

**Efeitos do exercício físico de intensidade moderada sobre parâmetros sistêmicos e cardíacos da sobrecarga crônica de ferro em ratos**

**Renata Andrade Ávila**

**Tese de Doutorado**

**Programa De Pós-Graduação Em Ciências Fisiológicas**

**Universidade Federal Do Espírito Santo**

Vitória, 2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DA CANDIDATA AO GRAU DE  
DOUTORA PELO PPGCF CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.**

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada "EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO DE INTENSIDADE MODERADA SOBRE PARÂMETROS SISTÊMICOS E CARDÍACOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO EM RATOS" elaborada por RENATA DE ANDRADE ÁVILA, candidata ao Grau de Doutora em Ciências Fisiológicas, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 15 de julho de 2021, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

Reprovada

Vitória, 15 de julho de 2021.

Prof. Dr. Leonardo dos Santos  
(PPGCF-UFES) – Orientador

Prof.ª. Dr.ª. Patricia Chakur Brum  
(EEFE-USP) – Titular externo

Prof. Dr. José Geraldo Mill  
(PPGCF-UFES) – Titular interno

Prof. Dr. Paulo José Ferreira Tucci  
(EPM-UNIFESP) – Titular externo

Prof.ª. Dr.ª. Nazaré Sousa Bissoli  
(PPGCF-UFES) – Titular interno



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

---

A958e AVILA, Renata Andrade, 1990-  
Efeitos do exercício físico de intensidade moderada sobre parâmetros sistêmicos e cardíacos da sobrecarga crônica de ferro em ratos / Renata Andrade AVILA. - 2021.  
95 f. : il.

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

1. Exercício aeróbico. 2. Miocárdio. 3. Cardiomiopatia. 4. Stress oxidativo. 5. Modelos animais em pesquisa. 6. Ferro no organismo. I. dos Santos, Leonardo. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

---

*Abelha fazendo mel vale o tempo que não  
voou.*

*A massa que faz o pão vale a luz do teu suor.*

*Lembra que o sono é sagrado e alimenta de  
horizontes o tempo acordado de viver.*

*...Todo amor é sagrado e o fruto do trabalho é  
mais que sagrado.*

*Amor de índio – Milton Nascimento*

*Para vó Lourdes, minha  
referência de vida, Matias e  
Benjamin, minhas esperanças  
no futuro.*

## **Agradecimentos**

Esta tese é o resultado de um trabalho de doutorado e de um projeto de vida. Embora o estudo tenha sido executado a poucas mãos, foi apoiado em muitos ombros e o sentimento de gratidão por concluir este texto nasce de forma natural.

A Deus, em todas as suas manifestações, agradeço a presença e a força.

Ao professor Leonardo, orientador deste trabalho, agradeço as indicações de caminho, a gentileza das correções, a firmeza do suporte, os desafios apresentados, o encorajamento e a amizade, o retoque em todas as figuras, a referência familiar. Agradeço a Letícia pela convivência e por fazer parte desta história.

A todos os professores do PPGCF, especialmente Alê, Iva e Dalton, que acompanharam de perto minha trajetória e sempre tiveram uma orientação importante no processo e à professora Nazaré por todo o incentivo.

À minha família, desafiada ainda mais nesta reta final pela distância física, por sempre ter encontrado meios de apoiar minhas aventuras e se fazer presente em forma de amor. Pai, mãe e Fabíola, obrigada.

A Matias, Benjamin, Cauã, Luiza e Jully, agradeço a esperança de um mundo mais iluminado e seguro.

Willian, obrigada por ser amor em chás e cafés, por priorizar minhas importâncias, pelo cuidado e pelas perguntas de curiosidade que me fizeram várias vezes refletir sobre este trabalho, sua importância, aplicação e minha habilidade de comunicação. É mais fácil com você e foi uma boa ideia casar no doutorado, Grande.

Queridos amigos, agradeço por existirem, enfeitarem meu caminho e por cada momento vivido nos últimos cinco anos. Marito e Gilson, obrigada por estar sempre perto e me incentivar e criticar. Divo e Divas, obrigada por toda a parceria reafirmada diariamente em todos os aspectos da minha vida. Emilly, minha dupla, obrigada por tudo. Eu não teria conseguido lidar com este projeto sem você. Elis, obrigada por ser referência no trabalho e ninho na vida. Camila, obrigada por compartilhar o sucesso, os pequenos fracassos e todos os processos. Já sinto sua falta!

Júlia e Nath, obrigada por serem apoio e amor em tudo que faço. Karla, obrigada por tornar as coisas mais fáceis e divertidas.

Aos colegas do LEMC e do PPGCF, a parceria e a convivência com vocês sempre foram fundamentais. Nay, João, Sabrina e Thiago, obrigada por serem tão especiais na minha vida e trajetória.

Aos meus alunos, agradeço por darem significado a este processo.

Ao CNPq e à FAPES, agradeço o apoio financeiro. À CAPES, além do fomento, agradeço a oportunidade de conviver, ainda que virtualmente, com os Bolsistas CAPES do Brasil e do exterior e aprender tanto todos os dias com as experiências de cada um. Em especial agradeço aos lunáticos amigos companheiros que este grupo me deu: Anderson, Ana Deyvis, Cristine, Natália, Girliani, Flávia, Bruno, Daniel, Rennan, Leonardo, Galileu e Lucas. Há pedacinhos de vocês nas linhas deste trabalho.

Enfim, agradeço ao povo brasileiro que financia as pesquisas científicas, os doutoramentos e a formação universitária pública no Brasil. Me esforçarei todos os dias para retribuir o investimento público realizado em minha educação nos últimos 25 anos, tentando trazer luz e construindo conhecimento.

## Sumário

<b>Lista de Tabelas</b> .....	7
<b>Abreviações e siglas</b> .....	9
<b>Resumo</b> .....	11
<b>1. Introdução</b> .....	14
<b>1.1 Ferro e homeostase</b> .....	14
<b>1.2 Metabolismo do ferro em mamíferos</b> .....	15
<b>2. Sobrecarga de Ferro</b> .....	18
<b>2.1 Tipos de sobrecarga de ferro</b> .....	19
<b>2.2 Alterações orgânicas associadas a sobrecarga de ferro</b> .....	20
<b>3. Efeitos da sobrecarga de ferro sobre a função cardíaca</b> .....	22
<b>3.1 Mecanismos envolvidos na insuficiência cardíaca provocada por ferro</b> .....	23
<b>3.2 Efeitos agudos da sobrecarga de ferro sobre o acoplamento excitação contração</b>	27
<b>4. Exercício físico e cardioproteção</b> .....	29
<b>4.1 Exercício aeróbio na cardiopatia</b> .....	31
<b>5. Justificativa</b> .....	32
<b>6. Objetivos</b> .....	35
<b>7. Material e Métodos</b> .....	36
<b>7.1 Modelo experimental</b> .....	36
<b>7.2 Análises hemodinâmicas</b> .....	37
<b>7.3 Análise da contratilidade miocárdica</b> .....	38
<b>7.4 Análises ponderais e depósito de ferro</b> .....	40
<b>7.5 Análises histológicas</b> .....	41
<b>7.6 Medição dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</b> .....	42
<b>7.7 Análise proteica pela técnica de Western blotting</b> .....	43
<b>7.8 Análise Estatística</b> .....	44
<b>8. Resultados</b> .....	45
<b>8.1 Estabelecimento do modelo de sobrecarga crônica de ferro</b> .....	45
<b>8.2 Caracterização do modelo experimental</b> .....	46
<b>8.4 Análises de função cardíaca</b> .....	50
<b>8.5 Respostas inotrópicas do músculo papilar</b> .....	53
<b>8.6 Expressão da PKA cardíaca e alvos fosforiláveis</b> .....	55
<b>9. Discussão</b> .....	57
<b>10. Conclusão</b> .....	71
<b>11. Referências Bibliográfica</b>	72



**Anexo 1: Resumo do artigo “Moderate-intensity aerobic training reduces cardiac damage due to iron overload in rats” publicado na revista EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY. .... 89**

### **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Efeitos do exercício aeróbico em parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro e enzimas indicadoras de dano cardíaco e hepático sobrecarga de ferro.

**Tabela 2.** Efeitos da sobrecarga de ferro e treinamento aeróbico de intensidade moderada sobre indicadores de capacidade física

**Tabela 3.** Efeitos da sobrecarga de ferro e treinamento aeróbico de intensidade moderada sobre os parâmetros hemodinâmicos

### **Lista de Figuras**

**Figura 1.** A – Principais vias de absorção do ferro iônico de origem dietética nos enterócitos

**Figura 2** – Ferro como elemento estrutural de proteínas.

**Figura 3.** Espectro do desenvolvimento de doenças do coração em pacientes com sobrecarga crônica de ferro.

**Figura 4.** Representação do processo de acoplamento excitação–contração do músculo cardíaco.

**Figura 5.** Influxo e distribuição intracelular do ferro em cardiomiócitos.

**Figura 6.** Efeitos da incubação aguda de  $Fe^{2+}$  na contratilidade de miocárdio de ratos.

**Figura 7.** Adaptações na função cardiovascular com treinamento de exercícios aeróbicos.

**Figura 8.** Esquema representativo do protocolo de exposição ao ferro e exercício físico aeróbico de intensidade moderada.

**Figura 9.** Representação do protocolo de cateterização para avaliação hemodinâmica.

**Figura 10:** Esquema representativo do protocolo de avaliação de contratilidade do músculo papilar.

**Figura 11.** Efeito da dose e tempo de exposição ao ferro sobre a força de contração do músculo papilar de ratos.

**Figura 12.** Trabalho desempenhado pelos animais nos testes de esforço inicial e final.

**Figura 13.** Microfotografias representativas de seções de fígado coradas com azul da Prússia ou Picrossirius dos grupos experimentais.

**Figura 14.** Microfotografias representativas de seções de coração coradas com azul da Prússia ou Picrossirius de grupos experimentais.

**Figura 15.** Níveis plasmáticos de malondialdeído, creatina fosfoquinase sérica, creatina fosfoquinase-MB e enzimas antioxidantes.

**Figura 16.** A mecânica miocárdica avaliada como força desenvolvida, suas derivadas e tempo de ativação e para 50% de relaxamento.

**Figura 17.** Respostas inotrópicas do músculo papilar.

**Figura 18.** Respostas inotrópicas do músculo papilar ao isoproterenol (a) e ao aumento de  $Ca^{2+}$  na solução do banho.

**Figura 19.** Avaliação de conteúdos de PKA e substratos fosforilados no miocárdio dos grupos experimentais foram avaliados por *imunoblotting*.

**Figura 20.** Indução da fibrose hepática pela sobrecarga de ferro.

**Figura 21.** Injúria cardíaca provocada pela sobrecarga crônica de ferro em rato.

**Figura 22.** Esquema representativo dos efeitos da sobrecarga de ferro e do exercício aeróbico moderado em parâmetros sistêmicos e cardíacos.

## Abreviações e siglas

ALT: alanina aminotransferase

ANOVA: Análise de Variância

AST: aspartato aminotransferase CaCl<sub>2</sub>: Cloreto de cálcio

CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais

CK: creatinoquinase CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Cys: cisteína

DCV: Doenças cardiovasculares

DMT-1: Transportador de metal divalente 1

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: etilenodiaminotetracético

EPM: Erro padrão da média

ERO: Espécie Reativa do Oxigênio

FAL: fosfatase alcalina

FC: Frequência Cardíaca

Fe: Ferro

Fe<sup>2+</sup>: Ferro ferroso

Fe<sup>3+</sup>: Ferro férrico

HJV: hemojuvelina

Hamp: gene codificador da hepcidina

i.p: via intraperitoneal

IRE: elemento responsivo do ferro

MDA: malondialdeído

MTP1: proteína transportadora de metal

NaCl: Cloreto de sódio

NO: Óxido Nítrico

PA: Pressão arterial

PKA: proteína quinase A

PRC: contração pós repouso

PPP: potenciação pós pausa

PSVE: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

SDS: dodecil sulfato de sódio

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Tf: Transferrina

TfR: Receptor da transferrina

Tyr: tirosina

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VMC: Velocidade máxima de corrida

## Resumo

**Introdução e objetivos:** O ferro é um micronutriente essencial em vários processos vitais e manutenção da homeostase corporal. Entretanto, seu excesso pode causar danos aos órgãos devido, principalmente, ao estresse oxidativo observado nesta condição, sendo a cardiomiopatia a principal causa de morte em pacientes com sobrecarga de ferro. Embora o exercício físico seja considerado há muito tempo uma ferramenta cardioprotetora e antioxidante, seus efeitos sobre a sobrecarga de ferro ainda não foram definidos. Por isso, este estudo foi desenhado para investigar os efeitos do treinamento aeróbio de intensidade moderada em um modelo de roedor com sobrecarga crônica de ferro. **Material e métodos:** Ratos Wistar receberam injeções intraperitoneais de ferro-dextrano 100 mg/kg/dia, 5 dias/semana por 4 semanas ou solução salina (NaCl 0,9%) no mesmo regime. Ao final, os animais injetados com ferro-dextrano foram randomizados em dois subgrupos, sendo mantidos não treinados ou submetidos ao exercício físico (60 min/dia, treinamento aeróbio progressivo a 60-70% da velocidade máxima, 5 dias/semana em uma esteira elétrica) nas 8 semanas seguintes. Ao final, a hemodinâmica ventricular esquerda foi registrada, e amostras de sangue, fígado e coração foram coletadas. Além disso, a mecânica miocárdica foi avaliada "in vitro" em músculos papilares isolados do ventrículo esquerdo, e o remodelamento cardíaco foi avaliado por histologia e *immunoblotting*. **Principais resultados:** O protocolo adotado no estudo foi eficiente em desenvolver um modelo de sobrecarga crônica de ferro em que os níveis séricos de ferro permaneceram aumentados e a saturação de transferrina também mantida acima de 20-50%, consistente com o que é encontrado em pacientes nessas condições. Confirmando o modelo experimental, a sobrecarga de ferro levou à deposição de ferro no fígado, fibrose e aumento da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) séricas. Além disso, o acúmulo de ferro cardíaco foi acompanhado por comprometimento da mecânica miocárdica, aumento do colágeno cardíaco tipo I e peroxidação lipídica (TBARS), e liberação de CK-MB no soro. Embora o exercício físico de intensidade moderada não tenha influenciado os níveis de ferro, os marcadores de lesão (AST, CK-MB e TBARS) foram significativamente reduzidos, em associação com o aumento da enzima antioxidante endógena catalase. Da mesma forma, a contratilidade miocárdica e a responsividade inotrópica ao cálcio e ao isoproterenol foram melhoradas nos ratos exercitados, assim

como os níveis de fosforilação de substratos fosforiláveis pela PKA. **Conclusão:** O exercício aeróbio de intensidade moderada atenuou o dano cardíaco e o estresse oxidativo neste modelo experimental, podendo, dessa forma, representar uma ferramenta terapêutica adjuvante não-farmacológica potencialmente útil na cardiomiopatia da sobrecarga de ferro.

**Palavras-chave:** Exercício aeróbio; Mecânica miocárdica; Cardiomiopatia por sobrecarga de ferro; Estresse oxidativo; Modelos animais.

## Abstract

**Background and goals:** Iron is an essential micronutrient in several vital processes and maintenance of body homeostasis. However, its excess can cause organ damage, mainly due to the oxidative stress observed in this condition, with cardiomyopathy being the main cause of death in patients with iron overload. Although exercise has long been considered a cardioprotective tool, its effects on iron overload are unknown. This study was designed to investigate the effects of moderate-intensity aerobic training in a rodent model with chronic iron overload. **Materials and methods:** Wistar rats received intraperitoneal injections of iron-dextran 100 mg/kg/day, 5 days/week for 4 weeks and then were kept untrained or submitted to physical exercise on a treadmill (60 min/day, progressive aerobic training at 60-70% of maximum speed, 5 days/week) in the following 8 weeks. At the end, left ventricular hemodynamics were assessed, and blood, liver and heart samples were collected. In addition, myocardial mechanics was studied "in vitro" in isolated left ventricular papillary muscles, and cardiac remodeling was evaluated by histology and immunoblotting. **Main results:** The protocol adopted in the study was efficient in developing the chronic iron overload model in which serum iron levels remained increased and transfer saturation also maintained above 20-50%, consistent with what is found in patients with these conditions. Confirming the experimental model, iron overload led to liver iron deposition and fibrosis and increased serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). In addition, cardiac iron accumulation was accompanied by impaired myocardial mechanics, increased cardiac collagen type I and lipid peroxidation (TBARS), and serum CK-MB release. Although moderate-intensity exercise did not influence iron levels, injury markers (AST, CK-MB and TBARS) were significantly reduced in association with an increase in the endogenous antioxidant enzyme catalase. Likewise, myocardial contractility and inotropic responsiveness to calcium and isoproterenol were improved in exercised rats, as were the phosphorylation levels of phosphorylated substrates by PKA. **Conclusion:** Moderate-intensity aerobic exercise attenuated cardiac damage and oxidative stress in this experimental model, and thereby may represent a potentially useful non-pharmacological adjuvant therapeutic tool for iron overload cardiomyopathy.

Key words: Aerobic exercise; Myocardial mechanics; Iron overload cardiomyopathy; Oxidative stress; Animal models



## 1. Introdução

### 1.1 Ferro e homeostase

A Terra é um planeta com abundância de elementos químicos - incluindo metais - e muitos deles desempenham papéis importantes na natureza. Carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre se combinam em uma maravilhosa associação e formam uma variedade de estruturas químicas que compõem a vida no planeta (BÖTTCHER, 2018). Outros elementos, além de compor a crosta, são também essenciais para processos vitais, sendo propagados ao longo da cadeia alimentar como os metais ferro, zinco, cobre, magnésio, manganês, selênio (HEJNA et al., 2018).

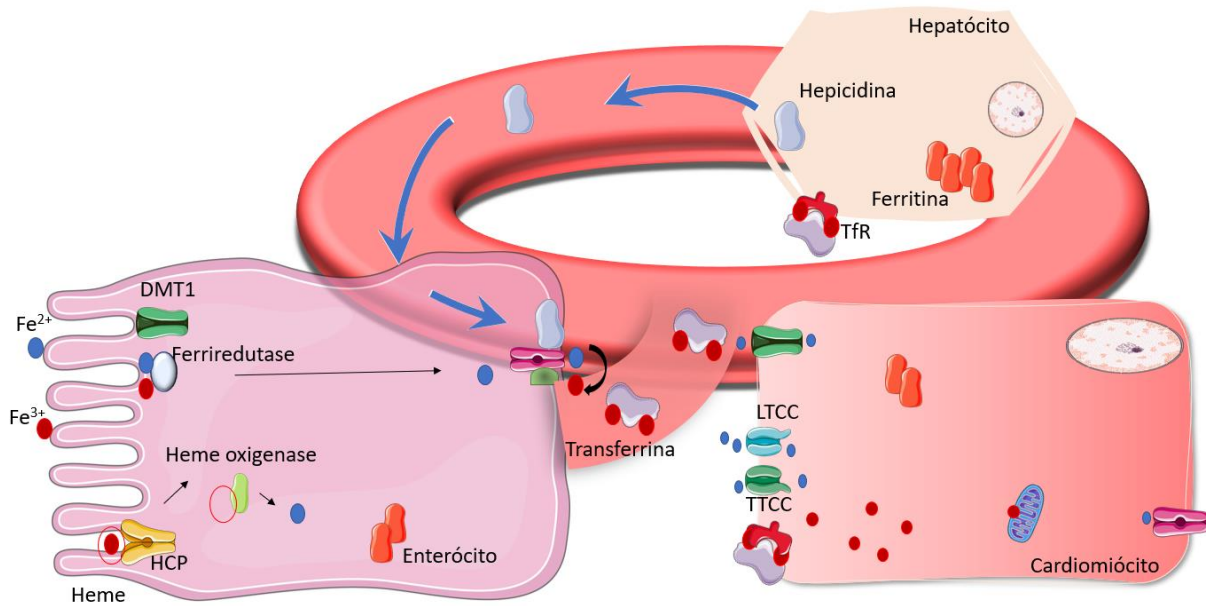
O ferro é o principal componente do núcleo terrestre e um dos metais mais abundantes do planeta, está presente na forma sólida no solo e se relaciona intimamente com atividades antrópicas industriais, bélicas, culturais e alimentares. Durante o início da vida na Terra, este elemento foi fonte de energia para as bactérias primitivas e acompanhou a evolução da vida. Inclusive, uma entre as hipóteses sobre a origem da vida - a hipótese do “metabolismo primeiro” - se baseia na utilização de associações Fe-S no fundo dos mares como fonte de energia para os organismos anaeróbios primitivos, sendo esta, uma característica conservada inclusive nas mitocôndrias atuais (WILLIAMS, 2012). O ferro também está presente como cofator para nitrogenases de bactérias fixadoras de nitrogênio para ser disponibilizado ao ecossistema, e está presente, por exemplo, em bases nitrogenadas e aminoácidos (NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003).

Não obstante, o ferro é um importante micronutriente também para os seres humanos e outros vertebrados, sendo essencial para o processo de eritropoiese, metabolismo oxidativo, síntese de DNA e respostas celulares imunológicas, cofator enzimático de muitas reações e fundamental para o transporte de elétrons na respiração de quase todos os organismos aeróbios conhecidos (BARUPALA et al., 2016; SOUSA et al., 2020). Durante o desenvolvimento embrionário, o ferro é altamente requisitado para a formação de hemácias, células musculares e nervosas, e para participar da geração de energia, tão fundamental para o acelerado desenvolvimento embrionário e fetal (CERAMI, 2017; FISHER; NEMETH, 2017;

GEORGIEFF, 2020). No sistema nervoso, é importante para produção de ATP que suporta as reações nervosas, cofator da síntese de neurotransmissores, participa da formação da bainha de mielina e é fundamental para processos sinápticos, desenvolvimento cognitivo e motor (CRICHTON; DEXTER; WARD, 2011; DUCK; CONNOR, 2016; THIRUPATHI; CHANG, 2019) e na função muscular, associado à mioglobina é responsável pelo aporte de oxigênio e energia e proteção contra a hipóxia (BEARD, 2001; ORDWAY; GARRY, 2004).

## **1.2 Metabolismo do ferro em mamíferos**

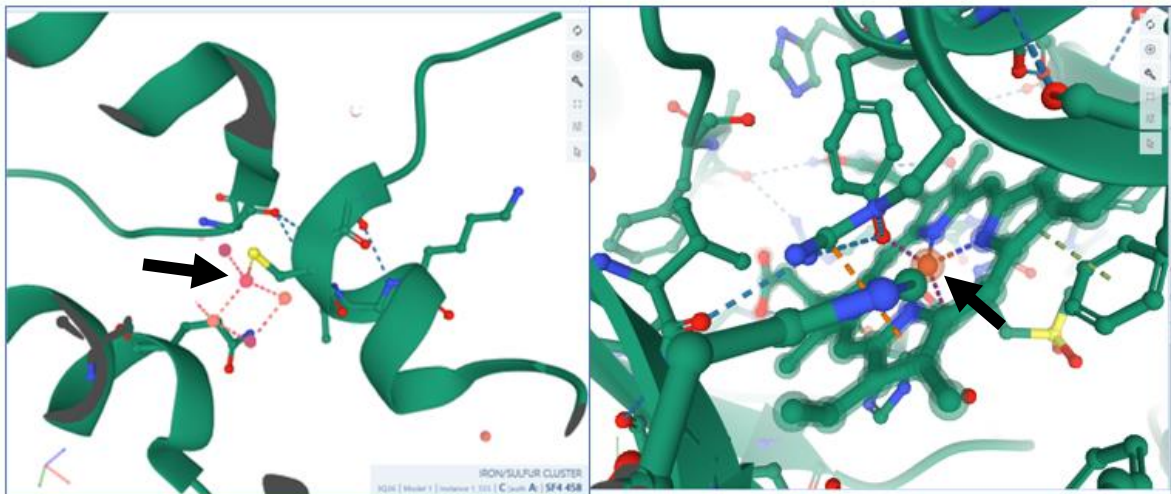
Nos mamíferos, o ferro é disponibilizado para o organismo através da sua reciclagem a partir da hemoglobinas da hemácias (CHERUKURI et al., 2004) e da sua absorção pelo epitélio intestinal (Figura 1). Na luz duodenal, cerca de apenas 10% do ferro obtido pela dieta encontra-se complexado com proteínas (heme) e os outros 90% encontram-se na forma iônica (não-heme). O ferro em grupos heme pode ser absorvido nos enterócitos e em outros tecidos através de um transportador recentemente descrito e denominado Heme Carrier Protein 1 (HCP-1) (LE BLANC; GARRICK; ARREDONDO, 2012; SHARMA et al., 2007). Quando na forma iônica, apresenta-se normalmente como íon férrico ( $Fe^{3+}$ ), que não pode ser absorvida pelos enterócitos e, por sua vez, precisa ser primeiramente reduzido para seu estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) pela enzima ferrirredutase presente na membrana dos próprios enterócitos. Enfim, a forma ferrosa é absorvida pelo enterócito pela ação do transportador de metal divalente (DMT-1), da proteína transportadora de metal (MTP1) e por transportadores da família ZIP e, no meio intracelular, é associado à proteína ferritina (ABBOUD; HAILE, 2000; KE et al., 2003; MENON; CHANG; KIM, 2015; THEIL, 2011).



