

Diversas proteínas são responsáveis pela homeostase do ferro, e algumas mutações nos genes que as codificam, tais como HFE, TfR2, HJV, BMP6 e HAMP, levam a diferentes formas de hemocromatoses (Siddique & Kowdley, 2012). A hemocromatose hereditária (HH) é uma desordem autossômica recessiva caracterizada pelo aumento da absorção de ferro intestinal, e na ausência de terapia

adequada leva a sobrecarga de ferro e lesão em muitos órgãos, como cirrose hepática, cardiomiopatias, diabetes, arritmias, hipogonadismo e pigmentação da pele (Santos *et al.*, 2012a; Santos *et al.*, 2012b). A HH relacionada ao gene HFE (HH tipo 1) ocorre em aproximadamente 80% dos casos de HH. A proteína codificada pelo gene relacionado à hemocromatose (HFE) normalmente participa de vias inibitórias para a absorção e disponibilização de ferro, compete com a transferrina (proteína transportadora de ferro) na ligação com seu receptor (TfR1), regulando a passagem deste íon para o citoplasma das células do organismo (Edison *et al.*, 2008), e ainda parece sinalizar para o estímulo da expressão de hepcidina em situações de ferro sérico elevado (Darshan & Anderson, 2009). Dentre as HH não-HFE, destacam-se as tipo 2, 3 e 4. A HH tipo 2 é mais rara, causada tanto por mutações no gene para a hemojuvelina (tipo 2A) quanto para a hepcidina (tipo 2B). A HH tipo 3 é causada por mutações no gene codificador do receptor de transferrina 2, comprometendo assim como na HH tipo 1, o controle da expressão de hepcidina e a interação com transferrina na sinalização em elevações dos níveis de ferro. Já a HH tipo 4 é uma doença autossômica dominante, originada por mutações no gene codificador da ferroportina, o que compromete a saída de ferro de células com enterócitos e macrófagos (Santos *et al.*, 2012b; Santos *et al.*, 2012a; Siddique & Kowdley, 2012).

A sobrecarga de ferro de origem secundária, assim como a sobrecarga de origem primária, tem alto índice de morbidade e mortalidade, levando a disfunção em vários órgãos, inclusive cardiomiopatias (Siddique & Kowdley, 2012; Berdoukas *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Danjou *et al.*, 2013). As principais desordens de origem secundária responsáveis por sobrecarga de ferro são as desordens hematológicas: talassemia (maior e intermediária), anemias sideroblástica (adquiridas ou congênitas), anemias diseritropoiéticas (deficiência de piruvato kinase, anemia pernicioso crônica, esferocitose hereditária, anemia falciforme e síndrome mielodisplásica) (Siddique & Kowdley, 2012). A talassemia é a causa mais comum de hematopoese ineficiente e consequente sobrecarga de ferro secundária, tendo uma estimativa de incidência de 1:10000 pessoas sintomáticas na União Europeia e 1:100000 em todo o mundo (Galanello & Origa, 2010; Siddique & Kowdley, 2012). Muitas dessas doenças, especialmente a talassemia e síndrome mielodisplásica, demandam necessidade de múltiplas transfusões sanguíneas, o que pode agravar em sobrecarga de ferro ao longo do tempo secundária a

transfusões, pois uma unidade de concentrado de hemácias contém entre 200-250 mg de ferro elementar (Pippard *et al.*, 1979;Pippard *et al.*, 1979;Gattermann, 2009;Siddique & Kowdley, 2012). Nesse aspecto, vale ressaltar que a transfusão sanguínea crônica é a principal causa de sobrecarga de ferro, independente da doença de base (Gattermann, 2009). Assim como a transfusão sanguínea, a administração parenteral excessiva de ferro em pacientes com insuficiência renal de estágio terminal pode levar a sobrecarga desse metal no organismo, devido à inadequada atenção para as reservas de ferro e/ou inflamação sistêmica e aos altos valores administrados I.V. (100 a 1000mg), que excede a capacidade de transferrina livre e representa uma quantidade enorme em comparação a absorção intestinal (1 a 2 mg/dia) (Sood *et al.*, 2008;Vaziri, 2014).

Além das desordens hematológicas outras situações patológicas podem levar ao aumento da sobrecarga de ferro, como as doenças crônicas do fígado, principalmente hepatite C (Di Bisceglie *et al.*, 1992;Sebastiani *et al.*, 2006) e aceruloplasminemia, uma doença recessiva autossômica ocorrida devido a mutação do gene de ceruloplasmina (Harris *et al.*, 1998). As manifestações clínicas nas sobrecargas de ferro secundárias são semelhantes as descritas anteriormente na HH, sendo mais brandas ou graves dependendo da origem da sobrecarga e dos órgãos acometidos (Gattermann, 2009).

Ademais, a ingestão acidental de ferro é um dos motivos de intoxicação por este metal, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade principalmente entre as crianças. Ocorre principalmente pela ingestão acidental de comprimidos contendo ferro em sua formulação, como o sulfato ferroso, prescrito a mulheres grávidas no pré-natal, e os diversos multivitamínicos prescritos a crianças. A ingestão acontece devido a múltiplos fatores, principalmente as características dos medicamentos, como a cor, revestimento com açúcar, semelhança a doces populares e a frequente associação dos multivitamínicos com personagens de desenhos animados, e também devido a incapacidade dos pais e do público em geral de reconhecer a toxicidade desses medicamentos (Fine, 2000;Madiwale & Liebelt, 2006).

1.1.2.1. Efeito da sobrecarga de ferro em diferentes sistemas

A sobrecarga de ferro tem sido relacionada a muitas desordens morfológicas e funcionais em diversos órgãos, sendo o fígado, o principal órgão de armazenamento de ferro, o mais frequentemente envolvido (Santos *et al.*, 2012b; Santos *et al.*, 2012a; Siddique & Kowdley, 2012). Pacientes assintomáticos podem apresentar aumento do fígado e elevados níveis de aminotransferase sérica (Bacon & Sadiq, 1997). Entre as pessoas com sobrecarga de ferro, embora a maioria, cerca de 40-100% dos pacientes desenvolvam significativa deposição de ferro no fígado, apenas 10-25% progridem para fibrose hepática e 4-6% desenvolvem cirrose (Olynyk *et al.*, 1999). Essas condições dependem da duração da sobrecarga, de níveis de ferritina sérica maiores que 1000 µg/L e da presença de outros fatores de risco como hepatite C viral e consumo crônico de álcool (Morrison *et al.*, 2003).

Disfunções no sistema endócrino também são comuns em pacientes com sobrecarga de ferro, principalmente a diabetes, prevalente em mais de 70% dos pacientes com cirrose (Siddique & Kowdley, 2012). Ocorre devido à diminuição da secreção de insulina em consequência ao acúmulo de ferro nas células beta do pâncreas ou devido ao aumento da resistência insulínica (Hramiak *et al.*, 1997; Mandler *et al.*, 1999). Além disso, hipogonadismo pode ocorrer devido à disfunção no hipotálamo, hipófise ou gônadas (Siminoski *et al.*, 1990), assim como a disfunção tireoidiana também pode estar presente, na forma de hipotireoidismo ou hipertireoidismo (Edwards *et al.*, 1983).

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

Além das alterações supracitadas, a pigmentação marrom da pele em pacientes com sobrecarga de ferro é muito comum. Isso ocorre devido à melanina e à deposição de ferro na camada basal da epiderme e em torno de glândulas sudoríparas, sendo mais pronunciada nas regiões onde a pele é exposta ao sol, como face, pescoço, antebraço, dorso das mãos, pernas e velhas cicatrizes (Chevrant-Breton *et al.*, 1977; Siddique & Kowdley, 2012).

1.1.2.2. Efeito da sobrecarga de ferro no sistema cardiovascular

Como mencionado anteriormente, o acúmulo de ferro no coração pode resultar em cardiomiopatia (tanto restritiva e dilatadas), arritmias (disfunções do nodo sinusal e também fibrilação atrial) e insuficiência cardíaca, sendo que morte súbita devido à essas causas pode ocorrer em pacientes com sobrecarga de ferro avançada. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o aumento do estresse oxidativo durante a sobrecarga de ferro exerce papel importante no sistema cardiovascular, particularmente na cardiomiopatia (Lou *et al.*, 2009;Kramer *et al.*, 2012;Pardo Andreu *et al.*, 2009;Oudit *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2004;Cheng & Lian, 2013;Pennell *et al.*, 2013;Murphy & Oudit, 2010).

A condição clínica mais importante que leva à cardiomiopatia por sobrecarga de ferro é a talassemia maior, sendo a insuficiência cardíaca responsável por maior número de mortes nesta doença (Zurlo *et al.*, 1989;Pennell *et al.*, 2013). Além disso, também em pacientes com HH, o acúmulo de ferro no coração leva à cardiomiopatia, arritmias e insuficiência cardíaca (Demant *et al.*, 2007). Existem modelos experimentais descritos em que a sobrecarga de ferro no organismo animal igualmente induz toxicidade em vários sistemas, incluindo disfunção cardíaca com altas taxas de mortalidade, basicamente por aumento na geração de radicais livres e diminuição das vias antioxidantes endógenas (Bartfay *et al.*, 1999a;Bartfay *et al.*, 1999b;Day *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2003;Bartfay & Bartfay, 2000a). Em estudo experimental de sobrecarga de ferro em ratos, Kramer *et al* (2012) verificaram diminuição do trabalho cardíaco e do débito cardíaco e aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Em camundongos, espécie com maior número de estudos com sobrecarga de ferro e cardiomiopatia, são descritos aumento da mortalidade, bradicardia, hipotensão, disfunção sistólica e diastólica, aumento da fibrose miocárdica e estresse oxidativo (Oudit *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2004) e as alterações da espessura do septo interventricular e da parede posterior ventricular durante a diástole são correlacionadas com concentração de ferro tecidual, que por sua vez dependem das doses acumulativas de ferro (Moon *et al.*, 2011). Além disso, segundo Gao *et al* (2010), a disfunção mitocondrial pode explicar

a cardiomiopatia crônica em camundongos com sobrecarga de ferro (Gao *et al.*, 2010).

Além das alterações cardíacas e pressóricas descritas acima, e considerando a importância do controle neural sobre o sistema cardiovascular, também foi identificado aumento do ganho barorrelexo em ratos com sobrecarga de ferro, sendo o mesmo normalizado após injeção de deferoxamina, um quelante de ferro. Ademais, tanto a frequência cardíaca quanto a variabilidade desta também foram diminuídas na sobrecarga de ferro (Cardoso *et al.*, 2005).

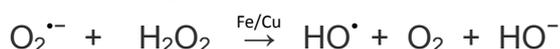
Vários estudos demonstraram o aumento de estresse oxidativo no organismo de ratos submetidos com ferro administrado cronicamente (Lou *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2012) e agudamente (Pardo Andreu *et al.*, 2009; Lucesoli *et al.*, 1999), o que leva a danos importantes no sistema cardiovascular. Estresse oxidativo elevado também foi identificado em camundongos tratados com ferro cronicamente e subagudamente (Day *et al.*, 2003; Oudit *et al.*, 2003; Oudit *et al.*, 2004; Davis & Bartfay, 2004) e em humanos, com sobrecarga de ferro de origem primária e secundária (Gaenger *et al.*, 2002; Kukongviriyapan *et al.*, 2008).

O aumento do estresse oxidativo e a geração de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) não são fatores presentes somente nos efeitos do ferro sobre o sistema cardiovascular, sendo eventos gerais e inerentes ao próprio elemento químico. O ferro é capaz de reagir com outras espécies químicas e ainda agir como catalisador de reações químicas que geram radicais livres, tais como as reações de Fenton e Haber-Weiss:

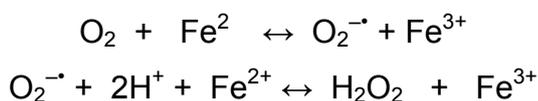
Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



Além disso, o Fe em sistemas biológicos pode reagir com EROs ou formá-las, por reações que ocorrem nos dois sentidos, na dependência da relação $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (Burkitt & Mason, 1991; Byler *et al.*, 1994; Wardman & Candeias, 1996; Kehrer, 2000):



Já é bem sabido que o aumento da produção de EROs diminui a biodisponibilidade de NO, promovendo disfunção endotelial e levando a adesão e agregação plaquetária (Russo *et al.*, 2002). Dessa maneira, é compreensível que o ferro promova peroxidação lipídica, acelerando o desenvolvimento de aterosclerose (Nagy *et al.*, 2010;Smith *et al.*, 1992;Vinchi *et al.*, 2014;Heinecke *et al.*, 1984). Do mesmo modo, em camundongos submetidos à sobrecarga crônica de ferro, a resposta trombótica após injúria fotoquímica em artérias carótidas foi acelerada (Day *et al.*, 2003) assim como a espessura da íntima e média da carótida (Adly *et al.*, 2014;Hahalis *et al.*, 2008). Estudos demonstram que a espessura da camada íntima e média da artéria carótida é um marcador precoce da aterosclerose, e é associada com a administração anual de ferro, os níveis de séricos de ferritina e marcadores de dano oxidante na doença renal de estado terminal (Bishu & Agarwal, 2006;Drueke *et al.*, 2002;Reis *et al.*, 2005).

Excesso de ferro livre no sangue é responsável pela geração não enzimática de parafibrina que, quando se depositam na parede arterial, iniciam reações inflamatórias (Lipinski & Pretorius, 2013) e quando em sobrecarga, é capaz de aumentar a aterosclerose em artéria aorta de camundongos ApoE -/- (Lee *et al.*, 1999) e coelhos com dieta rica em lipídeos (Araujo *et al.*, 1995). Estudos atuais da patogênese da aterosclerose enfatizam o papel central da disfunção endotelial, que parece ser por meio do estresse oxidativo (Bishu & Agarwal, 2006;Schulz *et al.*, 2008).

Considerando a função vascular no que se refere à vasomotricidade, Day *et al.* (2003) sugeriram que o aumento de EROs esteja também envolvida na disfunção vascular em camundongos com sobrecarga de ferro. Em humanos, por sua vez, foi identificado aumento do estresse oxidativo em combinação com prejuízo do relaxamento dependente do endotélio em condições de sobrecarga de ferro de origem primária e secundária (Gaenzer *et al.*, 2002;Kukongviriyapan *et al.*, 2008). Em estudo incluindo adultos com talassemia, ambos relaxamento dependente e independente do endotélio foram prejudicados, evidenciando que tanto o músculo liso vascular, quanto as células endoteliais podem potencialmente ser danificados nas condições de sobrecarga de Ferro (Hahalis *et al.*, 2008).

1.2. MÚSCULO LISO VASCULAR

O músculo liso vascular (MLV) tem importante função no controle da circulação sanguínea e resistência periférica, por meio do controle dos tônus arterial e venoso. Sua atividade contrátil é estimulada ou inibida por mecanismos locais, humorais e neurais. O aumento da concentração intracelular dos íons Ca^{2+} (Ca^{2+}) é fundamental para desencadear a contração, e pode ser obtido através de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, canais para Ca^{2+} mediados por receptores no sarcolema e através da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. As células relaxam quando o Ca^{2+} intracelular livre é bombeado para dentro do retículo sarcoplasmático, para fora da célula pela bomba de Ca^{2+} sarcolemal ou removido da célula pelo trocador Na/Ca^{2+} (Horowitz *et al.*, 1996; Somlyo & Somlyo, 2003; Salamanca & Khalil, 2005; Webb, 2003).

A atividade contrátil no MLV se dá pela interação entre actina e miosina. Inicia-se por uma interação do Ca^{2+} com a calmodulina, que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Esta por sua vez, cataliza a transferência do fosfato para as cabeças da miosina, proporcionando a formação das pontes cruzadas com os filamentos de actina. A remoção do Ca^{2+} a partir do citosol e estimulação de fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) iniciam o processo de relaxamento da musculatura lisa. Outra via importante é a ativação da RhoA/Rho Kinase que, ao fosforilar a MLCP, mantém a geração de força (Webb, 2003).

O potencial de membrana das células do MLV é essencial no controle do tônus. Nesse sentido, a abertura de canais de K^+ presentes na membrana das células musculares vasculares leva ao efluxo de K^+ , com redução do potencial de membrana e consequente fechamento de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem e diminuição da entrada de Ca^{2+} para o interior da célula, causando o relaxamento. Já o fechamento de um canal para potássio causa um estado de despolarização, abertura de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem e consequentemente, aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular e vasoconstrição (Nelson *et al.*, 1995; Nelson & Quayle, 1995; Edwards & Weston, 1990). Embora esses fenômenos se localizem essencialmente nas células do MLV, está bem claro o papel do endotélio vascular na liberação de fatores que interferem na ativação e inativação de canais para K^+ nos miócitos.

1.3. ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio vascular durante muito tempo foi considerado apenas uma barreira física passiva inerte, entre o sangue e o MLV. 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. Atualmente, é bem sabido que além de regular a angiogênese, inflamação, agregação plaquetária, adesão leucocitária, proliferação celular vascular e controle do estresse oxidativo (Feletou & Vanhoutte, 2009; Higashi *et al.*, 2009; De Meyer & Herman, 1997a), é também fundamental no controle do tônus vascular através da liberação de vários fatores vasodilatadores ou vasoconstritores que, em condições fisiológicas, permanecem em equilíbrio. A figura 3 ilustra os principais fatores vasoativos endoteliais.

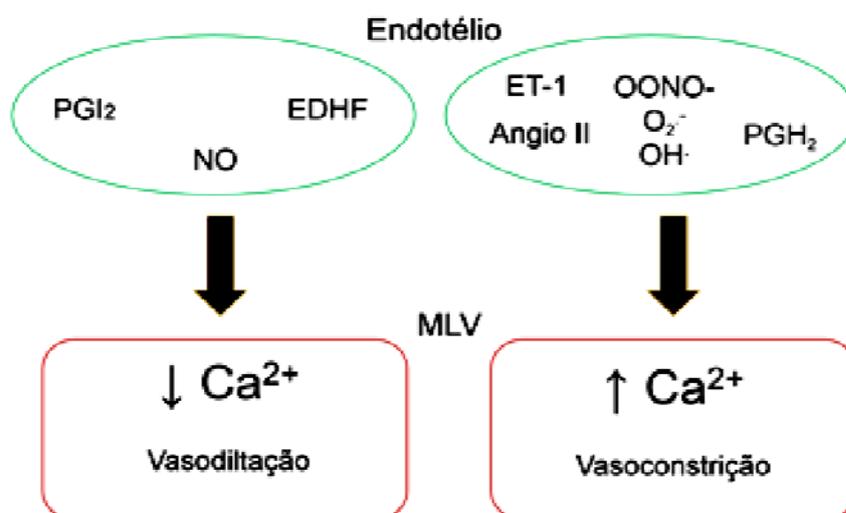


Figura 3: Principais fatores endoteliais envolvidos na regulação do tônus vascular. A esquerda, principais fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio, que ao atuarem no músculo liso vascular (MLV) ocasionam na diminuição de Ca²⁺ intracelular levando a vasodilatação; a direita, principais fatores vasoconstritores produzidos pelo endotélio, responsáveis pelo aumento de Ca²⁺ no citoplasma da célula do músculo liso vascular acarretando em vasoconstrição. Óxido nítrico (NO); prostaciclina (PGI₂); fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); Endotelina-1 (ET-1); Angiotensina II (Angio II); prostaglandinas H₂ (PGH₂); tromboxano A₂ (TXA₂); peroxinitrito (OONO⁻); ânion superóxido (O₂^{•-}); e radical hidroxila (OH[•]).

1.3.1. Fatores relaxantes derivados do Endotélio

Os principais fatores vasodilatadores são: óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Moncada *et al.*, 1977;Furchgott & Zawadzki, 1980;Palmer *et al.*, 1987). Furchgott e Zawadzki demonstraram em 1980 que a integridade do endotélio era essencial para a resposta vasodilatadora promovida pela acetilcolina, apontando como mediador dessa resposta, a liberação de então denominado fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Alguns anos depois, Palmer e colaboradores (1987) identificaram o EDRF como o NO. O NO é um gás de meia vida curta e altamente difusível por membranas celulares, sintetizado pelo óxido nítrico sintase. Em condições fisiológicas sua síntese é estimulada através do *shear stress* e da estimulação de receptores de membrana por agonistas como acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, entre outros (Moncada & Higgs, 2006;Feletou *et al.*, 2012). Essa produção é feita a partir da oxidação da L-arginina, que é transformada em NO e L-citrulina por ação da NO sintase (NOS) (Moncada *et al.*, 1991;Palmer *et al.*, 1987).

O NO ao se difundir pela célula vascular interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), alterando a conformação da enzima, ativando-a. Ocorre a seguir a catálise da saída de dois grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Moncada & Higgs, 2006). O aumento de GMPc no MLV resulta em relaxamento destas células através de hiperpolarização por abertura de canais para potássio e diminuição da entrada de Ca²⁺, inibição da liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático e aumento do sequestro de Ca²⁺ para o retículo sarcoplasmático (Moncada & Higgs, 2006;Feletou *et al.*, 2012).

Desde 1977, Moncada e colaboradores já haviam identificado a prostaciclina (PGI₂) como importante metabólito derivado do ácido araquidônico pela ação da ciclooxigenase em células endoteliais mediando papel relevante na agregação plaquetária e formação de trombos. Além disso, o acoplamento da PGI₂ com seu receptor de membrana acoplado a proteína G, localizado no MLV, ativa a adenilato ciclase e leva à produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Isto leva ao estímulo da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que por fosforilação, é capaz de ativar canais para K⁺ hiperpolarizando o MLV reduzindo a entrada de Ca²⁺,

estimulando a recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático e inibir a MLCK, reduzindo a concentração do Ca^{2+} mioplasmático e contribuindo assim para o relaxamento vascular (Feletou & Vanhoutte, 2009; Feletou & Vanhoutte, 2006a; Feletou *et al.*, 2011).

Nem todo vasorelaxamento pode ser explicado pelo NO e a PGI_2 , assim vários autores sugeriram a existência de mecanismo adicionais através de outros fatores vasodilatores produzidos pelo endotélio, que proveriam hiperpolarização do MLV (Beny & Brunet, 1988; Cowan & Cohen, 1991; Hasunuma *et al.*, 1991). A identidade do EDHF ainda é desconhecida, e a hipótese vigente é a da existência de vários EDHFs que podem variar conforme o leito vascular e a condição fisiológica ou patológica. Independente do EDHF em questão, a hiperpolarização do MLV ocorre sem aumentos celulares de GMPc , e parece depender da participação ativa dos canais para K^+ potássio presentes no MLV (Feletou & Vanhoutte, 2006a; Feletou & Vanhoutte, 2006b; Feletou & Vanhoutte, 2009).

