

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Ação do Bezafibrato, um Agonista de PPAR- α , sobre a Hipercolesterolemia Induzida por Dieta e Excesso de Ferro, em Hamsteres

AUTOR: Marcos Rodrigo de Oliveira
ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Maria Lúcia Pedrosa
CO-ORIENTADOR: Prof Dr Marcelo Eustáquio Silva

Ouro Preto, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Ação do Bezafibrato, um Agonista de PPAR- α , sobre a Hipercolesterolemia Induzida por Dieta e Excesso de Ferro, em Hamsteres

AUTOR: Marcos Rodrigo de Oliveira
ORIENTADORA: Prof^{ta} Dr^a Maria Lúcia Pedrosa
CO-ORIENTADOR: Prof Dr Marcelo Eustáquio Silva

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre, em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto, 2007.

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio da *CAPES*, *FAPEMIG** e *UFOP*.

*** Projeto financiado:**

"Efeito do tratamento com fibrato na hipercolesterolemia provocada por dieta e excesso de ferro e ação do ferro na expressão do PPAR-alfa em hamsteres"

FAPEMIG CDS-670/05

Dedicatória

Aos Meus pais, **Ana Maria e José Batista**, que
sempre me apoiaram e me incentivaram em
minhas infundáveis viagens

Agradecimento Especial

Aos professores **Maria Lúcia Pedrosa e
Marcelo Eustáquio Silva**, mais que orientadores
pessoas de lealdade e sinceridade, sempre e incondicional.
Obrigado pela paciência e atenção, continuem com esse belo exemplo

Agradecimentos

Ao meu irmão, **Marcelo**, pelo apoio e incentivo.

A todos os colegas do Laboratório de Nutrição Experimental, em especial, ao **Alan, Aleçandra, Bruno, Emerson, Fabiano, Flávia, Fabrício, Glauciene, Heberth, Jamily, Joamyr, Juliana, Kamylla, Larissa, Maísa, Wanda**, pelo companheirismo, carinho e ajuda.

Ao **Jair** incansável colaborador.

À **Cida**, pela dedicação e resolução de nossos grandes problemas.

À **República Vira Saia**, meu grande aprendizado.

A todos os **Virassaianos**, verdadeiros amigos.

Ao Maestro Raumsol.

Resumo

O ferro é essencial para o metabolismo celular e respiração aeróbica por atuar como cofator de diversas proteínas. Entretanto, em concentração elevada pode levar à toxicidade celular e lesão oxidativa dos componentes celulares devido ao seu envolvimento na formação de radicais livres. O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos do bezafibrato sobre a homeostase de lipídios séricos e enzimas relacionadas às defesas antioxidantes e à função hepática em hamsteres hipercolesterolêmicos e com excesso de ferro. Quarenta e cinco Hamsteres *Golden Syrian* machos, foram divididos em cinco grupos com nove animais cada (de acordo com a dieta recebida, bezafibrato e injeções de ferro dextran intraperitoneais): grupo C recebeu dieta controle; grupo H recebeu dieta hipercolesterolemiantes; grupo HFE recebeu dieta hipercolesterolemiantes e injeções de ferro dextran (25 mg via intraperitoneal divididas em cinco doses); grupo HFI recebeu dieta hipercolesterolemiantes mais bezafibrato na dieta (0,5%); grupo HFEFI recebeu dieta hipercolesterolemiantes mais ferro dextran e bezafibrato na dieta. As injeções de ferro dextran foram administradas diariamente a partir do 28º dia de experimento, contendo 5mg de ferro na forma de dextran durante 5 dias. Os animais dos grupos HFI e HFEFI receberam o bezafibrato a partir do 42º dia de experimento. Após 60 dias de experimento os animais foram anestesiados e sacrificados, os parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo foram determinados. Os resultados foram analisados pela ANOVA, análise univariada, complementada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Observou-se que o ferro potencializou o efeito hipercolesterolêmico da dieta, uma vez que os animais dos grupos que receberam excesso de ferro apresentaram valores de colesterol 43% superiores aos demais grupos. O ferro interferiu no metabolismo do colesterol, elevando principalmente na fração HDL (em cerca de 217% do grupo H comparado ao grupo HFE) e o bezafibrato reverteu parcialmente os efeitos provocados pelo ferro. O bezafibrato provocou o aumento de cerca de 7 vezes na atividade da aspartato aminotransferase (AST) e na presença de ferro esse efeito foi reduzido. O excesso de ferro reduziu a atividade de paraoxonase (PON), quando o paraoxon foi utilizado como substrato ($45,46 \pm 6,75$ e $37,99 \pm 3,34$ U/mL para os grupos H e HFE, respectivamente). O bezafibrato reduziu a atividade da PON, quando