**Figura 1.** Principais vias de absorção, armazenamento e uso do ferro de origem dietética nos enterócitos, hepatócitos e cardiomiócitos, respectivamente. DMT1: transportador de metal divalente; HFE: hefaestina; HCP1: *heme carrier protein*; LTCC: canal de cálcio do tipo C; TTCC: canal de cálcio do tipo T; Tf: Transferrina; TfR: receptor de transferrina. Modificado de Muñoz (2009) e Paterek; Mackiewicz e Mączewski (2019).

De acordo com a necessidade do organismo, o ferro é removido da ferritina e transportado para fora das células pela ferroportina (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009). Embora as células possam apresentar mecanismos específicos de obtenção do ferro, a principal via celular de aquisição é a internalização do complexo formado pela transferrina e seu receptor (GKOUVATSOS; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2012). Para isto, no meio extracelular o ferro ferroso é oxidado pela enzima hefaestina (Hp) na membrana basolateral dos enterócitos, o que permite sua ligação com a transferrina (Tf), uma proteína plasmática que atua como um quelante de ferro tornando-o disponível na forma iônica apenas às células que expressam o seu receptor (TfR) (AISEN; ENNS; WESSLING-RESNICK, 2001; CHENG et al., 2004). Depois de interiorizado, o ferro em pH ácido é liberado do complexo Tf-TfR pode ser complexado à ferritina, formar cluster Fe-S, ser internalizado pelo mitocôndria ou participar da composição estrutural de diversas proteínas, como nos exemplos

ilustrados na figura 2 (CHENG et al., 2004; PATEREK; MACKIEWICZ; MAĆZEWSKI, 2019).



**Figura 2** – Ferro como elemento estrutural de proteínas. À esquerda: núcleo Fe-S – DNA primase (*Homo sapiens*) indicado pela seta; à direita: átomo de ferro indicado pela seta na representação da estrutura 3D da catalase (*Proteus mirabilis*). As fitas verdes representam a conformação terciária das proteínas e os pontos circulares os radicais da cadeia. Fonte: Protein Data Bank- NCBI.

Não são conhecidas estratégias ativas para excreção de ferro, de modo que sua absorção e estoque precisam ser rigorosamente regulados (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009). Uma maneira de controle da absorção de ferro é conhecida como bloqueio da mucosa: uma dose de ferro reduz a capacidade de absorção de uma segunda dose. Isso acontece porque o ferro absorvido provoca a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem internalização do DMT-1, diminuindo a absorção de ferro por este transportador (ESPARZA et al., 2015). Outro mecanismo de regulação pós-transcricional da homeostase do ferro acontece através de elementos responsivos ao ferro (IREs), regiões do RNAm de proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro que regulam a expressão das mesmas. Em situações de diminuição da concentração intracelular de ferro, os IRE diminuem a tradução de proteínas relacionadas à quelação e exportação do ferro, tais como a ferritina e a ferroportina e suprimem a degradação do TfR e DMT-1, aumentando assim o influxo de ferro (ROUAULT, 2006).

Há ainda, e de maneira mais importante, a regulação hormonal dos níveis de ferro no organismo feita pela hepcidina. A hepcidina é um hormônio de natureza proteica produzido pelos hepatócitos de forma induzida, em situações como inflamação, estresse do retículo endoplasmático e nos aumentos da quantidade de ferro circulante, quando há elevação da saturação da Tf. A hepcidina é capaz de se ligar à ferroportina de outros tipos celulares como enterócitos, eritrócitos e macrófagos, e o complexo formado por estas duas proteínas é internalizado, o que resulta em inibição do efluxo celular de ferro para a circulação (GANZ, 2013; HUGMAN, 2006). Por outro lado, em situações como hipóxia e anemia, a síntese de hepcidina é inibida e, por consequência, há aumento do efluxo de ferro a partir das células e aumento da sua absorção através do epitélio intestinal.

## **2. Sobrecarga de Ferro**

Considerando a ausência de mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação da excreção de ferro pelo nosso organismo, algumas situações podem provocar o acúmulo deste metal: aumento da absorção de ferro, administração de ferro exógeno em casos de anemias que requerem repetidas transfusões de sangue ou uso inadequado de doses excessivas de compostos de ferro. A sobrecarga de ferro produzida nessas situações é caracterizada por níveis altos de ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina acima de 20%, e pode levar a depósitos sistêmicos e teciduais, danificando vários órgãos (BRASIL, 2013; CHIFMAN; LAUBENBACHER; TORTI, 2014).

A sobrecarga de ferro afeta pessoas em todo o mundo como resultado de condições genéticas e adquiridas, e exposições agudas e crônicas a quantidades excessivas de ferro. Apesar da Organização Pan Americana e da Organização Mundial da Saúde apontarem em 2020 que

*“o conhecimento aprimorado sobre a prevalência e distribuição da deficiência de ferro e do risco de sobrecarga de ferro na população ajuda os países a decidirem sobre intervenções apropriadas e a monitorar e avaliar o impacto e a segurança dos programas de saúde pública”,*

não há dados sistematizados sobre pacientes com sobrecarga de ferro no Brasil (OPAS Brasil, 2020).

## 2.1 Tipos de sobrecarga de ferro

De acordo com a situação, a sobrecarga de ferro pode ser aguda (normalmente denominada como intoxicação) ou crônica. Na década de 1980, a intoxicação por ferro já era considerada um problema relevante, e a quelação do ferro nestes quadros, apontada como urgente (BANNER; TONG, 1986; MAHONEY et al., 1989). Além disso, no início do século XXI, Jeffrey S. Fine revisou dados sobre envenenamento com compostos contendo ferro, especialmente alto em crianças menores de 6 anos, e destacou a necessidade de quelação imediata para evitar complicações sistêmicas (FINE, 2000).

A sobrecarga crônica deste elemento pode se apresentar como resultado de transfusões sanguíneas recorrentes, alterações genéticas que prejudicam seu metabolismo (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004; BRISSOT et al., 2018; CHIFMAN; LAUBENBACHER; TORTI, 2014; COATES, 2019; NAIR et al., 2018) e ao uso excessivo de compostos farmacêuticos contendo ferro (JIANG et al., 2015; RAJENDRAN et al., 2020).

A sobrecarga crônica de ferro é normalmente classificada em primária ou secundária. A sobrecarga de ferro primária é consequência de doenças genéticas envolvendo diretamente os elementos responsivos ao ferro e seu metabolismo. Um exemplo desta condição é a hemocromatose hereditária, uma doença autossômica recessiva, caracterizada por mutações nos genes que regulam o metabolismo do ferro, o que ocasiona o aumento da absorção do metal pelo epitélio duodenal, com intenso depósito nos tecidos e ocasionando lesões e danos funcionais importante (BARDOU-JACQUET; BRISSOT, 2014). A principal mutação responsável pelo desenvolvimento da hemocromatose tipo 1 é a p.Cys282Tyr em homozigose no gene da HFE, que pode modular a expressão de hepcidina. Além dessa, a heterozigose p.Cys282Tyr / His63Asp, também no gene da HFE, aparece em menor proporção como causa da hemocromatose hereditária (SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012; SIAH et al., 2006). Relativamente comum na Europa, ela é mais rara entre não

caucasianos e um estudo da Santa Casa de São Paulo demonstrou uma prevalência de aproximadamente 2% de mutação p.Cys282Tyr em seus doadores (SANTOS et al., 2010; SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012). Existem outros tipos de hemocromatose não associados a mutações do gene da HFE. Nestes casos, podem estar relacionadas a alterações no gene da HJV e Hamp (hemocromatose tipo 2), TfR2 (hemocromatose tipo 3) ou ferroportina (hemocromatose tipo 4) (SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012; SIAH et al., 2006). Estas proteínas são capazes de interferir na expressão da hepcidina e, além de altos níveis séricos de ferro e ferritina e alta taxa de saturação da transferrina, pacientes com hemocromatose hereditária também apresentam aumento nos produtos da peroxidação lipídica no plasma (MURPHY; OUDIT, 2010; SANTOS et al., 2009).

A sobrecarga de ferro secundária, com a própria denominação sugere, é decorrente de condições adquiridas e geralmente causada por transfusões sanguíneas recorrentes em consequência de eritropoiese insuficiente ou hemólise exacerbada, como por exemplo as anemias hemolíticas causadas por mutações nos genes codificadores das globinas, como ocorre na beta talassemia maior e também na anemia falciforme (SIAH et al., 2006). A talassemia maior afeta 310 brasileiros oficialmente registrados pelo Ministério da Saúde, concentrados principalmente na região Sudeste (BRASIL., [s.d.]), enquanto a anemia falciforme apresentava maior prevalência na Bahia e proporção de 1:1.800 em recém nascidos em território capixaba (BRASIL., 2014), e as transfusões recorrentes nesses pacientes levam a aumento da concentração sanguínea de ferro e acúmulo teciduais em órgãos como o fígado e o coração (DE SANCTIS, 2017).

## **2.2 Alterações orgânicas associadas a sobrecarga de ferro**

Os principais órgãos e tecidos prejudicados pelo excesso de ferro são os que têm maior concentração deste metal e elevada atividade metabólica: trato gastrointestinal, fígado e coração (FINE, 2000) e esses danos são parte importante do processo fisiopatológico da síndrome relacionada à sobrecarga. A sobrecarga de ferro é descrita como potencialmente fatal há várias décadas (MAHONEY et al., 1989). Neste trabalho, Mahoney e colaboradores utilizaram um modelo de intoxicação por ferro em camundongos e observaram que a taxa de mortalidade aumentava conforme

as doses administradas aumentavam. Qualquer que seja a causa ou o sistema de órgãos perturbado, o mecanismo fisiopatológico envolve estresse oxidativo associado à presença do ferro, e a peroxidação lipídica, carbonilação e oxidação de proteínas e os danos ao DNA decorrentes desta condição, que por sua vez levam a lesões celulares e disfunção orgânica (KAKHLON; CABANTCHIK, 2002; NAKAMURA; NAGURO; ICHIJO, 2019; SOUSA et al., 2020).

Clinicamente, os sintomas e sinais da sobrecarga de ferro dependem da gravidade e do órgão mais afetado e, frequentemente, o diagnóstico é difícil até que vários sistemas sejam perturbados. Os primeiros sintomas incluem letargia e fadiga, e podem evoluir para hiperpigmentação da pele, artropatia, hepatopatia, cardiomiopatia, hipogonadismo, diabetes e disfunções endócrinas quando o ferro se deposita em quantidades importantes nesses tecidos (FLEMING; PONKA, 2012; GAO et al., 2014; PIPERNO; PELUCCHI; MARIANI, 2020; PRABHU et al., 2020). A deposição de ferro no fígado induz um processo inflamatório e está associada a doenças hepáticas, incluindo cirrose e alto risco de carcinoma hepatocelular (JIANG et al., 2015; MEHTA; FARNAUD; SHARP, 2019). No pâncreas, a inflamação desencadeada pelo excesso de ferro pode prejudicar a produção e a responsividade à insulina, alterando o controle glicêmico (SIMCOX et al., 2013). Além disso, hipogonadismo hipofisário, osteoporose e disfunções da tireoide, adrenal e paratireoide foram efeitos relatados nas glândulas endócrinas (OUESLATI et al., 2019; PELUSI et al., 2016; ROSSI et al., 2016).

No sistema cardiovascular, a sobrecarga de ferro está associada à diminuição do débito cardíaco, alterações da reatividade vascular e diminuição da contratilidade cardíaca (ÁVILA et al., 2016; BARTFAY; BARTFAY, 2000; FINE, 2000; MARQUES et al., 2015) e os efeitos danosos da sobrecarga de ferro também são frequentemente relacionados ao estabelecimento de estresse oxidativo (JIANG et al., 2015; ROSSI et al., 2016; SOUZA; LOCATELLI, 2012).

Por fim, sabe-se que o depósito de ferro no coração prejudica gravemente a mecânica e o metabolismo do miocárdio, e a cardiomiopatia por sobrecarga de ferro representa a principal causa de morte nesses pacientes (BRASIL, 2013; BREWER et al., 2014; DÍEZ-LÓPEZ; COMÍN-COLET; GONZÁLEZ-COSTELLO, 2018; FERNANDES; FABRON; VERISSIMO, 2009; GUJJA et al., 2010). Geralmente, os efeitos da sobrecarga cardíaca se manifestam como cardiomiopatia restritiva ou



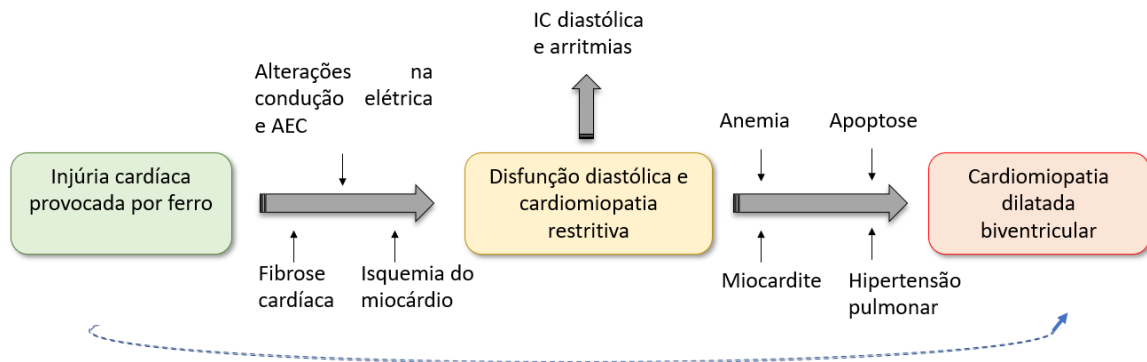
dilatada, arritmias e insuficiência (COATES, 2019; DÍEZ-LÓPEZ; COMÍN-COLET; GONZÁLEZ-COSTELLO, 2018; SIRI-ANGKUL et al., 2018).

### **3. Efeitos da sobrecarga de ferro sobre a função cardíaca**

Como mencionado, a homeostase do ferro é importante para a manutenção das funções orgânicas e muitos órgãos podem sofrer em situações de sobrecarga, especialmente o coração. Normalmente, os pacientes apresentam insuficiência cardíaca e arritmias cardíacas fatais mediados por radicais livres (LEKAWANVIJIT; CHATTIPAKORN, 2009). Os quadros de insuficiência cardíaca e arritmias também são apontadas pela Sociedade Brasileira de Hematologia como uma das principais causas de morte em pacientes com hemocromatose juvenil (ANA L.C. MARTINELLI, SBH)

O caminho para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca provocada pela sobrecarga de ferro é iniciado pelo comprometimento contrátil do músculo cardíaco que culmina em disfunção sistólica (Figura 3), identificada normalmente em sua fase mais avançada, e sendo mais comum no ventrículo esquerdo (LEKAWANVIJIT; CHATTIPAKORN, 2009). A disfunção sistólica evidente e a manifestação clínica da insuficiência cardíaca em humanos são precedidas pelo estabelecimento de cardiomiopatia restritiva e disfunção diastólica, embora alguns pacientes podem passar rapidamente do estágio inicial para a insuficiência cardíaca sistólica (LEKAWANVIJIT; CHATTIPAKORN, 2009; MURPHY; OUDIT, 2010). Já em modelos experimentais de camundongos talassêmicos a disfunção sistólica é observada mesmo sem que haja comprometimento da função diastólica (ZHANG et al., 2019).

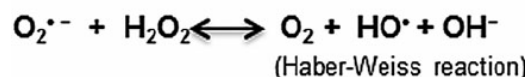
É importante notar que além de causar cardiopatia, a sobrecarga de ferro também pode potencializar uma insuficiência cardíaca pré-existente em pacientes e modelos experimentais (PATEREK; MACKIEWICZ; MAĆZEWSKI, 2019).



**Figura 3.** Espectro do desenvolvimento de doenças do coração em pacientes com sobrecarga crônica de ferro. AEC: acoplamento excitação-contração; IC: Insuficiência Cardíaca. A linha a tracejada indica que alguns doentes podem progredir rapidamente para a fase de cardiomiopatia dilatada. Adaptado de Murphy & Oudit, 2010.

### 3.1 Mecanismos envolvidos na insuficiência cardíaca provocada por ferro

O acúmulo de ferro no coração, que leva às consequências já mencionadas, está relacionado à entrada do íon ferroso nos cardiomiócitos através dos canais para cálcio, DMT-1 e TfR e sua participação na formação de EROs pela reação de Fenton:

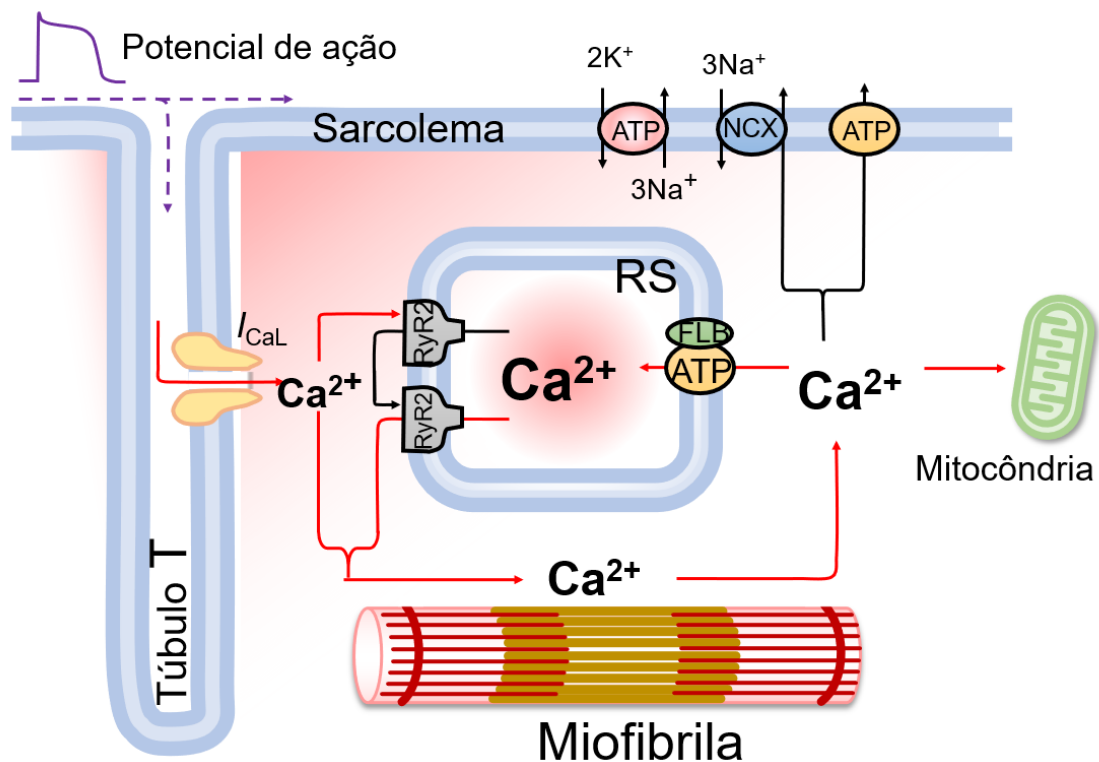


O estresse oxidativo resultante pode danificar as organelas celulares e causar peroxidação lipídica e danos às proteínas e ao DNA dessas células (DAS et al., 2017; GORDAN et al., 2018; OUDIT et al., 2003; SHIZUKUDA; ROSING, 2019). Os cardiomiócitos são vulneráveis à deficiência de ferro, porque para seu bom funcionamento, requerem enormes quantidades de energia e, portanto, enzimas mitocondriais contendo ferro. Por conseguinte, são mal protegidos da sobrecarga de ferro, porque proteínas importadoras de ferro locais não são reguladas negativamente pelo ferro sistêmico (PATEREK; MACKIEWICZ; MAĆZEWSKI, 2019).

Para vislumbrar os efeitos da sobrecarga de ferro no coração, faz-se necessária uma breve revisão sobre a função contrátil cardíaca, especialmente o acoplamento excitação contração (Figura 4).

Para realizar a função de bombear o sangue para corpo, o coração precisa desenvolver força – função contrátil – para que seja gerado o gradiente de pressão necessário a ejeção – função de bomba. Sendo um órgão autônomo e formado por célula excitáveis, o impulso elétrico gerado no nodo sinoatrial se espalha pelo miocárdio, excitando assim o sincício cardíaco. Ao atingir os cardiomiócitos ventriculares, o impulso elétrico se espalha pelas junções comunicantes ou do tipo gap, provocando uma onda de despolarização da massa ventricular, que leva ao influxo de íons  $\text{Na}^+$  e abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes, especialmente os canais do tipo L. A entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do meio extracelular funciona como um gatilho para a liberação do estoque do retículo sarcoplasmático (RS), um grande reservatório do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, por meio de canais denominados receptores de rianodina (RyR2). O  $\text{Ca}^{2+}$  livre em altas concentrações no mioplasma se liga à troponina C associada aos filamentos contráteis do sarcômero para então disparar a formação das pontes cruzadas e posteriormente a contração.

Para que ocorra o relaxamento, a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  deve diminuir. Em ratos, a principal forma de redução da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no mioplasma é pela ação da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a). Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser removido através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do sarcolema e de transportadores da mitocôndria (BERS; SHANNON, 2013).

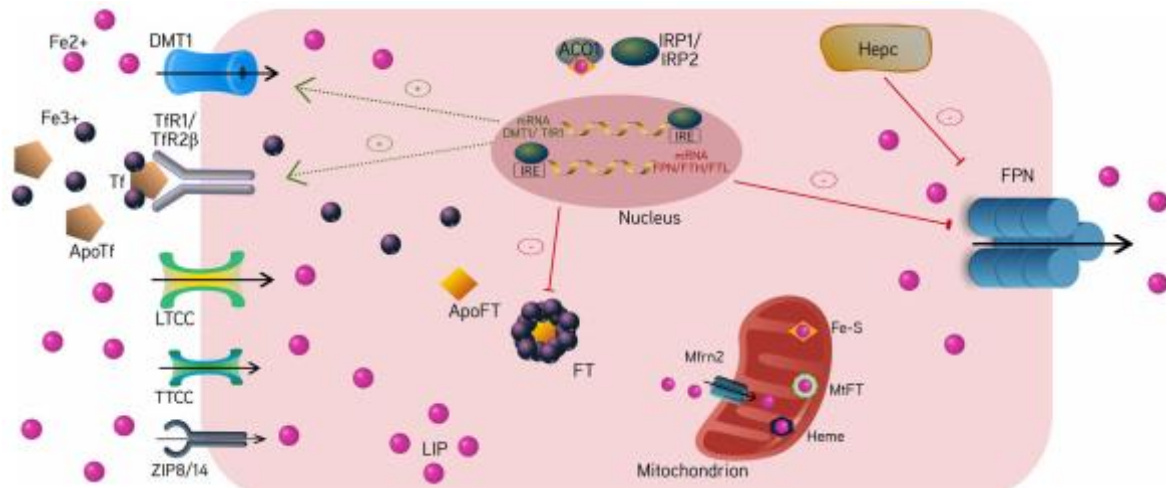


**Figura 4.** Representação do processo de acoplamento excitação-contracção do músculo cardíaco. SR: retículo sarcoplasmático, ATP: ATPase, PLB: fosfolamban, NCX: trocador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ , RyR: receptor de Rianodina, AP: potencial de ação,  $I_{\text{Ca}}$  : corrente de  $\text{Ca}^{2+}$ . As setas em vermelho representam os processos influenciados pelo ferro nos cardiomiócitos. Adaptado de Bers, 2002.

Nesse contexto, o excesso de ferro é descrito como sendo capaz de alterar o acoplamento excitação-contracção cardíaco de diversas maneiras e em vários pontos do processo descrito acima.

O influxo de ferro nos cardiomiócitos pode ocorrer através do TfR, das proteínas da família ZIP, pelo DMT1 e por canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo T e do tipo L, sendo essa última a principal forma de entrada de ferro em condições de sobrecarga, tal como revisado recentemente por Paterek; Mackiewicz e Maćzewski (Figura 5). De acordo com OUDIT et al (2006), níveis elevados de ferro presentes na sobrecarga crônica estão associados à disfunção diastólica, arritmia e cardiomiopatias, e o transporte de  $\text{Fe}^{2+}$  por canais para  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta a suscetibilidade ao acúmulo de ferro intracelular e a sensibilidade dos cardiomiócitos, além de prejudicar o influxo sarcolemal do íon  $\text{Ca}^{2+}$  (ÁVILA et al., 2016; OUDIT et al., 2003). Além disso, o ferro é capaz de ser

internalizado pelos canais do tipo L e deslocar os íons  $\text{Ca}^{2+}$  de seus sítios de ligação no domínio citoplasmático responsáveis pela inativação de canal dependente de ligante, o que atrasa a inativação de canal e também aumenta a entrada de mais ferro - configurando um feedback positivo desfavorável (PATEREK; MACKIEWICZ; MAÇZEWSKI, 2019).



**Figura 5.** Influxo e distribuição intracelular do ferro em cardiomiócitos. DMT1: transportador de metal divalente, LTCC: canal de cálcio do tipo C, TTCC: canal de cálcio do tipo T, FT: ferritina, MT: mitoferitina, FPN: ferroportina, Hepc: hepcidina, Tf: transferrina, TfR: receptor de Transferrina, IRE: elemento responsivo do ferro (*iron responsive element*). Paterek; Mackiewicz e Maçzewski (2019).

Uma vez internalizado e acumulado nos cardiomiócitos, o ferro é capaz de modular o RyR2 e tem um efeito depressor na função do RS: deprime o estoque e inibe a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (KIM; GIRI; PESSAH, 1995). Outro efeito da sobrecarga cardíaca de ferro é o prejuízo da capacidade contrátil associada à diminuição da sensibilidade das proteínas sarcoméricas ao  $\text{Ca}^{2+}$  e da ativação da maquinaria contrátil (ÁVILA et al., 2016).