1.3.2. Fatores constritores derivados do Endotélio

Dentre os fatores constritores, os principais são: endotelina-1 (ET-1), angiotensina II, prostaglandinas H_2 e $\text{F}_{2\alpha}$ (PGH_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$), tromboxano A_2 (TXA_2), e radicais livres derivados do oxigênio tais como ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}) e peroxinitrito (Vane *et al.*, 1990; Luscher, 1990; Luscher *et al.*, 1992; Stankevicius *et al.*, 2003).

As prostaglandinas H_2 e $\text{F}_{2\alpha}$ e tromboxano A_2 são derivados da via de metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase (AA-COX). A produção é regulada a partir da disponibilidade do ácido araquidônico, originado dos fosfolipídios de membrana, pela ação da enzima fosfolipase A_2 . O ácido araquidônico pode ser metabolizado pela COX e convertido a prostaglandina H_2 , que tem ação direta vasoconstritora e é precursora das demais prostaglandinas. As prostaglandinas e os tromboxanos estimulam a atividade contrátil MLV através do acoplamento com receptores específicos, e esta interação acarreta em aumento de Ca^{2+} intracelular e a maior sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} (Feletou *et al.*, 2010; Feletou *et al.*, 2011; Feletou *et al.*, 2010).

A angiotensina II é um octapeptídeo sintetizado no plasma e em diversos órgãos, inclusive o endotélio vascular. Sua formação se inicia com a síntese e liberação de renina nas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais, que ao atuar clivando o angiotensinogênio, gera a angiotensina I. A seguir a angiotensina I, sob ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), é clivada em seus peptídeos terminais formando a angiotensina II, que tem potentes efeitos vasoconstritores, mitogênicos, pró-inflamatórios e pró-fibróticos (Nguyen Dinh *et al.*, 2013).

São conhecidos dois tipos de receptores para a angiotensina II: AT1 e AT2, ambos acoplados a proteína G. Ela exerce efeito predominante no tônus vascular via interação com o receptor AT1, levando a efeitos vasoconstritores pelo aumento da entrada de Ca^{2+} , assim como aumento da produção de EROs (Nguyen Dinh *et al.*, 2013). A sinalização do receptor AT1 envolve principalmente a interação com proteínas G acopladas a segundos mensageiros, entre eles: fosfolipase C (PLC), fosfolipase A2 (PLA2), fosfolipase D (PLD) e proteína kinase C (PKC) (Mehta & Griendling, 2007a; Garrido & Griendling, 2009; Nguyen Dinh *et al.*, 2013). Em adição à sinalização do AT1 via proteína G envolve muitas tirosinas kinases, incluindo receptores de tirosina kinase (receptor de insulina, EGFR, PDGF) e não receptor de tirosina kinase (c-Src, prolina tirosina kinase 2 Ca^{2+} dependente (Pyk2), kinase de adesão focal e Janus kinase (JAK). O receptor AT1 também ativa serina/treonina kinases como PKC e MAPKs (ERK 1/2, p38 MAPK e c-Jun NH2-termina kinase (JNK) que estão relacionadas ao crescimento e hipertrofia (Mehta & Griendling, 2007b; Nguyen Dinh *et al.*, 2013). O aumento da contração se deve principalmente ativação da PLC via proteína Gq, levando à geração de DAG e IP3, resultando em aumento $[Ca^{2+}]_i$, que fosforila a MLC e estimula a contração, além de estimular a via RhoA/Rho-kinase, aumentando a sensibilidade ao Ca^{2+} por inibir a MLCP (Nguyen Dinh *et al.*, 2013).

O aumento da produção de EROs via sinalização do receptor AT1 é principalmente por meio do aumento da atividade e/ou expressão da NADPH oxidase vascular, devido interações moleculares que envolvem ativação de fosfolipases, PKC, Src tirosina kinase, fosfatidil inositol 3-kinase (PI3K), que acarretam em fosforilação de subunidades da NADPH e concomitante ativação e produção de EROs como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Touyz *et al.*,

2003;Mehta & Griendling, 2007a;Garrido & Griendling, 2009;Nguyen Dinh *et al.*, 2013).

A endotelina-1, principal isoforma de endotelina encontrada no endotélio e no sistema cardiovascular, é um peptídeo com 21 aminoácidos que pode exercer seus efeitos após unir-se ao seu receptor específico. Foram denominados três tipos de receptores: ET_A, ET_B, ET_C. O receptor ET_A é expresso principalmente em células do MLV, provendo vasoconstrição através da ativação da PLC, PKC e do aumento do Ca⁺² intracelular, pelos canais para Ca⁺² dependentes de voltagem. Fatores físicos como *shear stress* ou estimulação com trombina, adrenalina, angiotensina II, citocinas, fatores de crescimento e radicais livres aumentam a liberação de endotelina-1, enquanto NO, GMP, PGI₂ e peptídeo atrial natriurético diminuem (Marasciulo *et al.*, 2006;Rodriguez-Pascual *et al.*, 2011).

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

A principal fonte de EROs na vasculatura é a NAD(P)H oxidase (Cai & Harrison, 2000;Higashi *et al.*, 2009), principalmente nas células endoteliais (Montezano & Touyz, 2012). A função primária da NADPH oxidase é catalisar a transferência de elétrons de NADPH em moléculas de oxigênio por meio de suas subunidades catalíticas (Nox), sendo as isoformas Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 as identificadas em tecidos cardiovasculares (Lassegue & Clempus, 2003;Nguyen Dinh *et al.*, 2013). Além disso, a NADPH possui numerosas subunidades regulatórias citosólicas, como a p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox}, NoxO1, NoxA1 e Rac 1/2 que são cofatores para atividade enzimática e são usadas para iniciar e/ou regular a transferência de elétrons. Os componentes de membrana são a p22^{phox} (presente na Nox1, 2 e 4), gp91^{phox} (Nox 2) e as outras subunidades catalíticas da Nox. Hiperatividade da NADPH oxidase pode levar a aumento da geração de EROs em níveis que os sistemas antioxidantes podem ser incapazes de controlar, levando a

danos ao organismo (Cai & Harrison, 2000; Higashi *et al.*, 2009; Drummond *et al.*, 2011; Nguyen Dinh *et al.*, 2013).

Dentre as principais EROs de relevância vascular, destacam-se: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

O $O_2^{\cdot-}$ é um dos mais importantes radicais para a biologia vascular, o qual é formado pela redução univalente do oxigênio. Além de o $O_2^{\cdot-}$ poder diretamente promover alterações na função vascular por ação direta ou diminuição da biodisponibilidade de NO, ele também é fundamental na produção de outras espécies reativas, através de sua dismutação pelas diferentes isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) e sua reação direta com o NO, originando H_2O_2 e $ONOO^-$ respectivamente (Cai & Harrison, 2000; Taniyama & Griendling, 2003; Ferrer-Sueta & Radi, 2009). O $ONOO^-$, além de ser responsável pela diminuição do NO disponível, pode induzir danos vasculares diretos e ser protonado para radical hydroperoxyl, que desempenha um papel importante na peroxidação lipídica e aterogênese (Nguyen Dinh *et al.*, 2013).

Já os efeitos do H_2O_2 sobre o tônus vascular pode ser por diferentes mecanismos, a depender do sítio, concentração e condição experimental (Cseko *et al.*, 2004; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998; Thakali *et al.*, 2006a; Cai, 2005b). Além disso, na presença do ferro, o H_2O_2 é componente essencial na reação de Fenton, que forma metabólitos secundários altamente reativos, tais como OH^{\cdot} (Thakali *et al.*, 2006a; Wardman & Candeias, 1996; Cai, 2005a). A glutatona peroxidase e a catalase são as enzimas envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio. Enquanto a catalase transforma H_2O_2 em H_2O e O_2 , a glutatona peroxidase utiliza o H_2O_2 para transformar a glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) (Cai, 2005a).

Na figura 4 estão representadas as vias bioquímicas de origem e degradação dos principais radicais livres de importância vascular.

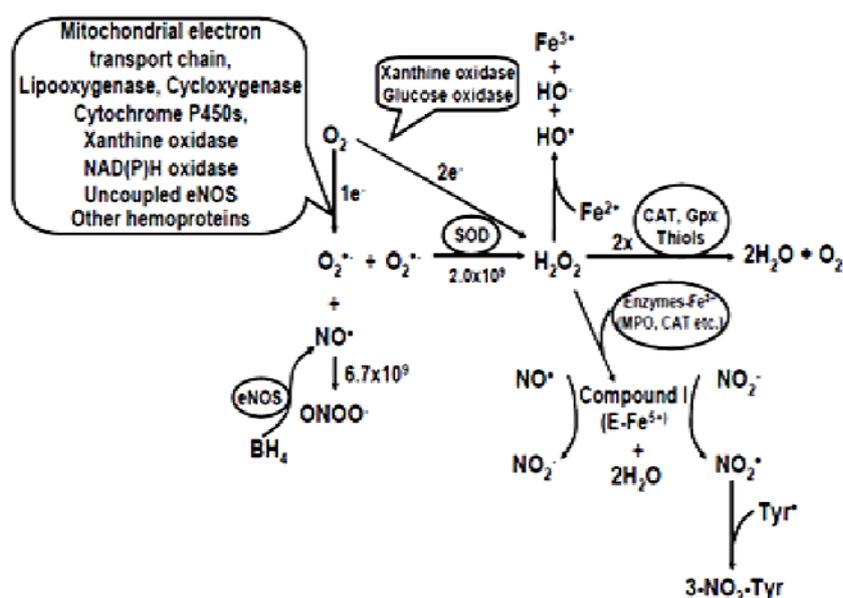


Figura 4: Via bioquímicas da geração de espécies reativas de oxigênio e metabolismo. O oxigênio reduz um ou dois elétrons (1 ou 2 e^-) e da origem a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) respectivamente. A principal via de formação de H_2O_2 é através da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela SOD (superóxido dismutase), enquanto a degradação de H_2O_2 ocorre através da catalase (CAT) intracelular e a glutaciona peroxidase (Gpx) extracelular. H_2O_2 também, indiretamente, pode ser degradado em radical hidroxila (HO^\cdot) na presença do Fe^{2+} (reação de Fenton) ou componente I (produto da oxidação do H_2O_2 por enzimas contendo Fe^{3+} com a mieloperoxidase, MPO). O $O_2^{\cdot-}$ pode também reagir com o NO^\cdot diminuindo a biodisponibilidade de NO^\cdot independente da regulação da NO sintase (Cai, 2005b).

1.4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Como já mencionado, é sabido que a sobrecarga de ferro pode causar importantes danos cardiovasculares (Cheng & Lian, 2013; Pennell *et al.*, 2013; Gaenzer *et al.*, 2002) o que torna necessário a investigação das diversas alterações ocorridas neste sistema devido à alta prevalência de doenças com sobrecarga de ferro na população, especialmente as de origens secundária que são as mais prevalentes entre a população caucasiana. É bem descrito pela ciência o aumento do estresse oxidativo (Gaenzer *et al.*, 2002; Lou *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2012; Pardo Andreu *et al.*, 2009; Kukongviriyapan *et al.*, 2008) as cardiomiopatias (Murphy & Oudit, 2010; Cheng & Lian, 2013; Pennell *et al.*, 2013; Oudit *et al.*,

2003;Kramer *et al.*, 2012;Demant *et al.*, 2007) e agilidade do processo aterosclerótico (Lee *et al.*, 1999;Araujo *et al.*, 1995;Nagy *et al.*, 2010;Lekakis *et al.*, 1999;Lipinski & Pretorius, 2013;Vinchi *et al.*, 2014). De fato, o ferro é um metal com grande capacidade redutora e oxidante, e participa de diversas reações, dentre elas a reação de Fenton (demonstrada na figura 3), que tem como resultado a produção de radical hidroxila, que é altamente reativo (Winterbourn, 1995;Wardman & Candeias, 1996;Lloyd *et al.*, 1997;Bokare & Choi, 2014;Cai, 2005a). Ademais, é bem conhecido que muitas funções do endotélio e MLV são prejudicadas pelas EROs. No endotélio EROs podem causar disfunção endotelial, por diminuir a biodisponibilidade do NO, aumentar a adesão de leucócitos, angiogênese e apoptose (De Meyer & Herman, 1997b;Cai & Harrison, 2000;Heistad, 2006;Irani, 2000;Montezano & Touyz, 2012). Enquanto no MLV pode ocorrer proliferação celular, hipertrofia, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular, apoptose e aumento do tônus muscular (Heistad, 2006;Irani, 2000;Lyle & Griending, 2006;Rao & Berk, 1992;Tabet *et al.*, 2004).

Finalmente, há um conhecimento bem estabelecido a respeito da participação do ferro em reações químicas que geram EROs, e da ideia de que o aumento da produção dessas espécies na sobrecarga de ferro poderia desencadear diversas alterações relacionadas à disfunção endotelial, como documentado em alguns trabalhos clínicos e experimentais (Gaenger *et al.*, 2002;Lou *et al.*, 2009;Kramer *et al.*, 2012;Pardo Andreu *et al.*, 2009;Kukongviriyapan *et al.*, 2008;Day *et al.*, 2003;Lekakis *et al.*, 1999). Porém, pouca ênfase tem sido dada às possíveis repercussões sobre a reatividade vascular e o papel do endotélio em modular o tônus do MLV, sendo que os estudos descritos até o momento têm demonstrado apenas uma associação entre sobrecarga de ferro, estresse oxidativo e disfunção endotelial, sem a investigação adequada acerca dos mecanismos e das vias responsáveis por essa disfunção. Dessa maneira, no presente estudo foi analisada a reatividade vascular *in vitro* em anéis de aorta em um modelo experimental de sobrecarga de ferro crônica em ratos, a fim de testar a hipótese de que a sobrecarga crônica de ferro pode induzir alteração de reatividade vascular por interferir no papel do endotélio em modular o tônus do MLV.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro em ratos sobre a reatividade vascular da aorta

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o melhor modelo a ser utilizado com base nos efeitos de dois protocolos com doses diferentes de ferro sobre a reatividade vascular da aorta analisada *in vitro*
- Confirmar o fenótipo de sobrecarga de ferro em ratos, pela análise do ferro sérico, deposição tecidual e estresse oxidativo sistêmico;
- Avaliar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre parâmetros ponderal e biométricos dos ratos;
- Avaliar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a hemodinâmica arterial e ventricular;
- Avaliar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reatividade vascular da aorta analisada *in vitro*, assim como testar os impactos sobre a modulação endotelial, estresse oxidativo, papel da COX e do sistema renina angiotensina local;
- Quantificar a produção *in situ* de ânion superóxido e NO em aorta de ratos após sobrecarga de ferro;
- Verificar *in situ* a expressão e localização da p22phox em aorta de ratos após sobrecarga de ferro;
- Avaliar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a atividade da ECA e conteúdo proteico da SOD, catalase, NADPH oxidase (NOX-2) e receptor AT₁ em segmentos aórticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS EXPERIMENTAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com aproximadamente 8 semanas de idade e peso entre 160 e 200 g, cedidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Todos os experimentos foram conduzidos em concordância com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA-MCT, 2013) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (007/2013 CEUA-UFES). Durante o tratamento, os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas, sob condições controladas de temperatura e umidade, com livre acesso a água e ração padrão para roedores, e ciclo-claro de 12h controlado por temporizador eletrônico.

Os experimentos foram divididos em dois segmentos:

1) Análise de dois diferentes regimes de administração de ferro. Neste conjunto de experimentos foi avaliado principalmente o fenótipo vascular: relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio ou acetilcolina; resposta contrátil à fenilefrina; e participação endotelial e da via do NO na modulação da resposta contrátil à fenilefrina. Para caracterização dos modelos foram analisados o conteúdo de ferro tecidual e histologia da aorta, avaliações ponderais e mensuração da pressão arterial sistólica em rato acordado.

2) Análise dos efeitos da sobrecarga de ferro sobre a função vascular e os prováveis mecanismos subjacentes. Neste conjunto de experimentos foram avaliados mais detalhadamente o fenótipo de sobrecarga de ferro, assim como as alterações vasculares envolvidas: peso corporal e consumo de ração; parâmetros de ferro sérico e peroxidação lipídica; hemodinâmica arterial e intraventricular de ratos anestesiados; reatividade vascular à fenilefrina e a influência do NO, EROs, NADPH oxidase, xantina oxidase, via do AA-COX e SRA local sobre a resposta contrátil à fenilefrina; produção *in situ* de NO e ânion superóxido; localização e expressão da p22^{phox}; expressão proteica da Cu/Zn SOD, catalase, gp91^{phox} e receptor AT1;

atividade da ECA; e resposta contrátil *in vitro* à angiotensina II em anéis isolados de aorta.

Para os protocolos de administração de ferro, os ratos eram randomizados em: controle (Ct), sobrecarga de ferro branda (Fe 10) ou sobrecarga ferro moderada (Fe 100). O grupo Fe 10 recebeu injeções i.p. de ferro dextrano (Ferrodex®, marca Fabiani, Fabiani Saúde Animal Ltda, São Paulo/SP, Brasil) na dose diária de 10 mg/Kg, 5 vezes por semana durante 4 semanas, totalizando 200 mg/kg de dose acumulada, enquanto o grupo Fe100 recebeu 100m/Kg, no mesmo regime de injeções do grupo Fe10, totalizando 2000 mg/kg de dose acumulada. Já o grupo Ct recebeu apenas veículo (solução salina isotônica) no mesmo período e regime de exposição dos grupos com sobrecarga de Fe. Cada injeção administrada nos ratos continha um volume médio de 300 µl de solução.

3.1.1. Ferro sérico

Ao final do tratamento, amostras de sangue dos animais foram coletadas através de punção na artéria aorta abdominal e acondicionadas em tubos com e sem heparina, para obtenção de plasma e soro respectivamente, através da centrifugação a 1200g por 15 min. As amostras permaneceram congeladas a -20°C até o dia da análise.

A concentração de ferro e a capacidade total de ligação do ferro (TIBC) foram mensuradas em amostras de soro em duplicata por método colorimétrico direto (Análise bioquímica automática, CMD 800i da marca Wiener laboratories, Rosario, Argentina). O ferro sérico foi liberado da transferrina em tampão acetato (150 mM) com pH 4,5 e reduzido pelo ácido ascórbico (30 mM). A seguir, o ferro reduzido, ao reagir com agente colorimétrico sulfonato pyridyl bis-phenyl triazine (ferrozine 0.2 mM), produzia cor margenta, que era mensurada a 560 nm. A porcentagem de saturação da transferrina foi calculada como se segue: ferro no soro/ (TIBC) × 100.

3.1.2. Histologia do fígado e aorta após administração crônica de ferro em ratos

Amostras de aorta e fígado foram fixadas em formalina a 4%. Posteriormente, os tecidos foram processados e embebidos em parafina a 58°C. Secções com 5 µm de espessura foram obtidas e montadas em lâminas, sendo armazenadas até o momento da coloração. Para coloração as lâminas permaneceram por no mínimo 2h em estufa a 58°C. A seguir foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou azul da Prússia (método de Mallory), para analisar morfometria da aorta e deposição de ferro tecidual respectivamente.

Para coloração, inicialmente as lâminas contendo as secções de aorta ou fígado foram desparafinizadas através da imersão em três banhos consecutivos de xilol P.A., seguido de xilol P.A e álcool P.A. (1:1). Para hidratação as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool P.A. e em banhos seriados de água destilada, em cada banho as lâminas permaneceram por 5 min. A seguir as colorações específicas foram seguidas.

Para a técnica de coloração com azul da Prússia as secções foram imersas durante 30 min em solução contendo ferrocianeto de potássio (5%) e ácido clorídrico (5%) (1:1). A seguir as lâminas foram imersas durante 5 min em água destilada, e imersas em banho com eosina (1:30 min) para corar os componentes básicos, realizando a contra coloração. Após, era feito banho com água destilada novamente por 5 min, seguido das etapas de hidratação e desparafinização. Ao fim, foi inserido meio de imersão e montagem (balsamo do Canadá) e lamínula sob as secções presentes na lâmina.

A coloração com HE segue as etapas semelhantes à coloração com azul da Prússia, exceto a solução de ferrocianeto de potássio (5%) com ácido clorídrico (5%) (1:1) que é substituída por solução contendo hematoxilina (para corar partes ácidas, especialmente os núcleos), onde as lâminas com secções de aorta foram inseridas por 4 min. Além disso, inclui-se a etapa de diferenciação com álcool ácido (1%) após o banho com eosina.

As imagens digitais foram coletadas no microscópio óptico Leica DM 2500 com a objetiva de 10X (para fígado) e 40X (para aorta), e câmera Leica DFC 310 X, usando a mesma configuração de imagem para controle e grupos com sobrecarga

de ferro. Para análise, 5 segmentos da aorta por animal foram utilizados para obter a média amostral. A análise de morfometria da aorta foi realizada utilizando o *software Image J* e para avaliar deposição de ferro tecidual foi feita análise qualitativa.

3.1.3. Peroxidação lipídica no plasma

As amostras de plasma dos animais foram coletadas e armazenadas a -20°C até o dia da análise. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) são produtos da peroxidação lipídica em consequência ao estresse oxidativo sistêmico 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 poliinsaturados 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 poliinsaturados oxidados e, portanto um indicador de peroxidação lipídica.

O plasma previamente coletado foi misturado 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°C por 30 minutos. A medida foi realizada através da absorbância usando a comprimento de onda de 535 nanômetros.

3.2. AVALIAÇÃO PONDERAL E DE CRESCIMENTO

No início e ao final do período de administração de ferro, os ratos foram pesados com o objetivo de avaliar se a sobrecarga de ferro interfere no ganho de peso dos animais. Para avaliar possíveis impactos sobre o crescimento ósseo, a tíbia foi medida com auxílio de paquímetro após eutanásia dos animais, ao fim dos

protocolos. Além disso, foram pesados em balança de precisão: fígado, baço, ventrículo esquerdo, ventrículo direito e pulmões. Para avaliar o teor de água como sinal de congestão, os pulmões foram dessecados em estufa e após 24 horas foram novamente pesados. Os pesos dos órgãos foram comparados tanto como valores absolutos quanto corrigidos pelo peso corporal e tibia do respectivo rato, e representados em mg/g e mg/mm, respectivamente.

3.3. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS

3.3.1. Medida indireta da pressão arterial sistólica em animal acordado

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais do grupo controle e dos grupos Fe 10 e Fe 100 foi mensurada antes e semanalmente após o início dos protocolos de injeção, de maneira indireta e não invasiva, pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasive blood pressure, versão 1.35). Os animais foram climatizados três dias antes da mensuração para adaptarem-se ao pletismógrafo e, desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal. No dia do registro os animais foram colocados em um contentor cilíndrico de acrílico onde permaneceram por 5 a 15 min. A cauda dos animais era conectada ao manguito inflável dotado de sensor de fluxo que por sua vez estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados pressóricos. Os cilindros com os ratos eram colocados no interior de um aparato que promovia um ambiente escuro e aquecido a 33 °C, a fim de promover dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. A média aritmética de três ou mais medidas foi utilizada.