tanto o paraoxon quanto o fenilacetato foram usados como substratos e estes efeitos foram parcialmente revertidos pelo ferro. Os resultados do presente trabalho mostraram que, em hamsteres, o ferro interfere no metabolismo do colesterol, principalmente na fração HDL e essa interferência pode envolver, direta ou indiretamente, a via de sinalização de receptores ativados de proliferação dos peroxisomos α (PPAR- α), posto que o bezafibrato reverteu parcialmente os efeitos provocados pelo ferro.

Abstract:

Iron is essential for cell metabolism and aerobic respiration because of its function as cofactor many proteins. However, in high concentration, it plays a role in cell toxicity and oxidative damage of cell components, because of its involvement in the formation of free radicals. The present study was designed to evaluate the effects of bezafibrate on serum lipids homeostasis and enzymes related to antioxidant defenses and to the hepatic function in hypercholesterolemic hamsters and with iron overdose excess. 45 *Golden Syrian* male hamsters were divided into five groups with 9 animals each, according to diet, bezafibrate and intraperitoneal iron dextran injection; Group C was fed a control diet; group H received hypercholesterolemic diet; Group HFE was fed hypercholesterolemic diet and iron dextran injections (25 mg intraperitoneal, divided in 5 doses); Group HFI was fed hypercholesterolemic diet, iron dextran and bezafibrate diet. The iron dextran injections were administered daily from 28th with 5mg of dextran iron for 5 days. The HFI and HFEFI groups received the bezafibrate from 42th day of experimentation. After 60 experimental days, the animals were anesthetized and sacrificed, and the biochemistry and oxidative stress parameters were determined. Data were tested by one-way ANOVA. When interactions were significant, Tukey's test was applied to determine the specific differences between means at 5% significance. Our results demonstrated that iron potentializes the hypercholesterolemic effect of the diet, since the animals of HFE and HFEFI groups presented higher cholesterol values when compared to the other groups without iron overdose (about 23% increase). Those data suggest that iron interferes in lipid metabolism. Iron interferes in cholesterol metabolism, mainly on the HDL fraction ($69,74 \pm 7,89$ and $151,57 \pm 46,67$ mg/dL for the H and HFE groups, respectively) and the bezafibrate reverts partially the effects caused by iron. The bezafibrate increased about 7 times the activity of the AST and in the presence of iron this effect was reduced. The iron excess reduced the PON activity when paraoxon was used as substrate (371 ± 54 and 310 ± 27 U/L for H and HFE groups, respectively). The bezafibrate reduced PON activity when the paraoxon and the fenilacetate were used as substrate, and those effects were partially reverted through the iron overdose. The results of the present work show that, in hamsters, iron by cholesterol metabolism, mainly by increase HDL fraction. This interference can

involve, directly or indirectly, the sinalization way of PPAR- α , since the bezafibrate reverts partially the effects caused by iron.

SUMÁRIO

APOIO FINANCEIRO	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTO ESPECIAL	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Captação e Transporte de Ferro	5
2.2 Regulação do Metabolismo do Ferro.....	8
2.3 Situações em que Ocorre Excesso de Ferro.....	9
2.4 Estresse Oxidativo e Ferro	10
2.5 Efeito do Estresse Oxidativo no Metabolismo do Ferro.....	11
2.6 Colesterol, Estresse Oxidativo e Aterosclerose	12
2.6 Paraoxonase	14
2.7 Fibratos e Hipercolesterolemia	15
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Animais	19
4.2 Dietas	19
4.3 Delineamento Experimental	20
4.4 Dosagem de Parâmetros Séricos.....	20
4.4.1 Colesterol Total.....	21
4.4.2 Colesterol HDL.....	21
4.4.3 Colesterol Não HDL	21
4.4.4 Triacilgliceróis	21
4.4.5 Ferro Sérico.....	22