Além dos efeitos diretos do excesso de ferro, a sobrecarga está associada a um desbalanço oxidativo no cardiomiócito: no citoplasma o ferro catalisa reações de Fenton (QIAN et al., 2019), e nas mitocôndrias cardíacas compromete a produção de ATP, produzindo radicais livres que não somente reduzem a contração miocárdica mas também estão associados à disfunção cardíaca (ÁVILA et al., 2016a; DAS et al.,

2015; KUMFU et al., 2012; MURPHY; OUDIT, 2010) ao desenvolvimento de hipertrofia (SUKUMARAN et al., 2017).

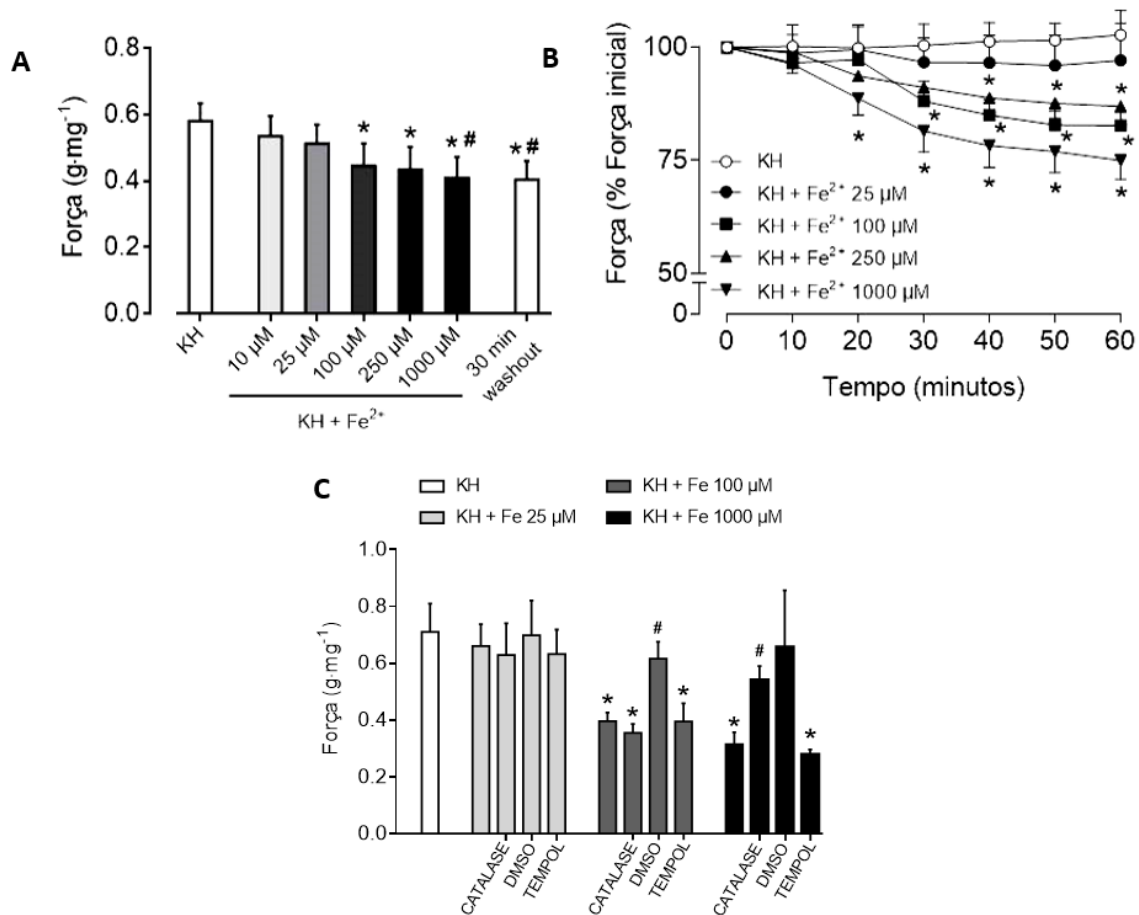
Os radicais livres também causam peroxidação lipídica tanto do sarcolema quanto das membranas das organelas, inclusive da mitocôndria, alterando o processo de fosforilação oxidativa que prejudica a produção de ATP e por sua vez leva a maior produção de EROs, potencializando assim os efeitos da sobrecarga de ferro no coração. De fato, atividade mitocondrial diminuída e comprometimento da geração de ATP são eventos já observados em situações de insuficiência cardíaca (PATEREK; MACKIEWICZ; MAÇZEWSKI, 2019; ZHANG et al., 2019).

A peroxidação lipídica também é um fenômeno que ocorre no processo de ferroptose, um tipo de morte celular causada por sobrecarga cardíaca de ferro estabelecida principalmente a partir de degradação hêmica. Interessantemente, a ferroptose é um evento presente não só na hemocromatose, mas também na injúria provocada por isquemia/reperfusão, insuficiência renal aguda e neurodegeneração (CONRAD; PRONETH, 2019).

### **3.2 Efeitos agudos da sobrecarga de ferro sobre o acoplamento excitação contração**

Os estudos sobre o comprometimento da função cardíaca tiveram início nos anos de 1960 e na década de 1980, alguns trabalhos demonstraram que agudamente o ferro em excesso já é capaz de comprometer a função cardíaca. Artman et al (1982, 1984) demonstraram que a exposição aguda *in vitro* do músculo cardíaco de coelhos a altas concentrações de ferro é capaz de se acumular no tecido após apenas 90 minutos de exposição e comprometer o desenvolvimento de força e que estes efeitos eram prevenidos pela N-acetilcisteína, manitol e superóxido dismutase, evidenciando a mediação de EROs neste processo. Em 1988, Moreb; Hershko e Hasin demonstraram que o excesso de ferro em meio de cultura de cardiomiócitos neonatais provoca depressão da contratilidade destas células e que este efeito era revertido pela cafeína, indicando que o ferro é capaz de agir sobre o RS. No início dos anos 2000, foi demonstrado finalmente que o ferro adentra o cardiomiócito pelo canal do tipo L, como já mencionado (OUDIT et al., 2003). Em 2016, nosso grupo demonstrou que além de comprometer o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular por ação direta, a sobrecarga

aguda de ferro também compromete a contratilidade de músculo papilar de ratos através da geração imediata de EROs, especialmente radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (Figura 6) (ÁVILA et al., 2016).



**Figura 6.** Efeitos da incubação aguda de Fe<sup>2+</sup> na contratilidade de miocárdio de ratos. (A) Efeito de diferentes concentrações de Fe<sup>2+</sup> sobre a força desenvolvida de músculos papilares. Cada condição foi mantida durante 30 minutos. (B) Força desenvolvida na ausência e na presença de várias concentrações Fe<sup>2+</sup> avaliada ao longo de 60 minutos. (C) Efeitos de varredores de EROs na força desenvolvida pelos músculos papilares expostos ao Fe<sup>2+</sup>. Adaptado de Ávila et al (2016).

Ainda neste trabalho foi demonstrado que associado ao aumento na geração de EROs e comprometimento da mecânica cardíaca, altas concentrações de ferro também prejudicaram a atividade da ATPase miosínica e a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio. Para avaliar esta última, as fibras miocárdicas tiveram as

membranas celulares decompostas por detergente e, quando expostos ao ferro 100  $\mu\text{M}$  (concentração equivalente àquela de indivíduos com sobrecarga), exibiram desempenho contrátil prejudicado na curva concentração-reposta de cálcio, notado pela redução significativa do  $\text{pCa}_{50}$  ( $-\text{Log}$  da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  necessária para produção da metade da contração máxima). Esses resultados reforçam ainda mais que, apesar do seu papel direto, o estresse oxidativo mediado pelo excesso de ferro no tecido cardíaco tem efeito significativo na fisiopatologia da cardiomiopatia da sobrecarga de ferro e sugerem que intervenções que protejam do miocárdio da lesão oxidativa possam desempenhar papel na atenuação dos efeitos da sobrecarga.

#### **4. Exercício físico e cardioproteção**

Ao mesmo tempo que mudanças no estilo de vida moderno, tal como inatividade física, contribuíram para o aumento da incidência e prevalência de doenças crônicas, estratégias não farmacológicas que interferem nesse estilo de vida - prática de atividade física e treinamento físico - têm sido amplamente investigadas na busca de um estilo de vida saudável para reduzir a dose dos medicamentos e a polifarmácia, além de diminuir a morbimortalidade.

Nos anos 1980, Caspersen et al definiram atividade física como qualquer movimento corporal promovido por músculos esqueléticos que gere gasto energético, normalmente medido em quilocalorias ou quilojoules (trabalho), enquanto exercício físico é um tipo de atividade física com intensidade, duração e frequência sistemáticas e progressivas, que geralmente envolve planejamento para manutenção ou aprimoramento da aptidão física e, por consequência, promoção de saúde.

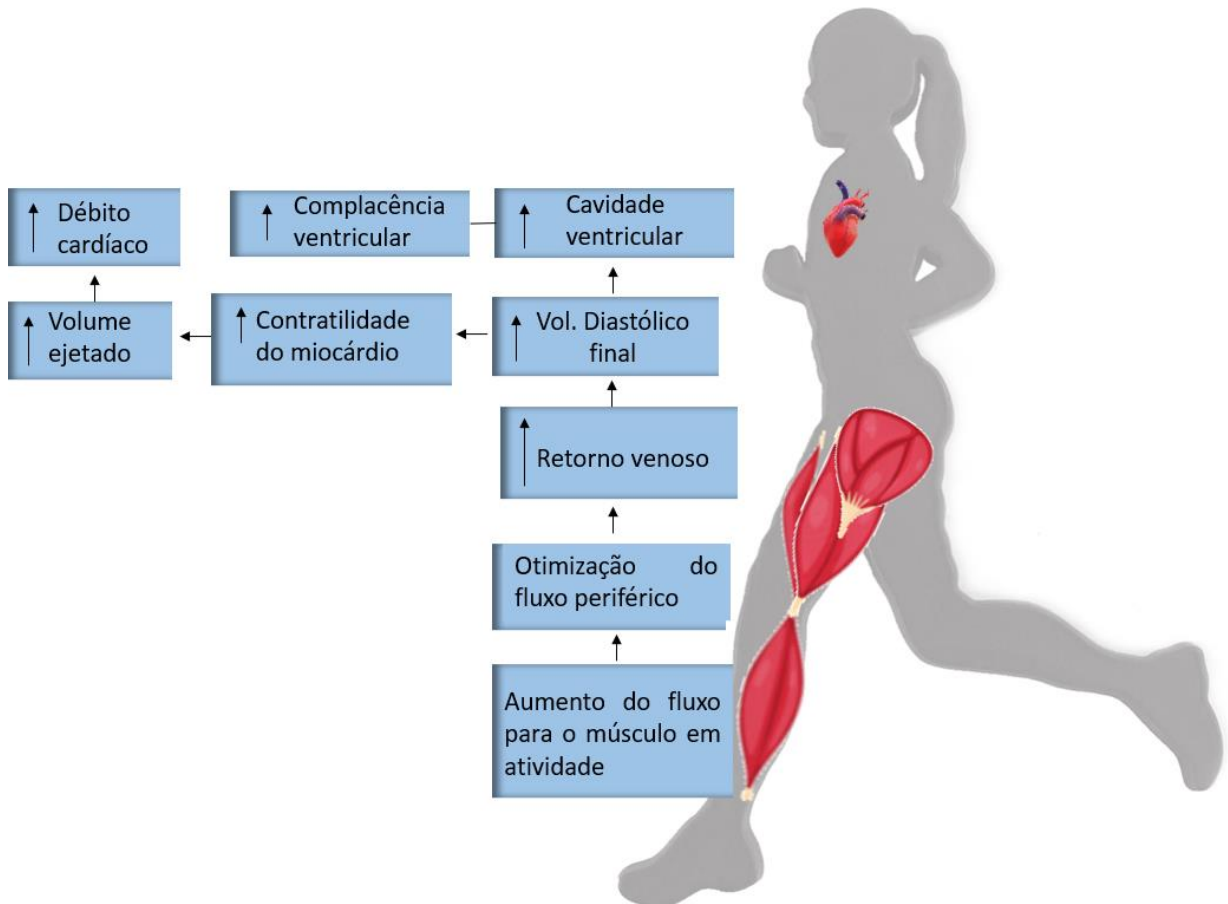
Atualmente, é bem conhecido que o treinamento físico regular induz diversas adaptações homeostáticas em diferentes sistemas fisiológicos, incluindo o cardiovascular (MOREIRA; WOHLWEND; WISLØFF, 2020), e claramente as respostas desses sistemas ao treinamento físico variam de acordo com a intensidade, duração, tipo de exercício e progressões empregadas. Nesse sentido, o exercício aeróbico se caracteriza pelo aumento do metabolismo de carboidratos e ácidos graxos ao mesmo tempo que incrementa a produção de ATP pelas mitocôndrias e provoca adaptações do sistema cardiovascular para prover o corpo com oxigênio durante a atividade, potencializando a função cardíaca, conforme ilustrado na figura 7



(HELLSTEN;

NYBERG,

2015).



**Figura 7.** Adaptações na função cardiovascular com treinamento de exercícios aeróbicos que aumentam a entrega de oxigênio aos músculos ativos. Adaptado de Victor I. Katch, William d. Mcardle (2013)

A intensidade do exercício se relaciona com limiar anaeróbio (ponto em que as células superam sua capacidade de produzir ATP através da fosforilação oxidativa e começa a realizar fermentação láctea) e depende da velocidade de execução, carga imposta, amplitude do movimento e tempo da pausa no treino. Assim, por exemplo, exercícios de corrida realizados dentro da faixa de intensidade de 50-70% da velocidade identificada para o limiar anaeróbio são denominados exercícios de intensidade moderada (FERREIRA et al., 2007; TEIXEIRA, 2010). Neste sentido, a Organização Mundial da Saúde recomenda a duração mínima de 150 minutos de exercício aeróbico em intensidade moderada ou 75 minutos em alta intensidade durante a semana para promoção de adaptações benéficas à saúde (OMS, 2020).

Várias são as evidências de que a prática de exercícios físicos, em especial o aeróbico de intensidade moderada, é capaz de melhorar a resposta anti-inflamatória e imunológica, e favorecer a função cardíaca e homeostase oxidativa das células e tecidos por aumentar resistência ao estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2010; MORRA et al., 2019; TURNER; BRUM, 2017).

No que diz respeito a esta proteção antioxidante, já foi demonstrado, por exemplo, que o exercício físico aeróbico de intensidade moderada é capaz de reduzir o estresse oxidativo e aumentar a disponibilidade de NO em pacientes hipertensos (KORSAGER LARSEN; MATCHKOV, 2016). Além disso, a prática de exercício estimula as defesas antioxidantes hepáticas (PILLON BARCELOS et al., 2017), atletas apresentam melhora na capacidade antioxidante (PARK; KWAK, 2016) e pacientes com diabetes melitus tipo 2 apresentam níveis de malondialdeído, indicador de estresse oxidativo sistêmico e peroxidação lipídica, reduzidos após praticarem 12 semanas de exercício aeróbico (ARSLAN et al., 2014).

Em modelos animais o treinamento físico também é estimulador da proteção antioxidante. O treinamento causa redução nos valores de pressão arterial de ratas ovariectomizadas, acompanhada de diminuição da peroxidação lipídica e expressão de enzimas oxidantes, enquanto aumenta a expressão de enzimas antioxidantes como SOD, catalase e glutathione (DA PALMA et al., 2016). O mesmo efeito é observado em animais diabéticos melhorando também a função cardíaca (GIMENES et al., 2015) e a proteção contra efeitos oxidativos é observada também em ratos hipertensos (BERTAGNOLLI et al., 2008) e expostos à sobrecarga crônica de frutose (FARAH et al., 2016)

#### **4.1 Exercício aeróbio na cardiopatia**

No que diz respeito às cardiopatias, o exercício físico tem sido considerado uma prática não só preventiva, por reduzir os impactos e melhorar as respostas adaptativas, mas também terapêutica por atenuar a evolução da doença e melhorar o prognóstico do indivíduo (CATTADORI et al., 2018; MOREIRA; WOHLWEND; WISLØFF, 2020), e apesar de vários protocolos de alta intensidade serem propostos

para pacientes com insuficiência cardíaca, o exercício aeróbico moderado é o mais prescrito para esta condição (GIALLAURIA et al., 2016).

Em modelos experimentais para estudos sobre o efeito da atividade física na doença cardíaca, as mais recentes revisões indicam que o treinamento físico se mostra benéfico em modelos experimentais de roedores como na insuficiência cardíaca (NATALI et al., 2015) no pós-infarto do miocárdio (CAMPOS et al., 2017; STØLEN et al., 2020).

Parece bastante consensual que os efeitos cardioprotetores do exercício físico aeróbico sejam, pelo menos em parte, devido à sua estimulação ao sistema antioxidante. Por exemplo, o exercício é capaz de reduzir a produção de ânion superóxido e a expressão de proteínas envolvidas na produção de EROs, melhorando a performance cardíaca (MORRA et al., 2019), enquanto aumenta a expressão das enzimas relacionadas à capacidade antioxidante do organismo (KORSAGER LARSEN; MATCHKOV, 2016).

Ademais, também foi demonstrado que o exercício físico aeróbico protege o tecido cardíaco da ação dos agentes oxidantes, avaliada por níveis de indicadores de dano tecidual como substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SCHNEIDER; REISCHAK DE OLIVEIRA, 2004). As evidências atuais não só reforçam o papel preventivo e terapêutico do exercício físico aeróbico de intensidade moderada na insuficiência cardíaca, mas também sustentam a hipótese de que este efeito poderia ser observado na cardiopatia induzida pela sobrecarga de ferro.

## **5. Justificativa**

Segundo a Portaria nº 1.324, de 25 de novembro de 2013 do Ministério da Saúde, pacientes com sobrecarga secundária de ferro (decorrente de transfusões sanguíneas recorrentes em quadros de anemias crônicas como a talassemia e anemia falciforme) tem no uso de quelantes sua principal forma de tratamento (BRASIL, [s.d.]).

Assim, removendo formas livres de ferro intra- e extracelulares, os quelantes agem também como agentes antioxidantes com benefícios para pacientes com sobrecarga de ferro. Contudo, de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes

Terapêuticas da Sobrecarga de Ferro (Sobrecarga de ferro- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, 2013), instituído pela citada portaria, o tratamento com quelantes, especialmente a dexferoxamina, tem a eficácia limitada pela forma de administração subcutânea e os efeitos colaterais do uso destes medicamentos. Além disso, a Portaria Conjunta nº 7, de 23 de fevereiro de 2018 do Ministério da Saúde restringe o uso de classes de quelantes em pacientes grávidas, crianças na primeira infância, pessoas com insuficiência renal, hepatite, e com algumas alterações da função cardíaca como bloqueio atrioventricular e alongamento QT.

Já entre os pacientes com sobrecarga primária, embora o uso de quelantes tenha sido aplicado recentemente, a flebotomia é a principal forma de tratamento (KOWDLEY et al., 2019). E em relação ao tratamento de cardiopatias causadas pela sobrecarga de ferro, além dos quelantes, clinicamente também se faz uso de bloqueadores de canais de cálcio. Visto que o LTCC e TTCC são portas de entrada para o ferro nos cardiomiócitos, o bloqueio destes canais diminui o influxo de ferro (ZHANG et al., 2016).

Devido ao dado o alto grau de dano oxidativo na sobrecarga de ferro, o uso de compostos antioxidantes pode ser uma terapia adjuvante valiosa para esses pacientes. De fato, há relatos de que a administração de antioxidante mitiga o dano tecidual em modelos animais e pacientes com sobrecarga de ferro primária e secundária (KOONYOSYING et al., 2018; SAJADI HEZAVEH et al., 2019). Na verdade, os efeitos antioxidantes da N-acetilcisteína (OZDEMIR et al., 2014; WONGJAIKAM et al., 2016), taurina (OUDIT et al., 2004), polifenóis como o resveratrol (DAS et al., 2016, 2018) e curcumina (THEPHINLAP et al., 2011) e flavonóides como quercetina e baicalina (ZHANG et al., 2011) também foram demonstrados como cardioprotetores na sobrecarga de ferro.

Apesar de saúde ser um estado de bem-estar físico, mental e social, do exercício físico aeróbico apresentar diversos benefícios cardioprotetores e antioxidantes e ser acessível para a maior parte da população, não há dados na literatura acerca dos efeitos da prática de exercício sobre a função cardíaca de pacientes com sobrecarga de ferro seja como medida preventiva, seja como terapia adjuvante prescrita a esses pacientes quando sabidamente cardiopatas.

Dessa forma, a hipótese deste estudo é que a prática de exercício aeróbico de intensidade moderada é capaz de mitigar os efeitos sistêmicos e cardíacos da sobrecarga de ferro. Por conseguinte, considerando a ausência de um modelo bem estabelecido de cardiomiopatia por sobrecarga de ferro em ratos, tivemos como metas: 1) estabelecer um modelo de sobrecarga de ferro capaz de provocar cardiopatia e 2) determinar o valor potencial do exercício físico moderado como potencial ferramenta terapêutica nessa condição.

## **6. Objetivos**

### **Objetivo geral**

Avaliar o potencial do exercício físico moderado na atenuação de efeitos sistêmicos e cardíacos da sobrecarga de ferro crônica em ratos.

### **Objetivos específicos**

1. Estabelecer um modelo de sobrecarga de ferro em ratos capaz de comprometer a força contrátil do músculo papilar do ventrículo esquerdo;
2. Determinar os efeitos sistêmicos da sobrecarga crônica de ferro no modelo estabelecido e a ação do exercício físico de intensidade moderada sobre eles;
3. Avaliar os efeitos do exercício físico sobre os níveis séricos e teciduais de depósito de ferro e marcadores séricos de dano oxidativo e celular (sistêmicos, hepáticos e cardíacos) após sobrecarga crônica de ferro;
4. Identificar os efeitos do exercício físico nessa situação sobre a função cardíaca e respostas inotrópicas relacionadas ao acoplamento excitação-contração após sobrecarga crônica de ferro.

## 7. Material e Métodos

Ratos wistar machos (*Rattus rattus*), com 8 semanas de idade e massa aproximado de 250 g, foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos publicada pelo CONCEA (2013), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Ufes (CEUA-UFES) sob o nº 88/2015.

Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso a água e ração, em condições de temperatura e umidade controladas, e submetidos a ciclo claro-escuro invertido de 12 horas.

### 7.1 Modelo experimental

Para atender nossa primeira meta e estabelecer o modelo de sobrecarga de ferro capaz de causar prejuízo na função contrátil do músculo papilar, iniciamos o seguinte protocolo de administração i.p. de ferro-dextrano:

- 200 mg/kg de ferro-dextrano durante 5 dias por semana, por 2 semanas;
- 100 mg/kg de ferro-dextrano durante 5 dias por semana, por 4 semanas;
- 100 mg/kg de ferro-dextrano durante 5 dias por semana, por 4 semanas mais suspensão das injeções por 9 semanas.

Ao fim de cada protocolo de administração do ferro, os animais tiveram a força de contração do músculo papilar avaliada conforme descrito na seção **7.3 Análise da contratilidade miocárdica**. Como identificamos comprometimento contrátil apenas no último modelo de sobrecarga (4 semanas de administração e 8 semanas de suspensão; Figura 11), passamos a investigar nele os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o coração e o fígado e o potencial do exercício físico para preveni-los.

Após as quatro semanas de injeção de ferro-dextrano (na dose estabelecida como promotora de disfunção miocárdica), os animais foram familiarizados e acomodados com a corrida em uma esteira motorizada (*Insight Scientific Equipment*, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) a 5–10 m/min, 0% de grau de inclinação por 10 min/dia durante 1 semana. Em seguida, foram divididos em três grupos experimentais: controle (Ct), sobrecarga de ferro (Fe), e sobrecarga de ferro e submetidos ao

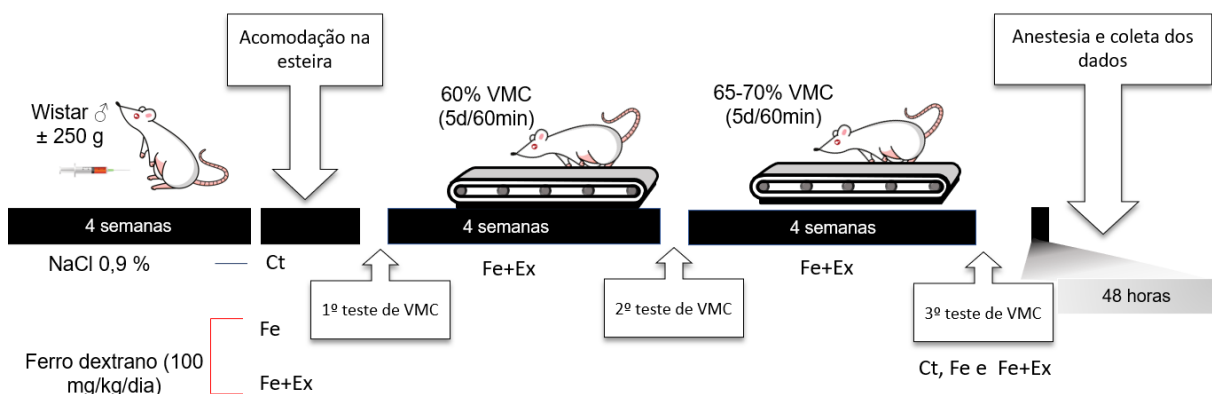
exercício (Fe+Ex). Quarenta e oito horas após o período de aclimatação, foi realizado um teste para determinar a velocidade máxima de corrida (VMC) de cada animal, em que a velocidade era aumentada de 3 m/min a cada 3 minutos até a fadiga. A fadiga foi definida como o momento em que o rato não conseguia mais acompanhar a velocidade da esteira e a velocidade máxima de velocidade ( $V_{m\acute{a}x}$ ) foi determinada.