3.3.2. Hemodinâmica arterial e ventricular por medida direta em animal anestesiado

Após 4 semanas de exposição ao ferro, os ratos foram anestesiados via i.p. com uretana (1,2 g/Kg) e submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso na pata, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. Após a anestesia, todos os ratos foram mantidos em manta aquecedora e com suplementação aerossol de oxigênio (0,5L/min). A canulação da jugular direita foi realizada com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) com extremidade curva, para facilitar a inserção no ventrículo direito (VD), e preenchido com salina heparinizada (50 UI/ml). O cateter foi acoplado a um transdutor de pressão (TSD 104A Biopac) conectado a um pré-amplificador interligado ao sistema (MP 100 Byopac Systems, Inc; CA), o qual permitiu que a pressão do VD fosse registrada e processada por um computador. Na carótida direita, por sua vez, foi inserido um cateter millar (SPR-320) que foi direcionado ao ventrículo esquerdo (VE) para mensurar a pressão intraventricular. Após registro, o cateter foi retraído para a artéria carótida para registrar a pressão arterial e verificar se houve lesão de válvula aórtica. Para o processamento dos dados foi utilizado período de estabilização de no mínimo 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: Pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD); frequência cardíaca (FC); pressão sistólica e diastólica final intraventricular direita (PSVD e PDfVD) e esquerda (PSVE e PDfVE); máximas derivadas de pressão intraventricular positiva ($+dP/dt_{máx}$) e negativa ($-dP/dt_{máx}$), estas últimas obtidas a partir da aquisição da primeira derivada temporal dos registros de ondas de pressão intraventricular.

3.4. MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Ao final de 4 semanas de exposição a sobrecarga de ferro, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2g/Kg) e, em seguida eutanasiados. 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 foi cuidadosamente removido e aorta foi dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (figura 5).

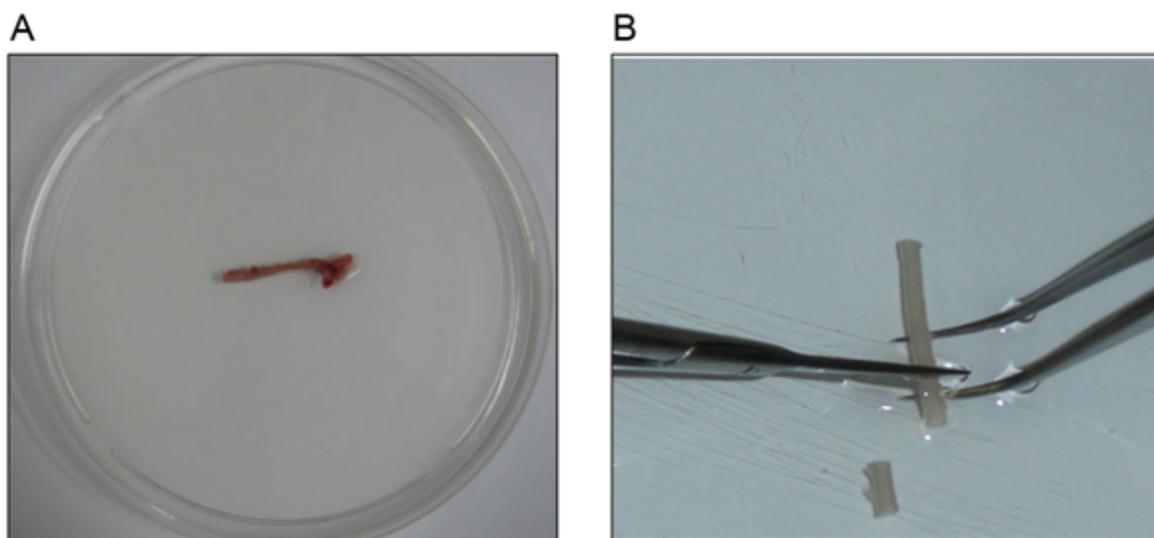


Figura 5: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm (Angeli, 2009).

3.4.1. Avaliação da reatividade vascular *in vitro*

Cada segmento foi montado em banho de órgãos contendo solução Krebs-Henseleit na temperatura de $36,5 \pm 0,5$ °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 ficassem paralelos na luz do vaso. Um triângulo foi fixado na parte inferior do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de força isométrica (TSD125C, CA, U.S.A). 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).

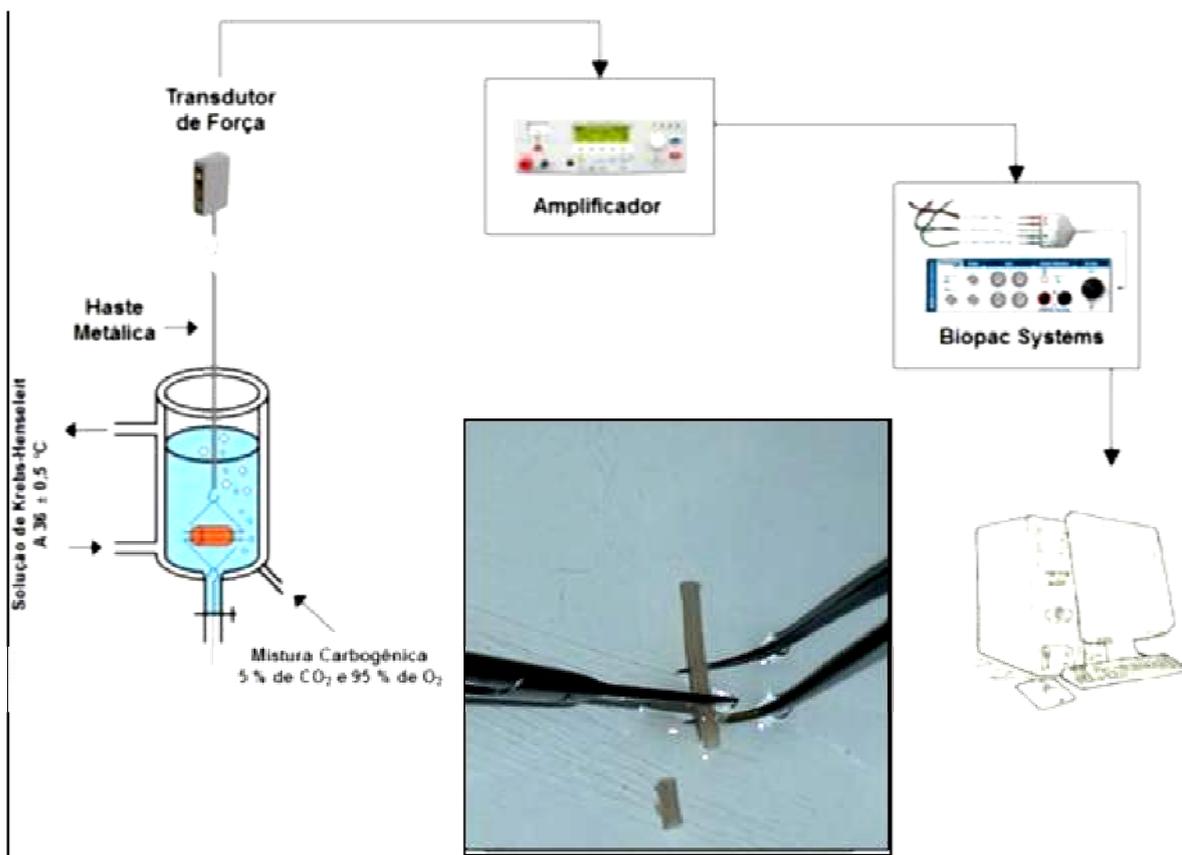


Figura 6: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *in vitro* (Modificado de Nunes, 2014).

3.4.1.1. Viabilidade da preparação

Após a montagem, as artérias foram submetidas à tensão de repouso de $1,0 \pm 0,1$ g, reajustada, quando necessário. A preparação foi mantida por um período de estabilização de 45 min antes de dar sequência aos protocolos experimentais (figura 7 A). A seguir foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do MLV induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, a solução do banho foi substituída pela solução de Krebs-Henseleit padrão até retornar à tensão de repouso (Figura 7 B, C). Os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 7 D), uma nova dose de KCl 75 mM foi adicionada ao banho para a aquisição da contração máxima do MLV, sendo aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 7 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes com a solução de

Krebs-Henseleit normal para atingir o valor basal (1,0 g) e, após 30 minutos (Figura 7 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

A integridade funcional do endotélio foi avaliada através da capacidade da acetilcolina (10^{-5} M), agonista muscarínico, induzir relaxamento em anéis de aorta previamente contraídos com agonista α -adrenérgico fenilefrina (10^{-7} a 10^{-6} M), até atingir platô de contração mínimo de 50 a 70% da contração do KCl) (Figura 7 I, J). A integridade funcional do endotélio era considerada por um relaxamento igual ou superior a 80%. Os anéis que tiveram o endotélio removido mecanicamente relaxaram no máximo 10% ou até contraíram. A avaliação era realizada como garantia de integridade física do endotélio (ou remoção deste, quando intencionalmente provocada) após manipulação dos vasos. Esse procedimento foi realizado em todos os anéis provenientes de animais controles. Para os animais submetidos à administração crônica de ferro, todos os anéis foram utilizados, independente do desempenho nessa avaliação, para os primeiros 10-12 experimentos. Sendo então comprovado que este teste não estava alterado nos animais tratados, passou-se a utilizá-lo, também nos grupos tratados, como protocolo de avaliação de integridade endotelial para garantia de que nenhuma lesão fora provocada pelos procedimentos de isolamento e dissecação do vaso.

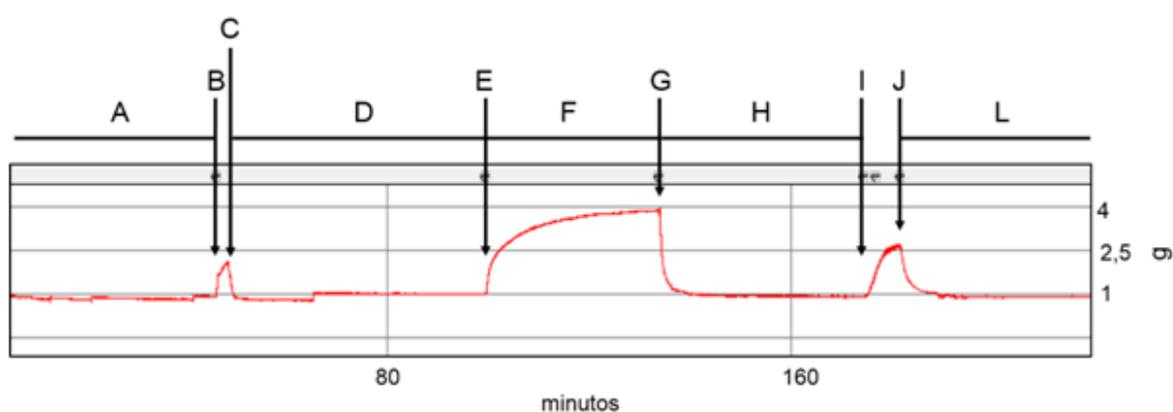


Figura 7: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de $1 \pm 0,1$ g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10^{-7} M ou mais até atingir entre 50 e 70% do 2º KCl; J) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

3.4.1.2. Protocolos experimentais

3.4.1.2.1. Resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio

A função vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliada através do relaxamento induzido pela acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta com endotélio 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, foram realizadas as curvas concentração-resposta cumulativas, à acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M).

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 acetilcolina, houve pré-contração com fenilefrina até atingir platô com 60 a 70% do KCl, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta ao NPS em concentrações de 10^{-11} a 10^{-4} M.

3.4.1.2.2. Resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Após 30 minutos de estabilização era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa.

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). A camada de células endoteliais foi removida mecanicamente através do uso de haste metálica. Estas foram inseridas na luz do vaso e friccionadas à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina (10^{-5} M) induzir o relaxamento, após a pré-contração 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).

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste de viabilidade da preparação e dos 30 minutos de estabilização, o fármaco a ser estudado era incubado por 30 minutos (L-NAME, tiron, catalase, apocinina, alopurinol, indometacina, SQ 29.548 e losartan) e, logo após, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) nos efeitos vasculares promovidos pela sobrecarga de ferro, os anéis de aorta foram incubados previamente as curvas de fenilefrina com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

Além disso, para avaliar a influência da liberação basal de NO na modulação da resposta contrátil, L-NAME (100 μ M) foi adicionado em anéis de aorta pré-contráídos com fenilefrina (60% do KCl). A contração máxima após adição de L-NAME foi calculada e normalizada pela contração prévia, sendo representada em %, conforme outros estudos (Xavier *et al.*, 2003).

A fim de investigar a participação das espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença de tiron (1 mM), um “varredor” de $O_2^{\cdot-}$; catalase (1000 U/ml), um “varredor” enzimático de H_2O_2 ; apocinina (30 μ M), um inibidor da enzima NADPH oxidase; e alopurinol (100 μ M), um inibidor da enzima xantina oxidase.

Buscando averiguar o envolvimento dos prostanóides derivados da via do AA-COX na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis foram incubados com indometacina (10 μ M), inibidor não específico da COX e com SQ 29.548 (1 μ M), antagonista de receptor de tromboxano A₂ (TP).

Finalmente, para verificar uma possível participação da angiotensina II local no efeito provocado pela sobrecarga de ferro na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, foi utilizado losartan, um antagonista dos receptores AT₁ (10 μ M).

3.4.1.2.3. Resposta vasoconstritora à angiotensina II

Com a finalidade de analisar a resposta contrátil à angiotensina II em anéis isolados de aorta, após 30 minutos de estabilização era realizada curvas concentração resposta à angiotensina II (10^{-9} a 10^{-6} M) de forma cumulativa.

3.4.2. Detecção *in situ* da produção de óxido nítrico

A produção de NO foi determinada usando a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), um método descrito previamente e ajustado a partir de outros estudos (Kojima *et al.*, 1998; Lobato *et al.*, 2011). Após isolamento e dissecação, as aortas foram imersas em solução tampão de Krebs-HEPES (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂, 8,3 HEPES, e 11 glicose, pH 7.4) com 30% de sacarose durante uma hora, a seguir foram embebidas em meio de inclusão para cortes com criostato (Killik®, Easy Path) e mantidas em -80°C até o momento de realização dos cortes.

As secções de aorta foram cortadas em criostato a 10 μm de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DAF-2. As lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas em idênticas condições a 37°C por 30 min com tampão fosfato (0,1 M) contendo CaCl₂ (0,45M). As lâminas foram secadas e incubadas durante 30 min a 37°C em câmara úmida protegida da luz com 8 μM de DAF diluído em solução tampão fosfato contendo CaCl₂. A fim de excluir autofluorescência e fluorescência não específica, incubamos L-NAME (100 μM) por uma hora após os protocolos de incubação com DAF, para avaliar a fluorescência sensível à inibição da NOS. Imagens digitais foram coletadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500 com a objetiva de 40 \times 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*.

3.4.3. Detecção *in situ* da quantidade de ânion superóxido

A fluorescência oxidativa ao dihidroetídio (DHE) foi utilizada para avaliar a produção de ânion superóxido *in situ*, e os procedimentos se seguiram como previamente descrito (Nunes *et al.*, 2014). A membrana celular é permeável ao hidroetídio, e na presença de $O_2^{\cdot-}$, esse componente é oxidado a brometo de etídio, que intercala com o DNA. Brometo de etídio é excitado a 546 nm e emite luz a 610 nm.

Após isolamento e dissecação, as aortas foram imersas em *ependorf* contendo solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora, a seguir foram embebidas em meio de inclusão para criostato e mantidas em -80 até o momento de realização dos cortes. As secções de aorta foram cortadas com criostato em 10 μ m de espessura e colocadas em lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DHE. No dia do protocolo as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas com tampão Krebs-HEPES, em idênticas condições por 30 min a 37°C . Foram então secadas e incubadas com solução tampão de Krebs-HEPES contendo DHE (2 μ M) em câmara úmida e protegida da luz, à temperatura de 37°C por 30 min. Após este período as lâminas foram montadas com meio de montagem (Erv-Mount, Easy Path) e lamínula. As imagens das secções de aorta foram detectadas com microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500) usando filtro 568 nm, no aumento de $100\times$ e fotografadas com a câmera acoplada ao microscópio (Leica DFC 310 FX). 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*.

3.4.4. Análise *in situ* da subunidade de membrana (p22^{phox}) da NADPH oxidase

Após isolamento e dissecação, as aortas foram fixadas em formalina (4%, pH 7.4) durante uma hora, posteriormente imersas em PBS (0,2M) com 30% de sacarose por uma hora, a seguir imersas em blister com meio de inclusão para

cortes congelados e armazenados a -80°C até o dia dos cortes. A identificação e semiquantificação da p22phox foi feita através da imunofluorescência determinada nas secções de 10 μm utilizando anticorpo anti-p22phox (1:100, Santa Cruz Biotechnology).

Para o protocolo de imunofluorescência, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. Cortes congelados foram incubados em câmara úmida em condições idênticas por 1h a 37°C com solução PBS 0,1 M, Tween 20 a 0,3% e solução tampão de albumina (BSA) 5%. Subsequentemente, as secções foram incubadas com o anticorpo primário de coelho anti-p22phox de um dia para o outro a 4°C . Após lavagem com PBS 0,1 M, Tween 20 a 0,3% e BSA a 5% três vezes durante 10 min a 37°C , as secções foram incubadas numa câmara úmida e protegida da luz durante 1h a 37°C , com anticorpo secundário de coelho biotilado (1:200, Alexa Fluor®594, Nitrogen). Após lavagem com PBS 0,1 M, Tween 20 a 0,3% e 5% BSA 3 vezes durante 10 min a 37°C , as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Leica, ampliação 400 \times), utilizando as mesmas configurações de imagem para todas as secções. A fluorescência foi detectada com filtro de 568 nm. Para a quantificação, cinco cortes de tecido por animal foram utilizados para obter a média amostral para cada condição experimental. As densidades médias de fluorescência na região do alvo foram calculadas no *software image J*.

3.4.5. Atividade da enzima conversora de angiotensina na aorta

Amostras de aorta foram homogeneizadas por homogeneizador de metal em tubo contendo solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH 7,4 em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier-Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6000 rpm a 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi retirado e feita então a quantificação proteica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A seguir, foi calculado o volume necessário para obtenção de 80 μg de proteína, sendo este volume utilizado para reação fluorimétrica nos poços.

Duplicatas de homogeneizado da aorta (80 µg de proteína) foram incubados com 40 µL de tampão de ensaio de atividade enzimática contendo 5 mM de Hip-His-Leu (Hipuril-Histidina-Leucina, substrato ECA) (Sigma Chemical) em tampão borato de sódio (0,4 M) e NaCl (0,9 M), pH 8,3, durante 15 minutos a 37°C. A reação foi parada pela adição de 190 µL de NaOH (0,34 M). O produto gerado, His-Leu, foi medido fluorimetricamente a 365 nm de excitação e de emissão de 495 nm, utilizando um fluoro-colorímetro (Synergy 2, Biotek, E.U.A) antecedido por 10 min de incubação com 17 µL de o-phataldialdehyde (OPA) (2%), diluído em metanol.

As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 poços (Black polystyrene, Corning, U.S.A.) com filtros de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo *software* Gen5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa (n=6). Para o branco foi adicionado 40 µL “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3, 190 µL de 0,34 M NaOH, 17 µL de OPA.

Ademais, foi utilizado um controle metodológico com captopril para comprovar que a fluorescência é influenciada pela inibição da ECA. A ação do captopril sobre a atividade da ECA foi mensurada através da incubação com captopril (10 µM) por 10 min na presença das amostras, substrato da ECA e do tampão descritos acima.

3.4.6. Expressão proteica da Cu/Zn SOD, catalase, nox2 e AT1 na aorta

A técnica de Western Blotting foi utilizada para determinar a influência da sobrecarga de ferro sobre o conteúdo de proteínas-chaves nos processos e vias identificados pelos ensaios funcionais em aorta. Para tal, os segmentos aórticos foram dissecados em solução nutritora de Krebs-Henseleit e armazenados a -80°C até a homogeneização das amostras. Para extração das proteínas, os segmentos aórticos foram homogeneizados por trituração em solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH 7,4, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- HinzGmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6.000 rpm a 4°C e, em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a

quantificação proteica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%). As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para 1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed, previamente imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (Power PacTM HC, BioRad, Singapura) a 4°C. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida na qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplados a uma cuba (Trans-Blot SD CellBio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) à 8°C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas eram incubadas durante toda a noite à 4°C, sob agitação, em solução a 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários de camundongo para catalase (1:1000, Sigma, Aldrich, Germany), gp91phox (1:1000; Transduction Laboratories, Lexington, UK) e α-actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA), e anticorpos primários de coelhos para superóxido dismutase Cu/Zn (1:1000, Sigma Aldrich, Germany) e receptor AT₁ (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Ao final da incubação dos anticorpos primários, as membranas eram lavadas sob agitação com solução TBS-T durante 15 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com

peroxidase (1:5000, Sigma Aldrich, Germany). As bandas correspondentes foram detectadas por uma reação de quimiluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ECL Prime, Amersham International, Little Chalfont, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm ECL International), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto, os filmes com as bandas proteicas impregnadas foram escaneadas e analisados pelo *software Image J*.

3.5. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTÁTISTICA

Todos os valores são 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 são expressas como porcentagem de relaxamento em relação à contração prévia com fenilefrina. Para cada curva concentração-resposta, 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 6 Software*, San Diego, CA). A sensibilidade dos agonistas foi expressa como $-\log EC_{50}$. Para comparar a magnitude dos efeitos da incubação com L-NAME e da remoção mecânica do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina, as diferenças na área sob as curvas (dASC) concentração-resposta à fenilefrina foram calculadas em ambos os grupos. As ASC foram calculadas a partir dos gráficos de curvas individuais, e as diferenças são expressas como a porcentagem da ASC em relação ao seu controle correspondente, adquirido do mesmo animal. Estes valores indicam se a magnitude do efeito de cada tratamento é diferente entre os grupos. Os dados de conteúdo das proteínas de interesse nos homogenados de aorta são expressos como a razão

entre os sinais correspondentes da proteína estudada em relação à banda identificada para α -actina.

Para estatística inferencial, o nível de significância foi estabelecido em 5%. Todos os dados foram previamente submetidos ao teste para avaliação da distribuição normal D'Agostino & Pearson. Quando a amostra apresentava distribuição não-normal (não-gaussiana) seguia-se a submissão de teste de Mann-Whitney para comparação entre médias. Ademais, a comparação entre os grupos foi feita por teste *t* de Student não pareado, análise de variância uma e duas vias, dependendo da ocasião e do número de grupos e vias a comparar. Quando identificadas diferenças significantes, foi aplicado o teste post-hoc de Bonferroni para localizar essas diferenças.