A partir de então, os animais se exercitaram a 50 a 60% de  $V_{m\acute{a}x}$ , em tempos progressivos até atingir 1h/dia. O teste  $V_{m\acute{a}x}$  também foi realizado no final da quarta semana de treinamento em animais do grupo Fe+Ex para atualizar a intensidade do treinamento durante mais 4 semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, o teste  $V_{m\acute{a}x}$  foi repetido em todos os grupos (Figura 9). O regime de desenvolvimento de sobrecarga de ferro e treinamento físico seguiu o mesmo daqueles publicado recentemente por Rossi et al., (2020).

Os dados de velocidade máxima e tempo foram utilizados para calcular o trabalho executado no protocolo de exercício (KJ), de acordo com a equação:

$$\bar{T} = \text{massa} \times \text{gravidade} \times \text{velocidade} \times \text{tempo}$$

onde a massa foi avaliada em Kg, velocidade em m/s, tempo em segundos e gravidade =  $9.8 \text{ m/s}^2$ .



**Figura 8.** Esquema representativo do desenho experimental com os protocolos de exposição ao ferro e exercício físico. Adaptado de Rossi, 2019.

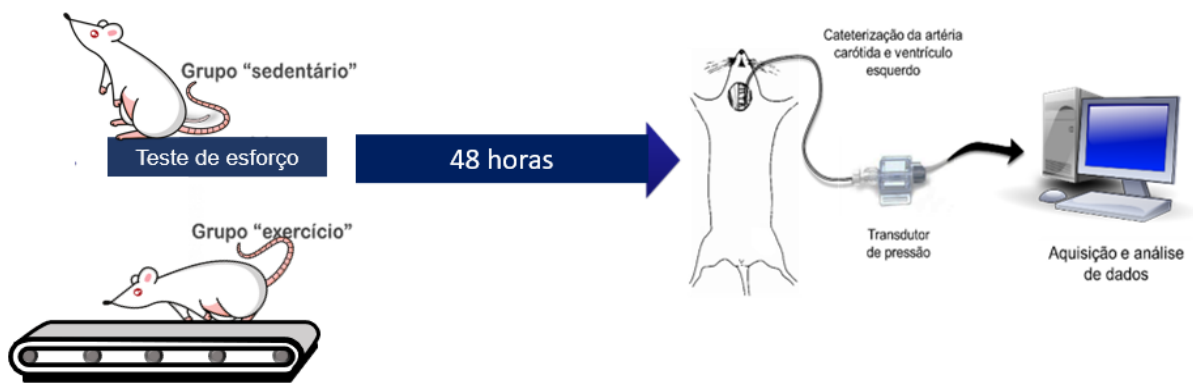
## 7.2 Análises hemodinâmicas

Quarenta e oito horas após o último teste de esforço, os animais foram anestesiados com uretana 1,5 g/kg, i.p., para a realização de análises hemodinâmicas



do ventrículo esquerdo. Para isto foi realizada a canulação da artéria carótida e do ventrículo esquerdo (Figura 10) com um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com heparina em solução salina (50 U/ml). As cânulas foram conectadas a um sistema de aquisição de dados com transdutor de pressão (TSD 104A, Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA) para registro e avaliação da frequência cardíaca (FC) e dos seguintes parâmetros, após 20 minutos de estabilização no ventrículo esquerdo:

- Pressão sistólica e diastólica final do ventrículo esquerdo (PSVE; PDfVE);
- máximas derivadas positiva ( $+dP/dt_{\text{máx}}$ ) e negativa ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) temporal de pressão.



**Figura 9.** Representação do protocolo de cateterização para avaliação hemodinâmica.

### 7.3 Análise da contratilidade miocárdica

Após o estudo hemodinâmico, o coração foi retirado rapidamente do tórax e colocado em solução de *Krebs-Henseleit*, previamente oxigenada com mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, e aquecida a 30°C. A parede livre do ventrículo direito foi separada para expor o septo interventricular, que foi dividido ao meio para que os músculos papilares do ventrículo esquerdo fossem adequadamente expostos.

O músculo papilar posterior foi cuidadosamente dissecado numa plataforma de silicone e suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável, sendo em seguida imerso em uma cuba contendo 20 ml de solução de *Krebs-Henseleit*. A extremidade superior foi conectada por anel e fio de aço inoxidável a um transdutor de força

isométrica (TSD125 - *Byopac Systems*, Inc; CA) e o anel da extremidade inferior do músculo conectado a um gancho fixo na cuba de vidro. A solução de *Krebs-Henseleit* era composta, em mM: NaCl 135; KCl 4,6; CaCl<sub>2</sub> 1,0; MgSO<sub>4</sub> 1,15; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; glicose 5,5, e tinha pH e oxigenação mantidos pelo borbulhamento da mesma mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico e temperatura controlada em 29 °C por meio de um banho-maria circulante (LEITE; VASSALLO; MILL, 1988). O transdutor era conectado a um microcomputador dotado do software AcqKnowledge® 3.7.5. (*Biopac Systems* Inc., CA, USA) que permitia determinar os valores de força a uma taxa amostral de 200 Hz. Paralelamente ao músculo, posicionavam-se dois eletrodos acoplados a estimulador elétrico que liberam estímulos de 10 V e 12 milissegundos de duração. Todos os músculos foram estimulados em frequência de 0,5 Hz.

Os registros foram iniciados 60 min após ser atingido o pico da sua curva comprimento-tensão para permitir que os músculos papilares se adaptassem às novas condições da preparação. Os testes foram realizados em comprimento ótimo de contração ( $L_{max}$ ), e a força desenvolvida foi normalizada pela massa muscular do papilar, sendo apresentada em g/mg, conforme proposto por Bocalini e Tucci, (2009).

A mecânica do músculo cardíaco foi avaliada pelo protocolo representado na figura 11. No estado estacionário, em solução com 1,25 mM de CaCl<sub>2</sub>, foi mensurado:

- O pico de força desenvolvida e
- A primeira derivada temporal da força desenvolvida ( $dF/dt$ );

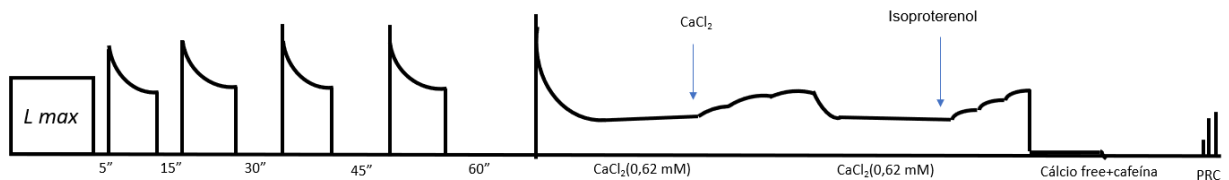
Outro protocolo utilizado neste trabalho foi o estudo da contração após curtas pausas de estímulos elétricos, manobra experimental que permite avaliar, indiretamente, o equilíbrio entre o papel captador, armazenador e liberador de Ca<sup>2+</sup> do RS e a extrusão deste íon da célula através do sarcolema (MILL; VASSALLO; LEITE, 1992). Para isso, no protocolo de potenciação pós pausa (PPP) foram feitas pausas de 5, 15, 30, 45 e 60 s na estimulação elétrica e a contração após a pausa de estímulos foi normalizada pelo valor relativo às contrações que precediam a pausa, aguardando-se o retorno da contração para as condições basais entre um teste de pausa de estímulos e outro.

A responsividade ao Ca<sup>2+</sup> extracelular foi mensurada a partir de uma curva

concentração-reposta de  $\text{CaCl}_2$  na solução nutritora de 0,5 a 2 mM, considerando-se a força desenvolvida no platô de cada concentração da curva.

A capacidade de resposta inotrópica à estimulação do receptor  $\beta$ -adrenérgico foi medida também em curva concentração-resposta ao agonista isoproterenol ( $2 \times 10^{-12}$  a  $2 \times 10^{-7}$  M) em solução de 0,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  e considerou-se a força desenvolvida no platô da curva de cada dose.

O papel do influxo transarcoleal para a contração miocárdica também foi indiretamente avaliado no músculo papilar. Para tanto, ao fim da curva de isoproterenol, a solução nutritora foi trocada por solução livre de  $\text{CaCl}_2$  e acrescida de cafeína (10 mM) para esvaziamento do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS por 10 minutos. Após, o estímulo elétrico foi desligado e o músculo permaneceu na solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e acrescida de cafeína por mais 10 minutos. Em seguida, a solução foi trocada por pela solução Krebs-Henseleit normal e o estímulo elétrico foi religado. A primeira contração após o religamento do estímulo (PRC, *post rest contraction*), considerada como totalmente dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, foi representada como porcentagem da força desenvolvida em  $L_{\text{máx}}$ .



**Figura 10:** Esquema representativo do protocolo de avaliação de contratilidade do músculo papilar. PRC: Post Rest Contraction. Elaborado pela autora.

#### 7.4 Análises ponderais e depósito de ferro

Amostras de sangue foram coletadas por punção da aorta abdominal, centrifugadas a  $2000 \times g$  por 20min a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi coletado e congelado a  $-20^\circ\text{C}$ . Nas amostras de soro foram analisados os parâmetros de sobrecarga de ferro: concentração sérica de ferro ( $\mu\text{g/dL}$ ), transferrina ( $\mu\text{g/dL}$ ) e saturação de transferrina (%). As medidas foram realizadas pelo método colorimétrico direto

(analisador automático de bioquímica CMD 800i *Wiener Laboratories*, Rosário, Argentina) no setor de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, além dos níveis das enzimas indicadoras de dano cardíaco (creatina fosfoquinase total e isoforma MB) e hepático (alanina aminotransferase – ALT, aspartato aminotransferase -AST e fosfatase alcalina - FAL).

Para mensurar as concentrações de ferro nas amostras de fígado e no músculo cardíaco foi utilizada a espectrometria de absorção atômica de chama (F AAS), como descrito anteriormente por Bressy et al, em um espectrômetro ZEE nit 700 (*Analytik Jena*, Jena, Alemanha).

As amostras foram secas em estufa por 72 horas à 60 °C e maceradas com o auxílio de um pistilo. Para o processo de decomposição assistida por radiação micro-ondas, pesou-se cerca de 0,1 g de amostra em um tubo de teflon, ao qual foram adicionados os seguintes reagentes: 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%v/v; 6 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura tipo 1+ e 1 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. O programa de aquecimento utilizado teve uma rampa de aquecimento até 130 ± 5 °C em 10min e permanência por 10 min. Em seguida, outra rampa de aquecimento até 180± 5 °C em 10 min e permanência por 10 min e, finalmente, uma rampa de resfriamento de 15 min. Após a decomposição, as amostras foram filtradas e avolumadas para 15 mL em tubo de polipropileno. As amostras digeridas foram então analisadas no F AAS.

A massa corpórea foi utilizado para normalização da massa dos órgãos.

## 7.5 Análises histológicas

Amostras de fígado e coração foram coletadas e fixadas com formalina a 4%. Depois disso, os tecidos foram incorporados em parafina e cortados em seções de 5 µm que foram montadas em lâminas e coradas com ferricianeto de potássio (azul da Prússia) e *pricrosirius red* para analisar o depósito de ferro e colágeno nos tecidos, respectivamente. Antes de serem expostas aos corantes, as amostras foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em álcool e água destilada.

Para a coloração de azul da Prússia, as lâminas foram expostas durante 30 min à solução de ferrocianeto de potássio (5%) e ácido clorídrico (5%). A seguir as lâminas foram imersas durante 5 min em água destilada e a contra coloração foi realizada em banho com eosina (90 min). A análise histológica de deposição de ferro

foi qualitativa, a concentração tecidual do metal foi analisada como descrito na seção anterior.

Já nas lâminas coradas com *picrossirius red*, as etapas de desparafinização e hidratação foram idênticas, substituindo apenas o corante azul da Prússia e a deposição de colágeno foi mensurada como porcentagem da área observada. Cada lâmina (amostra) foi avaliada em três campos de observação (triplicata por amostra) e o resultado de cada amostra é a média do valor dos três campos.

A preparação e coloração histológica foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Histologia da UFES. As imagens das colorações foram capturadas com um microscópio (Leica, 10x e 40x objetiva) usando uma câmera digital. A análise histológica foi realizada no software *ImageJ*.

## **7.6 Medição dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

Para avaliar a peroxidação lipídica induzida pela sobrecarga e o efeito do protocolo de exercício sobre este índice, foi medida a concentração plasmática de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). As TBARS, em especial o malondialdeído, são produtos da oxidação de ácidos graxos de membranas células e lipoproteínas, de modo que sua concentração é proporcional ao nível de oxidação destas moléculas.

O sangue foi coletado como já descrito e transferido para tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O plasma foi obtido por centrifugação (1500 × g, 4 °C, 15 min). Uma alíquota de plasma foi incubada com ácido tiobarbitúrico 0,8% (TBA), tampão de ácido fosfórico a 1% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), e dodecil sulfato de sódio a 0,8% (SDS), a 100°C durante 60 minutos. Os resultados da análise de absorvância em Leitora de Microplaca para Absorvância ELx808 (*Biosystems*) a 540 nm foram expressos como µmol/L.

Amostras de tecido cardíaco armazenadas a -80°C foram utilizadas para análise do nível de TBARS também no coração. As amostras homogeneizadas foram acrescidas de TBA 1% em e ácido fosfórico 7% e aquecidas a 95 °C. Em seguida, acrescentou-se butanol e as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm a 4 °C por 5 minutos. A fase superior do centrifugado foi coletada e a placa de 96 poços foi

montada em duplicata e lida a 540 nM. Os resultados foram corrigidos pela concentração de proteína da amostra, determinada pelo método de Bradford e estão expressos em nmol/mg de proteína.

## 7.7 Análise proteica pela técnica de Western blotting

Para avaliar a expressão de proteínas de interesse, amostras do ventrículo esquerdo foram rapidamente separadas e congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento e análise. No dia dos ensaios, o ventrículo esquerdo foi homogeneizado em tampão RIPA (*Sigma Aldrich*, St Louis, EUA) e centrifugado a  $1200 \times g$ . O sobrenadante foi coletado e a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford. Alíquotas de cada amostra contendo  $80\text{ }\mu\text{g}$  de proteína tiveram solução de Lammeli adicionada. As amostras, sem aquecimento, correram em gel STAIN FREE 10% ou 12% (*TGX Stain-Free Gels*, Bio-Rad) a 80 V por 3 horas, em cuba de eletroforese (*MiniPROTEAN Tetra Bio-Rad*) em tampão contendo 140 mM de glicina, 37 mM Tris base e 1% de dodecil sulfato de sódio (*Sigma Aldrich*, St Louis, EUA).

Após a corrida, o gel foi ativado e uma fotografia foi tirada no aparelho *ChemiDoc*. As amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad) por 22 horas a 0,02 A em tampão de transferência contendo glicina 140 mM, Tris base 37 mM, 20% de metanol, sem SDS. A eficiência da transferência foi verificada por nova foto no *ChemiDoc* e as membranas foram bloqueadas com solução leite 5% em TBST por uma hora. Para análise de substratos fosforilados da PKA, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário Ser/Thr PKA *substrate* (1:1000; RRXS\*/T\* 100G7E – *Cell Signaling Technology Inc.*, Beverly, MA, EUA) por 18 horas. Também foram analisadas as expressões das enzimas antioxidantes SOD 1 (1: 1200 - *Sigma-Aldrich* SAB5200083\_ RRID:AB\_2890259) e catalase (1: 1500 - *Sigma-Aldrich* Cat# C0979, RRID:AB\_258720), colágenos tipo I (1: 500 Santa Cruz *Biotechnology* Cat# sc-293182, RRID:AB\_2797597) e tipo III (1: 500 - Santa Cruz *Biotechnology* Cat# sc-271249, RRID:AB\_10613985), e das proteínas envolvidas no acoplamento excitação contração SERCA (1:1000. Santa Cruz *Biotechnology* Cat# sc 8094) e PLB (1:2000 Santa Cruz *Biotechnology* Cat# sc 393990).

Depois destas incubações, as membranas eram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit ou anti-mouse (1:5000, SIGMA) durante 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem cuidadosa com TBST, as bandas correspondentes as proteínas de interesse foram detectadas usando um sistema de detecção de coloração *Western ECL Plus* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

A aquisição das imagens foi realizada por meio do *ChemiDoc* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA), e os sinais no *immunoblot* foram quantificados pelo software *ImageLab* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA). A expressão de cada proteína de interesse foi normalizada pelo conteúdo de proteína total obtido pela detecção fluorescente de resíduos de triptofano para a respectiva amostra (ROSSI et al., 2020; SUKUMARAN et al., 2017). Após a revelação, as membranas incubadas com anticorpo anti Ser/Thr PKA *substrate* passaram por lavagem com solução de *stripping* e foram incubadas com anticorpo anti-PKA II $\alpha$  (1:200; SC909 – Santa Cruz Biotechnology, Bath, RU) e o processo se repetiu para a revelação dessas membranas. Para sugerir o grau de atividade da PKA, o nível de substratos fosforilados da PKA também foi normalizado pelo conteúdo de PKA II $\alpha$  para cada amostra.

## 7.8 Análise Estatística

Os dados foram testados para distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados das análises são expressos como a média  $\pm$  EPM. Para cada conjunto de dados, o teste de Grubbs (alfa 0,05) foi utilizado para identificar e excluir dados aberrantes (*outliers*). As diferenças foram analisadas usando o teste *t* de Student, ANOVA uma ou duas vias, seguidas de um teste post hoc de Fisher para múltiplas comparações. Para todas as análises,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas no software *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism* versão 8 para *Windows*, La Jolla, CA, EUA).

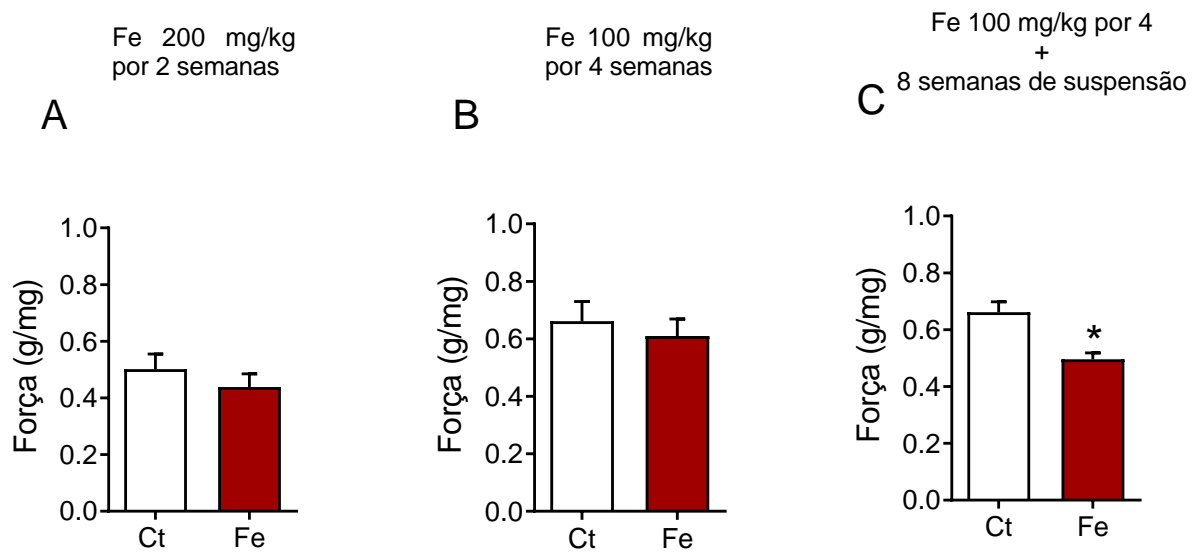
## 8. Resultados

### 8.1 Estabelecimento do modelo de sobrecarga crônica de ferro

A primeira etapa deste trabalho foi o estabelecimento de um modelo de sobrecarga de ferro em ratos capaz de comprometer a força de contração do músculo papilar (Figura 11), para investigação da cardiopatia provocada por sobrecarga de ferro em ratos.

Num primeiro momento, os animais receberam injeções i.p. de 200 mg/kg/dia de ferro-dextrano durante 5 dias por semana, por 2 semanas. Ao final deste período, a força de contração do músculo papilar se apresentou inalterada ( $p=0,4$ ). Estudos do nosso grupo com exposição aguda de músculos papilares a diferentes concentrações de ferro mostraram que a dose e o tempo de exposição são determinantes na causa e magnitude dos efeitos provocados pelo ferro (ÁVILA et al., 2016). Baseados nisto, diminuimos a dose pela metade (100 mg/kg/dia) e prolongamos o tempo de tratamento para 4 semanas, embora mesmo assim não tenhamos identificado prejuízo da contratilidade do músculo papilar ( $p=0,58$ ). Ainda baseados no tempo de exposição como um fator determinante da ação do ferro sobre o coração e sabendo que a sobrecarga de ferro, uma vez estabelecida, se mantém por longo período já que não há mecanismos ativos de excreção deste metal, iniciamos um protocolo onde os animais recebiam as injeções de ferro-dextrano i.p. 100 mg/kg/dia por 4 semanas e a administração era suspensa por 9 semanas e aí sim encontramos comprometimento da força de contração nos músculos papilares isolados ( $p=0,002$ ), conforme mostrado na figura abaixo.





**Figura 11.** Efeito da dose e tempo de exposição ao ferro sobre a força de contração do músculo papilar de ratos. Dados representados em média  $\pm$  EPM. Teste *t* de Student, \* $p < 0,05$  ( $n = 7-8$ ).

## 8.2 Caracterização do modelo experimental

O fenótipo de sobrecarga de ferro e a caracterização do modelo de sobrecarga associado exercício físico estão apresentados na tabela 1 e na figura 12. Ao final dos protocolos, os animais que receberam o ferro-dextrano (grupos Fe e Fe+Ex) apresentavam um fenótipo característico de sobrecarga: aumento do ferro sérico, da saturação de transferina e de biomarcadores de lesão cardíaca e hepática como AST e ALT (Tabela 1 e Figura 15 B – C).

**Tabela 1.** Efeitos do exercício aeróbico em parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro e enzimas indicadoras de dano cardíaco e hepático sobrecarga de ferro.

	Ct	Fe	Fe+Ex
<b>Biometria</b>			
Massa corporal (g)	515 $\pm$ 12	439 $\pm$ 11 *	440 $\pm$ 8 *
Tíbia (mm)	41,3 $\pm$ 0,46	37,46 $\pm$ 1,07*	40,5 $\pm$ 0,47
Massa do coração (mg)	1185 $\pm$ 79	1039 $\pm$ 65	1074 $\pm$ 78
Massa coração/corpo (mg/g)	2,31 $\pm$ 0,16	2,43 $\pm$ 0,15	2,45 $\pm$ 0,17

## Parâmetros hematológicos

Ferro sérico ( $\mu\text{g/dL}$ )	208 $\pm$ 46	447 $\pm$ 41*	428 $\pm$ 28*
Transferrina ( $\text{mg/dL}$ )	122,7 $\pm$ 4,2	114,4 $\pm$ 4,2	118,3 $\pm$ 5,7
Saturação da transferrina (%)	49,5 $\pm$ 3,9	91,8 $\pm$ 1,1*	85,0 $\pm$ 3,9*

## Indicadores de dano tecidual

FAL (U/L)	368 $\pm$ 33	358 $\pm$ 27	389 $\pm$ 29
AST (U/L)	85,1 $\pm$ 4,1	189,1 $\pm$ 22,1 *	123,4 $\pm$ 23,6 #
ALT (U/L)	54,8 $\pm$ 2,8	124,4 $\pm$ 29,7*	85,9 $\pm$ 15,9

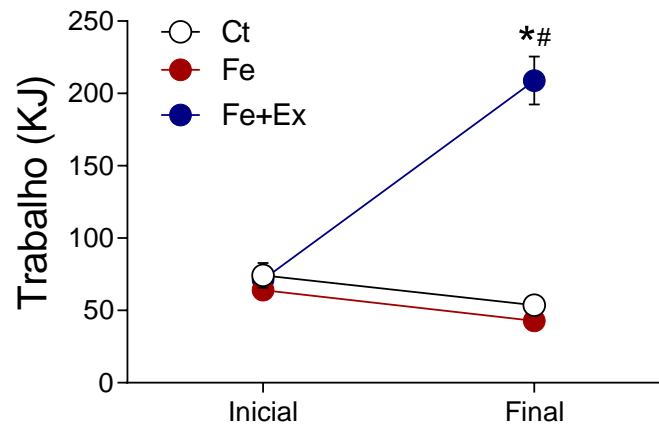
Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n = 7–10). \*p<0.05 vs Ct, #p<0.05 vs Fe, ANOVA uma via e pós teste de Fisher. FAL: fosfatase alcalina, ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase.

Quando avaliamos a capacidade física dos animais, observamos que o grupo exercitado também teve aumento no trabalho desempenhado no último teste de esforço em esteira em relação ao grupo Ct e Fe (Tabela 2, Figura 12).

**Tabela 2.** Efeitos da sobrecarga de ferro e treinamento aeróbico de intensidade moderada sobre indicadores de capacidade física

Capacidade física	Ct	Fe	Fe+Ex
Tempo até a fadiga, inicial (min)	17,3 $\pm$ 1,10	16,1 $\pm$ 0,81	16,8 $\pm$ 1,22
Velocidade máxima inicial (m/min)	23,1 $\pm$ 1,53	21,4 $\pm$ 0,94	22,8 $\pm$ 1,25
Tempo até fadiga final (min)	10,3 $\pm$ 0,96	8,3 $\pm$ 0,87	25,1 $\pm$ 1,10 **
Velocidade máxima final (m/min)	17,3 $\pm$ 0,10	14,1 $\pm$ 0,81#	31,8 $\pm$ 1,11*

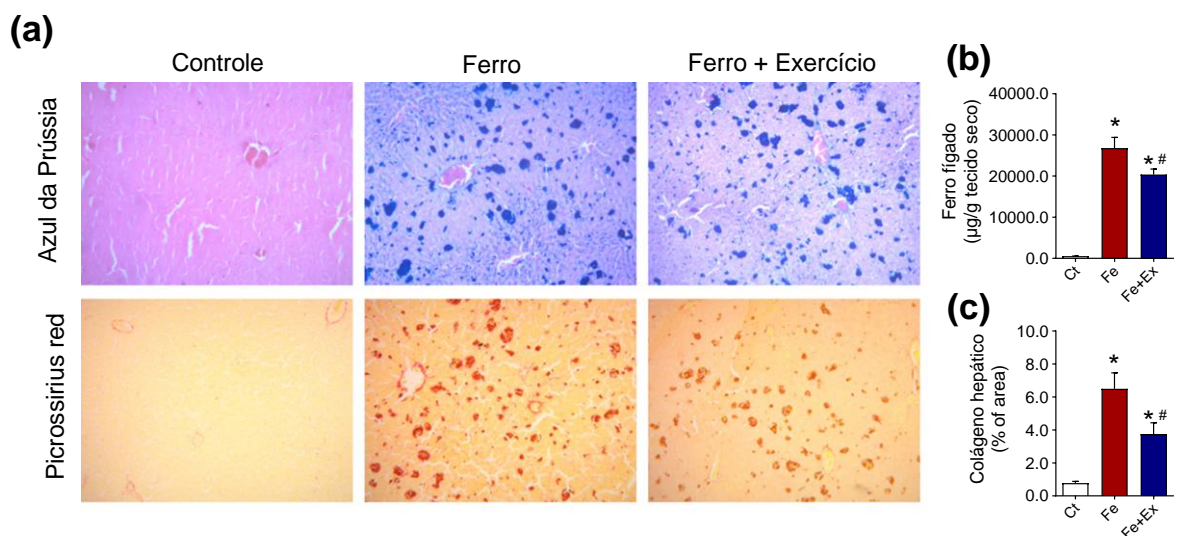
Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n = 10). p<0.05 vs Ct, #p<0.05 vs Fe, ANOVA uma via e pós teste de Fisher.



**Figura 12.** Trabalho desempenhado pelos animais nos testes de esforço inicial e final (após 8 semanas de corrida em esteira). Dados expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 7-10$ ). \* $p < 0.05$  vs Ct, # $p < 0.05$  vs Fe, ANOVA uma via e pós teste de Fisher.

O tratamento com ferro-dextrano aumentou não apenas os níveis séricos de ferro, mas também o conteúdo tecidual (Figuras 13 e 14). Os depósitos de ferro no fígado (Figura 13) e no coração (Figura 14) avaliados por F AAS indicaram que os depósitos de ferro foram significativamente aumentados nos grupos Fe e Fe+Ex em comparação com o Ct.

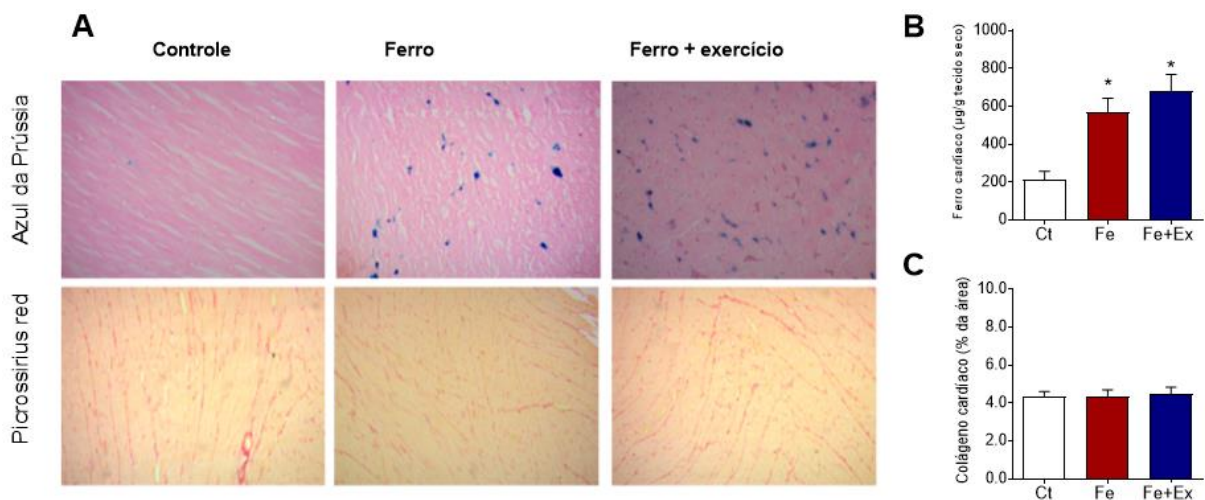
À microscopia, foi observada deposição significativa de ferro nas células de Kupffer e no parênquima hepático nos grupos tratados com ferro, enquanto nenhum depósito foi encontrado no Ct (Figura 13A).

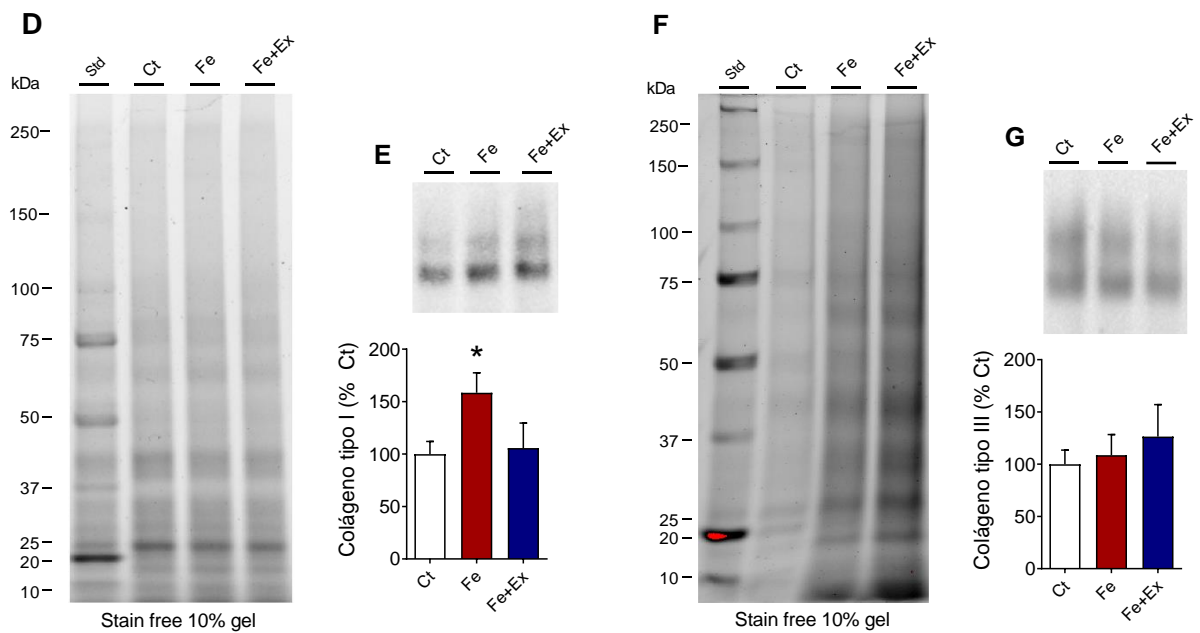


**Figura 13.** Microfotografias representativas de seções de fígado coradas com azul da Prússia ou Picrossirius de grupos experimentais (A). Em B e C, teor de ferro medido por FAAS e conteúdo de colágeno expresso como porcentagem da área de superfície, respectivamente. Os dados são as médias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs Ct, # $p < 0,05$  vs Fe, usando ANOVA de uma via e pós teste de Fisher.

No fígado (Figura 13 A-C), a deposição de ferro foi acompanhada por fibrose intersticial, conforme indicado pelo aumento do conteúdo de colágeno. Apesar do efeito parcial sobre o aumento dos níveis de ferro, o exercício aeróbio de intensidade moderada impediu a elevação da AST (Tabela 1) em ratos treinados em comparação com ratos com sobrecarga de ferro, indicando que houve um efeito de preservação dos hepatócitos, mas não teve efeito sobre a fibrose hepática (Figura 13).

Nas avaliações do tecido cardíaco, a análise de FAAS e a coloração histológica também evidenciam acúmulo de ferro nos grupos com sobrecarga Fe e Fe+EX (Figura 14 A e B). Curiosamente, apesar do aumento nos valores indicadores de expressão de colágeno tipo I, a deposição de colágeno não aparece alterada na coloração com *picrossirius red* e não temos o estabelecimento de fibrose cardíaca (Figura 14 A, C-G).





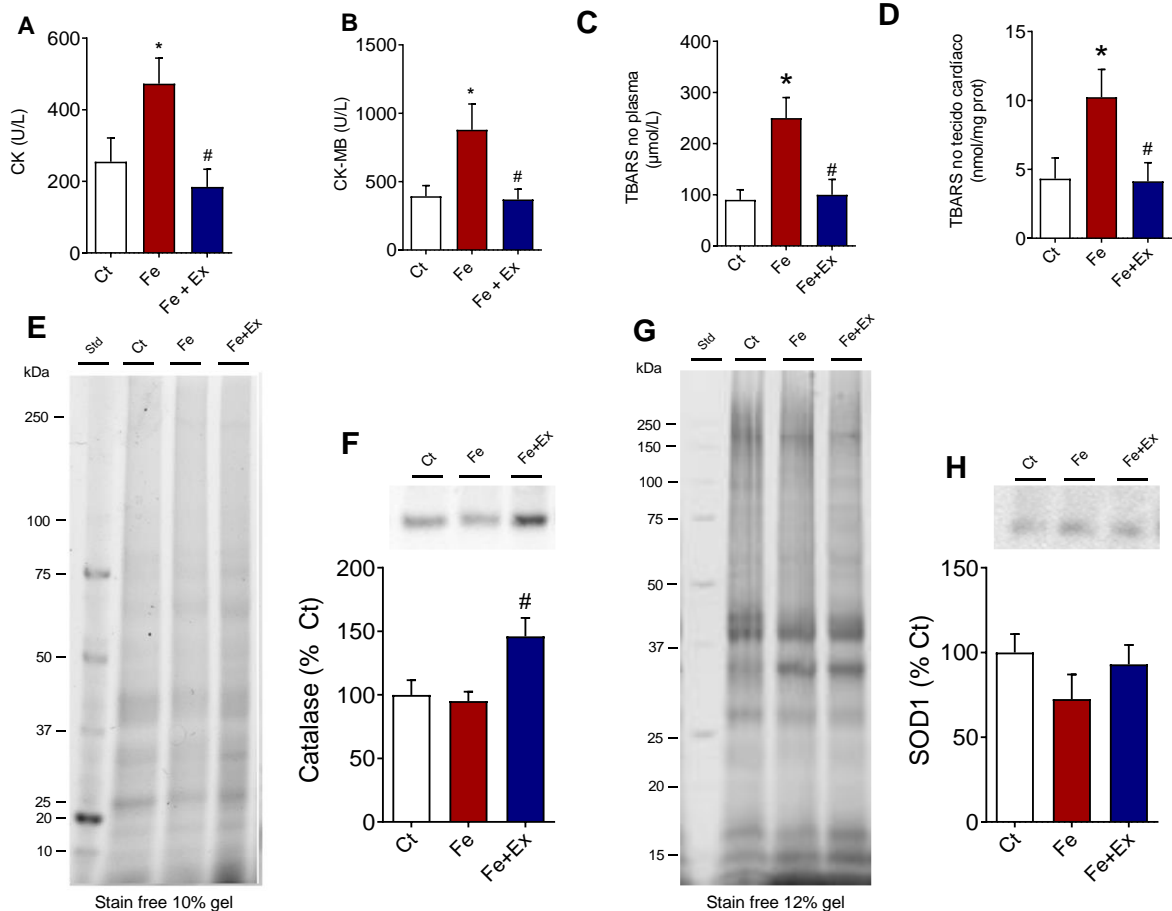
**Figura 14.** Microfotografias representativas de seções de ventrículo esquerdo coradas com azul da Prússia ou Picrossirius de grupos experimentais (A). Em B e C, teor de ferro medido por FAAS e conteúdo de colágeno expresso como porcentagem da área de superfície, respectivamente. O conteúdo proteico do colágeno cardíaco tipo I (E) e tipo III (G) foi avaliado por imunoblotting e as densidades das bandas foram normalizadas pela respectiva proteína total. Os dados são as médias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs Ct, # $p < 0,05$  vs Fe, usando ANOVA de uma via e pós teste de Fisher.

Em resumo, nosso modelo de sobrecarga de ferro apresenta redução de massa, aumento de indicadores séricos de sobrecarga de ferro, depósito de ferro no coração e fígado, acompanhado de fibrose hepática e dano aos hepatócitos. O modelo de sobrecarga de ferro associada ao exercício físico se caracteriza também por redução de massa, níveis altos de indicadores de sobrecarga e depósito tecidual, com redução da fibrose hepática e dos indicadores de danos aos hepatócitos.

#### 8.4 Análises de função cardíaca

Uma vez verificado o depósito de ferro no tecido cardíaco no grupo Fe e Fe+Ex, analisamos seu efeito sobre a função cardíaca. Como mostrado na Figura 15 A e B, e já mencionado, houve aumento da concentração circulante de enzimas que indicam dano miocárdico, CK e CK-MB, o que não ocorreu no grupo Fe+Ex (Figura 15 C-D). Estes resultados são acompanhados do aumento dos níveis de TBARS no plasma e no tecido cardíaco (C e D), indicando dano celular oxidante no grupo Fe, apesar de

não haver prejuízo na expressão das enzimas antioxidantes. Neste sentido, o grupo Fe+Ex não apresenta os níveis de TBARS elevados como no grupo Fe e este resultado se apresenta associado ao aumento de expressão de catalase (Figura 15 F).



**Figura 15.** Os níveis de creatina fosfoquinase sérica (CK; em A) e creatina fosfoquinase-MB (CK-MB; em B) TBARS plasmáticos (C), cardíacos (D) e foram medidos nos grupos experimentais. Também foi mensurada a expressão das enzimas antioxidantes catalase (E e F) e SOD 1 (G e H). Os dados são expressos em médias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs Ct, #  $p < 0,05$  vs Fe, usando ANOVA de uma via e o pós teste de Fisher.

O grupo com sobrecarga de ferro (FE) não apresentou efeitos nas medidas de frequência cardíaca e PDF no VE, realizadas nos animais sob efeito de anestesia, como demonstrado na Tabela 3. Porém, este grupo apresentou reduções

significativas na pressão sistólica desenvolvida pelo VE, que não aparece restaurada no grupo Fe+Ex. Já as derivadas de pressão, também comprometidas no grupo Fe aparentaram reestabelecidas no grupo Fe+Ex, quando comparadas do grupo Ct,

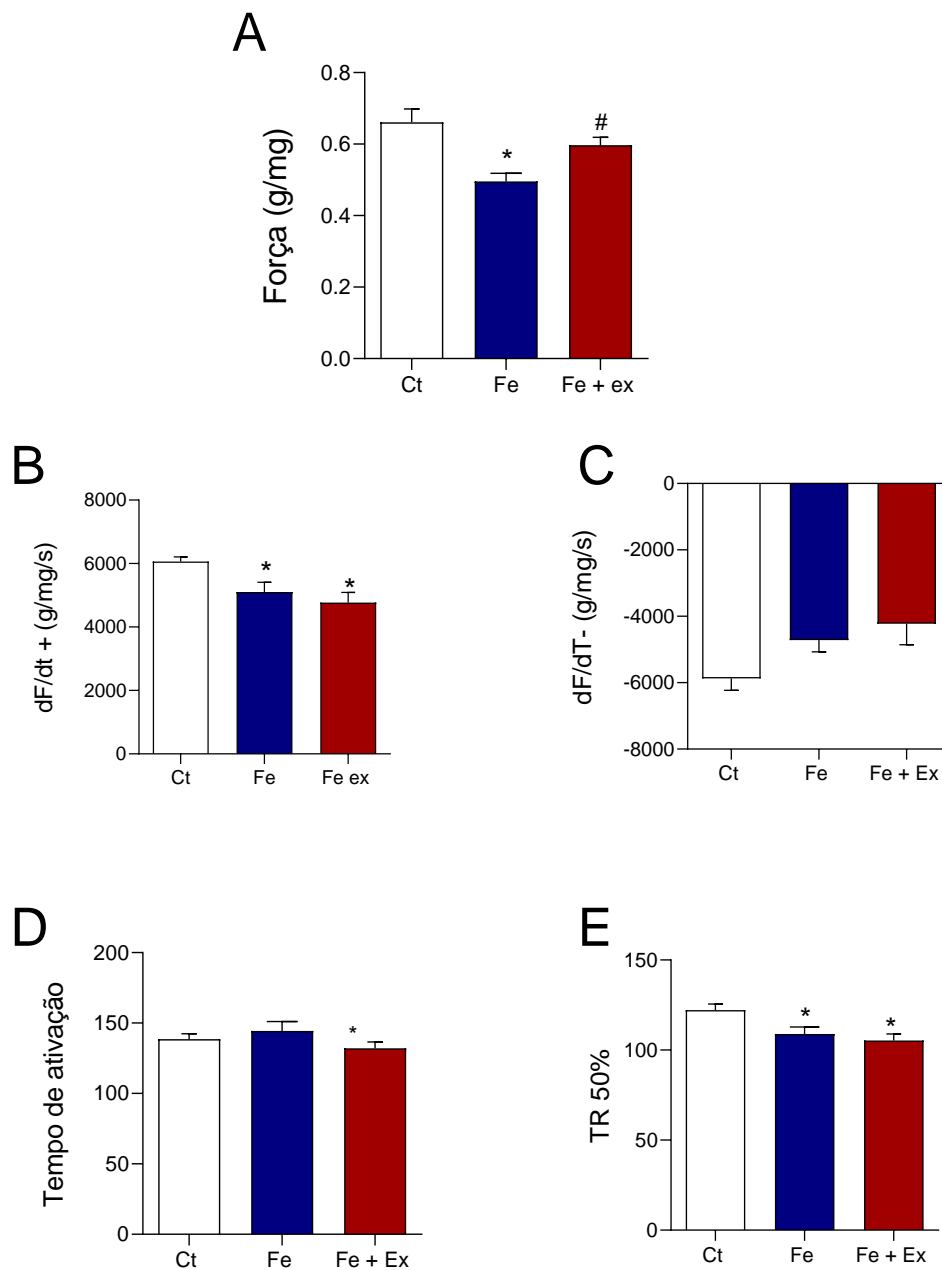
A redução da PSVE foi acompanhada pelo comprometimento da força contrátil dos músculos papilares avaliados “*in vitro*” como apresentado na figura 17.

**Tabela 3.** Efeitos da sobrecarga de ferro e treinamento aeróbico de intensidade moderada sobre os parâmetros hemodinâmicos

Parâmetros	Ct	Fe	Fe+Ex
Frequência Cardíaca (bpm)	341 ± 13	391 ± 21	334 ± 12
PS VE (mmHg)	139,0 ± 3,5	100,8 ± 4,9 *	109,8 ± 4,3 *
PDF VE (mmHg)	2,32 ± 0,40	1,37 ± 0,38	1,53 ± 0,42
+dP/dtmax (mmHg/s)	7535 ± 272	5664 ± 491 *	6445 ± 707
-dP/dtmax (mmHg/s)	-5072 ± 382	-3972 ± 194 *	-4611 ± 538

PSVE: pressão sistólica desenvolvida pelo ventrículo esquerdo; PDF VE: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Dados expressos como média ± EPM (n = 6 – 10). p<0.05 vs Ct, #p<0.05 vs Fe, ANOVA uma via e pós teste de Fisher.

O exercício físico foi capaz de prevenir o comprometimento da força de contração do músculo papilar causado pela sobrecarga de ferro, bem como a integridade do músculo cardíaco pela análise das enzimas de lesão muscular circulante, mas não teve efeito sobre as alterações provocadas pela sobrecarga de ferro nos tempos de ativação e derivadas de força (Figura 16 C-D) e na pressão diastólica do VE (Tabela 3).



**Figura 16.** A mecânica miocárdica in vitro foi avaliada como força desenvolvida (A: força desenvolvida pelo músculo papilar corrigida por sua massa em miligramas), suas derivadas ( $+dF/dt_{max}$  e  $-dF/dt_{max}$ , em B e C respectivamente) e os tempos de ativação e para 50% de relaxamento (em D e E). Os dados são as médias  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Ct, # $p < 0,05$  vs Fe, usando ANOVA de uma via e o teste post hoc de Fisher.

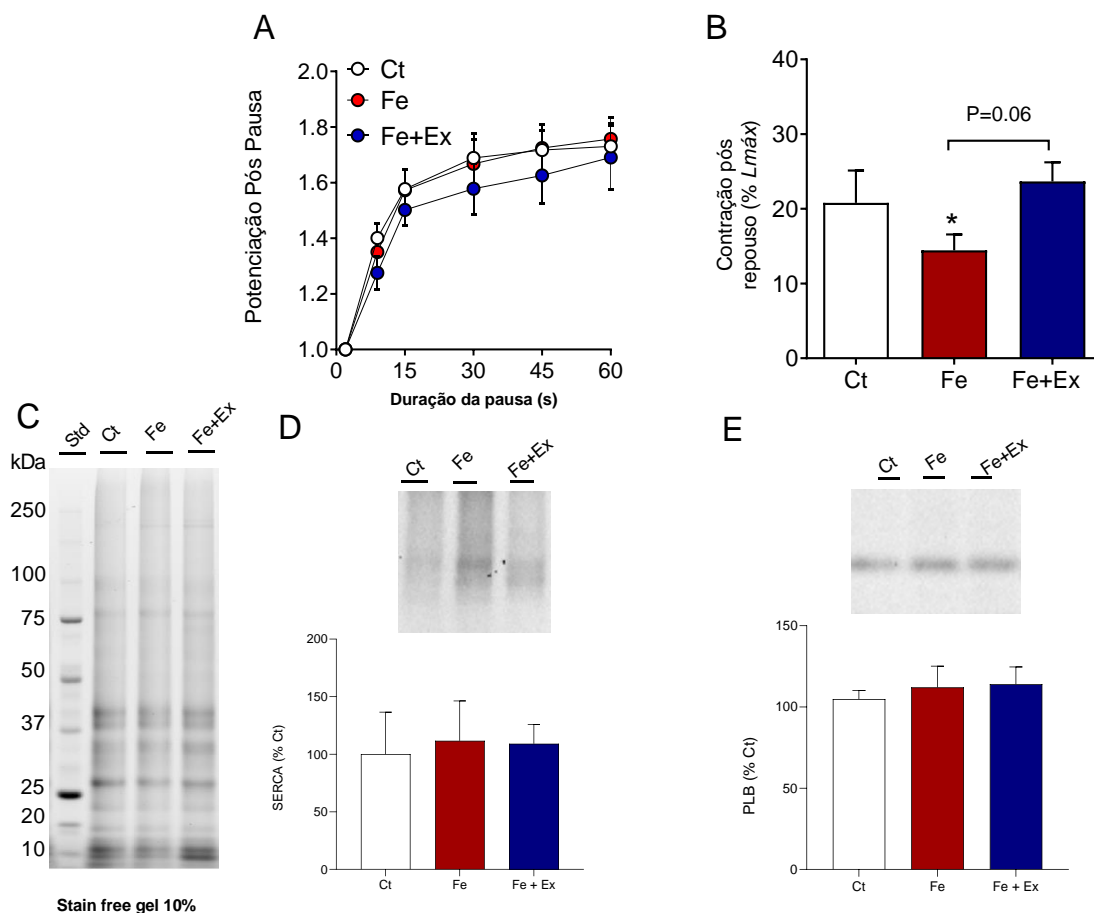
### 8.5 Respostas inotrópicas do músculo papilar

Uma vez estabelecido o comprometimento contrátil dos músculos papilares após período acumulado de 13 semanas de exposição crônica ao ferro, investigamos



indiretamente a funcionalidade do Retículo Sarcoplasmático, da responsividade do músculo papilar ao  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e da resposta ao agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol nos grupos submetidos ou não ao treinamento físico aeróbio de intensidade moderada.