3.6. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- 4,5 diaminofluorescein (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido clorídrico (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Albumina bovina (Sigma)
- Alopurinol (Sigma)
- Anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Sigma)
- Anticorpo anti- α -actina (Sigma)
- Anticorpo anti-catalase (Sigma)
- Anticorpo anti-gp91phox (Transduction Laboratories)
- Anticorpo anti-AT₁ (Santa Cruz Biotechnology)
- Anticorpo anti-SOD Cu/Zn (Sigma)
- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Captopril (Sigma)
- Catalase (Sigma)

- Cloreto de Ca^{2+} dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dihidroetídio (Sigma)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Eosina (Dinâmica)
- Ferrocianeto de potássio (Neon)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hematoxilina (Dinâmica)
- Heparina sódica (Cristália)
- HEPES (SIGMA)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Leite desnatado (Nestle)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- L-NAME (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio dihidratado (Fluka)
- N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Prime) (Amersham)
- SQ 29.548 (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Superóxido dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- Tiron (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)
- Uretana (Sigma)
- Xilol (dinâmica)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, exceto indometacina preparada em solução TRIS/bicarbonato de sódio e alopurinol preparado em DMSO, e mantidas no congelador à -20°C (fármacos), a 4°C na geladeira (soluções de Krebs) e temperatura ambiente (anestésico e corantes para histologia).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FERRO 10mg/kg/dia E 100mg/kg/dia EM RATOS

4.1.1. Conteúdo de ferro nos tecidos e histologia da aorta

A deposição de ferro no fígado e aorta foi determinada nos três grupos experimentais Ct, Fe 10 e Fe 100, através da coloração com azul da Prússia. Os grupos Fe 10 e Fe 100 apresentaram muitos depósitos de ferro no fígado presentes em células de Kupffer e no parênquima hepático, formando aglomerados de células (setas nas figuras 8 B-C), enquanto no grupo Ct não foi possível visualizar depósitos em qualquer magnificação (figura 8 A). Já nas secções de aorta, apenas um discreto depósito de Fe foi identificado no grupo Fe 100, com ausência nos demais grupos experimentais (figura 8 D-F).

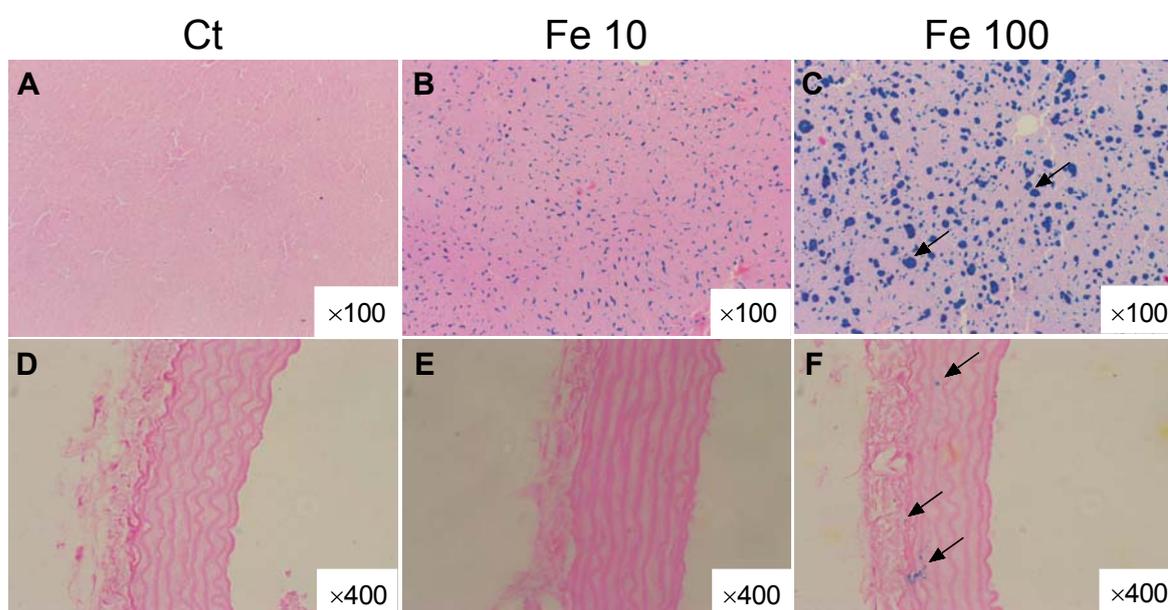


Figura 8. Depósitos de ferro no fígado e aorta após administração crônica de ferro nas duas diferentes doses. Depósitos de ferro (em azul) são visualizados por coloração com azul da Prússia. Secções do fígado (A-C) e da parede da aorta (D-F) representativas dos grupos controle (Ct) e injetados com ferro nas doses 10mg/kg/dia (Fe 10) e 100mg/kg/dia (Fe 100). Em C, setas representam aglomerados de células do parênquima hepático com depósitos de ferro. Em F, setas representam os pontos esparsos de depósito de ferro na aorta do grupo Fe 100. Aumento original $\times 100$ para secções do fígado e $\times 400$ para aorta.

Nas secções de aortas coradas com hematoxilina e eosina, nenhuma alteração morfológica foi notada, e todas as amostras apresentaram aparência histológica normal, com razão parede/lúmen e espessura da média e intima similares entre os grupos (Figura 9).

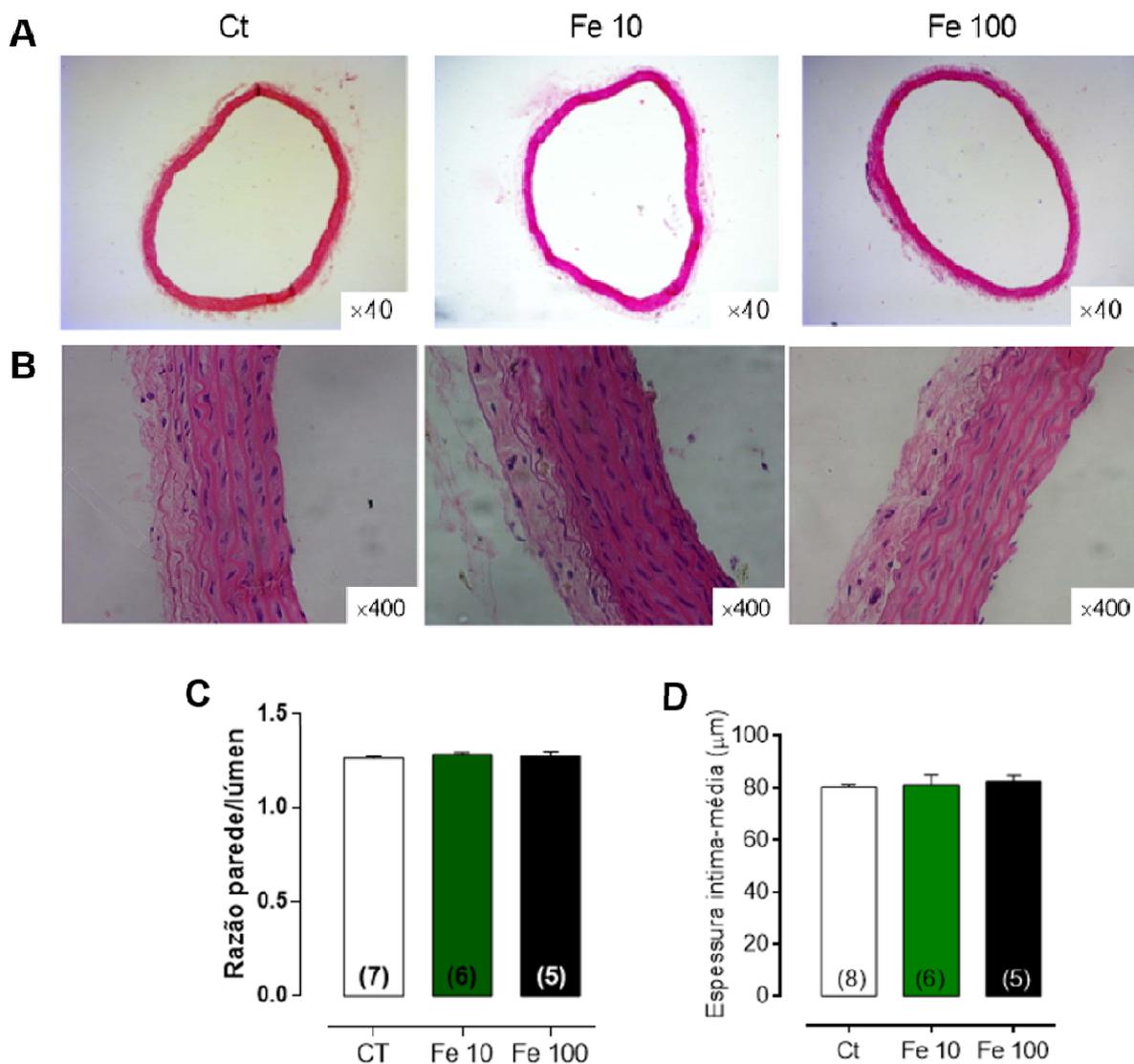


Figura 9. Efeitos da administração crônica de ferro na razão/parede lúmen e espessura de aortas. Secções de aorta torácica coradas com hematoxilina e eosina representativas dos três grupos experimentais (A,B), razão parede/lúmen (C) e espessura íntima-média (D) mensuradas nos grupos controle (Ct), sobrecarga de ferro branda (Fe 10) e sobrecarga de ferro moderada (Fe 100). Aumento original $\times 40$ e $\times 400$. Dados são expressos em média \pm EPM. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.1.2. Avaliações ponderal e biométrica

Ao fim do tratamento (tabela 1), somente os ratos do grupo Fe 100 apresentaram menor peso corporal em relação ao grupo controle, que foi acompanhado também de redução do crescimento ósseo, mensurado através do comprimento da tíbia. Além disso, os animais do grupo Fe 100 apresentaram maior peso do fígado, baço e menor peso do ventrículo esquerdo quando comparado ao Ct, enquanto no grupo Fe 10 não foi encontrada qualquer diferença estatística. Finalmente, os pesos do ventrículo direito, dos pulmões e a razão peso úmido e seco dos pulmões foram similares em todos os grupos experimentais.

Tabela 1. Parâmetros ponderais e biométricos de ratos dos três grupos experimentais

	Controle	Ferro 10	Ferro 100
Peso final (g)	320±7 (52)	329±11 (15)	264±5** (53)
Tíbia (mm)	35±0,2 (28)	35,6±0,4 (8)	33,8±0,3** (28)
Fígado (mg)	10476±414 (9)	12339±1034 (7)	13684±823** (9)
Fígado (mg/g peso final)	35,7±1 (10)	36,9±1,3 (8)	57,3±2** (9)
Fígado (mg/mm tíbia)	302±11 (10)	342±29 (7)	417±22** (9)
Baço (mg)	594±41 (10)	683±37 (8)	918±47** (10)
Baço (mg/g peso final)	2,02±0,15 (10)	2,14±0,15 (9)	3,85±0,18 ** (10)
Baço (mg/mm tíbia)	17±1,2 (10)	18,4±1 (8)	28±1,3** (10)
Pulmão (mg)	1245±45 (15)	-	1219±45 (15)
Pulmão (mg/g peso final)	4,34±0,13 (9)	-	5,22±0,20**(8)
Pulmão (mg/mm tíbia)	37,3±1,3 (8)	-	39,9±1.6 (8)
Pulmão seco/úmido (%)	77,7±0,2 (6)	-	77±0,3 (8)
VE (mg)	599±22 (9)	578±45 (4)	520±29* (8)
VE (mg/g peso final)	2,03±0,05 (10)	2,03±0,05 (5)	2,20±0,08 (9)
VE (mg/mm tíbia)	17,2±0,6 (10)	16,2±1,1 (4)	15,3±0,6* (8)
VD (mg)	140±8 (8)	148±10 (4)	119±4* (9)
VD (mg/g peso final)	0,49±0,015 (9)	0,49±0,008 (5)	0,43±0,059 (9)
VD (mg/mm tíbia)	3,90±0,1 (7)	4,14±0,3 (4)	3,75±0,1 (8)

Efeitos da sobrecarga de ferro sobre os parâmetros ponderais. *P<0.05 e **P<0.01 vs animais controles no teste t Student não-pareado. Número amostral está indicado entre parênteses.

4.1.3. Acompanhamento da Pressão arterial sistólica nos animais acordados

A PAS foi avaliada nos animais acordados através da pletismografia de cauda, antes do tratamento (Dia 0) e semanalmente após o início dos protocolos de administração do ferro. Como mostrado na figura 10, os valores pressóricos foram similares entre os grupos Fe 10 e Fe 100 em relação aos seus respectivos animais controles observados na mesma época (Figura 10).

As únicas diferenças, do ponto de vista estatístico, foram identificadas quando comparados os níveis de PAS do grupo Fe10 ao longo do protocolo de administração (dias 21 e 28) em relação aos seus valores do dia 0 (figura 10A), e quando comparadas as mudanças na PAS (delta, em mmHg). Nessa última configuração (figura 10C), o aumento na PAS no grupo Fe 10 foi maior nos dias 14, 21 e 28 quando comparados ao dia 0.

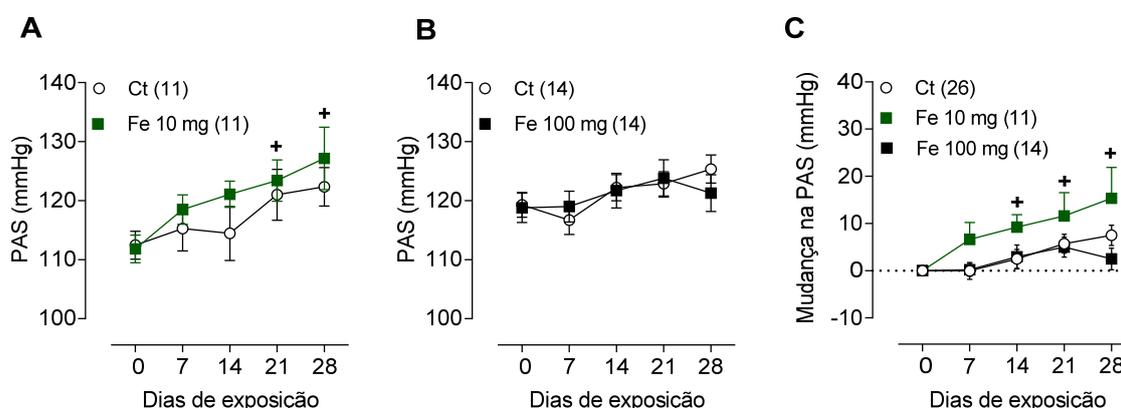


Figura 10. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a pressão arterial. Pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada semanalmente por pletismografia de cauda em ratos acordados do grupo controle (Ct), sobrecarga de ferro branda (Fe 10mg) e sobrecarga de ferro moderada (Fe 100mg). Dados são expressos em média \pm EPM. O número de animais está indicado entres parênteses.

4.1.4. Reatividade vascular em anéis isolados de aorta em diferentes modelos experimentais de sobrecarga de ferro

As respostas contráteis ao KCl (75mM) foram similares entre os grupos Ct e e Fe 10 (Ct: $2,94 \pm 0,13$, N=10; Fe 10: $2,85 \pm 0,16$, N=13, $P>0.05$), assim como entre

os grupos Ct e Fe 100 (Ct: $2,86 \pm 0,08g$, $N=50$; Fe 100: $2,81 \pm 0,05$, $N=52$, $P>0.05$). Como pode ser observado na figura 11, tanto a resposta contrátil ao agonista α -adrenérgico fenilefrina, quanto a resposta relaxante dependente do endotélio (acetilcolina) foi similar entre o grupo Fe 10 e Ct. No entanto, apesar do relaxamento dependente e independente (nitroprussiato de sódio) se apresentarem preservados no grupo Fe 100 (figuras 11D e E), a resposta contrátil à fenilefrina foi maior quando comparado à do Ct (Figura 11B), com aumento tanto da sensibilidade ($-\log EC_{50}$) (Ct: $-6,30 \pm 0,06$, $N=42$; Fe 100: $-6,68 \pm 0,06$, $N=46$, $P>0.01$), como também da resposta máxima ($R_{máx}$) (Ct: $97,5 \pm 19\%$, $N=42$; Fe 100: $121,2 \pm 16$, $N=46$, $P<0.01$) (figura 11 A, B).

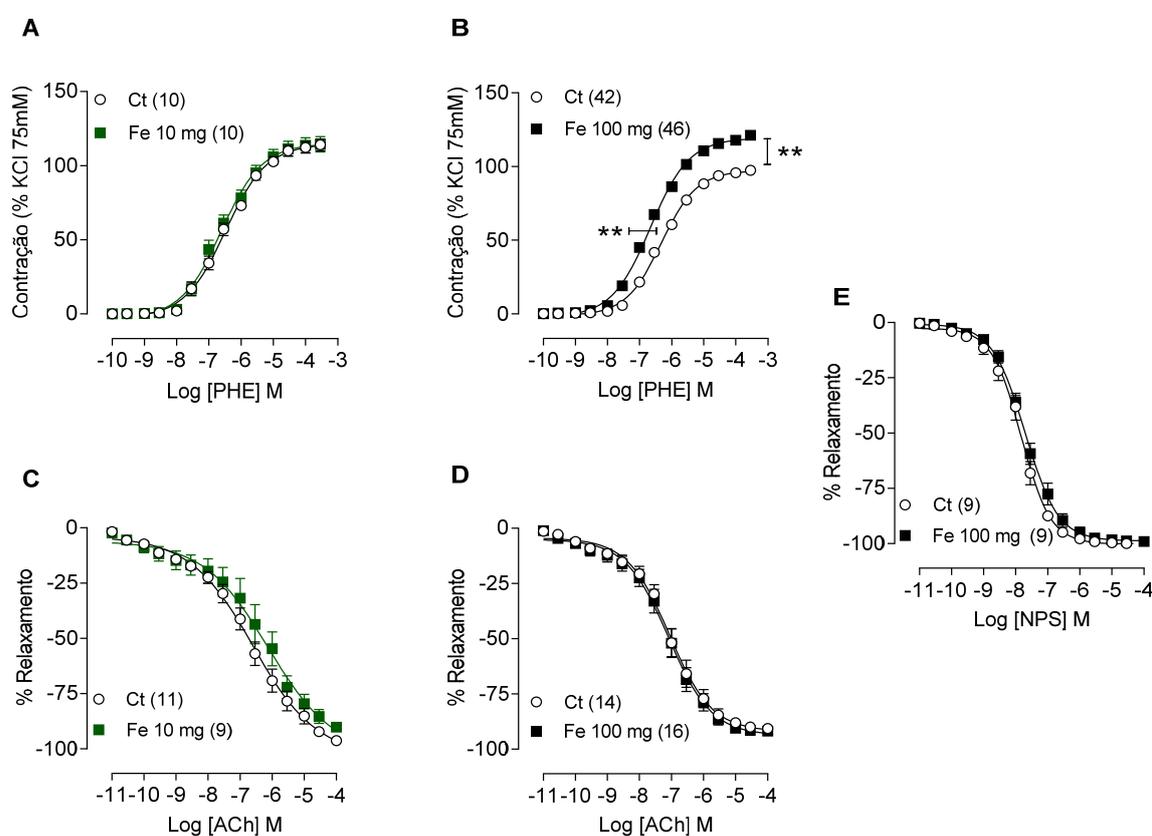


Figura 11. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica em duas diferentes doses (Fe 10 e Fe 100) sobre a reatividade vascular em aorta. Curva concentração resposta à fenilefrina (A, B), à acetilcolina (C, D) e ao nitroprussiato de sódio (E). PHE: fenilefrina, ACh: acetilcolina e NPS: nitroprussiato de sódio. Os dados são expressos em média \pm EPM. ** $P<0,01$ pelo teste t de Student quando comparados com o Ct, a resposta máxima (barra vertical) e o $-\log EC_{50}$ (barra horizontal). O número de animais é indicado entre parênteses.

4.1.4.1. Modulação endotelial e pelo NO na resposta contrátil à fenilefrina em anéis isolados de artéria aorta de ratos

A remoção mecânica do endotélio no grupo Ct, Fe 10mg e Fe 100 mg aumentou a resposta contrátil à fenilefrina, evidenciado tanto pelo aumento da sensibilidade como da resposta máxima (Figura 12). No entanto, o cálculo da porcentagem das diferenças da área sob a curva (dASC%) demonstrou que enquanto esta modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina no grupo Fe 10 foi similar à do grupo Ct (figura 12C), no grupo Fe 100 estava significativamente reduzida quando comparada ao seu grupo Ct (Figura 12F).

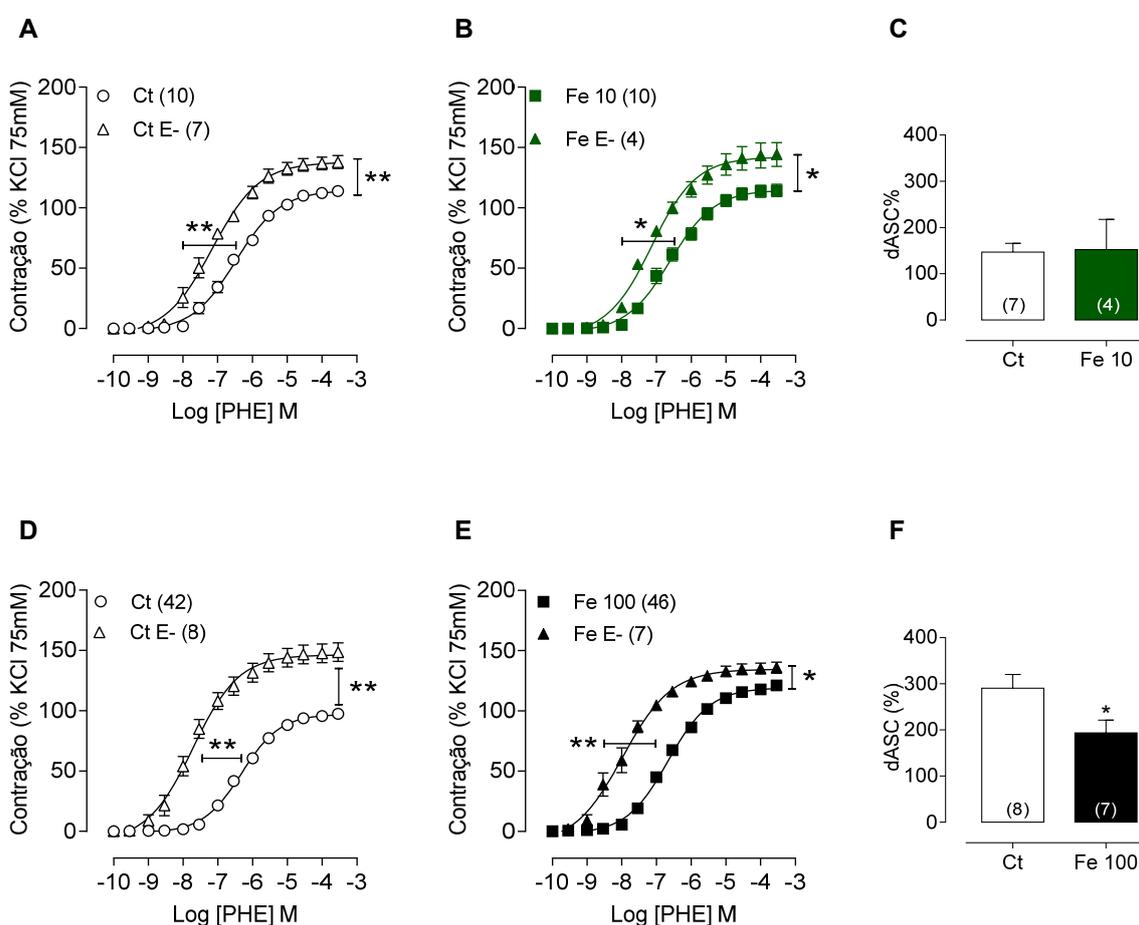


Figura 12. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica na reatividade vascular à fenilefrina e modulação endotelial. A magnitude dos efeitos foi mensurada através das diferenças da área sob a curva (dASC) sem endotélio (E-) e com endotélio preservado, representada em porcentagem da curva sem intervenção (C, F). Dados são expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ no teste *t* de Student quando comparados com o Ct, a resposta máxima (barra vertical) e o $-\log EC_{50}$ (barra horizontal). O número de animais é indicado entre parênteses.

Para avaliar a participação do NO na modulação da resposta contrátil à fenilefrina foi pré-incubado L-NAME (100 μ M) um inibidor não seletivo da NOS. A incubação com L-NAME aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos experimentais (figura 13), porém em menor magnitude no grupo Fe 100 quando comparado ao seu respectivo grupo Ct, como demonstrado na comparação da percentagem da dASC (Figura 13 F).

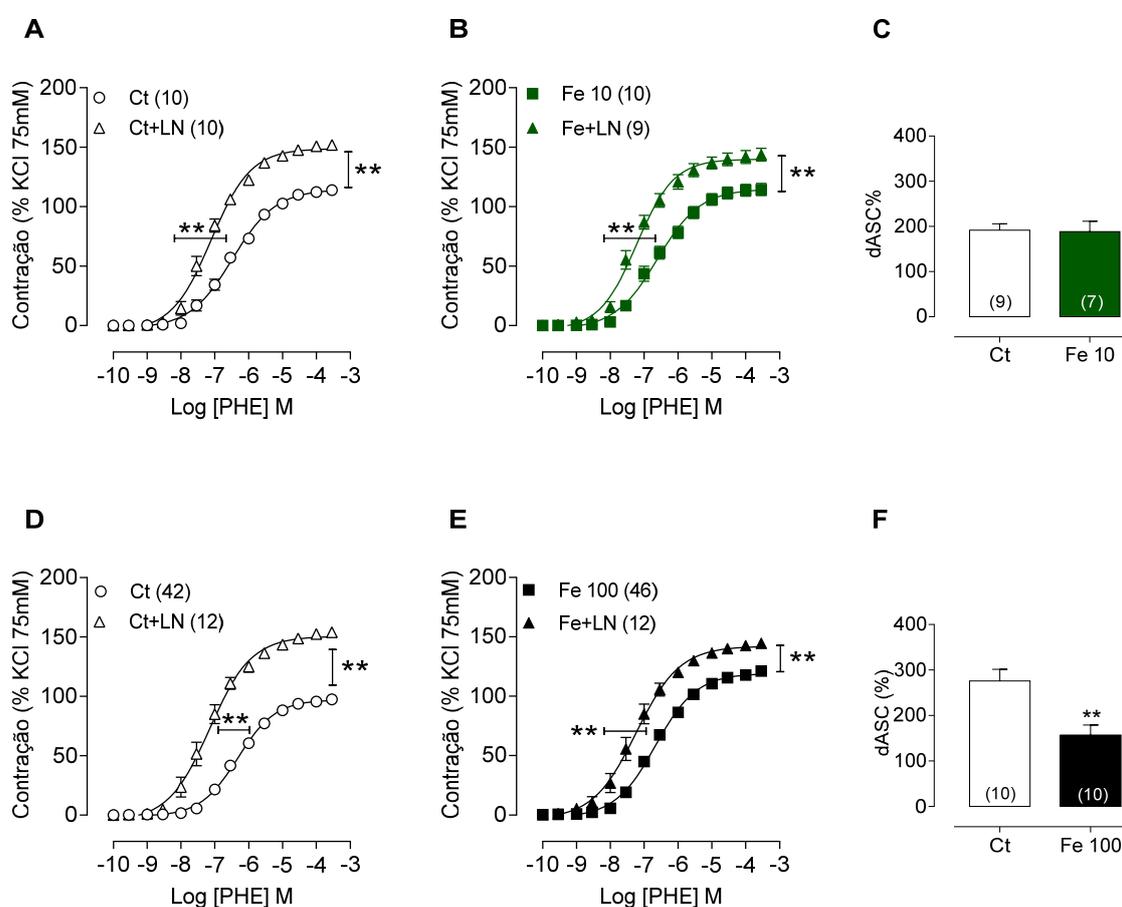


Figura 13. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a modulação pelo óxido nítrico na reatividade vascular à fenilefrina. A magnitude dos efeitos foi mensurada através das diferenças da área sob a curva (dASC) com e sem pré-incubação com L-NAME (LN), representada em porcentagem da curva sem intervenção (C, F). Os dados são expressos em média \pm EPM. ** $P < 0,01$ no teste t de Student quando comparados com o Ct, a resposta máxima (barra vertical) e o $-\log EC_{50}$ (barra horizontal). O número de animais é indicado entre parênteses.

4.2. ESCOLHA DO MODELO A SER ESTUDADO EM DETALHES

Os resultados até agora apresentados demonstraram que a sobrecarga de ferro crônica em ratos pode causar diversas alterações a depender dos níveis de administração de ferro a que o animal foi submetido. Tendo em vista o fenótipo de disfunção endotelial detectado no grupo submetido à sobrecarga de ferro na dose de 100 mg/kg/dia (Fe 100) ser o principal objetivo desta investigação, nós estudamos mais amplamente este modelo, focando as análises nos principais mecanismos envolvidos na hiperreatividade vascular e na menor modulação endotelial, modelo de exposição que passa a ser denominado doravante simplificada como grupo Fe.

4.2.1. Peso corporal, consumo de ração e características anatômicas macroscópicas no modelo experimental de sobrecarga de ferro em ratos

Ao fim do tratamento, os animais com sobrecarga de ferro apresentaram menor tamanho e peso corporal, como já apresentado na tabela 1, além de hiperpigmentação da pele e anexos, e órgãos internos como fígado e baço (Figura 14). Ao decorrer do tratamento, foi detectado que os ratos submetidos à sobrecarga de ferro tiveram um menor ganho de peso corporal a partir do 11º dia de administração do Fe (Figura 15 A), assim como consumo de ração normalizado pelo peso do animal foi também reduzido quando comparados ao grupo Ct (Figura 15 B).

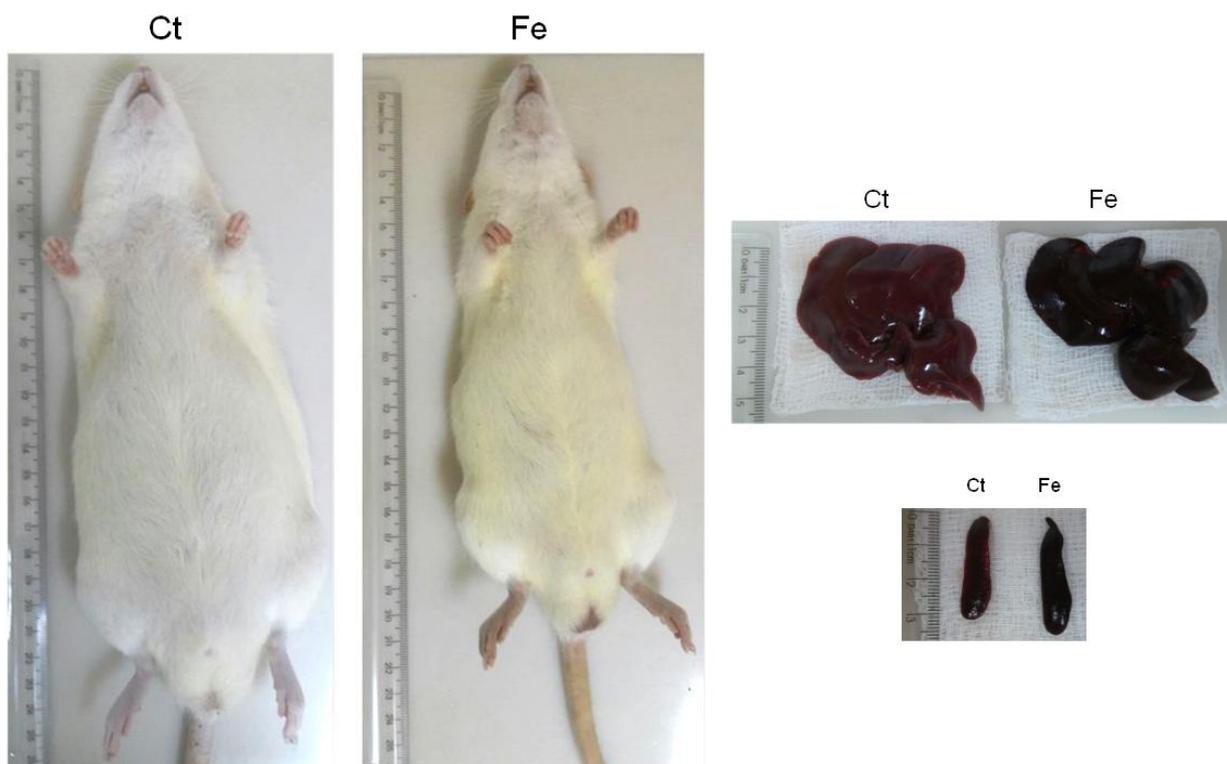


Figura 14. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre aspectos físicos e macroscópicos dos animais e principais órgãos-alvo de depósito de ferro. Fotografia de dois animais representativos dos grupos Ct e Fe nos painéis a esquerda. Nos painéis à direita, fotografias de fígados e baços representativos dos ratos de ambos os grupos. À esquerda de todas as fotos, a escala representada por uma régua milimetrada.

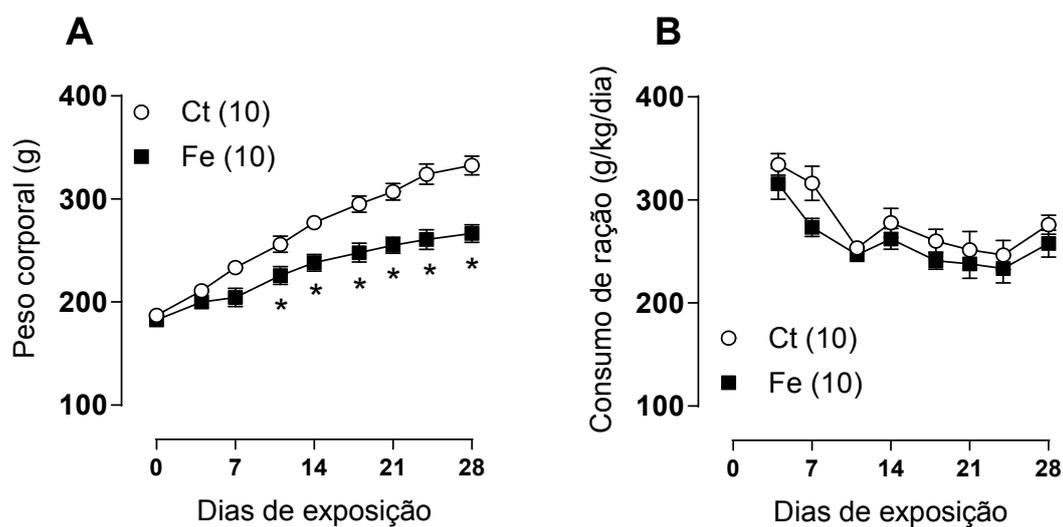


Figura 15. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre o ganho de peso corporal e o consumo médio de ração. (A) Ganho de peso corporal em animais do grupo Ct e Fe. (B) Consumo médio diário de ração por rato (em g de ração por Kg de peso corpóreo). Os dados são expressos em média \pm EPM. Comparação entre grupos realizada por ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ Ct vs Fe para o período de exposição avaliado. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.2.2. Ferro sérico e estresse oxidativo sistêmico no modelo experimental de sobrecarga de ferro em ratos

Ao fim do tratamento o sangue foi coletado e os parâmetros de ferro sérico foram mensurados no soro, e os níveis de malondialdeído no plasma. Como demonstrado na tabela 2, o grupo Fe apresentou significativo aumento do ferro sérico, saturação da transferrina e capacidade total de ligação do ferro quando comparados ao controle. Além disso, os níveis de malondialdeído plasmático também estavam significativamente elevados no grupo Fe (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis de ferro e estresse oxidativo circulantes

	Ct	Fe
Ferro sérico (µg/dl)	102±17 (6)	422±46** (7)
CTLF (µg/dl)	325±33 (6)	489±46* (7)
Saturação da transferrina (%)	31±4 (6)	86±1** (7)
MDA plasmático (µM)	0.56±0.06 (19)	0.85±0.1** (22)

Valores expressos em média ± EPM. CTLF indica capacidade total de ligação do ferro. *P<0.05 e **P<0.01 Fe vs Ct pelo teste *t* não pareado de Student, exceto para o MDA: teste de Mann-Whitney. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.2.3. Estudo hemodinâmico

Após 4 semanas de administração de ferro ou solução salina, os ratos foram anestesiados e os parâmetros hemodinâmicos arteriais e intraventriculares foram mensurados de forma direta por meio de cateterização da artéria carótida e jugular e estão descritos na tabela 3.

No grupo com sobrecarga de ferro nota-se diminuição da PAS comparado ao grupo Ct, enquanto valores de PAD e FC foram similares entre os grupos. Além disso, a pressão intraventricular esquerda e suas derivadas temporais máximas positiva e negativa estavam significativamente menores no grupo Fe. Em relação a

parâmetros hemodinâmicos do ventrículo direito, também foi encontrada redução da pressão intraventricular e suas derivadas temporais positiva e negativa.

Tabela 3. Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares de ratos submetidos e não submetidos à sobrecarga crônica de ferro

	Ct (10)	Fe (10)
PAS (mmHg)	110±3	95±3**
PAD (mmHg)	66±5	55±2
FC (bpm)	359±13	329±15
PSVE (mmHg)	116±3	102±3**
PDfVE (mmHg)	1,7±0,8	2,6±0,9
+dP/dt_{máx} VE (mmHg/s)	10150±593	7739±579**
-dP/dt_{máx} VE (mmHg/s)	-7559±327	-6137±338**
PSVD (mm Hg)	31±1,4	25±1,8*
PDfVD (mmHg)	0,16±1,14	-0,32±1,28
+dP/dt_{máx} VD (mmHg/s)	1664 ± 88	1292 ± 43**
-dP/dt_{máx} VD (mmHg/s)	-1392±56	-1061 ± 124**

Pressão arterial sistólica (PAS); pressão arterial diastólica (PAD); pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); pressão diastólica final do VE (PDfVE); derivadas máximas positiva e negativa da pressão de VE (+dP/dt_{máx} VE e -dP/dt_{máx} VE); pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD); pressão diastólica final do VD (PDfVD); derivadas máximas positiva e negativa da pressão de VD (+dP/dt_{máx} VD e -dP/dt_{máx} VD) e frequência cardíaca (FC). Valores expressos em média ± EPM. *P<0.05 and **P<0.01 Fe vs Ct pelo teste *t* não pareado de Student. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.2.4. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a função vascular e estudo dos possíveis mecanismos envolvidos

Como já demonstrado anteriormente na figura 11 o grupo com sobrecarga de ferro na dose de 100mg/kg/dia, agora determinado apenas como grupo Fe, apresentou aumento da resposta contrátil à fenilefrina quando comparado ao grupo Ct, associado a um prejuízo da modulação endotelial (figura 12), e significativa diminuição da participação do NO nesta modulação (Figura 13).

A partir de nossos resultados iniciais, os próximos passos foram avaliar detalhadamente as principais vias envolvidas neste aumento de reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta.

Além das curvas de reatividade vascular à fenilefrina obtidas na presença do L-NAME (figura 13), foi utilizado mais um protocolo para determinar a modulação do NO. Em anéis pré-contraídos com fenilefrina, a adição de L-NAME conduziu a um aumento no tônus. Como observado na figura 16, a contração induzida pela incubação com L-NAME teve menor magnitude no grupo com sobrecarga de Fe em relação ao grupo Ct, indicando que neste grupo há uma menor participação do NO na modulação da resposta contrátil à fenilefrina, provavelmente devido à diminuição da sua produção e/ou biodisponibilidade.

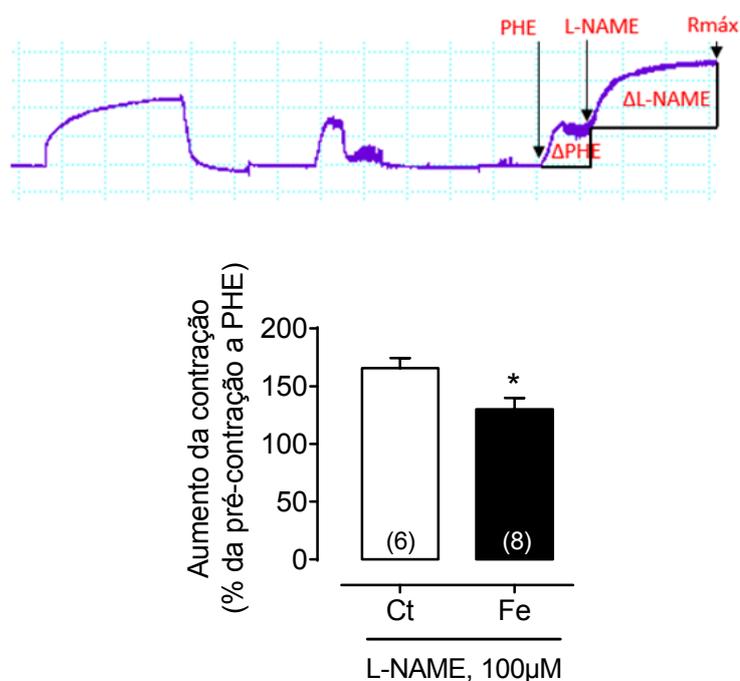


Figura 16. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre o papel do NO sobre a modulação do tônus vascular. A importância funcional da produção basal de NO foi avaliada pela medida do aumento da tensão isométrica evocada por L-NAME (100 µM) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina 10^{-7} (PHE). Os dados são expressos em média \pm EPM do percentual de aumento no tônus ao incubar L-NAME em relação a tensão inicial induzida pela PHE. * $P<0,05$ Fe vs Ct pelo teste *t* de Student. O número de animais está indicado entre parênteses.

Com o intuito de confirmar os efeitos da sobrecarga de Fe sobre a produção e/ou biodisponibilidade de NO, utilizamos um ensaio de detecção *in situ* de NO em secções de anéis isolados de aorta (10µm), mensurada pela sonda DAF-2 fluorescente. Como mostrado na figura 17, o grupo Fe apresentou fluorescência

reduzida em relação ao grupo Ct. Além disso, a inibição da NOS pela incubação com L-NAME diminuiu a produção de NO somente no grupo Ct, indicando que o grupo Fe cursa com prejuízo na produção e disponibilidade de NO.

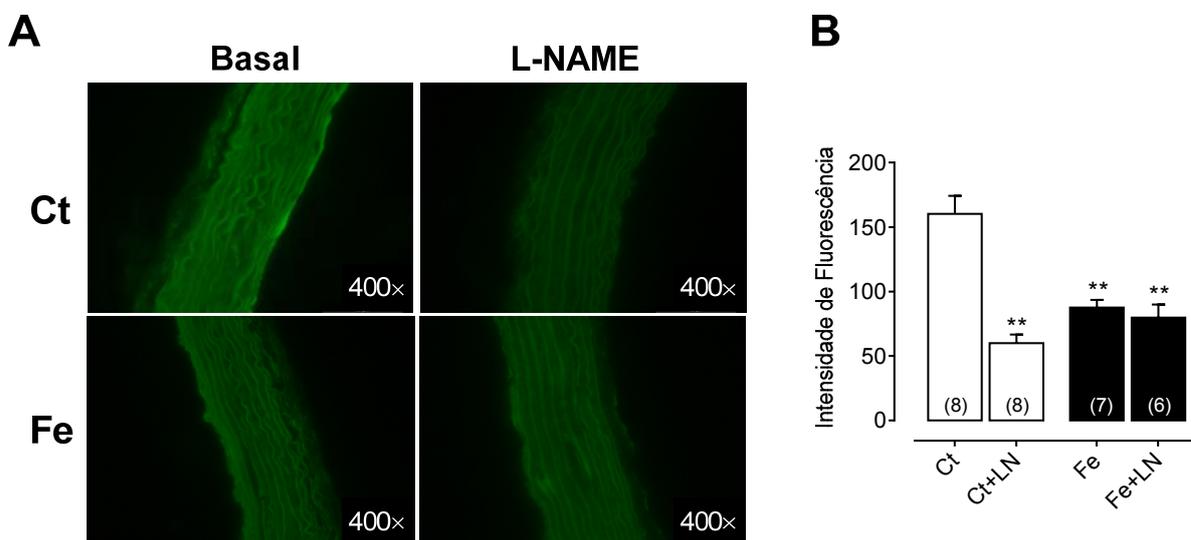


Figura 17. Detecção *in situ* de NO em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência (A) representando secções de aorta na presença da sonda fluorescente (NO sensível) 4,5-diaminofluoreceim (DAF-2) em aortas de animais controle (Ct) e com sobrecarga de ferro (Fe). A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com o L-NAME (LN, 100 µM). Em B, gráfico de barras demonstrando a análise semi quantitativa. Os dados são expressos em média ± EPM da densidade de fluorescência. **P<0,01 vs Ct pela ANOVA duas vias seguida de teste pós-hoc de Bonferroni. O número de animais está indicado entre parênteses.

4.2.4.1. Papel das espécies reativas de oxigênio e sua modulação na resposta contrátil à fenilefrina

A fim de investigar se o aumento na reatividade vascular à fenilefrina no grupo Fe seria devido a maior degradação de NO por EROs, foram incubados agentes anti-oxidantes, “varredores” de EROs ou mesmo inibidores da sua produção.