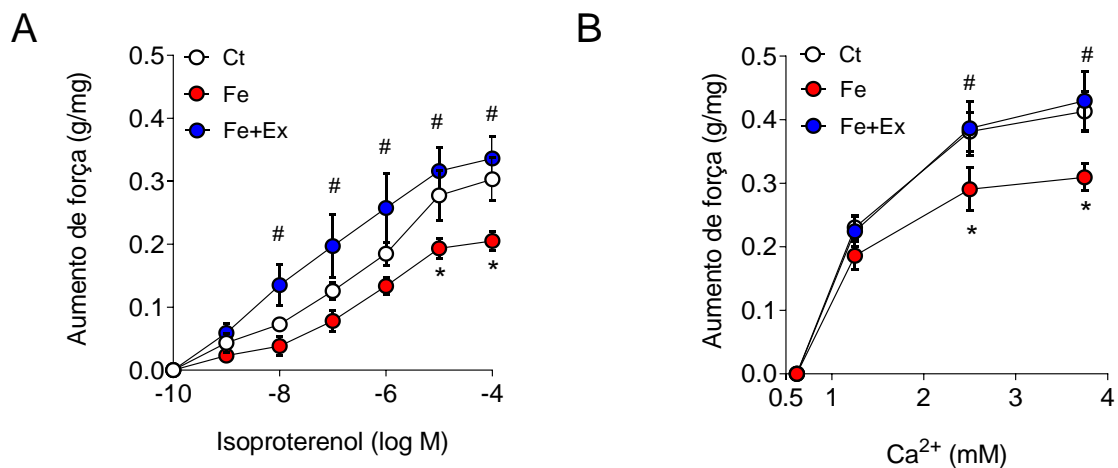
Como demonstrado na figura 17 A, não há diferença entre a potenciação pós pausa (PPP), que reflete os mecanismos de liberação de cálcio para contração *versus* aqueles aqueles para extrusão do cálcio citosólico, acompanhados da preservação da expressão das proteínas SERCA (C) e PLB (D). No entanto, a porcentagem de contração, que depende do influxo de cálcio transsarcolemal, foi significativamente reduzida pela sobrecarga de ferro, enquanto foi preservada no músculo cardíaco isolado do grupo Fe+Ex (Figura 17 B).



**Figura 17.** Potenciação da resposta contrátil avaliada após curtas pausas do estímulo (A), e percentual da contração dependente do influxo transsarcolemal de cálcio – contração pós repouso - (B). Em C e D, expressão proteica da SERCA (C) e PLB (D). Os dados são as

médias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs Ct, # $p < 0,05$  vs Fe, usando ANOVA de uma (B,C e D) ou duas vias (A) e pós teste de Fisher.

Também investigamos se a sobrecarga crônica de ferro alterou a resposta inotrópica ao aumento do cálcio extracelular e à estimulação  $\beta$ -adrenérgica por meio da curva de resposta à concentração de isoproterenol (Figura 19). Os resultados indicaram que ambas as respostas inotrópicas positivas foram deprimidas no grupo Fe. Por outro lado, o exercício físico preservou essas respostas. Conforme mostrado na Figura 18 A, a estimulação inotrópica deprimida com isoproterenol foi significativamente melhorada no grupo Fe+Ex. Além disso, o grupo Fe+Ex exibiu resposta inotrópica restaurada ao cálcio extracelular em comparação com o grupo Fe (Figura 20b).

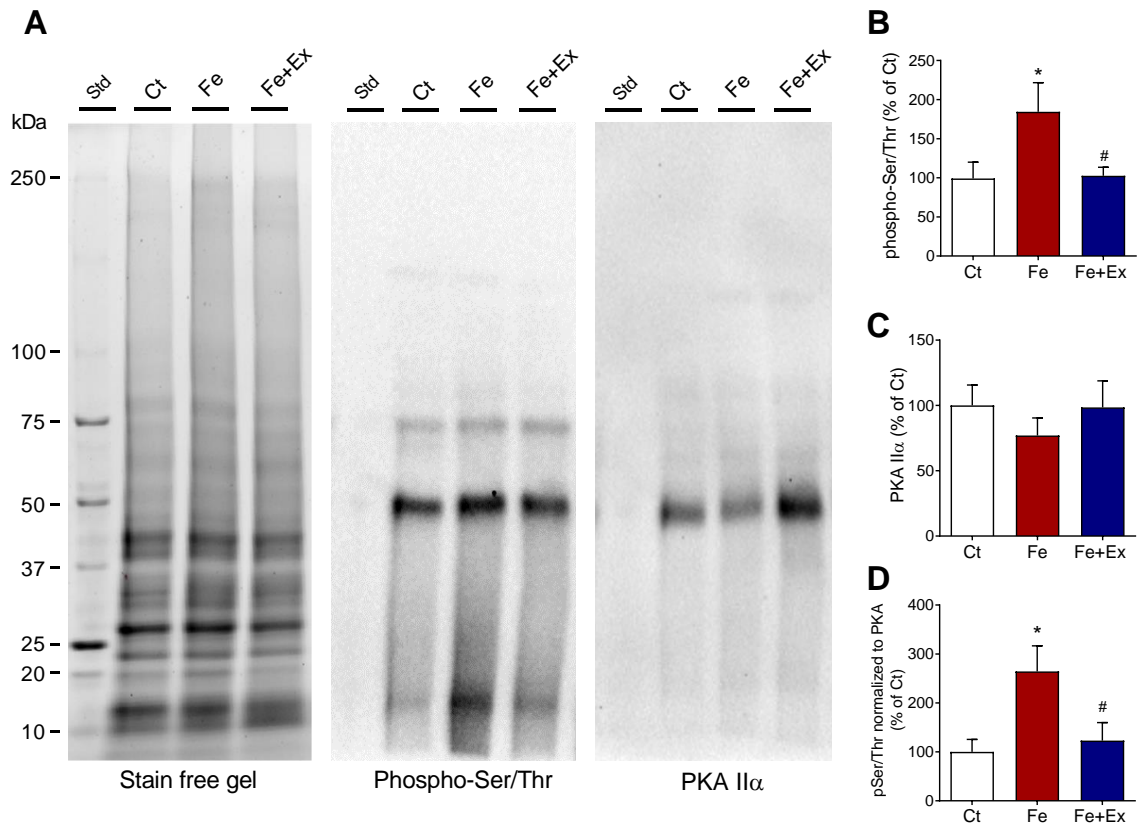


**Figura 18.** Respostas inotrópicas do músculo papilar ao isoproterenol (a) e ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução do banho (b) foram avaliados. Os dados são as médias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs Ct, # $p < 0,05$  vs Fe, usando ANOVA de duas vias e pós teste de Fisher.

## 8.6 Expressão da PKA cardíaca e alvos fosforiláveis

A partir destes resultados, especialmente os relacionados à estimulação adrenérgica, avaliamos a expressão da PKA e o conteúdo de substratos fosforilados alvos da PKA (Figura 19) e verificamos que, enquanto a expressão desta enzima não sofre alteração em decorrência da exposição crônica ao ferro acompanhada ou não de exercício físico, a quantidade de sítios proteicos fosforilados pela PKA (tanto em termos

absolutos quanto normalizados pelo conteúdo de PKA) está significativamente aumentada no grupo Fe, enquanto o grupo Fe+Ex apresentou níveis equivalentes ao grupo Ct.



**Figura 19.** O exercício aeróbio de intensidade moderada aumenta a ativação cardíaca da PKA em ratos com sobrecarga de ferro. Os conteúdos de PKA (A) no miocárdio dos grupos experimentais foram avaliados por imunoblotting. Os níveis de fosforilação de substratos de PKA nas amostras cardíacas (B) foram avaliados usando um anticorpo que reconhece proteínas contendo um fosfo-Ser / Thr. A soma de todas as proteínas fosfo-PKA por coluna foi estimada por densitometria e normalizada pela proteína total da referida coluna. Os dados são as médias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , usando ANOVA de uma via e o teste post hoc de Fisher.

## 9. Discussão

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que o protocolo de exercício físico de intensidade moderada realizado em esteira por 8 semanas é capaz de prevenir parcialmente os danos cardíacos causados pela sobrecarga crônica de ferro em ratos. Após 13 semanas de exposição ao ferro (4 semanas de administração e 9 semanas de suspensão), o prejuízo da força contrátil do músculo papilar isolado do VE de ratos foi amenizado no grupo submetido ao exercício físico moderado.

A primeira etapa deste trabalho buscou o estabelecimento de um modelo de sobrecarga de ferro em ratos, capaz de comprometer a função miocárdica. Sabe-se que o sexo dos pacientes que sofrem com sobrecarga crônica de ferro tem interferência em suas complicações - homens tem efeitos mais severos da sobrecarga de ferro na talassemia e na hemocromatose hereditária – e os dados já existentes na literatura indicam diferenças entre sexo e idade também em animais submetidos à sobrecarga - a deposição de ferro no coração de machos é maior que em fêmeas e estes efeitos exacerbados são observados em machos púberes e pós-púberes (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004; BREWER et al., 2014; BURKE et al., 1998; WOOD et al., 2010).

Além disso, um estudo brasileiro com pacientes de 7 a 18 anos submetidos a transfusões sanguíneas repetidas mostrou que mesmo nessa idade já pode ocorrer deposição cardíaca de ferro em decorrência da sobrecarga deste metal (FERNANDES; FABRON; VERISSIMO, 2009). Estes fatores nos levaram a determinar animais machos jovens, com 8 semanas de idade, como alvo de investigação dos efeitos crônicos da sobrecarga de ferro em nosso modelo experimental.

Apesar de já ser sabido que o depósito de ferro no coração, o comprometimento da função cardíaca e suas complicações em condições de sobrecarga estão associadas a maior parte das mortes nesses pacientes (BRASIL, 2013; BREWER et al., 2014; FERNANDES; FABRON; VERISSIMO, 2009; FINE, 2000; GROTTTO, 2008), existe uma relativa carência de um modelo de sobrecarga crônica de ferro em ratos, que mimetize situações como aquelas relacionadas a administração excessiva por politransfusões, por exemplo.

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa já havia realizado uma série de estudos com administração crônica de ferro em ratos que evidenciaram alterações vasculares e endócrinas importantes associadas a elevação do ferro sérico (BERTOLI et al., 2018; FIDELIS et al., 2019; MARQUES et al., 2019; ROSSI et al., 2015). Entretanto, esses estudos ainda não contemplavam a análise da morfologia e função cardíacas.

Nosso protocolo definido na primeira etapa e utilizado para a avaliação dos impactos do exercício físico foi eficiente em desenvolver um modelo de sobrecarga crônica de ferro em que os níveis séricos de ferro permaneceram aumentados, consistente com o que é encontrado em pacientes nessas condições (HARADA et al., 1998; SONG et al., 2016) e a saturação de transferrina também excedeu o limite de 20-50% usado para diagnosticar a sobrecarga de ferro (ELSAYED; SHARIF; STACK, 2016; SEBASTIANI; TEMPESTA; ALBERTI, 2012).

Este fenótipo da sobrecarga de ferro também é compatível com parâmetros medidos em modelos com 4 semanas de injeção seguida da avaliação imediata, já publicados por nosso grupo (BERTOLI et al., 2018; MARQUES et al., 2015), e demonstra que a sobrecarga imposta pelas 4 semanas é sustentada ao longo das semanas subsequentes, estando o organismo continuamente exposto a altas concentrações de ferro mesmo após a cessação das injeções. Esse fato fora recentemente reportado por Rossi e colaboradores (ROSSI et al., 2020) utilizando protocolo semelhante, e está provavelmente relacionado à ausência de mecanismos ativamente recrutáveis para regular a excreção de ferro em excesso.

A descrição de modelos para estudo da sobrecarga de ferro é importante porque além de ser uma consequência das desordens relacionadas ao metabolismo do ferro e de transfusões sanguíneas recorrentes, níveis elevados de ferro no soro são fatores de risco, ou ainda estão associados a outras condições como maior mortalidade em pacientes com sepse (LAN et al., 2018), risco de preeclampsia em gestantes (LIU et al., 2019), risco de desenvolver alguns tipos de neoplasias, como de pulmão, mama e fígado (CHEN et al., 2018; WEN et al., 2014), agravamento de insuficiência cardíaca preexistente (PATEREK; MACKIEWICZ; MAÇZEWSKI, 2019) e, como já introduzido, não se trata apenas de um xenobiótico, mas de um metal essencial à manutenção da homeostase.

Em relação ao protocolo de injeção, a via intraperitoneal é comumente usada para simular um estado crônico de sobrecarga de ferro em humanos, independentemente da etiologia e permite uma administração mais controlada e doses mais altas de infusões, e evita os processos de controle fisiológico da absorção intestinal de ferro durante condições de sobrecarga, como bloqueio da mucosa e regulação negativa de receptores DMT1 (ESPARZA et al., 2015; WILKINSON; PANTOPOULOS, 2014).

Embora nosso modelo seja compatível com vários parâmetros de sobrecarga de ferro em humanos como mencionado e, até agora, este é o primeiro trabalho que estabelece uma associação entre sobrecarga de ferro crônica e cardiomiopatia em ratos, essas alterações não configuram a condição de insuficiência cardíaca comumente observada em pacientes (PATEREK; MACKIEWICZ; MAÇZEWSKI, 2019; ZHANG et al., 2019), como discutido adiante.

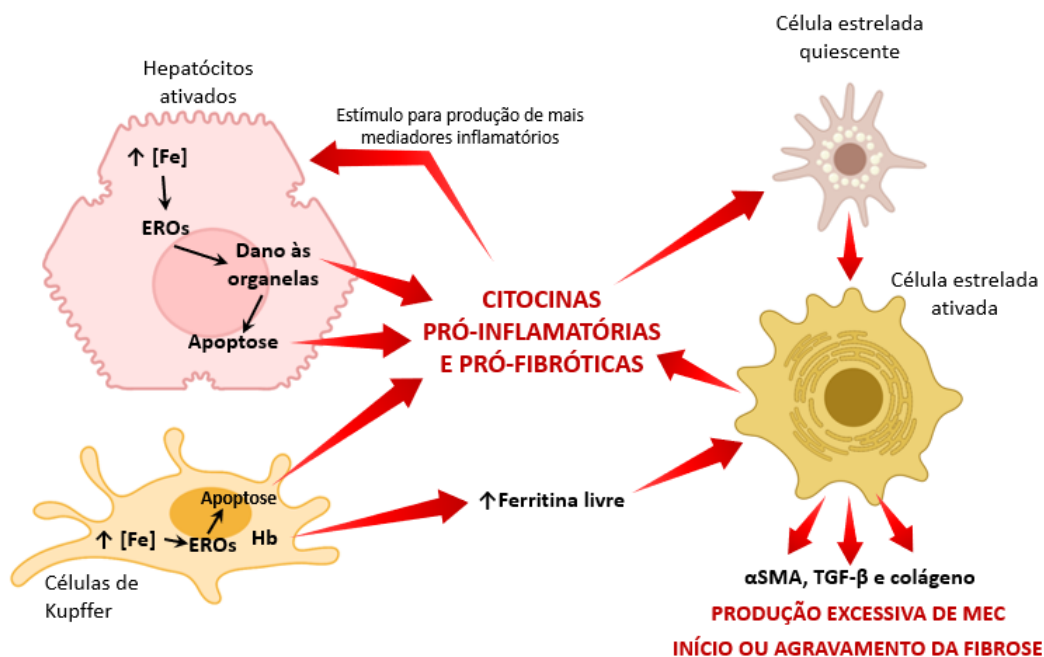
No presente modelo de sobrecarga de ferro, demos atenção especial também ao depósito de ferro no fígado e seus efeitos, pois este é um importante marcador de sobrecarga rotineiramente avaliado tanto em pacientes quanto em modelos experimentais (BRISSOT et al., 2018; SANYEAR et al., 2020; SATO et al., 2020). Sendo o principal sítio de depósito deste elemento no organismo, o depósito hepático de ferro também foi elevado em nosso protocolo, conforme demonstrado pelo FAAS e pela histologia.

Esta deposição patológica é relacionada a lesões neste órgão tais como fibrose e danos nos hepatócitos demonstrado em dados da literatura: pacientes com sobrecarga hepática de ferro decorrente de hepatite B e anemias falciformes apresentam concentrações séricas elevadas de enzimas hepáticas (SEBASTIANI; TEMPESTA; ALBERTI, 2012; YASSIN et al., 2017). Em nosso trabalho, também utilizamos as concentrações séricas de ALT, AST e FAL como indicadores sugestivos de dano funcional hepático. Normalmente, estas enzimas hepáticas apresentam baixa concentração sérica, mas estão aumentadas quando há lesão no fígado. Os animais submetidos a sobrecarga crônica de ferro não exibiram aumento nos níveis séricos de FAL, porém AST e ALT circulantes se mostraram significativamente elevadas, de modo semelhante ao que acontece em pacientes com sobrecarga de ferro (BOURBON FILHO et al., 2011). Segundo Motta (2000), em casos de lesão hepática

grave a forma predominante no soro é justamente a AST, que também é um indicador de dano cardíaco, ainda que inespecífico.

Quanto às modificações na matriz extracelular do tecido hepático, notamos que a porcentagem de área ocupada por colágeno foi cerca 8 vezes maior nos animais com sobrecarga de ferro em relação aos controles. Além de ser um marcador de dano e remodelamento do parênquima em consequência à sobrecarga de ferro, este depósito traz implicações patológicas importantes. A fibrose hepática é, normalmente, uma resposta do tecido hepático que envolve danos aos hepatócitos e ativação de células estreladas, frente à estímulos danosos sustentados (RAMM; RUDDELL, 2005), e pode ser consequência de diversas condições como hemocromatose, hepatites, esteatose e diabetes (MEHTA; FARNAUD; SHARP, 2019).

No caso das sobrecargas de ferro, este elemento se deposita em células de Kupffer e do parênquima hepático e promove remodelamento da matriz extracelular, pois, por si só, é capaz de estimular a expressão gênica de colágeno, e o estresse oxidativo decorrente da reação de Fenton pode alterar vias de sinalização celular e levar a remodelamento da MEC (HARADA et al., 1998; MEHTA; FARNAUD; SHARP, 2019; RAMM; RUDDELL, 2005), como ilustrado no esquema a seguir:



**Figura 20.** Indução da fibrose hepática pela sobrecarga de ferro. A figura mostra as interações entre hepatócitos, células de Kupffer e células estreladas hepáticas que iniciam e conduzem a progressão da fibrose. Adaptado de Mehta et al, 2019.

Como mencionado, o papel do ferro como catalisador da formação de EROs já é bem conhecido, e dentre os mecanismos propostos para as lesões teciduais associadas ao ferro, o desbalanço oxidativo é apontado como grande mediador nas sobrecargas (ÁVILA et al., 2016; CHAICHOMPOO et al., 2019; NANBA et al., 2016; THERIOT et al., 2016). Por exemplo, esse desbalanço redox provoca peroxidação lipídica, o que pode expor a célula a maiores danos, além de prejudicar processos importantes com controle de transporte de substâncias através das membranas e as funções de organelas intracelulares que contém essa mesma estrutura de membrana lipídica (tais como núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndrias, etc).

No presente estudo, a sobrecarga crônica de ferro foi associada a nível aumentado de TBARS no plasma, que tem sido patente como marcador de peroxidação lipídica durante as injeções de ferro-dextrano em modelos de roedores (BARTFAY; BARTFAY, 2000; MARQUES et al., 2015).

Ademais, o estresse oxidativo local induzido pelo ferro em excesso desempenha um papel central na lesão tecidual, uma vez que quantidades tóxicas de EROs produzem além de peroxidação lipídica, oxidação e nitração de proteínas e oxidação e danos aos ácidos nucleicos (CHAICHOMPOO et al., 2019; FERRO et al., 2017; NAKAMURA; NAGURO; ICHIJO, 2019) e é extremamente prejudicial também para o sistema cardiovascular, como evidenciado em trabalhos do nosso grupo avaliando diferentes sítios e componentes deste sistema no modelo do rato (ÁVILA et al., 2016; BERTOLI et al., 2018; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017).

Especificamente no coração, o estresse oxidativo e os níveis aumentados de TBARS estão associados à injúria e comprometimento da sua função, como por exemplo em situações de isquemia e reperfusão (DU et al., 2019; XU et al., 2019; XU; XU; WANG, 2019) e na própria sobrecarga de ferro (WONGJAIKAM et al., 2017). Em 2017, Wongjaikam e colaboradores demonstraram que a sobrecarga de ferro provocada por dieta constituída por alta concentração de ferro por pelo menos três meses foi capaz de comprometer a função ventricular e afetar o trânsito de  $Ca^{2+}$  em



associação aos elevados níveis séricos de TBARS, e que estes efeitos foram revertidos pela ação de antioxidantes.

Por conseguinte, fármacos ou substâncias na dieta com efeito antioxidante devem promover melhora também nas consequências patológicas cardíacas da sobrecarga de ferro (DAS et al., 2018; GÜVENDI et al., 2020; JING et al., 2019; YANG et al., 2017). Assim, se torna natural a busca de estratégias antioxidantes na mitigação dos prejuízos causados pela sobrecarga de ferro, como o ácido ascórbico, o extrato de chá verde e da N- acetilcisteína (HE et al., 2018; KOONYOSYING et al., 2018; KUMFU et al., 2018; LOU et al., 2009), porém o potencial do exercício físico aeróbico ainda não foi explorado.

Nesse sentido, nossos resultados confirmaram uma certa proteção frente aos efeitos notados a partir do desbalanço oxidativo, quando demonstram que o nível de TBARS no grupo Fe+Ex foi semelhante ao do grupo Ct, mesmo que não tenha havido influência do exercício nos níveis séricos de ferro. Resultado semelhante foi descrito também por um estudo de caso publicado em 2012 sobre uma paciente com síndrome metabólica, que relata permanência dos níveis aumentados de ferritina circulante após protocolo de exercício físico aeróbico moderado por 12 semanas, apesar de este protocolo ter melhorado vários outros parâmetros fisiológicos, tais como a pressão arterial (JERUSA TEREZINHA FINK, 2012).

Na verdade, já é bem conhecido que o exercício físico aeróbico é capaz de reduzir o dano tecidual provocado por estresse oxidativo e aumentar a capacidade antioxidante do organismo (NADERI et al., 2015; POWERS; RADAK; JI, 2016), e em nosso estudo o exercício foi associado à atenuação significativa não apenas do dano oxidativo sistêmico (avaliado no plasma) e no fígado (avaliado pelas enzimas e fibrose), mas também no coração.

Em associação à redução dos níveis de TBARS, os animais submetidos ao nosso protocolo de exercício físico moderado também demonstraram significativo incremento no trabalho desempenhado, indicando que o protocolo foi efetivo e é importante destacar que o incremento de trabalho pode estar associado a melhor desempenho cardíaco (KEMI; WISLØFF, 2010). Embora a intensidade do exercício físico estabelecida em nosso trabalho não teve como parâmetro determinante a  $VO_2$  máxima, aplicamos o protocolo de corrida a 60–70% da capacidade máxima indicada

pelo teste de  $V_{\text{máx}}$  para cada animal, que corresponderia ao estado estacionário máximo do lactato (FERREIRA et al., 2007).

Assim como destacamos a importância da verificação de deposição de ferro hepática e seus efeitos, este órgão foi também alvo na avaliação do efeito do treinamento físico por causa de seu papel na síntese e liberação de moléculas que fornecem energia para os músculos em exercício e por seu papel importante no estado redox e na modulação inflamatória durante o exercício (PILLON BARCELOS et al., 2017).

No fígado, nosso protocolo de exercício físico de intensidade moderada mitigou o processo fibrótico do parênquima em 50% em comparação com ratos não treinados com sobrecarga de ferro, o que foi acompanhado de redução da AST sérica a níveis não mais diferentes do grupo controle. Embora não tenhamos medido o nível de dano oxidativo diretamente no tecido hepático, esses dados reforçam que a modulação de EROs relacionadas ao ferro tem potenciais benefícios terapêuticos como uma estratégia adjuvante para desacelerar a progressão da fibrose hepática, antes de atingir os estágios irreversíveis da cirrose avançada.

Em relação aos efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre os impactos do ferro no coração, além da redução de TBARS medidos no próprio tecido miocárdico, o grupo Fe+Ex exibiu níveis séricos reduzidos de CK e CK-MB e também uma melhora da mecânica miocárdica em comparação ao grupo Fe. A capacidade do ferro de promover injúria miocárdica, com danos às membranas celulares ou indução de ferropoptose é conhecida para além da condição de sobrecarga sistêmica deste elemento, como por exemplo em quadros de câncer e diabetes (CONRAD; PRONETH, 2019; LI et al., 2020; PARK et al., 2019; YE et al., 2020), e os estudos sobre injúrias cardíacas costumam apresentar uma relação próxima entre os níveis de peroxidação lipídica e as enzimas indicadoras da integridade dos cardiomiócitos (BARBOSA et al., 2021; BASHAR; SAMIR EL-SHERBEINY; BORAIE, 2019; ZILINYI et al., 2018). Neste sentido, nossos resultados observados no grupo exercitado sugerem que o efeito sobre a capacidade funcional e a mecânica miocárdica pode ser, pelo menos em parte, decorrente da preservação da integridade dos miócitos no grupo Fe+Ex.

Ao final de 13 semanas de sobrecarga de ferro identificamos intenso depósito de ferro no coração e comprometimento da força de contrátil dos músculos papilares do ventrículo esquerdo, mas não acompanhados de hipertrofia e fibrose, estes últimos

comumente observados em protocolos de sobrecarga crônica de ferro em camundongos (BARTFAY et al.; BARTFAY; BARTFAY, 2000; OUDIT et al., 2004).