A incubação com o “sequestrador ou varredor” de $O_2^{\cdot-}$ tiron (1mM) não alterou a contração à fenilefrina no grupo Ct, no entanto a reduziu de forma significativa no grupo Fe (Figura 18 A-B). Além disso, a incubação com o antioxidante enzimático catalase (1000UI/ml), que decompõe o H_2O_2 , também reduziu a reatividade apenas no grupo Fe, sem alterar no Ct (Figura 18 C-D),

demonstrando importante participação do H_2O_2 no aumento da reatividade vascular à fenilefrina.

Como as EROs podem ser produzidas por diversas enzimas que podem ser expressas nos vasos sanguíneos, foram inibidas, em estudos *in vitro*, as principais enzimas envolvidas na produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , a NADPH oxidase e xantina oxidase. A incubação com apocinina ($30\mu M$), que em concentrações menores que $100\mu M$ atua como inibidor seletivo da NADPH oxidase (Heumuller *et al.*, 2008), reduziu a reatividade vascular à fenilefrina apenas no grupo Fe, sem alterar no grupo Ct (Figura 18 E, F). Da mesma maneira, a inibição seletiva da xantina oxidase com alopurinol ($100\mu M$) não alterou a reatividade no grupo Ct, porém a reduziu de forma estatisticamente significativa no grupo Fe (Figura 18 G, H).

Ademais, secções transversas de aorta ($10\mu m$), provenientes de amostras retiradas de ambos os grupos e imediatamente processadas para congelamento, foram submetidas ao protocolo determinar a produção *in situ* de $O_2^{\cdot-}$, pela incubação com DHE. Como demonstrado na figura 18 I-J, a detecção de $O_2^{\cdot-}$ foi 82% maior em amostras de ratos submetidos à sobrecarga crônica de ferro quando comparadas às do grupo Ct.

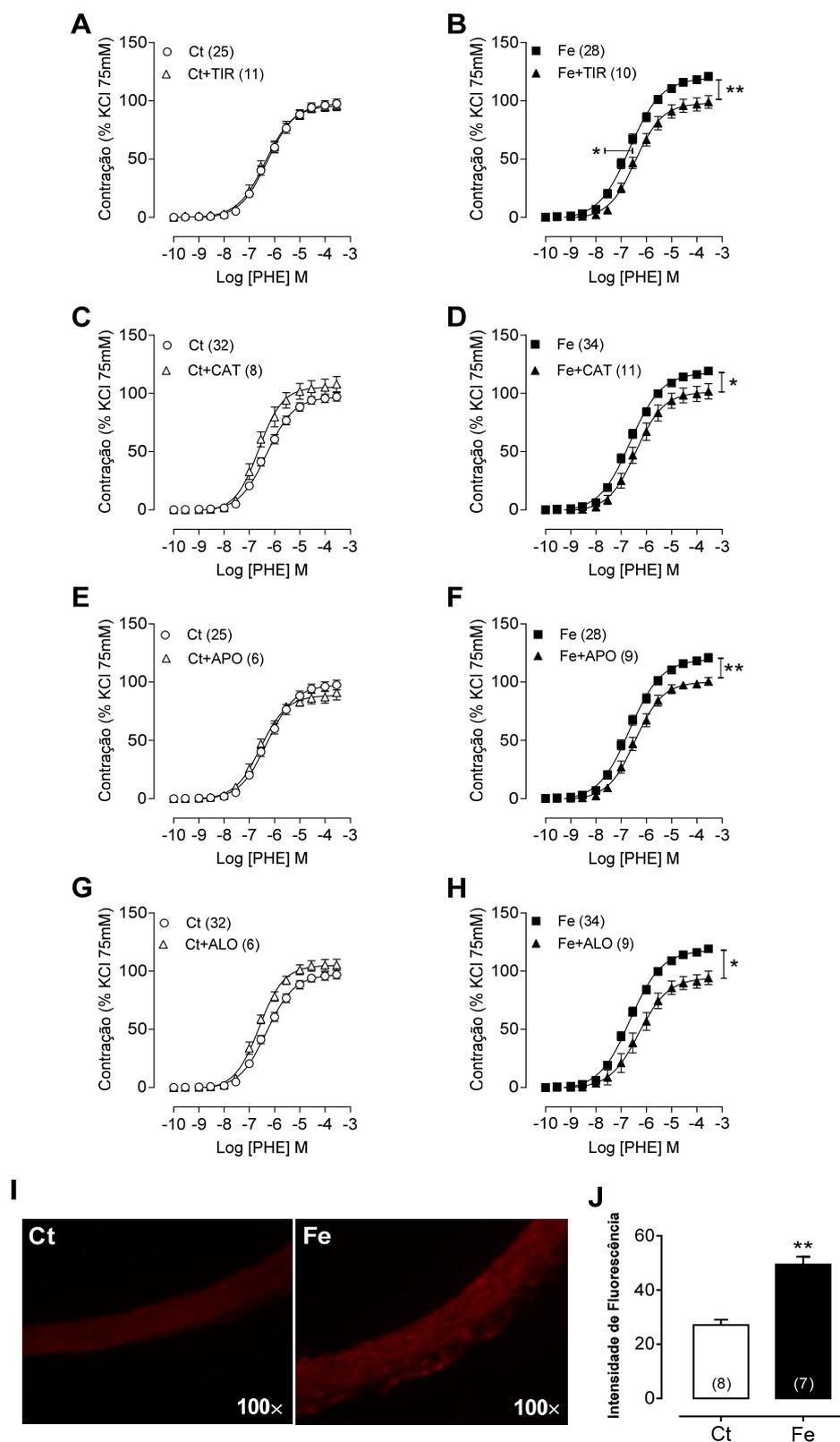


Figura 18. Papel de ERO na modulação da reatividade vascular. Curva concentração-resposta à fenilefrina (PHE) foram realizadas com ou sem pré-incubação com tiron 1 mM (A,B), catalase 1000 U.mL⁻¹ (C,D), apocinina 30 μM (E,F) e alopurinol 100 μM (G,H). Microfotografias de fluorescência de seções de aorta incubadas com DHE (I) e análise semi-quantitativa de O₂^{•-} (J). TIR: tiron, APO: apocinina, ALO: alopurinol, CAT: catalase. Os dados são expressos em média ± EPM. *P<0,05 e **P<0,01 pelo teste *t* de Student quando comparados com o Ct, a resposta máxima (barra vertical) e o -logEC₅₀ (barra horizontal), ou as médias da intensidade de fluorescência no gráfico de barras. O número de animais é indicado entre parênteses.

Numa investigação mais detalhada do papel do estresse oxidativo local sobre as alterações presentes em aortas de animais com sobrecarga crônica de ferro, foram feitos estudos de expressão/conteúdo proteico de algumas enzimas produtoras de EROs e algumas enzimas antioxidantes. O conteúdo dessas proteínas foi determinado através da análise de western blotting e imunofluorescência. Como evidenciado na figura 19, a sobrecarga de ferro não alterou o conteúdo da isoforma Cu/Zn da SOD (Figura 19A) nem da catalase (Figura 19B). Embora o conteúdo de gp91^{phox} avaliado por western blotting fora similar em ambos os grupos (Figura 19C), a pesquisa através de imunofluorescência para a subunidade p22^{phox} da NADPH em cortes de aorta evidenciou aumento significativo no grupo Fe (Figura 19D).

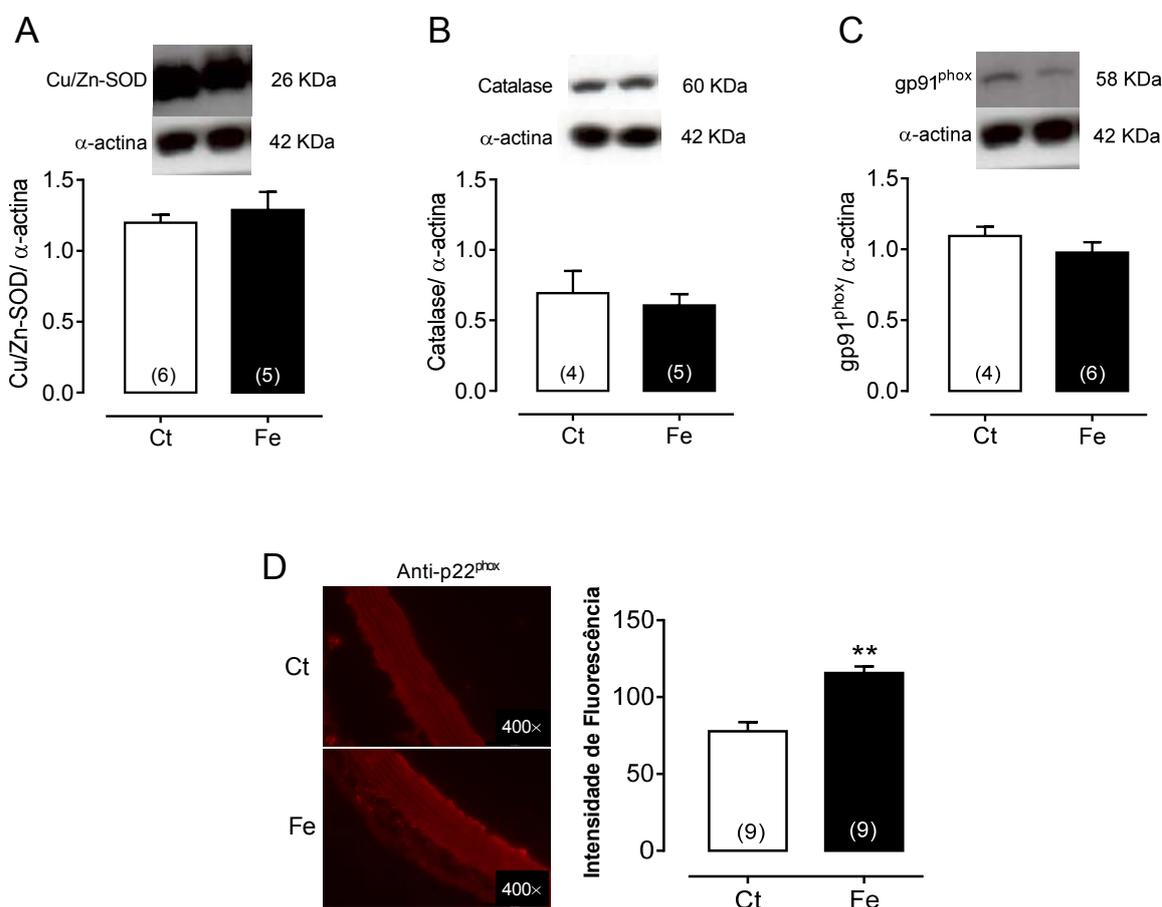


Figura 19. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica no conteúdo de proteínas pró-oxidantes e antioxidantes na aorta de ratos. O conteúdo proteico de Cu/Zn-SOD (A), catalase (B) e gp91^{phox} (C) foi analisado por Western blotting em homogenatos de aorta e normalizados pelo conteúdo de α -actina. Bandas representativas estão demonstradas acima das barras. Em D, microfotografias de fluorescência representando a imagens marcadas com anticorpo anti-p22^{phox} em secções transversas de aorta e gráfico de barras mostrando análise semiquantitativa do conteúdo desta subunidade proteica, representado como média da fluorescência integrada da região alvo. Os dados são expressos em média \pm EPM. *P<0,05 e **P<0,01 pelo teste *t* de Student quando comparado com o Ct. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.2.4.2. Papel do sistema renina-angiotensina local sobre a resposta contrátil à fenilefrina

Para avaliar a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) na resposta contrátil à fenilefrina, um inibidor seletivo do receptor AT_1 losartan ($10\mu M$) foi incubado antes das curvas concentração-resposta. A incubação com losartan não alterou a resposta contrátil à fenilefrina no grupo Ct, porém a reduziu significativamente grupo submetido à sobrecarga crônica de ferro (Figura 20A-B).

Ao ser avaliada a expressão/conteúdo do receptor AT_1 em homogenatos da aorta, não foi identificada diferença entre os grupos (Figura 20C). Da mesma maneira, o ensaio para avaliar a atividade *in vitro* da ECA obtida de amostras de aorta de ambos os grupos experimentais indicou que a atividade enzimática no consumo do substrato Hip-His-Leu foi similar nos animais Ct e Fe (Figura 20D).

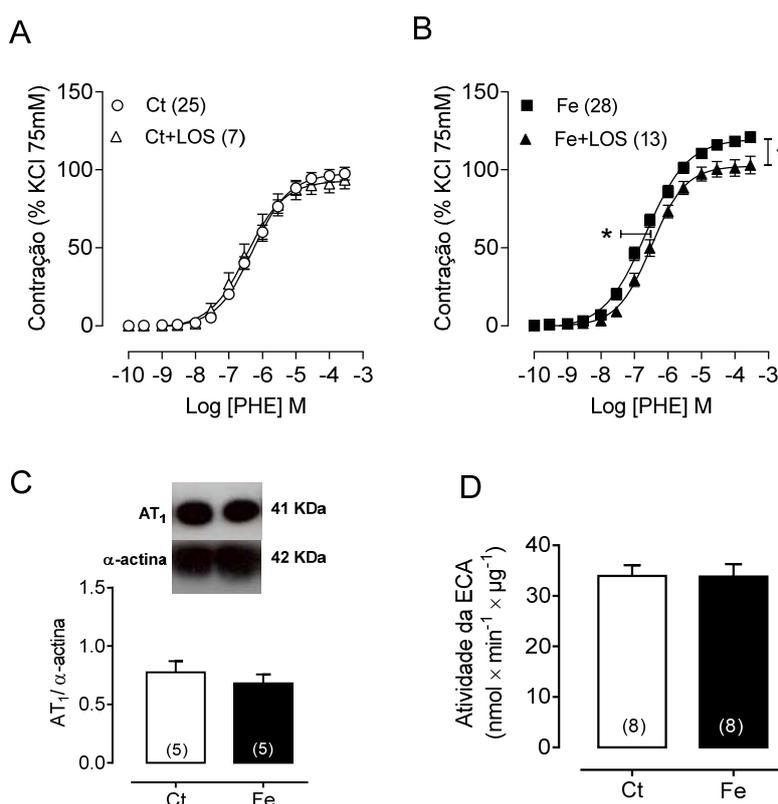


Figura 20. Papel do sistema renina-angiotensina local na reatividade vascular de aorta. Curva concentração resposta à fenilefrina (PHE) foram realizadas com ou sem pré-incubação com losartan $10\mu M$ (A,B). O conteúdo de receptor para angiotensina II do tipo 1 (AT_1) foi analisado por Western blot (C) em homogenatos de aorta e normalizados pelo conteúdo de α -actina. Bandas representativas estão demonstradas acima das barras (C). Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) em homogenatos de aorta, expressa em nmol de Hip-His-Leu hidrolizado/min/g de proteína (D). LOS: losartan. Os dados são expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$ pelo teste *t* de Student quando comparados com o Ct, a resposta máxima (barra vertical) e o $-\log EC_{50}$ (barra horizontal). O número de animais é indicado entre parênteses.

Dessa maneira, a fim de investigar se o papel do SRA em mediar a hiperreatividade vascular à fenilefrina era devido a um aumento na sensibilidade da aorta à angiotensina II produzida localmente, foram realizadas curvas concentração-resposta à angiotensina II em segmentos isolados de aorta, sendo a resposta contrátil também representada como % da contração do KCl. Como demonstrado na Figura 21, a resposta contrátil à angiotensina II nos anéis de aorta provenientes do grupo Fe foi, de fato, maior quando comparada à do grupo Ct.

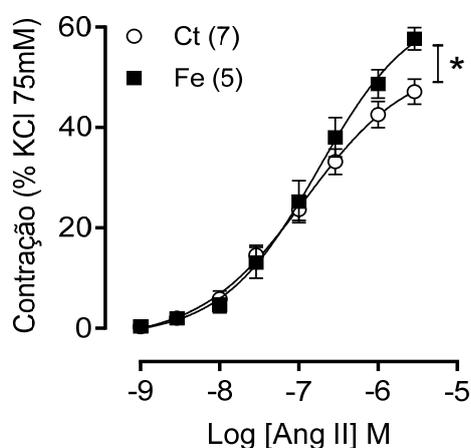


Figura 21. Efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a resposta contrátil à angiotensina II em aorta de ratos. Curvas concentração-resposta à angiotensina II (Ang II) foram realizadas em artérias dos ratos controle (Ct) e com sobrecarga de ferro (Fe). Os dados são expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$ pelo teste *t* de Student quando comparados com o Ct, a resposta máxima (barra vertical). O número de animais é indicado entre parênteses.

4.2.4.3. Papel da via do AA-COX sobre a resposta contrátil à fenilefrina

Para avaliar a participação da via do ácido araquidônico-COX na resposta contrátil à fenilefrina, a indometacina (10 μ M), um inibidor seletivo, mas não específico para as diferentes isoformas da COX, e o SQ 29598 (1mM), um inibidor seletivo do receptor para tromboxano (TP), foram incubados previamente à construção das curvas concentração-resposta à fenilefrina. A incubação com indometacina reduziu a reatividade vascular à fenilefrina apenas no grupo Fe, sem alterar no grupo Ct (Figura 22A-B). Da mesma maneira, SQ 29598 não alterou a

resposta contrátil à fenilefrina no grupo Ct, mas a reduziu significativamente no grupo com sobrecarga de Fe (Figura 22C-D).

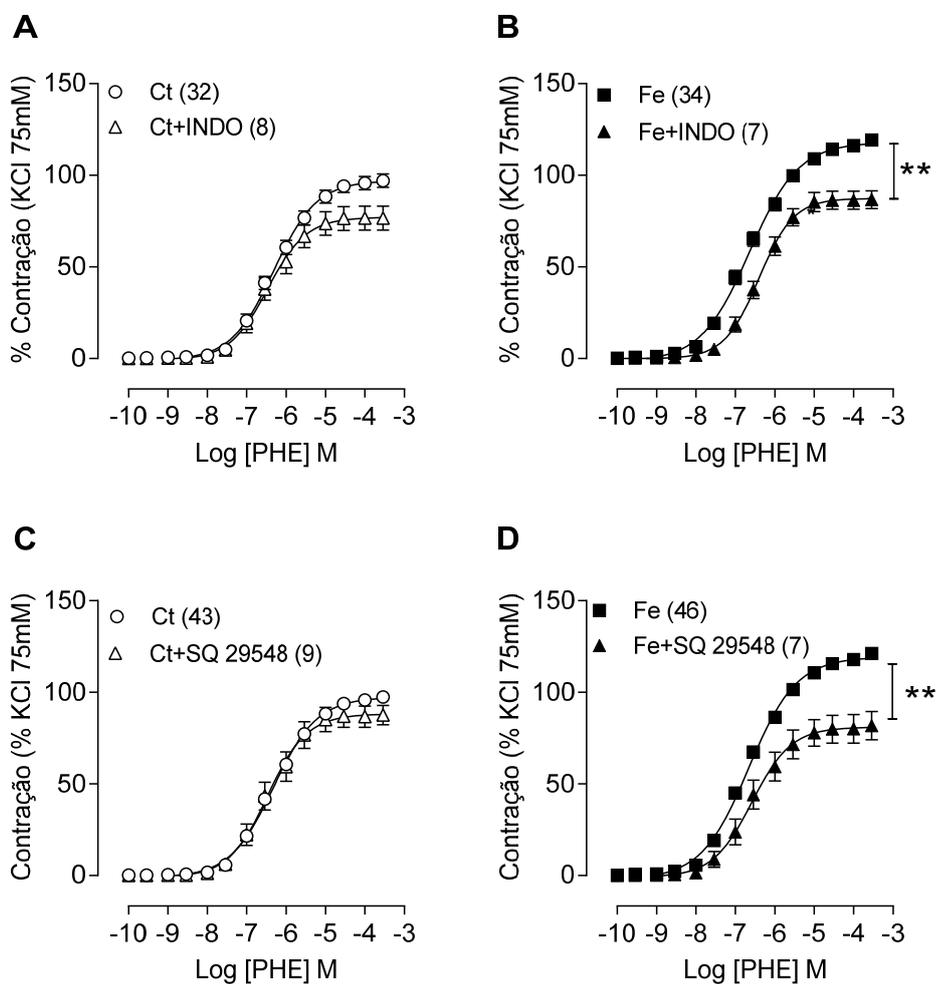


Figura 22. Papel da COX e do tromboxano A_2 nos efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a reatividade vascular da aorta. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE) foram realizadas com ou sem pré-incubação com indometacina $10\ \mu\text{M}$ (INDO) (A,B) e SQ 29598 1mM (C,D). Os dados são expressos em média \pm EPM. $**P < 0,01$ pelo teste *t* de Student quando comparados com o Ct, a resposta máxima (barra vertical). O número de animais é indicado entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram investigados os efeitos vasculares da sobrecarga de ferro crônica em ratos, avaliando possíveis mecanismos envolvidos na resposta vasoconstritora alterada da aorta. Inicialmente utilizamos dois modelos experimentais de sobrecarga de ferro, um com exposição branda (10mg/Kg/dia, que denominamos grupo Fe 10) e outro com exposição moderada de ferro (100mg/Kg/dia, que denominamos grupo Fe 100). A confirmação da sobrecarga foi pela coloração com azul da Prússia marcando depósitos de ferro no fígado, uns dos principais órgãos que acumulam esse elemento em situações de sobrecarga, corroborando outros modelos em roedores (Bartfay & Bartfay, 2000b;Crackower *et al.*, 2002;Oudit *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2004;Lou *et al.*, 2009;Cardoso *et al.*, 2005;Day *et al.*, 2003). Além disso, foi detectado alguns pequenos pontos de depósitos de ferro na aorta dos ratos submetidos à sobrecarga de ferro na dose de 100mg/kg/dia, enquanto nenhum foi detectado no Ct e sobrecarga de ferro branda, usando 10mg/kg/dia. Embora sejam raros os relatos de depósitos vasculares, a deposição de ferro em aorta também foi descrita em outro modelo experimental de sobrecarga de ferro, porém em camundongos (Day *et al.*, 2003).