É conhecido que em doenças que provocam aumento do ferro corporal, há alterações morfológicas do coração que podem incluir desde alterações sarcoméricas (CHEN et al., 2014) e na abundância de miofibrilas (BARTFAY et al., 2014) até fibrose cardíaca (ISHIZAKA et al., 2002; SUKUMARAN et al., 2017). Então, uma vez constatada a deposição de ferro no coração, investigamos se este depósito teria provocado algum grau de remodelamento morfoestrutural neste órgão. A pesagem do coração não indicou aumento de massa que pudesse ser sugestivo de hipertrofia e, ao contrário do observado no fígado, nosso protocolo de sobrecarga de ferro não induziu fibrose intersticial cardíaca, como reportado por outros autores acima citados. Apesar de não identificamos alterações patológicas notáveis por meio de análise histológica, o estudo por *western blotting* identificou aumento da expressão de colágeno tipo I no grupo Fe, que talvez esteja em um nível ainda insuficiente para caracterizarmos fibrose.

Em nosso trabalho, iniciamos o protocolo de exposição ao ferro em indivíduos jovens e, a priori, sem condições estressantes ou patológica preexistentes, enquanto na literatura, encontramos evidências de que a fibrose cardíaca está presente em modelos genéticos de sobrecarga (DAS et al., 2016), e que também pode estar relacionada à idade, sendo consideravelmente maior em animais aos 12 meses de idade (SUKUMARAN et al., 2017). Além disso, um outro estudo mostra que há deposição de ferro associada à fibrose cardíaca em ratos continuamente infundidos com angiotensina II, e que a quelação de ferro é capaz de mitigar este processo (ISHIZAKA et al., 2002).

Dessa forma, não foi surpreendente que nosso modelo no rato realmente não exibisse tal remodelação cardíaca aparente (isto é, hipertrofia, degeneração e fibrose evidentes) e acreditamos que nesse modelo as alterações na função miocárdica aparentemente precedem (ou independem de) um remodelamento morfoestrutural mais intenso. Além disso, é possível que um maior nível de toxicidade ao ferro (maior tempo de exposição ou maiores doses) ou a presença associada de condições estressantes pudesse levar a fibrose cardíaca no rato, embora não tenhamos avaliado tal fato neste estudo.

Como a carga de ferro para o cardiomiócito é determinante para ocorrência de lesão, também avaliamos o efeito do treinamento aeróbio moderado no conteúdo total

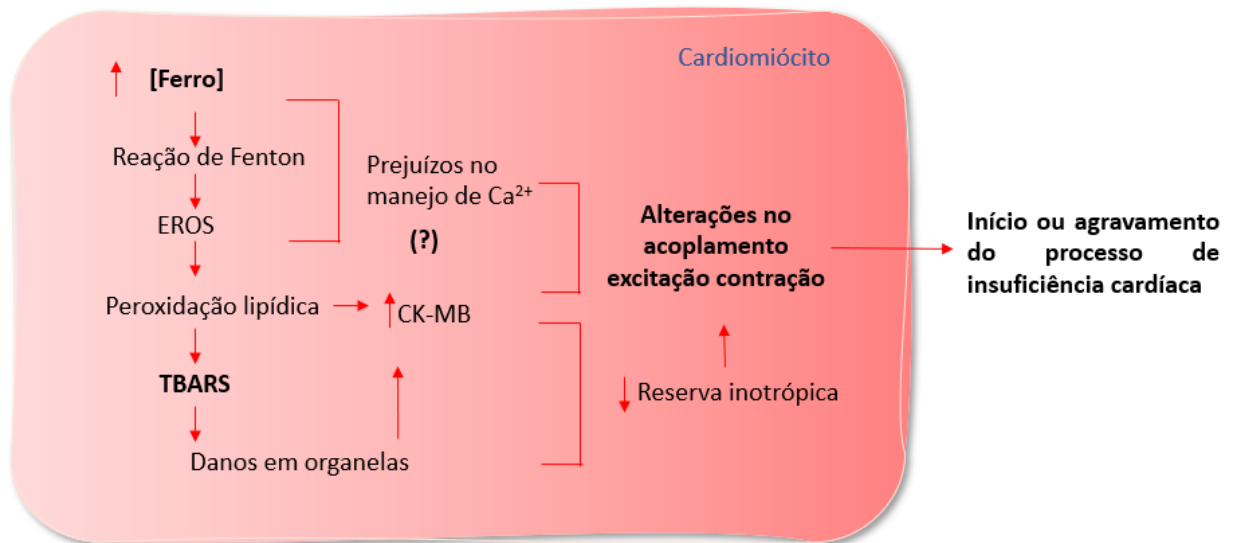
de ferro no coração. Nosso protocolo de exercícios não foi capaz de diminuir o acúmulo de ferro, que permaneceu intensamente depositado no coração dos ratos Fe+Ex.

Na verdade, alguns estudos mostraram que, embora quelantes de ferro e agentes antioxidantes isoladamente tenham alguma eficácia, apenas a terapia combinada restaurou satisfatoriamente a função cardíaca em modelos animais de sobrecarga de ferro (DAS et al., 2015; WONGJAIKAM et al., 2017). Somados ao fato de que o nível de TBARS foi reduzido no plasma e no coração de ratos exercitados, assim como a expressão de colágeno do tipo I foi equivalente aos controles, e que a expressão de catalase foi significativamente aumentada nestes animais, nossos dados reforçam a hipótese de que tais benefícios poderiam ocorrer devido à melhora da capacidade antioxidante, independentemente de interferências no manejo de ferro para o coração.

Em nosso estudo, a função cardíaca global analisada pela hemodinâmica ventricular esquerda em ratos anestesiados mostrou diminuição da pressão sistólica intraventricular e suas derivadas, provavelmente relacionada à perda de contratilidade do músculo cardíaco. Apesar da mecânica miocárdica prejudicada, não observamos alterações na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, o que pode ser devido ao estado depressor da anestesia que dificultou a identificação de diferenças na função de bomba (isto é, restrições ao esvaziamento e/ou ao enchimento), ou simplesmente porque a insuficiência cardíaca evidente só é detectada por último na história natural deste modelo experimental.

Aqui, vale mencionar que a maioria dos estudos anteriores em ratos e camundongos que mimetizam a cardiomiopatia de sobrecarga de ferro cursaram com deposição cardíaca de ferro muito mais severa (3.000 a 10.000  $\mu\text{g} / \text{g}$  de tecido seco) em comparação com o nível obtido em nosso modelo de rato (500 a 700  $\mu\text{g}/\text{g}$  tecido seco).

Embora o caminho para a evolução da cardiomiopatia provocada por ferro descrita por Murphy e Oudit (2010) em camundongos não seja reproduzida em nosso protocolo no rato, temos a descrição de um modelo de sobrecarga crônica de ferro com injúria cardíaca caracterizada por danos oxidativos aos cardiomiócitos e pelo comprometimento da função contrátil, este último podendo ser resultado tanto de perda de células como de alterações no processo de acoplamento excitação contração (figura 21).



**Figura 21.** Injúria cardíaca provocada pela sobrecarga crônica de ferro em rato. A figura mostra os eventos identificados no modelo experimental deste trabalho que podem iniciar ou agravar o processo de insuficiência cardíaca. Elaborado pela autora.

Em relação ao protocolo de exercício, embora este tenha preservado a força máxima desenvolvida pelos músculos papilares isolados de ratos sobrecarregados de ferro, não houve significativa recuperação das derivadas positivas e negativas ( $dF/dt_{máx}$ ). Ainda que não tenhamos uma explicação definitiva para isso, é possível que se decorra de um efeito preponderante da sobrecarga de ferro sobre o cardiomiócito: mais intenso sobre o estado inotrópico e a quantidade de  $Ca^{2+}$  disponível, do que necessariamente sobre a cinética (velocidade) de mudanças do  $Ca^{2+}$  para contração.

Dessa maneira, uma vez verificado o comprometimento no desenvolvimento de força pelo músculo papilar, investigamos eventos relacionados ao acoplamento excitação-contração e influência do exercício físico sobre eles.

Uma vez que a contração do músculo cardíaco é significativamente modulada pela cinética do  $Ca^{2+}$  através do sarcolema e também pelo RS, as mudanças na frequência e no ritmo podem ser usadas como manobras experimentais para avaliar o comportamento ou revelar anormalidades nesses sítios (BERS, 2008; BOCALINI et al., 2012; MILL; VASSALLO; LEITE, 1992).

Quanto à função de estoque e liberação pelo RS, não observamos alterações na potenciação pós-pausas de estímulos, nem na expressão das proteínas SERCA-2a e PLB, seja no grupo Fe ou Fe+Ex. Porém, este protocolo experimental de análise da potenciação pós-pausa envolve múltiplos passos que dependem da integridade tanto dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema, dos receptores de rianodina, SERCA e PLB, e também da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da e trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) sarcolemas.

Nesse sentido, embora o ferro tenha um papel inibitório sobre a SERCA, potencialmente diminuindo a recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS, ele também exerce esse papel sobre o NCX reduzindo o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOUSA et al., 2018). Assim, durante a pausa poderia acontecer um certo grau de compensação que mascararia uma disfunção identificável em nosso protocolo. Além disso, a oxidação do RyR pode aumentar seu tempo de abertura e promover uma maior liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado (BURGOYNE et al., 2012) ao mesmo tempo em que as várias proteínas envolvidas no trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$  são fosforiláveis, sendo inibidas ou estimuladas por quinases diversas. Dessa maneira, ainda não temos realmente evidências que suportem um impacto do exercício físico na sobrecarga de ferro sobre esses passos do acoplamento excitação-contração cardíaco no modelo do rato.

Entretanto, os músculos papilares dos animais expostos ao ferro foram nitidamente menos responsivos ao  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e ao isoproterenol, além de ter reduzido a % de participação do influxo transsarcolemal na contração, o que poderia ser explicado pelo fato do ferro ser capaz de exercer competição direta pelos canais do tipo L, diminuir sensibilidade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$  disponível e ainda deprimir a atividade ATPásica da miosina, sendo a maior parte desses efeitos mediados por EROs (ÁVILA et al., 2016; OUDIT et al., 2003, 2006).

Essa menor responsividade ao isoproterenol poderia caracterizar uma perda de reserva inotrópica, componente fisiopatológico importante em cardiopatias. Embora não haja dados sobre os impactos da sobrecarga crônica de ferro sobre a resposta inotrópica adrenérgica em modelos “*in vivo*”, nosso grupo demonstrou anteriormente que a incubação aguda com  $\text{Fe}^{2+}$  em concentrações comumente encontradas em pacientes com sobrecarga de ferro e equivalentes àquelas mensuradas nos nossos animais, foi capaz de reduzir a resposta à estimulação  $\beta$ -adrenérgica de músculos papilares (ÁVILA et al., 2016).

Além disso, foi relatado que cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) expostos a altas concentrações de ferro também

mostraram prejudicadas as respostas inotrópicas e cronotrópicas positivas à estimulação adrenérgica (LEE et al., 2014). É interessante mencionar que esses autores geraram os cardiomiócitos a partir de iPSC reprogramando fibroblastos de pele humana terminalmente diferenciados, isolados de pacientes com Ataxia de Friedreich, um distúrbio neurodegenerativo comumente associado à cargas elevadas de ferro e disfunção cardíaca. Embora não tenhamos avaliado a atividade do sistema nervoso simpático, e o aumento da FC não tenha nível de significância estatística, poderíamos sugerir que a resposta prejudicada ao isoproterenol *in vitro* pode ser resultado de uma superestimulação simpática induzida por ferro para o coração.

Neste sentido, como a sinalização dependente da proteína quinase A (PKA) é crítica na modulação aguda e crônica da função cardíaca pela estimulação  $\beta$ -adrenérgica, o aumento no perfil de fosforilação dos substratos da PKA no grupo Fe poderia justificar essa reserva inotrópica reduzida dos músculos papilares desse grupo. De fato, quando a via  $\beta$ -adrenérgica é ativada cronicamente, a excessiva fosforilação dependente de PKA daquelas proteínas-chave para o acoplamento excitação-contração cardíaco pode limitar posteriores respostas inotrópicas (LIU et al., 2021)). Em suporte a essa explicação, evidências de estudos clínicos indicam que o excesso de ferro exerce efeitos simpatoexcitatórios no coração e na circulação periférica, não apenas na hemocromatose hereditária primária (SERAVALLE et al., 2016), mas também na sobrecarga secundária de ferro (GRASSI et al., 2004; MANCUSO et al., 2009; OZTARHAN et al., 2012), equivalente ao nosso modelo animal.

Por outro lado, o grupo Fe+Ex apresentou níveis mais baixos de ativação de PKA (menor conteúdo de alvos fosforilados) e os músculos papilares com uma melhor responsividade inotrópica ao isoproterenol. É sabido que o exercício físico melhora mecanismos celulares de geração e utilização do ATP e a função dos filamentos contráteis (KEMI; WISLØFF, 2010) e seguindo a mesma linha de raciocínio, o exercício físico de intensidade moderada foi relacionado não apenas à restauração da fosforilação dependente de PKA no miocárdico sob estimulação adrenérgica (PAROO; NOBLE, 1999) mas também à melhora do perfil de fosforilação em situações de estresse (BUDIONO et al., 2016; FU et al., 2014)), ambos com efeito cardioprotetor. Ademais, modelos animais e indivíduos exercitados exibem atenuação da

hiperatividade simpática cardíaca e de seus efeitos (CURTIS; O'KEEFE, 2002; SILVA et al., 2014).

Assim, além do efeito benéfico sobre a geração de força contrátil e menor grau de atividade da PKA no estado estacionário dos músculos papilares de ratos com sobrecarga de ferro, o exercício aeróbio de intensidade moderada melhorou a resposta contrátil do músculo cardíaco aos estímulos testados ( $\text{Ca}^{2+}$  e estimulação  $\beta$ -adrenérgica), indicando um provável aumento da reserva inotrópica.

Todavia, independente desse potencial efeito benéfico do exercício sobre as adaptações do miocárdio a sobrecarga de ferro, é inegável que o mecanismo antioxidante promovido continue em evidência no nosso estudo, tal como já bem descrito que o exercício seja hábil em aumentar a capacidade de defesa orgânica contra danos oxidativos em diferentes órgãos e tecidos, incluindo o coração (Powers et al., 2002; 2014).

A *upregulation* da catalase mediada pelo exercício no grupo Fe+Ex, mas não SOD1, indica que  $\text{H}_2\text{O}_2$  era provavelmente mais impactante do que o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  no estresse oxidativo dos corações sobrecarregados com ferro. Na verdade, nosso estudo “in vitro” sobre os efeitos de altas concentrações de ferro no músculo cardíaco isolado de rato mostrou que  $\text{OH}\cdot$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  são as EROs mais geradas, e que somente a incubação prévia com DMSO ou catalase, mas não com um mimético da SOD, era capaz de prevenir a disfunção contrátil induzida pela sobrecarga de ferro (ÁVILA et al., 2016).

Em concordância, em recente trabalho publicado por nosso grupo, ROSSI et al (2020) demonstraram que o exercício aeróbio aumentou a expressão da catalase também em amostras de artérias de ratos previamente submetidos à sobrecarga de ferro, enquanto nenhum efeito foi observado na SOD (ROSSI et al., 2020). Além disso, TAYLOR et al (2003) descreveram que os corações de animais exercitados são mais tolerantes aos efeitos do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Considerando que  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é apenas uma molécula intermediária nas reações mediadas pelo ferro (ou seja, as reações de Fenton e de Haber-Weiss), essa superexpressão da catalase seria especialmente protetora contra as altas quantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e especialmente do produto final  $\text{OH}\cdot$ , que não possui proteção antioxidante endógena e, portanto, seria extremamente prejudicial aos cardiomiócitos.





**Figura 22.** Esquema representativo dos efeitos da sobrecarga de ferro e do exercício aeróbico moderado em parâmetros sistêmicos e cardíacos. Elaborado pela autora.

## **10. Conclusão**

Em conclusão, nossos resultados caracterizam um modelo de sobrecarga de ferro com miocardiopatia em ratos e indicam que o exercício aeróbio de intensidade moderada por 8 semanas, embora não altere a carga total de ferro e os depósitos teciduais, é capaz de reduzir o estresse oxidativo, prevenir danos cardíacos e preservar parcialmente a mecânica miocárdica.

Até o presente momento, esta é a primeira vez que um protocolo de exercício físico é evidenciado como tendo um efeito benéfico na cardiomiopatia por sobrecarga de ferro. Devido ao seu baixo custo e alta acessibilidade, fácil execução e possibilidade de alta adesão, a prática de exercícios físicos aeróbicos alia outros benefícios como capacidade funcional para realização de tarefas da vida diária, independência, bem-estar psicossocial e, conseqüentemente, a qualidade de vida desses pacientes. Assim, nosso estudo deve instigar a proposição da prescrição de exercícios regulares como abordagem não farmacológica adjuvante em condições de sobrecarga de ferro, a ser testada em futuros ensaios translacionais e pré-clínicos.

## 11. Referências Bibliográficas

ABBOUD, S.; HAILE, D. J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 19906–19912, 30 Jun. 2000.

ANA L.C. MARTINELLI. **Hemocromatose hereditária: muito além do HFE**. Disponível em: <<https://sbhepatologia.org.br/fasciculos/26.pdf>>. Acesso em: 17 feb. 2021.

ARSLAN, M. et al. Effect of Aerobic Exercise Training on MDA and TNF-  $\alpha$  Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus . **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–5, 2014.

ÁVILA, R. A. et al. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. **Toxicology in Vitro**, v. 36, p. 38–45, Oct. 2016a.

ÁVILA, R. A. et al. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 36, p. 38–45, Oct. 2016b.

ÁVILA, R. A. et al. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. **Toxicology in Vitro**, v. 36, p. 38–45, 1 Oct. 2016c.

BANNER, W.; TONG, T. G. Iron poisoning. **Pediatric clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 393–409, Apr. 1986.

BARBOSA, J. et al. Repeated administration of clinically relevant doses of the prescription opioids tramadol and tapentadol causes lung, cardiac, and brain toxicity in wistar rats. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 2, p. 1–34, 1 Feb. 2021.

BARTFAY, W. J. et al. A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice. **Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 8, n. 6, p. 305–14, Jan. .

BARTFAY, W. J.; BARTFAY, E. Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. **Biological research for nursing**, v. 2, n. 1, p. 49–59, 25 Jul. 2000.

BARUPALA, D. P. et al. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 592, p. 60–75, 15 Feb. 2016.

BASHAR, S. M.; SAMIR EL-SHERBEINY, S. M.; BORAIE, M. Z. Correlation between the blood level of irisin and the severity of acute myocardial infarction in exercise-trained rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 59–71, 1 Jan. 2019.

BEARD, J. L. **Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning**. Journal of Nutrition. **Anais...American Institute of Nutrition**, 1 Feb. 2001Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/131/2/568S/4686826>>. Acesso em: 19 oct. 2020

BERS, D. M. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. **Annual Review of Physiology**, v. 70, n. 1, p. 23–49, 13 Mar. 2008.

BERS, D. M.; SHANNON, T. R. Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 58, n. 1, p. 59–66, 2013.

BERTAGNOLLI, M. et al. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 11, p. 1188–1193, 2008.

BERTOLI, S. R. et al. Chronic iron overload induces vascular dysfunction in resistance pulmonary arteries associated with right ventricular remodeling in rats. **Toxicology Letters**, v. 295, p. 296–306, 1 Oct. 2018.

BOCALINI, D. S. et al. Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post rest-potential in force decay. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 98, n. 3, p. 243–51, Mar. 2012.

BOCALINI, D. S.; TUCCI, P. J. F. Developed force of papillary muscle: what index correctly indicates contractile capacity? **International heart journal**, v. 50, n. 5, p.

643–52, Sep. 2009.

BORGNA-PIGNATTI, C. et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. **Haematologica**, v. 89, n. 10, p. 1187–93, Oct. 2004.

BÖTTCHER, T. From Molecules to Life: Quantifying the Complexity of Chemical and Biological Systems in the Universe. **Journal of Molecular Evolution**, v. 86, n. 1, 1 Jan. 2018.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Política Nacional de Sangue e Hemoderivados - Talassemias.** Disponível em:

<[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/folder/talasseмии\\_folder.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/folder/talasseмии_folder.pdf)>. Acesso em: 3 jan. 2021a.

BRASIL. **Ministério da Saúde. DOENÇA FALCIFORME: O QUE SE DEVE SABER SOBRE HERANÇA GENÉTICA.** Disponível em:

<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca\\_falciforme\\_deve\\_saber\\_sobre\\_heranca.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_deve_saber_sobre_heranca.pdf)>. Acesso em: 3 jan. 2021b.

BRASIL, M. DA S. **PORTARIA Nº 1.324, DE 25 DE NOVEMBRO DE 2013.**

Disponível em:

<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt1324\\_25\\_11\\_2013.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt1324_25_11_2013.html)>.

Acesso em: 1 mar. 2018.

BRASIL, M. DA S. **Sobrecarga de ferro- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**, 2013.

BREWER, C. et al. Sex differences and steroid modulation of cardiac iron in a mouse model of iron overload. **Translational Research**, v. 163, n. 2, p. 151–159, 2014.

BRISSOT, P. et al. Haemochromatosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 5 Apr. 2018.

BUDIONO, B. P. et al. Coupling of myocardial stress resistance and signalling to voluntary activity and inactivity. **Acta Physiologica**, v. 218, n. 2, p. 112–122, 1 Oct. 2016.

BURKE, W. et al. Hereditary Hemochromatosis. **JAMA**, v. 280, n. 2, p. 172, 8 Jul. 1998.

- CAMPOS, J. C. et al. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. **Autophagy**, v. 13, n. 8, p. 1304–1317, 3 Aug. 2017.
- CATTADORI, G. et al. Exercise and heart failure: an update. **ESC Heart Failure**, v. 5, n. 2, p. 222–232, 1 Apr. 2018.
- CERAMI, C. Iron Nutrition of the Fetus, Neonate, Infant, and Child. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 71, n. 3, p. 8–14, 1 Dec. 2017.
- CHAICHOMPOO, P. et al. Abnormal red blood cell morphological changes in thalassaemia associated with iron overload and oxidative stress. **Journal of Clinical Pathology**, v. 72, n. 8, p. 520–524, 1 Aug. 2019.
- CHEN, H. F. et al. A meta-analysis of association between serum iron levels and lung cancer risk. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 13, p. 33–37, 2018.
- CHEN, M. PIAN et al. Left ventricular torsional mechanics and myocardial iron load in beta-thalassaemia major: A potential role of titin degradation. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2014.
- CHENG, Y. et al. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. Albert Einstein College of Medicine. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 565–576, 2004.
- CHERUKURI, S. et al. Anemia and impaired stress-induced erythropoiesis in aceruloplasminemic mice. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 33, n. 3, p. 346–355, Nov. 2004.
- CHIFMAN, J.; LAUBENBACHER, R.; TORTI, S. V. A systems biology approach to iron metabolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 844, p. 201–225, 2014.
- COATES, T. D. Iron overload in transfusion-dependent patients. **Hematology (United States)**, v. 2019, n. 1, p. 337–344, 6 Dec. 2019.
- CONRAD, M.; PRONETH, B. Broken hearts: Iron overload, ferroptosis and cardiomyopathy. **Nature Cell Research**, v. 29, p. 263–264, 2019.
- CRICHTON, R. R.; DEXTER, D. T.; WARD, R. J. Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 3, p. 301–314, 1 Mar. 2011.

CURTIS, B. M.; O'KEEFE, J. **Autonomic tone as a cardiovascular risk factor: The dangers of chronic fight or flight** *Mayo Clinic Proceedings* Elsevier Ltd, , 2002.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11794458/>>. Acesso em: 18 jun. 2021

DA PALMA, R. K. et al. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 4, p. 1032–1038, Oct. 2016.

DAS, S. K. et al. Iron-overload injury and cardiomyopathy in acquired and genetic models is attenuated by resveratrol therapy. **Scientific reports**, v. 5, p. 18132, 7 Dec. 2015.

DAS, S. K. et al. Iron-overload injury and cardiomyopathy in acquired and genetic models is attenuated by resveratrol therapy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 18132, 7 Nov. 2016.

DAS, S. K. et al. Females Are Protected From Iron-Overload Cardiomyopathy Independent of Iron Metabolism: Key Role of Oxidative Stress. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 1, 23 Jan. 2017.

DAS, S. K. et al. Advanced iron-overload cardiomyopathy in a genetic murine model is rescued by resveratrol therapy. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 1, 10 Jan. 2018.

DE SANCTIS, V. LIVER IRON CONTENT (LIC) IN ADULTS WITH NON-TRANSFUSION DEPENDENT SICKLE CELL DISEASE (NT-SCD). CORRELATION WITH SERUM FERRITIN AND LIVER ENZYMES CONCENTRATIONS.

**Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 2017037, 20 Jun. 2017.

DÍEZ-LÓPEZ, C.; COMÍN-COLET, J.; GONZÁLEZ-COSTELLO, J. **Iron overload cardiomyopathy: From diagnosis to management** *Current Opinion in Cardiology* Lippincott Williams and Wilkins, , 1 May 2018.

DU, J. et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through regulating lactate signaling cascade in mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 8, p. 3527–3532, 2019.

DUCK, K. A.; CONNOR, J. R. **Iron uptake and transport across physiological barriers** *BioMetals* Springer Netherlands, , 1 Aug. 2016. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27457588/>>. Acesso em: 19 oct. 2020

ELSAYED, M. E.; SHARIF, M. U.; STACK, A. G. Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker. In: **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l.] Academic Press Inc., 2016. v. 75p. 71–97.