Os valores de peso corporal e peso de órgãos foram similares entre os grupos Ct e sobrecarga de Fe 10. No entanto, ao fim do tratamento, o grupo submetido à sobrecarga de ferro mais intensa apresentou menor peso corporal e do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo Ct, além de aumentar o peso do fígado e do baço, que corrobora estudos anteriores em modelos de roedores (Lou *et al.*, 2009;Oudit *et al.*, 2004;Legssyer *et al.*, 2003;Mandalunis & Ubios, 2005). Sabe-se da importância do fígado e baço na hemólise de eritrócitos senescentes, que por sua vez tem como consequência liberação de ferro (Grotto, 2010). No entanto, com o aumento significativo dos níveis séricos de ferro no grupo Fe 100, é possível que haja aumento da síntese e liberação da hepcidina, hormônio capaz de internalizar e degradar a ferroportina, inibindo a externalização de ferro destes tecidos, com consequente acúmulo (Dunn *et al.*, 2007;Ganz, 2013;Grotto, 2010). Pode-se especular que o aumento de peso encontrado nestes órgãos no grupo Fe 100 é devido ao intenso acúmulo de ferro tecidual, comprovado no fígado através da coloração azul da Prússia, ocasionado provavelmente pelos mecanismos

reguladores supracitados em conjunto com aumento da captação direta do ferro circulante por estes órgãos, em especial o ferro livre, levando em consideração o aumento da saturação da transferrina no grupo Fe 100 (Liuzzi *et al.*, 2006; Grotto, 2010). Além da redução do peso corporal, também identificamos menor comprimento da tíbia, que tomando em conjunto sugere restrição do crescimento. Outros estudos experimentais demonstraram que a sobrecarga crônica de ferro inibiu a ossificação endocondral na tíbia de roedores, assim como a formação da medula óssea em ratos (Mandalunis & Ubios, 2005; Mandalunis *et al.*, 1997) e porcos (de Vernejoul *et al.*, 1984), provavelmente pela diminuição da atividade dos osteoblastos, da proliferação celular e do IGF-1 (Mandalunis & Ubios, 2005; Diamond *et al.*, 1991; Mahachoklertwattana *et al.*, 2003). A respeito disso, poderíamos traçar mais algumas especulações. É possível que, devido ao intenso acúmulo de ferro no fígado do grupo com sobrecarga de Fe 100, poderia haver lesão hepática, tal como comumente descrito nessas condições tanto em modelos experimentais (Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 2009; Najafzadeh *et al.*, 2010) quanto na sobrecarga de ferro no homem (Bacon & Britton, 1990; Arthur, 1996; Thakerngpol *et al.*, 1996; Bonkovsky & Lambrecht, 2000; Bonkovsky & Lambrecht, 2000; Ramm & Ruddell, 2005), podendo resultar em alterações no metabolismo de proteínas, e assim, levando à redução do ganho de peso encontrado em nosso estudo. Além disso, a peroxidação lipídica aumentada, fato presente em nosso modelo e detectada pelo aumento dos níveis de malondialdeído plasmático, poderia influenciar negativamente o crescimento. De fato, Oudit *et al.* (2004) demonstraram que a suplementação com taurina, devido a sua ação antioxidante (Huxtable, 1992), causa uma melhoria significativa no peso corporal em camundongos com sobrecarga de ferro. Finalmente, este crescimento reduzido pode ser também resultado de uma lesão induzida pelo ferro das glândulas endócrinas, semelhantes aos observados em crianças com talassemia major (Skordis & Kyriakou, 2011). Ademais, o consumo de ração discretamente reduzido no grupo Fe pode ser uns dos fatores responsáveis pelo menor ganho de peso corporal encontrado nesses animais, que em conjunto com outros fatores também pode influenciar no crescimento.

A pressão arterial dos animais acordados foi similar entre os grupos quando comparados aos seus respectivos animais controles da mesma época. No entanto, houve uma pequena diferença estatística no grupo Fe10 ao longo do protocolo de administração (dia 21 e 28) em relação aos seus valores do dia 0 e quando

comparadas a mudança da PAS (delta, em mmHg) que foi maior no dia 14, 21 e 28 comparada ao dia 0. É possível especular que este discreto aumento de PAS no grupo Fe 10 seja por alterações na função baroreflexa como demonstrado em outro estudo com sobrecarga de ferro em ratos (Cardoso *et al.*, 2005) e/ou a possível alterações no sistema nervoso autônomo e resistência periférica total devido a conhecida capacidade do ferro em induzir deposição tecidual em diversos órgãos (Day *et al.*, 2003;Legssyer *et al.*, 2003;Jiang *et al.*, 2007;Lou *et al.*, 2009;Moon *et al.*, 2011;Ma *et al.*, 2012), assim como estresse oxidativo (Bartfay *et al.*, 1999b;Bartfay & Bartfay, 2000a;Bartfay & Bartfay, 2000b;Davis & Bartfay, 2004;Lucesoli *et al.*, 1999;Day *et al.*, 2003;Crackower *et al.*, 2002;Oudit *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2004;Pardo Andreu *et al.*, 2009;Lou *et al.*, 2009;Kramer *et al.*, 2012) e reações inflamatórias e de proliferação celular (Araujo *et al.*, 1995;Lee *et al.*, 1999;Lipinski & Pretorius, 2013). Apesar do aumento da PAS no grupo Fe 10, não foi observado esse aumento no grupo Fe 100, possivelmente devido aos maiores níveis de sobrecarga de ferro tecidual neste grupo, que pode levar a cardiomiopatias já descrita em outros estudos experimentais com sobrecarga de ferro, que inclusive apresenta um comportamento dose-dependente (Bartfay *et al.*, 1999b;Bartfay & Bartfay, 2000a;Moon *et al.*, 2011;Kramer *et al.*, 2012;Oudit *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2004), o que pode esconder um possível aumento de pressão arterial frente a alterações da resistência periférica total ou baroreflexas.

Estudos tem demonstrado que as alterações morfofuncionais encontradas em modelos experimentais de sobrecarga de ferro secundária são dose-dependentes (Bartfay *et al.*, 1999a;Bartfay *et al.*, 1999b;Bartfay & Bartfay, 2000a;Lucesoli *et al.*, 1999;Moon *et al.*, 2011). Moon *et al.* (2011) demonstrou em camundongos que os níveis plasmáticos e conteúdo de ferro no fígado são proporcionais às doses administradas de ferro, e os depósitos de ferro no fígado e coração foram proporcionais à dose de ferro acumulada no plasma, além do aumento da dilatação do ventrículo esquerdo na fase diastólica final de forma concentração-dependente. Outros autores demonstraram que a sobrecarga de ferro aguda em ratos induz estresse oxidativo e prejudica a espermatogênese de forma dose-dependente (Lucesoli *et al.*, 1999). Além disso, Bartfay & Bartfay (2000) mostraram que a sobrecarga de ferro de forma dose-dependente aumenta o depósito de ferro no miocárdio, diminuiu a atividade da glutathione peroxidase, aumentou a produção de radicais livres e também a mortalidade. No entanto,

estudos morfofuncionais de vasos em diferentes níveis de sobrecarga de ferro ainda não foram descritos, e não é conhecido se as alterações vasculares provocadas por sobrecarga de ferro são dose-dependentes em modelos experimentais.

Ao estudar a função vascular em condições caracterizadas por aumento do estresse oxidativo combinado à ativação do sistema renina-angiotensina, o remodelamento vascular e a hipertrofia da camada média são relevantes fenótipos (Montezano & Touyz, 2012). De fato, verificou-se aumento da espessura íntima-média da artéria carótida em pacientes com hemocromatose hereditária (Gaenger *et al.*, 2002) e beta-talassemia maior (Hahalis *et al.*, 2008; Adly *et al.*, 2014). No entanto, Cusma *et al.* (2013) encontraram semelhança na espessura da camada média de artéria carótida de adultos com sobrecarga de ferro secundária. Da mesma forma, não foram identificadas diferenças na espessura íntima-média e da razão parede/lúmen de aorta de ratos após administração de ferro em nenhum dos dois regimes de sobrecarga utilizadas. Considerando-se que fatores como o tempo de sobrecarga de ferro, acúmulo e níveis de deposição e efeitos vasculares locais específicos podem estar presentes, a relação exata entre a sobrecarga de ferro e o remodelamento vascular continua não resolvida.

Já os distúrbios vasculares relacionados à disfunção endotelial são geralmente caracterizados pela vasodilatação reduzida e/ou aumento da resposta vasoconstritora, e podem estar presentes em inúmeras condições patológicas. Apesar de alguns estudos clínicos com sobrecarga de ferro mostrarem diminuição de ambos os relaxamentos dependente (Gaenger *et al.*, 2002; Kukongviriyapan *et al.*, 2008; Hahalis *et al.*, 2008) e independente do endotélio (Hahalis *et al.*, 2008), no presente estudo não foi encontrada nenhuma alteração no relaxamento induzido pela acetilcolina ou pelo doador de NO nitroprussiato de sódio na aorta de ratos. Não obstante, pelos resultados apresentados ficou evidente a redução na capacidade do endotélio em modular negativamente a resposta contrátil vascular à fenilefrina no grupo com sobrecarga de Fe 100, não havendo alteração no grupo com sobrecarga de Fe 10. De maneira importante, esse prejuízo na modulação endotelial, provavelmente relacionada à diminuição da produção e/ou biodisponibilidade do NO, parece justificar o aumento da resposta constritora identificada no grupo Fe 100, como evidenciado com a remoção mecânica do endotélio e com a incubação com L-NAME sobre as curvas concentração-resposta à fenilefrina. Em aortas do grupo Fe 100, os deslocamentos para cima e para a

esquerda da curva concentração-resposta à fenilefrina após desnudação do endotélio e após incubação com L-NAME foram significativamente reduzidos, enquanto no grupo Fe 10 esse comportamento não foi diferente quando comparados ao ocorrido no grupo Ct.

Como o principal objetivo era investigar se a sobrecarga de ferro crônica causa disfunção vascular em aorta de ratos e quais seriam os prováveis mecanismos subjacentes, um estudo mais amplo e aprofundado a cerca das alterações cardiovasculares foi feito no modelo de sobrecarga de ferro com a dose de 100mg/kg/dia, o qual passa a ser denominado apenas como grupo Fe.

Além da deposição de ferro tecidual, hepático e vascular, descrita anteriormente pela técnica de coloração com azul da Prússia, houve aumento dos parâmetros hematológicos de ferro (ferro sérico, CTF e nível de saturação da transferrina) no grupo Fe comparado ao Ct. Estes resultados são consistentes com outros estudos que avaliaram a função cardiovascular em sobrecarga de ferro em modelos experimentais de roedores (Day *et al.*, 2003;Kramer *et al.*, 2012;Cardoso *et al.*, 2005) e em humanos (Gaenger *et al.*, 2002;Kukongviriyapan *et al.*, 2008). Além disso, o aumento da peroxidação lipídica, indicando elevado estresse oxidativo sistêmico, foi confirmado neste modelo de sobrecarga de ferro através do aumento dos níveis plasmáticos de MDA. Em relação a este, outros estudos apresentam resultados semelhantes em ratos (Lou *et al.*, 2009;Zhou *et al.*, 2000), camundongos (Davis & Bartfay, 2004;Oudit *et al.*, 2004) e homens (Naithani *et al.*, 2006) indicando, de fato, que o estresse oxidativo é um fator presente na fisiopatologia da sobrecarga de ferro, e que deve ser o principal mediador dos danos identificados em diferentes órgãos e sistemas (Cheng & Lian, 2013;Gudjoncik *et al.*, 2014).

Na investigação de quais os mecanismos poderiam justificar esse prejuízo na modulação endotelial levando a hiperreatividade vascular no grupo Fe, diferentes estratégias e protocolos foram utilizados, dentre eles, alguns para confirmar essa redução da participação do NO na aorta dos animais com sobrecarga de ferro. Reforçando essa linha de evidência, quando o L-NAME foi incubado após uma contração leve (submáxima) à fenilefrina, uma menor resposta contrátil foi observada no grupo Fe, indicando menor modulação do NO em contrapor o tônus arterial. Finalmente, a detecção *in situ* utilizando uma sonda sensível ao NO mostrou uma menor quantidade deste gás no grupo Fe quando comparado ao Ct, a qual corrobora os dados funcionais. Entre os fatores moduladores derivados do endotélio,

o NO é realmente reconhecido como o mais importante, sendo que a diminuição da biodisponibilidade do NO fora sugerida em outros estudos experimentais com sobrecarga de ferro, embora por métodos indiretos tais como medida de nitrato/nitrito urinário, bem como um aumento de EROs provavelmente mediando inativação do NO (Day *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2000).

Nesse sentido, como a diminuição da biodisponibilidade de NO em condições patológicas muitas vezes ocorre como resultado de sua degradação metabólica por EROs, tais como $O_2^{\cdot-}$, foi investigado se a hiperreatividade à fenilefrina no grupo com sobrecarga de Fe estaria relacionada ao aumento de $O_2^{\cdot-}$. A incubação com tiron, um varredor de $O_2^{\cdot-}$, de fato reduziu a resposta contrátil no grupo Fe, sem alterá-la no grupo Ct. Confirmando os dados funcionais, nas aortas dos animais com sobrecarga de ferro houve aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$, avaliadas *in situ* pelo ensaio com DHE. É sabido que o $O_2^{\cdot-}$ pode interagir com o NO para formar peroxinitrito, que além de reduzir a biodisponibilidade do NO, induz danos vasculares e pode ser protonado a radical hydroperoxyl, que desempenha um papel importante na peroxidação lipídica e aterogênese (Nguyen Dinh *et al.*, 2013).

Sendo a NADPH oxidase a principal fonte de EROs tais como $O_2^{\cdot-}$ na vasculatura, para investigar o papel dos derivados da NADPH oxidase sobre a hiperreatividade à fenilefrina identificada no grupo Fe, incubamos apocinina (30 μ M) em anéis de aorta. De maneira significativa, a apocinina reduziu a resposta contrátil dos anéis de aorta do grupo Fe, mas não no grupo Ct. Além disso, por uma análise semiquantitativa por imunofluorescência *in situ*, a p22^{phox}, uma subunidade ligada à membrana da NADPH-oxidase, foi aumentada em aortas do grupo Fe, diferença esta localizada principalmente na região do endotélio. Apesar da técnica de western blotting ser considerada mais precisa para quantificação proteica, não foi possível quantificar a expressão da p22^{phox} por meio desta, tendo em vista o insucesso para obtenção de sinais desta proteína por essa técnica em nosso laboratório, mesmo com repetidas tentativas, adequações no protocolo e uso de anticorpos similares aos descritos em artigos científicos. Além de NADPH oxidase, a xantina oxidase é uma importante fonte de EROs. De fato, o inibidor da xantina oxidase, alopurinol (100 μ M), também reduziu a hiperreatividade vascular apenas no grupo Fe, sugerindo que a sobrecarga de ferro pode aumentar a produção de EROs por meio dessas duas enzimas NADPH oxidase e xantina oxidase na aorta.

Além do $O_2^{\cdot-}$, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também parece desempenhar um papel importante nesse aumento da reatividade vascular à fenilefrina, pois a incubação com catalase reduziu a resposta contrátil no grupo Fe, sem alterá-la no grupo Ct. Sabe-se que o peróxido de hidrogênio pode ser produzido por dismutação de $O_2^{\cdot-}$, que foi significativamente aumentada no grupo Fe pelo ensaio *in situ*, mas também pode ser produzido diretamente por enzimas tais como a NADPH-oxidase (Drummond *et al.*, 2011), xantina oxidase e glicose-oxidase (Cai, 2005b). O peróxido de hidrogênio pode desencadear várias alterações vasculares por diferentes mecanismos, dependendo do sítio, concentração e condição experimental (Cai, 2005b; Cai, 2005a; Cseko *et al.*, 2004; Thakali *et al.*, 2006a; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998). Além disso, a presença do Fe pode, tanto como participante ativo na reação de Fenton, quanto como um catalizador da reação de Haber-Weiss, participar na formação de metabólitos altamente reativos, tais como os radicais hidroxila (Cai, 2005a; Thakali *et al.*, 2006b; Wardman & Candeias, 1996). Ademais, os resultados apresentados sugerem que o aumento da resposta contrátil à fenilefrina no grupo Fe devido ao aumento da produção de EROs na sobrecarga de ferro ocorre, provavelmente, sem mecanismos anti-oxidantes compensatórios, visto que o conteúdo proteico da Cu/ZnSOD e catalase na aorta foram similares entre os grupos. Entretanto, apesar da expressão dessas duas enzimas serem similares, é possível que a atividade enzimática esteja alterada, pois o estudo de Legssyer *et al.* (2003) demonstrou que a atividade da SOD e catalase foram aumentadas em macrófagos alveolares de ratos Wistar submetidos à sobrecarga crônica de ferro, sendo que estas enzimas antioxidantes podem ter aumento da atividade, sem necessariamente aumento de expressão (Xue *et al.*, 2015).

Como a disfunção endotelial associada a hiperatividade contrátil do vaso também pode ser devido ao aumento da geração de produtos vasoconstritores derivados do endotélio, e conhecendo sua relação com a produção de EROs, investigamos o envolvimento da angiotensina II localmente produzida. Nossos resultados mostram um efeito inibidor significativo do losartan (10 μ M) sobre o aumento da resposta contrátil à fenilefrina em aortas de ratos submetidos sobrecarga de ferro, sem qualquer efeito detectável no grupo Ct. Já é conhecido que a via do receptor AT_1 desempenha um importante papel na contração do músculo liso vascular não apenas por mecanismos que aumentam o Ca^{2+} intracelular, mas também por induzir a produção de EROs através do aumento da atividade e/ou

expressão de subunidades citosólicas e de membrana da NADPH-oxidase (Nguyen Dinh *et al.*, 2013). Além disso, esta forte relação entre as ações do receptor AT₁ mediada por angiotensina II e a produção de EROs pela NADPH-oxidase estão presentes em ambas condições fisiológicas e fisiopatológicas (Briones & Touyz, 2010). Tomados juntos, no grupo sobrecarga de Fe houve significativa produção de EROs e participação da ativação local do receptor AT₁ sobre a hiperreatividade vascular, além de aumento da p22^{phox}. Todavia, apesar do aumento da p22^{phox}, o conteúdo de gp91^{phox} (subunidade catalítica da NOX2) foi semelhante entre os grupos quando avaliamos por western blotting. Apesar da redução da sinalização do NO que ocorre nas fases iniciais da doença vascular ser muitas vezes atribuída a níveis excessivos de O₂^{•-} derivados de NOX2, a ativação da NOX2 mediada pela angiotensina II parece ser mais importante em artérias de resistência, enquanto a ativação ou “upregulation” de NOX1 pela angiotensina II é predominante em vasos de maior calibre, tais como a aorta (Nguyen Dinh *et al.*, 2013; Touyz *et al.*, 2002; Lassegue *et al.*, 2001). Além disso, Lassegue *et al.* (2001) mostraram que no músculo liso vascular de aorta de rato, a expressão do mRNA da NOX2 é significante menor (cerca de 3000 vezes) do que NOX1 e NOX4, sugerindo menor envolvimento da gp91^{phox} na produção de O₂^{•-} induzida pela angiotensina II nestas células. Assim, pode-se especular que a ativação do sistema renina-angiotensina local na sobrecarga de ferro na aorta, além de contribuir para a vasoconstrição, por si só, também poderia amplificar a formação de EROs e a subsequente diminuição da biodisponibilidade de NO associada à hiperreatividade aqui identificados. Apesar do efeito significativo do bloqueio AT₁ com losartan sobre a hiperreatividade vascular no grupo Fe, a atividade da ECA e expressão de receptores de AT1 em extratos protéicos de aorta permaneceram semelhantes entre os grupos. Embora não tenhamos nenhuma explicação definitiva para estes resultados contraditórios, pode-se especular que há uma sensibilidade crescente das vias de sinalização intracelular ativadas pela ligação da angiotensina II ao receptor AT1 na sobrecarga de ferro, visto que a própria resposta constrictora induzida pela angiotensina II incubada agudamente nos anéis de aorta do grupo Fe foi maior quando comparada a do grupo Ct.

Além disso, assim como a angiotensina II, estudos descrevem que os produtos derivados da COX, tais como prostaglandina H₂, prostaglandina F_{2α} e tromboxano A₂ podem, além de promover vasoconstrição, aumentar a atividade e/ou

expressão da NADPH oxidase e como consequência, induzir a produção de EROs (Martinez-Revelles *et al.*, 2013). Nesse sentido, os resultados evidenciam, de fato, um importante envolvimento também da via da COX neste aumento de reatividade no grupo submetido à sobrecarga de Fe, pois a incubação com o inibidor não seletivo da COX indometacina reduziu significativamente a reatividade no grupo Fe, sem alterá-la no Ct, sugerindo ainda haver um predomínio da ação dos prostanóides vasoconstritores.

Como uns dos principais produtos originados da COX com ação vasoconstritora é o tromboxano A_2 , os anéis de aorta foram incubados com SQ 29598, um antagonista seletivo para o receptor TP, antes da realização de curvas concentração-resposta à fenilefrina. A inibição do receptor TP reduziu de forma estatisticamente significativa a contração à fenilefrina no grupo Fe de maneira tão eficaz quando a indometacina, demonstrando assim importante participação do TXA_2 na disfunção vascular durante a sobrecarga crônica de ferro. Já é bem descrito na literatura que a angiotensina II pode aumentar a atividade e/ou expressão da isoforma induzível da COX, a COX-2 (Alvarez *et al.*, 2007; Beltran *et al.*, 2009), que por sua vez é muito importante na produção de prostanóides contráteis (Alvarez *et al.*, 2005).

Em face de todas as alterações identificadas na aorta justificando a hiperreatividade contrátil e disfunção endotelial neste vaso de condutância, qualquer alteração na pressão arterial foi identificada ao longo deste protocolo de sobrecarga de ferro crônica. A respeito disso, considerando que os principais vasos responsáveis pela resistência vascular periférica são aqueles de pequeno calibre e mais muscularizados, é possível especular que neste modelo, a resistência vascular total não tenha sido significativamente modificada, a despeito do aumento de resposta vasocontrátil em amostras de aorta. É possível que o tempo de administração utilizado ou nível de sobrecarga atingido não tenham sido suficientes para conduzir à alterações de pressão arterial. De fato, os estudos em animais ou seres humanos com sobrecarga de ferro não encontraram aumento da pressão arterial (Gaenger *et al.*, 2002; Kukongviriyapan *et al.*, 2008; Cusma *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2005), e alguns estudos revelam ainda hipotensão arterial (Oudit *et al.*, 2003; Oudit *et al.*, 2004), que também foi encontrada nos animais utilizados no presente estudo, quando anestesiados. Além disso, também houve diminuição da pressão intraventricular esquerda e direita, assim como das derivadas

temporais positivas e negativas de ambos ventrículos, o que corrobora outros estudos de sobrecarga de Fe em roedores (Oudit *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2004). Finalmente, considerando que a pressão arterial é um produto da resistência periférica pelo débito cardíaco, é de salientar que a cardiopatia característica de condições severas de sobrecarga de ferro poderia esconder elevações da pressão arterial resultante de um aumento da resistência vascular periférica, ou ainda ser a responsável pela hipotensão arterial (Oudit *et al.*, 2003;Oudit *et al.*, 2004), com diminuição do trabalho cardíaco e da fração de ejeção (Kramer *et al.*, 2012).

6. CONCLUSÃO

Esses dados demonstram pela primeira vez que a sobrecarga crônica de ferro está associada à alteração na reatividade vascular devido à disfunção endotelial no modelo experimental de sobrecarga de ferro em ratos. Nossos dados sugerem que estas alterações estão relacionadas à redução da biodisponibilidade de NO e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, provavelmente mediado pela NADPH oxidase e xantina oxidase vascular, com significativo envolvimento do sistema renina-angiotensina local e da via da cicloxigenase.