ESPARZA, A. et al. Iron-induced reactive oxygen species mediate transporter DMT1 endocytosis and iron uptake in intestinal epithelial cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 309, n. 8, p. C558-67, 15 Oct. 2015.

FARAH, D. et al. Exercise Training Prevents Cardiovascular Derangements Induced by Fructose Overload in Developing Rats. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0167291, 2016.

FERNANDES, J. L.; FABRON, A.; VERISSIMO, M. Early cardiac iron overload in children with transfusion-dependent anemias. **Haematologica**, v. 94, n. 12, p. 1776–7, 1 Dec. 2009.

FERREIRA, J. C. et al. MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE: EFFECT OF EXERCISE TRAINING. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 1 Aug. 2007.

FERREIRA, J. C. B. et al. Aerobic exercise training improves Ca<sup>2+</sup> handling and redox status of skeletal muscle in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 4, p. 497–505, Apr. 2010.

FERRO, E. et al. Genotoxic effect of iron overload and disease complications in transfused  $\beta$  thalassaemic patients. **Mutagenesis**, v. 32, n. 2, p. 275–281, Mar. 2017.

FIDELIS, H. G. et al. Blockade of angiotensin AT1 receptors prevents arterial remodelling and stiffening in iron-overloaded rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 5, p. 1119–1130, Mar. 2019.

FINE, J. S. Iron poisoning. **Current Problems in Pediatrics**, v. 30, n. 3, p. 71–90, 2000.

FISHER, A. L.; NEMETH, E. **Iron homeostasis during pregnancy**. American Journal of Clinical Nutrition. **Anais...**Oxford University Press, 1 Dec. 2017Disponível



em: </pmc/articles/PMC5701706/?report=abstract>. Acesso em: 19 oct. 2020

FLEMING, R. E.; PONKA, P. Iron overload in human disease. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 4, p. 348–359, Jan. 2012.

FU, Y. et al. Basal and  $\beta$ -adrenergic regulation of the cardiac calcium channel CaV1.2 requires phosphorylation of serine 1700. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 46, p. 16598–16603, 18 Nov. 2014.

GAO, C. et al. Clinical outcomes of transfusion-associated iron overload in patients with refractory chronic anemia. **Patient preference and adherence**, v. 8, p. 513–517, 2014.

GEORGIEFF, M. K. **Iron deficiency in pregnancy****American Journal of Obstetrics and Gynecology**Mosby Inc., , 1 Oct. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32184147/>>. Acesso em: 19 oct. 2020

GIALLAURIA, F. et al. Exercise training modalities in chronic heart failure: Does high intensity aerobic interval training make the difference? **Monaldi Archives for Chest Disease - Cardiac Series**, v. 86, n. 1–2, 2016.

GIMENES, C. et al. Low Intensity Physical Exercise Attenuates Cardiac Remodeling and Myocardial Oxidative Stress and Dysfunction in Diabetic Rats. **Journal of diabetes research**, v. 2015, p. 457848, 2015.

GORDAN, R. et al. **Involvement of cytosolic and mitochondrial iron in iron overload cardiomyopathy: an update****Heart Failure Reviews**Springer New York LLC, , 1 Sep. 2018.

GRASSI, G. et al. Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. **Journal of hypertension**, v. 22, n. 9, p. 1747–1753, Sep. 2004.

GUJJA, P. et al. **Iron overload cardiomyopathy: Better understanding of an increasing disorder****Journal of the American College of Cardiology**, 21 Sep. 2010.

GÜVENDI, G. F. et al. Selenium or ozone: Effects on liver injury caused by experimental iron overload. **Life Sciences**, v. 262, 1 Dec. 2020.

- HARADA, Y. et al. Activated hepatic stellate cells participate in liver fibrosis in a patient with transfusional iron overload. **Journal of gastroenterology**, v. 33, n. 5, p. 751–4, Oct. 1998.
- HE, H. et al. Dual action of vitamin C in iron supplement therapeutics for iron deficiency anemia: prevention of liver damage induced by iron overload. **Food and Function**, v. 9, n. 10, p. 5390–5401, 1 Oct. 2018.
- HEJNA, M. et al. Review: Nutritional ecology of heavy metals. **Animal Consortium**, v. 12, p. 2156–2170, 2018.
- HELLSTEN, Y.; NYBERG, M. Cardiovascular Adaptations to Exercise Training. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 1–32, Jan. 2015.
- ISHIZAKA, N. et al. Iron overload augments angiotensin II-induced cardiac fibrosis and promotes neointima formation. **Circulation**, v. 106, n. 14, p. 1840–1846, 1 Oct. 2002.
- JERUSA TEREZINHA FINK. Revista Brasileira de Obesidade , Nutrição e Emagrecimento. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e emagrecimento.**, v. 6, n. 43, p. 364–375, 2012.
- JIANG, Y. et al. [Maternal iron overload results in liver damage in rat offspring]. **Weisheng yan jiu = Journal of hygiene research**, v. 44, n. 3, p. 402–6, May 2015.
- JING, X. et al. Icariin protects against iron overload-induced bone loss via suppressing oxidative stress. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 7, p. 10123–10137, 1 Jul. 2019.
- KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z. I. Introduction-serial review: iron and cellular redox status. **Free radical biology & medicine**, v. 32, n. 8, p. 565–567, 2002.
- KE, Y. et al. Post-transcriptional expression of DMT1 in the heart of rat. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, n. 1, p. 124–130, 2003.
- KEMI, O. J.; WISLØFF, U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. **Acta Physiologica**, v. 199, n. 4, p. 425–439, 2010.
- KIM, E.; GIRI, S. N.; PESSAH, I. N. **Iron(II) is a modulator of ryanodine-sensitive**

**calcium channels of cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. Toxicology and applied pharmacology**, 1995. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530865>>

KOONYOSYING, P. et al. Green tea extract modulates oxidative tissue injury in beta-thalassemic mice by chelation of redox iron and inhibition of lipid peroxidation.

**Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1694–1702, 1 Dec. 2018.

KORSAGER LARSEN, M.; MATCHKOV, V. V. **Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress** *Medicina (Lithuania)* Elsevier, , 1 Jan. 2016.

KOWDLEY, K. V. et al. ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis.

**American Journal of Gastroenterology**, v. 114, n. 8, p. 1202–1218, 1 Aug. 2019.

KUMFU, S. et al. Mitochondrial calcium uniporter blocker prevents cardiac mitochondrial dysfunction induced by iron overload in thalassemic mice. **BioMetals**, v. 25, n. 6, p. 1167–1175, 2012.

KUMFU, S. et al. A combination of an iron chelator with an antioxidant exerts greater efficacy on cardioprotection than monotherapy in iron-overload thalassemic mice.

**Free Radical Research**, v. 52, n. 1, p. 70–79, 2 Jan. 2018.

LAN, P. et al. High Serum Iron level is Associated with Increased Mortality in Patients with Sepsis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 1 Dec. 2018.

LE BLANC, S.; GARRICK, M. D.; ARREDONDO, M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 302, n. 12, p. C1780-5, 15 Jun. 2012.

LEE, Y. K. et al. Modeling of Friedreich ataxia-related iron overloading cardiomyopathy using patient-specific-induced pluripotent stem cells. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 466, n. 9, p. 1831–1844, 2014.

LEKAWANVIJIT, S.; CHATTIPAKORN, N. **Iron overload thalassemic cardiomyopathy: Iron status assessment and mechanisms of mechanical and electrical disturbance due to iron toxicity** *Canadian Journal of Cardiology* Pulsus Group Inc., , 2009. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2706758/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2706758/?report=abstract)>.

Acesso em: 4 jan. 2021

LI, W. et al. Ferroptosis Is Involved in Diabetes Myocardial Ischemia/Reperfusion

Injury Through Endoplasmic Reticulum Stress. **DNA and Cell Biology**, v. 39, n. 2, p. 210–225, 1 Feb. 2020.

LIU, J. X. et al. Increased serum iron levels in pregnant women with preeclampsia: a meta-analysis of observational studies. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 39, n. 1, p. 11–16, 2019.

LIU, Y. et al. Physiological and pathological roles of protein kinase A in the heart. **Cardiovascular Research**, 23 Jan. 2021.

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

MAHONEY, J. R. et al. Acute iron poisoning. Rescue with macromolecular chelators. **The Journal of clinical investigation**, v. 84, n. 4, p. 1362–6, Oct. 1989.

MANCUSO, L. et al. Electrocardiographic abnormalities in thalassemia patients with heart failure. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 1, p. 29–35, Mar. 2009.

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

MARQUES, V. B. et al. Chronic iron overload intensifies atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction. **Life Sciences**, v. 233, 15 Sep. 2019.

MEHTA, K. J.; FARNAUD, S. J.; SHARP, P. A. Iron and liver fibrosis: Mechanistic and clinical aspects. **World J Gastroenterol**, v. 25, n. 5, p. 521–538, 2019.

MENON, A. V.; CHANG, J.; KIM, J. Mechanisms of Divalent Metal Toxicity in Affective Disorders. **Toxicology**, v. 339, p. 58–72, 2 Nov. 2015.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V.; LEITE, C. M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 25, n. 4, p. 399–408, Jan. 1992.

MOREB, J.; HERSHKO, C.; HASIN, Y. Effects of acute iron loading on contractility and spontaneous beating rate of cultured rat myocardial cells. **Basic research in cardiology**, v. 83, n. 4, p. 360–368, 1988.

MOREIRA, J. B. N.; WOHLWEND, M.; WISLØFF, U. **Exercise and cardiac health: physiological and molecular insights** *Nature Metabolism* Nature Research, , 1 Sep. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s42255-020-0262-1>>. Acesso em: 18 jun. 2021

MORRA, E. A. et al. Endurance training restores spatially distinct cardiac mitochondrial function and myocardial contractility in ovariectomized rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, p. 174–188, 1 Jan. 2019.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretação. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**, v. V, p. 237–240, 2000.

MURPHY, C. J.; OUDIT, G. Y. **Iron-overload cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnosis, and treatment** *Journal of Cardiac Failure* Elsevier, , 1 Nov. 2010.

NADERI, R. et al. Voluntary exercise protects heart from oxidative stress in diabetic rats. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 2, p. 231–236, 2015.

NAIR, M. et al. Iron Overload in Children with Leukemia Receiving Multiple Blood Transfusions. **Indian pediatrics**, v. 55, n. 11, p. 962–965, 15 Nov. 2018.

NAKAMURA, T.; NAGURO, I.; ICHIJO, H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. **Biochimica et biophysica acta. General subjects**, v. 1863, n. 9, p. 1398–1409, Sep. 2019.

NANBA, S. et al. Association of hepatic oxidative stress and iron dysregulation with HCC development after interferon therapy in chronic hepatitis C. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 3, p. 226–233, 1 Mar. 2016.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 872–879, Dec. 2003.

OMS. **Who guidelines on physical activity and sedentary behaviour**. [s.l.: s.n.].

ORDWAY, G. A.; GARRY, D. J. **Myoglobin: An essential hemoprotein in striated**

**muscleJournal of Experimental Biology** J Exp Biol, , Sep. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15339940/>>. Acesso em: 19 oct. 2020

OUDIT, G. Y. et al. L-type Ca<sup>2+</sup> channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1187–1194, 2003.

OUESLATI, I. et al. Multiple endocrine dysfunctions in a patient with secondary hemochromatosis. **La Tunisie medicale**, v. 97, n. 2, p. 391–393, Feb. 2019.

OZDEMIR, Z. C. et al. N-acetylcysteine supplementation reduces oxidative stress and DNA damage in children with  $\beta$ -thalassemia. **Hemoglobin**, v. 38, n. 5, p. 359–364, 1 Oct. 2014.

OZTARHAN, K. et al. Assessment of cardiac parameters in evaluation of cardiac functions in patients with thalassemia major. **Pediatric hematology and oncology**, v. 29, n. 3, p. 220–234, Apr. 2012.

PARK, S.-Y.; KWAK, Y.-S. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 12, n. 2, p. 113–118, 26 Apr. 2016.

PARK, S. J. et al. Protective effect of sestrin2 against iron overload and ferroptosis-induced liver injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 379, 15 Sep. 2019.

PAROO, Z.; NOBLE, E. G. Isoproterenol potentiates exercise-induction of Hsp70 in cardiac and skeletal muscle. **Cell Stress and Chaperones**, v. 4, n. 3, p. 199–204, 1999.

PATEREK, A.; MACKIEWICZ, U.; MAĆZEWSKI, M. Iron and the heart: A paradigm shift from systemic to cardiomyocyte abnormalities. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 12, p. 21613–21629, 2019.

PELUSI, C. et al. Endocrine dysfunction in hereditary hemochromatosis. **Journal of endocrinological investigation**, v. 39, n. 8, p. 837–847, Aug. 2016.

PILLON BARCELOS, R. et al. **Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise** *Free Radical Research* Taylor and Francis Ltd, , 1 Feb. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10715762.2017.1291942>>. Acesso

em: 5 jan. 2021

PIPERNO, A.; PELUCCHI, S.; MARIANI, R. Inherited iron overload disorders.

**Translational gastroenterology and hepatology**, v. 5, p. 25, 2020.

POWERS, S. K.; RADAK, Z.; JI, L. L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 18, p. 5081–5092, 15 Sep. 2016.

PRABHU, A. et al. Systematic review of the clinical outcomes of iron reduction in Hereditary Hemochromatosis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, Jun. 2020.

QIAN, X. et al. Nanocatalysts-augmented Fenton chemical reaction for nanocatalytic tumor therapy. **Biomaterials**, v. 211, n. November 2018, p. 1–13, 2019.

RAJENDRAN, S. et al. Differences in the response to iron supplementation on oxidative stress, inflammation, and hematological parameters in nonanemic and anemic pregnant women. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, p. 1–7, 20 Feb. 2020.

RAMM, G. A.; RUDDELL, R. G. Hepatotoxicity of Iron Overload: Mechanisms of Iron-Induced Hepatic Fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, v. 25, n. 04, p. 433–449, 29 Nov. 2005.

RIBEIRO JÚNIOR, R. F. et al. Chronic iron overload induces functional and structural vascular changes in small resistance arteries via NADPH oxidase-dependent O<sub>2</sub>[rad]-production. **Toxicology Letters**, v. 279, n. June, p. 43–52, 2017.

ROSSI, E. M. et al. Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. **Toxicology letters**, 1 Nov. 2015.

ROSSI, E. M. et al. Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. **Toxicology letters**, v. 240, n. 1, p. 196–213, 5 Jan. 2016.

ROSSI, E. M. et al. Chronic Iron Overload Restrains the Benefits of Aerobic Exercise to the Vasculature. **Biological Trace Element Research**, 2020.

SAJADI HEZAVEH, Z. et al. The effect of quercetin on iron overload and inflammation in  $\beta$ -thalassemia major patients: A double-blind randomized clinical trial.

**Complementary Therapies in Medicine**, v. 46, p. 24–28, 1 Oct. 2019.

SANTOS, P. C. J. L. et al. **Molecular changes associated with hereditary hemochromatosis** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, , 2009.

SANTOS, P. C. J. L. et al. HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 1, p. 107–114, 2010.

SANTOS, P. C. J. L.; KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Molecular Diagnostic and Pathogenesis of Hereditary Hemochromatosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 1497–1511, 1 Feb. 2012.

SANYEAR, C. et al. Iron homeostasis in a mouse model of thalassemia intermedia is altered between adolescence and adulthood. **PeerJ**, v. 8, p. e8802, 19 Mar. 2020.

SATO, K. et al. Relationship between the Induced Iron Overload Model and Hepatic Erythropoiesis in *Xenopus laevis*. **Zoological Science**, v. 37, n. 1, p. 61, 30 Jan. 2020.

SCHNEIDER, C. D.; REISCHAK DE OLIVEIRA, A. **Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training** \**Rev Bras Med Esporte*. [s.l.: s.n.].

SEBASTIANI, G.; TEMPESTA, D.; ALBERTI, A. Hepatic iron overload is common in chronic hepatitis B and is more severe in patients coinfecting with hepatitis D virus. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 19, n. 2, p. e170–e176, Feb. 2012.

SERAVALLE, G. et al. Alterations in sympathetic nerve traffic in genetic haemochromatosis before and after iron depletion therapy: A microneurographic study. **European Heart Journal**, v. 37, n. 12, p. 988–995, 21 Mar. 2016.

SHARMA, S. et al. Heme carrier protein 1 (HCP1) expression and functional analysis in the retina and retinal pigment epithelium. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 6, p. 1251–1259, 1 Apr. 2007.

SHIZUKUDA, Y.; ROSING, D. R. Iron overload and arrhythmias: Influence of confounding factors. **Journal of Arrhythmia**, v. 35, n. 4, p. 575–583, 1 Aug. 2019.



SIAH, C. W. et al. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 27, n. 1, p. 5–16, 2006.

SILVA, J. A. et al. Exercise training can prevent cardiac hypertrophy induced by sympathetic hyperactivity with modulation of kallikrein-kinin pathway and angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 91017, 10 Mar. 2014.

SIMCOX, J. A. et al. Iron and diabetes risk. **Cell metabolism**, v. 17, n. 3, p. 329–41, 5 Mar. 2013.

SIRI-ANGKUL, N. et al. Cellular Electrophysiology of Iron-Overloaded Cardiomyocytes. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1615, 15 Nov. 2018.

SONG, L. L. et al. Study of abnormal iron metabolism parameters and iron overload in patients with myelodysplastic syndromes. **Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi**, v. 37, n. 10, p. 903–907, 14 Oct. 2016.

SOUSA, L. et al. Iron overload: Effects on cellular biochemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 504, n. April 2019, p. 180–189, 2020.

SOUZA, M. C.; LOCATELLI, C. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO/ SULFATO FERROSO EM RATOS TRATADOS SUBCRONICAMENTE** *Ágora : revista de divulgação científica*, 11 Apr. 2012. Disponível em: <<http://www.periodicos.unc.br/index.php/agora/article/view/135>>. Acesso em: 24 mar. 2016

STØLEN, T. et al. Effect of exercise training on cardiac metabolism in rats with heart failure. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v. 54, n. 2, p. 84–91, 3 Mar. 2020.

SUKUMARAN, A. et al. Iron overload exacerbates age-Associated cardiac hypertrophy in a mouse model of hemochromatosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 Dec. 2017.

TEIXEIRA, P. S. A. Caracterização Do Treinamento Físico Experimental De Endurance Em Esteira Adaptada Fortaleza – Ceará. **Dissertação de mestrado. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ.**, p. 172, 2010.

THEIL, E. C. Iron homeostasis and nutritional iron deficiency. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 4, p. 724S-728S, 1 Apr. 2011.

THEPHINLAP, C. et al. Reversal of Cardiac Iron Loading and Dysfunction in Thalassaemic Mice by Curcuminoids. **Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 62–69, 1 Jan. 2011.

THERIOT, C. A. et al. High dietary iron increases oxidative stress and radiosensitivity in the rat retina and vasculature after exposure to fractionated gamma radiation. **npj Microgravity**, v. 2, 7 Jan. 2016.

THIRUPATHI, A.; CHANG, Y. Z. Brain iron metabolism and CNS diseases. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2019. v. 1173p. 1–19.

TURNER, J. E.; BRUM, P. C. **Does Regular Exercise Counter T Cell Immunosenescence Reducing the Risk of Developing Cancer and Promoting Successful Treatment of Malignancies?Oxidative Medicine and Cellular Longevity**Hindawi Limited, , 2017.

VICTOR L. KATCH, WILLIAM D. MCARDLE, F. I. K. **Essentials of Exercise Physiology**. 4. ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 351, 2013.

WEN, C. P. et al. High serum iron is associated with increased cancer risk. **Cancer Research**, v. 74, n. 22, p. 6589–6597, 15 Nov. 2014.

WILKINSON, N.; PANTOPOULOS, K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 176, Jan. 2014.

WILLIAMS, R. J. P. **Iron in evolutionFEBS Letters**FEBS Lett, , 9 Mar. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21704034/>>. Acesso em: 16 dec. 2020

WONGJAIKAM, S. et al. Combined iron chelator and antioxidant exerted greater efficacy on cardioprotection than monotherapy in iron-overloaded rats. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 1 Jul. 2016.

WONGJAIKAM, S. et al. Restoring the impaired cardiac calcium homeostasis and cardiac function in iron overload rats by the combined deferiprone and N-acetyl cysteine. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 13 Mar. 2017.

WOOD, J. C. et al. The effect of deferasirox on cardiac iron in thalassemia major:

impact of total body iron stores. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 537–43, 29 Jul. 2010.

XU, G. et al. Resveratrol increase myocardial Nrf2 expression in type 2 diabetic rats and alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI). **Annals of Palliative Medicine**, v. 8, n. 5, p. 565–575, 1 Nov. 2019.

XU, Y. Q.; XU, Y.; WANG, S. H. Effect of exosome-carried MIR-30a on myocardial apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury rats through regulating autophagy. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 16, p. 7066–7072, 2019.

YANG, F. et al. Melatonin protects bone marrow mesenchymal stem cells against iron overload-induced aberrant differentiation and senescence. **Journal of Pineal Research**, v. 63, n. 3, 1 Oct. 2017.

YE, Z. et al. **Ferroptosis: Final destination for cancer?Cell Proliferation**Blackwell Publishing Ltd, , 1 Mar. 2020.

ZHANG, H. et al. Role of iron metabolism in heart failure: From iron deficiency to iron overload. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 7, p. 1925–1937, 1 Jul. 2019.

ZHANG, Y. et al. Protective effects of baicalin and quercetin on an iron-overloaded mouse: Comparison of liver, kidney and heart tissues. **Natural Product Research**, v. 25, n. 12, p. 1150–1160, Jul. 2011.

ZHANG, Y. et al. Calcium channel blockers ameliorate iron overload-associated hepatic fibrosis by altering iron transport and stellate cell apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 301, p. 50–60, 15 Jun. 2016.

ZILINYI, R. et al. The cardioprotective effect of metformin in doxorubicin-induced cardiotoxicity: The role of autophagy. **Molecules**, v. 23, n. 5, 2018.

**Anexo 1: Resumo do artigo “Moderate-intensity aerobic training reduces cardiac damage due to iron overload in rats” publicado na revista EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY.**

## Moderate-intensity aerobic training reduces cardiac damage attributable to experimental iron overload in rats

Renata Andrade Ávila<sup>1,2</sup>, Emily Martinelli Rossi<sup>1</sup>, Guilherme Mendes de Carvalho<sup>1</sup>, Maiara Krause<sup>3</sup>, André Soares Leopoldo<sup>4</sup>, Maria Tereza W D Carneiro<sup>3</sup>, Leonardo Dos Santos<sup>1</sup>

Affiliations collapse

### Affiliations

- <sup>1</sup>Department of Physiological Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitória, ES, Brazil.
- <sup>2</sup>Faculdades Integradas São Pedro (FAESA), Vitória, ES, Brazil.
- <sup>3</sup>Department of Chemistry, Federal University of Espirito Santo, Vitória, ES, Brazil.
- <sup>4</sup>Department of Sports, Federal University of Espirito Santo, Vitória, ES, Brazil.

PMID: 34148259 DOI: [10.1113/EP089429](https://doi.org/10.1113/EP089429)

### Abstract

**New findings:** What is the central question of this study? The current literature indicates that oxidative stress plays a major role in iron overload. Although exercise is a well-established approach to treat/prevent cardiovascular diseases, its effects on iron overload are not known. What is the main finding and its importance? Moderate-intensity aerobic training had benefits in a rodent model of iron-overload cardiomyopathy by improving the antioxidant capacity of the heart. After further confirmation by translational and clinical studies, we should consider using this non-pharmacological, highly accessible and easily executable adjuvant approach allied to other therapies to improve the quality of life of iron-overloaded patients.

**Abstract:** Iron is an essential micronutrient for several life processes, but its excess can damage organs owing to oxidative stress, with cardiomyopathy being the leading cause of death in iron-overloaded patients. Although exercise has long been considered as a cardioprotective tool, its effects on iron overload are not known. This study was designed to investigate the effects of moderate-intensity aerobic training in rats previously submitted to chronic iron overload. Wistar rats received i.p. injections of iron dextran (100 mg/kg, 5 days/week for 4 weeks); thereafter, the rats were kept sedentary or exercised (60 min/day, progressive aerobic training, 60-70% of maximal speed, 5 days/week on a treadmill) for 8 weeks. At the end of the experimental period, haemodynamics were recorded and blood samples, livers and hearts harvested. Myocardial mechanics of papillary muscles were assessed in vitro, and cardiac remodelling was evaluated by histology and immunoblotting. Iron overload led to liver iron deposition, liver fibrosis and increased serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. Moreover, cardiac iron accumulation was accompanied by

impaired myocardial mechanics, increased cardiac collagen type I and lipid peroxidation (TBARS), and release of creatine phosphokinase-MB to the serum. Although exercise did not influence iron levels, tissue injury markers were significantly reduced. Likewise, myocardial contractility and inotropic responsiveness were improved in exercised rats, in association with an increase in the endogenous antioxidant enzyme catalase. In conclusion, moderate-intensity aerobic exercise was associated with attenuated oxidative stress and cardiac damage in a rodent model of iron overload, thereby suggesting its potential role as a non-pharmacological adjuvant therapy for iron-overload cardiomyopathy.

**Keywords:** aerobic exercise; animal models; iron overload; myocardial mechanics; oxidative stress.

© 2021 The Authors. Experimental Physiology © 2021 The Physiological Society.