Assim, esses resultados levantam a proposta de que a disfunção vascular possa vir a constituir um importante fenótipo a ser investigado na sobrecarga de ferro, visto que independente da presença ou não de franca cardiopatia, o estresse oxidativo e disfunção endotelial poderiam conduzir à aterosclerose, trombose, inflamação e subperfusão de órgãos e sistemas vitais, contribuindo assim para o aumento do risco cardiovascular identificado nessas condições.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adly AA, El-Sherif NH, Ismail EA, El-Zaher YA, Farouk A, El-Refaey AM, & Wahba MS (2014) . Vascular Dysfunction in Patients With Young beta-Thalassemia: Relation to Cardiovascular Complications and Subclinical Atherosclerosis. *Clin Appl Thromb Hemost*.

Alvarez Y, Briones AM, Balfagon G, Alonso MJ, & Salaices M (2005) . Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens* **23**, 767-777.

Alvarez Y, Perez-Giron JV, Hernanz R, Briones AM, Garcia-Redondo A, Beltran A, Alonso MJ, & Salaices M (2007) . Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 381-388.

Araujo JA, Romano EL, Brito BE, Parthe V, Romano M, Bracho M, Montano RF, & Cardier J (1995) . Iron overload augments the development of atherosclerotic lesions in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1172-1180.

Arthur MJ (1996) . Iron overload and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* **11**, 1124-1129.

Bacon BR & Britton RS (1990) . The pathology of hepatic iron overload: a free radical--mediated process? *Hepatology* **11**, 127-137.

Bacon BR & Sadiq SA (1997) . Hereditary hemochromatosis: presentation and diagnosis in the 1990s. *Am J Gastroenterol* **92**, 784-789.

Bartfay WJ & Bartfay E (2000a) . Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. *Biol Res Nurs* **2**, 49-59.

Bartfay WJ & Bartfay E (2000b) . Systemic oxygen-free radical production in iron-loaded mice. *West J Nurs Res* **22**, 927-935.

Bartfay WJ, Butany J, Lehotay DC, Sole MJ, Hou D, Bartfay E, & Liu PP (1999a) . A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice. *Cardiovasc Pathol* **8**, 305-314.

Bartfay WJ, Dawood F, Wen WH, Lehotay DC, Hou D, Bartfay E, Luo X, Backx PH, & Liu PP (1999b) . Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc Res* **43**, 892-900.

Beltran AE, Briones AM, Garcia-Redondo AB, Rodriguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martinez-Gonzalez J, & Salaices M (2009) . p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* **27**, 142-154.

Beny JL & Brunet PC (1988) . Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta. *J Physiol* **398**, 277-289.

Berdoukas V, Nord A, Carson S, Puliyl M, Hofstra T, Wood J, & Coates TD (2013) . Tissue iron evaluation in chronically transfused children shows significant levels of iron loading at a very young age. *Am J Hematol* **88**, E283-E285.

Bishu K & Agarwal R (2006) . Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety. *Clin J Am Soc Nephrol* **1 Suppl 1**, S19-S23.

Bokare AD & Choi W (2014) . Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *J Hazard Mater* **275**, 121-135.

Bonkovsky HL & Lambrecht RW (2000) . Iron-induced liver injury. *Clin Liver Dis* **4**, 409-vii.

Bradford MM (1976) . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 853. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2011/prt0853_05_12_2011.html.

Acesso: 19/05/2015. 2011.

Ref Type: Generic

Briones AM & Touyz RM (2010) . Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep* **12**, 135-142.

Buja LM & Roberts WC (1971) . Iron in the heart. Etiology and clinical significance. *Am J Med* **51**, 209-221.

Burkitt MJ & Mason RP (1991) . Direct evidence for in vivo hydroxyl-radical generation in experimental iron overload: an ESR spin-trapping investigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8440-8444.

Byler RM, Sherman NA, Wallner JS, & Horwitz LD (1994) . Hydrogen peroxide cytotoxicity in cultured cardiac myocytes is iron dependent. *Am J Physiol* **266**, H121-H127.

Cai H (2005a) . Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* **68**, 26-36.

Cai H (2005b) . NAD (P) H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res* **96**, 818-822.

Cai H & Harrison DG (2000) . Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**, 840-844.

Cardoso LM, Pedrosa ML, Silva ME, Moraes MF, Colombari E, & Chianca DA, Jr. (2005) . Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. *Braz J Med Biol Res* **38**, 205-214.

Cheng CF & Lian WS (2013) . Prooxidant mechanisms in iron overload cardiomyopathy. *Biomed Res Int* **2013**, 740573.

Chevrant-Breton J, Simon M, Bourel M, & Ferrand B (1977) . Cutaneous manifestations of idiopathic hemochromatosis. Study of 100 cases. *Arch Dermatol* **113**, 161-165.

Cowan CL & Cohen RA (1991) . Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am J Physiol* **261**, H830-H835.

Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveirados-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, & Penninger JM (2002) . Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737-749.

Cseko C, Bagi Z, & Koller A (2004) . Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. *J Appl Physiol* (1985) **97**, 1130-1137.

Cusma PM, Piraino B, Zito C, Khandheria BK, Di BG, De GC, Oreto L, Rigoli L, Ferrau V, Salpietro CD, & Carerj S (2013) . Early identification of cardiovascular involvement in patients with beta-thalassemia major. *Am J Cardiol* **112**, 1246-1251.

Danjou F, Origa R, Anni F, Saba L, Cossa S, Podda G, & Galanello R (2013) . Longitudinal analysis of heart and liver iron in thalassemia major patients according to chelation treatment. *Blood Cells Mol Dis* **51**, 142-145.

Darshan D & Anderson GJ (2009) . Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* **22**, 77-87.

Davis MT & Bartfay WJ (2004) . Dose-dependent effects of chronic iron burden on heart aldehyde and acyloin production in mice. *Biol Trace Elem Res* **99**, 255-268.

Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, & Fay WP (2003) . Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation* **107**, 2601-2606.

De Meyer GR & Herman AG (1997a) . Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* **39**, 325-342.

De Meyer GR & Herman AG (1997b) . Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* **39**, 325-342.

de Vernejoul MC, Pointillart A, Golenzer CC, Morieux C, Bielakoff J, Modrowski D, & Miravet L (1984) . Effects of iron overload on bone remodeling in pigs. *Am J Pathol* **116**, 377-384.

Demant AW, Schmiedel A, Buttner R, Lewalter T, & Reichel C (2007) . Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* **96**, 900-903.

Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, & Bacon BR (1992) . Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* **102**, 2108-2113.

Diamond T, Pojer R, Stiel D, Alfrey A, & Posen S (1991) . Does iron affect osteoblast function? Studies in vitro and in patients with chronic liver disease. *Calcif Tissue Int* **48**, 373-379.

Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, Gausson V, & London GM (2002) . Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* **106**, 2212-2217.

Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, & Sobey CG (2011) . Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 453-471.

Dunn LL, Suryo RY, & Richardson DR (2007) . Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* **17**, 93-100.

Edison ES, Bajel A, & Chandy M (2008) . Iron homeostasis: new players, newer insights. *Eur J Haematol* **81**, 411-424.

Edwards CQ, Kelly TM, Ellwein G, & Kushner JP (1983) . Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Arch Intern Med* **143**, 1890-1893.

Edwards G & Weston AH (1990) . Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. *Pharmacol Ther* **48**, 237-258.

Feletou M, Huang Y, & Vanhoutte PM (2010) . Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch* **459**, 941-950.

Feletou M, Huang Y, & Vanhoutte PM (2011) . Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* **164**, 894-912.

Feletou M, Kohler R, & Vanhoutte PM (2012) . Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann Med* **44**, 694-716.

Feletou M & Vanhoutte PM (2006a) . Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1215-1225.

Feletou M & Vanhoutte PM (2006b) . Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1215-1225.

Feletou M & Vanhoutte PM (2009) . EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* **117**, 139-155.

Ferrer-Sueta G & Radi R (2009) . Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* **4**, 161-177.

Fine JS (2000) . Iron poisoning. *Curr Probl Pediatr* **30**, 71-90.

Furchgott RF & Zawadzki JV (1980) . The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.

Gaenger H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J, & Weiss G (2002) . Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol* **40**, 2189-2194.

Galanello R & Origa R (2010) . Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* **5**, 11.

Ganz T (2013) . Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* **93**, 1721-1741.

Gao X, Qian M, Campian JL, Marshall J, Zhou Z, Roberts AM, Kang YJ, Prabhu SD, Sun XF, & Eaton JW (2010) . Mitochondrial dysfunction may explain the cardiomyopathy of chronic iron overload. *Free Radic Biol Med* **49**, 401-407.

Garrido AM & Griendling KK (2009) . NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* **302**, 148-158.

Gattermann N (2009) . The treatment of secondary hemochromatosis. *Dtsch Arztebl Int* **106**, 499-504, I.

Grotto HZW. **Fisiologia e metabolismo do ferro**. REVISTA BRASILEIRADE HEMATOLOGIAE HEMOTERAPIA 32, 8-17. 2010.

Ref Type: Generic

Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, & Rochette L (2014) . Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res* **58**, 1721-1738.

Hahalis G, Kremastinos DT, Terzis G, Kalogeropoulos AP, Chrysanthopoulou A, Karakantza M, Kourakli A, Adamopoulos S, Tselepis AD, Grapsas N, Siablis D, Zoumbos NC, & Alexopoulos D (2008). Global vasomotor dysfunction and accelerated vascular aging in beta-thalassemia major. *Atherosclerosis* **198**, 448-457.

Hamilton EB, Bomford AB, Laws JW, & Williams R (1981). The natural history of arthritis in idiopathic haemochromatosis: progression of the clinical and radiological features over ten years. *Q J Med* **50**, 321-329.

Harris ZL, Klomp LW, & Gitlin JD (1998). Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr* **67**, 972S-977S.

Hasunuma K, Yamaguchi T, Rodman DM, O'Brien RF, & McMurtry IF (1991). Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. *Am J Physiol* **260**, L97-104.

Heinecke JW, Rosen H, & Chait A (1984). Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* **74**, 1890-1894.

Heistad DD (2006). Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 689-695.

Heumuller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schroder K, & Brandes RP (2008). Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* **51**, 211-217.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, & Kihara Y (2009) . Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* **73**, 411-418.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, & Morgan KG (1996) . Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* **76**, 967-1003.

Hramiak IM, Finegood DT, & Adams PC (1997) . Factors affecting glucose tolerance in hereditary hemochromatosis. *Clin Invest Med* **20**, 110-118.

Huxtable RJ (1992) . Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* **72**, 101-163.

Irani K (2000) . Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* **87**, 179-183.

Jiang H, Song N, Wang J, Ren LY, & Xie JX (2007) . Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Neurochem Int* **51**, 32-36.

Kehrer JP (2000) . The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43-50.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, & Nagano T (1998) . Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**, 2446-2453.

Kramer JH, Spurney CF, Iantorno M, Tziros C, Chmielinska JJ, Mak IT, & Weglicki WB (2012) . d-Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 1257-1268.

Kremastinos DT & Farmakis D (2011) . Iron overload cardiomyopathy in clinical practice. *Circulation* **124**, 2253-2263.

Kukongviriyapan V, Somparn N, Senggunprai L, Prawan A, Kukongviriyapan U, & Jetsrisuparb A (2008) . Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric patients with hemoglobin E-beta thalassemia. *Pediatr Cardiol* **29**, 130-135.

Lassegue B & Clempus RE (2003) . Vascular NAD (P) H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R277-R297.

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, & Griending KK (2001) . Novel gp91 (phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* **88**, 888-894.

Lee TS, Shiao MS, Pan CC, & Chau LY (1999) . Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Circulation* **99**, 1222-1229.

Legssyer R, Josse C, Piette J, Ward RJ, & Crichton RR (2003) . Changes in function of iron-loaded alveolar macrophages after in vivo administration of desferrioxamine and/or chloroquine. *J Inorg Biochem* **94**, 36-42.

Lekakis J, Papamicheal C, Stamatelopoulos K, Cimponeriu A, Voutsas A, Vemmos K, Mavrikakis M, & Stamatelopoulos S (1999) . Hemochromatosis associated with endothelial dysfunction: evidence for the role of iron stores in early atherogenesis. *Vasc Med* **4**, 147-148.

Lipinski B & Pretorius E (2013) . Iron-induced fibrin in cardiovascular disease. *Curr Neurovasc Res* **10**, 269-274.

Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, & Cousins RJ (2006) . Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13612-13617.

Lloyd RV, Hanna PM, & Mason RP (1997) . The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* **22**, 885-888.

Lobato NS, Figueira FP, Akamine EH, Davel AP, Rossoni LV, Tostes RC, Carvalho MH, & Fortes ZB (2011) . Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **21**, 808-816.

Lou LX, Geng B, Chen Y, Yu F, Zhao J, & Tang CS (2009) . Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 612-618.

Lucesoli F, Caligiuri M, Roberti MF, Perazzo JC, & Fraga CG (1999) . Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch Biochem Biophys* **372**, 37-43.

Luscher TF (1990) . Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Hypertens* **3**, 317-330.

Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, & Yang ZH (1992) . Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* **19**, 117-130.

Lyle AN & Griendling KK (2006) . Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* **21**, 269-280.

Ma Z, Zhou Y, & Xie J (2012) . Nifedipine prevents iron accumulation and reverses iron-overload-induced dopamine neuron degeneration in the substantia nigra of rats. *Neurotox Res* **22**, 274-279.

Madiwale T & Liebelt E (2006) . Iron: not a benign therapeutic drug. *Curr Opin Pediatr* **18**, 174-179.

Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat P, Choubtum L, Sriphrapadang A, Domrongkitchaiporn S, Sirisriro R, & Rajatanavin R (2003) . Bone histomorphometry in children and adolescents with beta-thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 3966-3972.

Mandalunis P & Ubios A (2005) . Experimental renal failure and iron overload: a histomorphometric study in rat tibia. *Toxicol Pathol* **33**, 398-403.

Mandalunis PM, Cabrini RL, & Ubios AM (1997) . Iron overloading inhibits endochondral ossification. *Acta Odontol Latinoam* **10**, 55-61.

Marasciulo FL, Montagnani M, & Potenza MA (2006) . Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem* **13**, 1655-1665.

Martinez-Revelles S, Avendano MS, Garcia-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Perez-Giron JV, Garcia-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, & Salices M (2013) . Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* **18**, 51-65.

Mehta PK & Griendling KK (2007a) . Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C82-C97.

Mehta PK & Griendling KK (2007b) . Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C82-C97.

Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, Brissot P, David V, & Deugnier Y (1999) . Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* **117**, 1155-1163.

Moncada S, Herman AG, Higgs EA, & Vane JR (1977) . Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* **11**, 323-344.

Moncada S & Higgs EA (2006) . Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* **213-254**.

Moncada S, Palmer RM, & Higgs EA (1991) . Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.

Montezano AC & Touyz RM (2012) . Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **110**, 87-94.

Moon SN, Han JW, Hwang HS, Kim MJ, Lee SJ, Lee JY, Oh CK, & Jeong DC (2011) . Establishment of secondary iron overloaded mouse model: evaluation of

cardiac function and analysis according to iron concentration. *Pediatr Cardiol* **32**, 947-952.

Morrison ED, Brandhagen DJ, Phatak PD, Barton JC, Krawitt EL, El-Serag HB, Gordon SC, Galan MV, Tung BY, Ioannou GN, & Kowdley KV (2003) . Serum ferritin level predicts advanced hepatic fibrosis among U.S. patients with phenotypic hemochromatosis. *Ann Intern Med* **138**, 627-633.

Murphy CJ & Oudit GY (2010) . Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Card Fail* **16**, 888-900.

Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklosi J, Mehes G, Csonka T, Smith A, Vercellotti GM, Balla G, & Balla J (2010) . Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1347-1353.

Naithani R, Chandra J, Bhattacharjee J, Verma P, & Narayan S (2006) . Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with beta-thalassemia major. *Pediatr Blood Cancer* **46**, 780-785.

Najafzadeh H, Jalali MR, Morovvati H, & Taravati F (2010) . Comparison of the prophylactic effect of silymarin and deferoxamine on iron overload-induced hepatotoxicity in rat. *J Med Toxicol* **6**, 22-26.

Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, & Lederer WJ (1995) . Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**, 633-637.

Nelson MT & Quayle JM (1995) . Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* **268**, C799-C822.

Nguyen Dinh CA, Montezano AC, Burger D, & Touyz RM (2013) . Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal* **19**, 1110-1120.

Nunes DO, Almenara CC, Broseghini-Filho GB, Silva MA, Stefanon I, Vassallo DV, & Padilha AS (2014) . Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids Health Dis* **13**, 107.

Oliveira F, Rocha S, & Fernandes R (2014) . Iron metabolism: from health to disease. *J Clin Lab Anal* **28**, 210-218.

Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, & Powell LW (1999) . A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* **341**, 718-724.

Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, Koch SE, Dawood F, Ackerley C, Yazdanpanah M, Wilson GJ, Schwartz A, Liu PP, & Backx PH (2003) . L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med* **9**, 1187-1194.

Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Husain T, Wilson GJ, Liu P, Sole MJ, & Backx PH (2004) . Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation* **109**, 1877-1885.

Palmer RM, Ferrige AG, & Moncada S (1987) . Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.

Pardo Andreu GL, Inada NM, Vercesi AE, & Curti C (2009) . Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. *Arch Toxicol* **83**, 47-53.

Pennell DJ, Udelson JE, Arai AE, Bozkurt B, Cohen AR, Galanello R, Hoffman TM, Kiernan MS, Lerakis S, Piga A, Porter JB, Walker JM, & Wood J (2013) . Cardiovascular function and treatment in beta-thalassemia major: a consensus statement from the American Heart Association. *Circulation* **128**, 281-308.

Pippard MJ, Callender ST, Warner GT, & Weatherall DJ (1979) . Iron absorption and loading in beta-thalassaemia intermedia. *Lancet* **2**, 819-821.

Ponka P, Beaumont C, & Richardson DR (1998) . Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* **35**, 35-54.

Ramm GA & Ruddell RG (2005) . Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* **25**, 433-449.

Rao GN & Berk BC (1992) . Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* **70**, 593-599.

Reis KA, Guz G, Ozdemir H, Erten Y, Atalay V, Bicik Z, Ozkurt ZN, Bali M, & Sindel S (2005) . Intravenous iron therapy as a possible risk factor for atherosclerosis in end-stage renal disease. *Int Heart J* **46**, 255-264.

Ribeiro RF, Jr., Potratz FF, Pavan BM, Forechi L, Lima FL, Fiorim J, Fernandes AA, Vassallo DV, & Stefanon I (2013) . Carvedilol prevents ovariectomy-induced myocardial contractile dysfunction in female rat. *PLoS One* **8**, e53226.

Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M, & Marin J (1998) . Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* **125**, 1329-1335.

Rodriguez-Pascual F, Busnadiego O, Lagares D, & Lamas S (2011) . Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacol Res* **63**, 463-472.

Russo G, Leopold JA, & Loscalzo J (2002) . Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* **38**, 259-269.

Salamanca DA & Khalil RA (2005) . Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol* **70**, 1537-1547.

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.

Schellhammer PF, Engle MA, & Hagstrom JW (1967) . Histochemical studies of the myocardium and conduction system in acquired iron-storage disease. *Circulation* **35**, 631-637.

Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, & Munzel T (2008) . Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1115-1126.

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.

Siddique A & Kowdley KV (2012) . Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther* **35**, 876-893.

Siminoski K, D'Costa M, & Walfish PG (1990) . Hypogonadotropic hypogonadism in idiopathic hemochromatosis: evidence for combined hypothalamic and pituitary involvement. *J Endocrinol Invest* **13**, 849-853.

Skordis N & Kyriakou A (2011) . The multifactorial origin of growth failure in thalassaemia. *Pediatr Endocrinol Rev* **8 Suppl 2**, 271-277.

Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, & Halliwell B (1992) . Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* **286 (Pt 3)** , 901-905.

Somlyo AP & Somlyo AV (2003) . Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358.

Sood MM, Oudit GY, Mohammadi H, Huang H, & Lok CE (2008) . Effects of parenteral iron on inflammation and the myocardium in hemodialysis patients. *Hemodial Int* **12**, 362-368.

Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, & Simonsen U (2003) . [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)* **39**, 333-341.

Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, & Touyz RM (2004) . Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **44**, 200-208.

Taniyama Y & Griendling KK (2003) . Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* **42**, 1075-1081.

Thakali K, Davenport L, Fink GD, & Watts SW (2006a) . Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **47**, 482-487.

Thakali K, Davenport L, Fink GD, & Watts SW (2006b) . Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **47**, 482-487.

Thakerngpol K, Fucharoen S, Boonyaphipat P, Srisook K, Sahaphong S, Vathanophas V, & Stitnimankarn T (1996) . Liver injury due to iron overload in thalassemia: histopathologic and ultrastructural studies. *Biometals* **9**, 177-183.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, & Schiffrin EL (2002) . Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD (P) H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* **90**, 1205-1213.

Touyz RM, Yao G, & Schiffrin EL (2003) . c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 981-987.

Valenti L, Fracanzani AL, Rossi V, Rampini C, Pulixi E, Varenna M, Fargion S, & Sinigaglia L (2008) . The hand arthropathy of hereditary hemochromatosis is strongly associated with iron overload. *J Rheumatol* **35**, 153-158.

Valenti L, Varenna 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.

Vane JR, Anggard EE, & Botting RM (1990) . Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* **323**, 27-36.

Vaziri ND (2014) . Toxic effects of IV iron preparations in CKD patients. *Nephrol News Issues* **28**, 4-5.

Vinchi F, Muckenthaler MU, Da Silva MC, Balla G, Balla J, & Jeney V (2014) . Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level. *Front Pharmacol* **5**, 94.

Wardman P & Candeias LP (1996) . Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* **145**, 523-531.

Webb RC. **Smooth Muscle Contraction and relaxation**. ADV PHYSIOL EDUC 27, 201-206. 2003.

Ref Type: Generic

Winterbourn CC (1995) . Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* **82-83**, 969-974.

Xavier FE, Davel AP, Rossoni LV, & Vassallo DV (2003) . Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vascul Pharmacol* **40**, 67-76.

Xue H, Zhou S, Xiao L, Guo Q, Liu S, & Wu Y (2015) . Hydrogen sulfide improves the endothelial dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Physiol Res*.

Zhang Y, Huang Y, Deng X, Xu Y, Gao Z, & Li H (2012) . Iron overload-induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin. *Eur J Pharmacol* **680**, 95-101.

Zhang Y, Li H, Zhao Y, & Gao Z (2006) . Dietary supplementation of baicalin and quercetin attenuates iron overload induced mouse liver injury. *Eur J Pharmacol* **535**, 263-269.

Zhou XJ, Laszik Z, Wang XQ, Silva FG, & Vaziri ND (2000) . Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. *Lab Invest* **80**, 1905-1914.

Zurlo MG, De SP, Borgna-Pignatti C, Di PA, Piga A, Melevendi C, Di GF, Burattini MG, & Terzoli S (1989) . Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet* **2**, 27-30.