4.4.6 Capacidade de Ligação de Ferro.....	22
4.4.7 Proteínas Totais.....	23
4.4.8 Aspartato Aminotransferase (AST).....	23
4.4.9 Alanina Aminotransferase (ALT).....	23
4.4.10 Glicose.....	24
4.4.11 Albumina.....	24
4.4.12 Uréia.....	24
4.4.13 Determinação de Radicais Sulfidrilas.....	25
4.4.14 Paraoxonase – Atividade Arilesterase.....	25
4.4.15 Paraoxonase - Atividade Paraoxonase.....	26
4.4.16 Catalase.....	26
4.4.17 Digestão e Dosagem de Ferro no Fígado.....	27
4.5 Análise Estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Ensaio 1- Efeito da Dieta Hipercolesterolemia (H) Sobre Enzimas, Metabólitos Séricos, Pesos Corporal e de Órgãos em Hamsteres Alimentados Com Dietas Controle e Hipercolesterolemia.....	29
5.1.1 Capacidades Total e Latente de Ligação ao Ferro, Ferro Sérico e Índice de Saturação da Transferrina e Ferro Hepático.....	29
5.1.2 Perfil Lipídico.....	30
5.1.3 Defesas Antioxidantes.....	31
5.1.4 Atividade das Aminotransferases.....	31
5.1.5 Albumina, Proteínas Totais, Glicose, Bilirrubinas e Uréia.....	32
5.1.6 Pesos relativos dos Órgãos e Peso Corporal.....	32
5.2 Ensaio 2: Avaliação do Efeito do Bezafibrato no Perfil Lipídico, Parâmetros Bioquímicos e Estresse Oxidativo em Hamsteres Hipercolesterolemicos Induzidos por Dieta e Excesso de Ferro.....	33
5.2.1 Concentração de Ferro, Capacidade Latente de Ligação ao Ferro (CLLF), Capacidade Total de Ligação ao Ferro (CTLF), Índice de Saturação da Transferrina (%IST).....	33
5.2.2 Defesas Antioxidantes.....	35
5.2.2.1 Atividade da Paraoxonase para Fenilacetato.....	35
5.2.2.2 Atividade da Paraoxonase para Paraoxon.....	35
5.2.2.3 Atividade da Catalase.....	36
5.2.3 Valores do Perfil Lipídico.....	37
5.2.4 Atividades da Aspartato e Alanina Aminotransferase.....	40
5.2.5 Pesos Relativos dos Órgãos e Peso Corporal.....	41
6 DISCUSSÃO.....	43
6.1 Ferro.....	43
6.2 Lipídios.....	46
6.3 Defesas Antioxidantes.....	49
6.4 Aminotransferases.....	51
6.5 Peso dos Órgãos.....	52
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53

8 CONCLUSÕES	55
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

Lista de quadros e tabelas

Quadro I: Composição das dietas controle e hipercolesterolemiantes em gramas para cada 1000g de dieta

Tabela 1. Capacidade Total de Ligação ao Ferro (CTLF), Ferro, Capacidade Latente de Ligação ao Ferro (CLLF) e Índice de Saturação da Transferrina (IST), de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Tabela 2. Colesterol, Triacilgliceróis, Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e Colesterol não HDL em hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Tabela 3. Atividade da Paraoxonase (PON-fenilacetato), Paraoxonase- (PON - Paraoxon), Catalase de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Tabela 4. Sulfidrilas Totais, Sulfidrilas Livres e Sulfidrilas Ligadas à Fração Protéica de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Tabela 5. Atividades séricas das aminotransferases AST e ALT de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Tabela 6. Albumina, Proteínas Totais, Glicose, Bilirrubinas e Uréia de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Tabela 7. Pesos Relativos do Fígado, Rins, Coração e Peso Corporal de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Tabela 8. Ferro sérico, Capacidade Latente de Ligação ao Ferro (CLLF) e Capacidade Total de Ligação ao Ferro (CTLF), em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Tabela 9. Transferrina sérica, Índice de Saturação da Transferrina (IST) e Ferro Hepático em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Tabela 10. Concentrações de Sulfidrilas Totais, Livres, e Protéica em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI)

Tabela 11. Porcentagem dos pesos dos órgãos em relação ao peso final dos hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes, com ou sem ferro dextran e bezafibrato. FE(ferro), FI (Bezafibrato) no final do experimento.

Lista de figuras

Figura I - Mecanismo de transporte gastrintestinal do ferro.

Figura II - Mecanismo de transporte do ferro dentro dos hepatócitos

Figura III - Esquema sumarizado da ativação do PPAR. AR - ácido retinóico

Figura 1. Ferro no fígado de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H).

Figura 2. Ferro no fígado em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Figura 3. Atividade sérica da Paraoxonase fenilacetato em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI)

Figura 4. Atividade sérica da Paraoxonase paraoxon em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Figura 5. Atividade sérica da Catalase em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Figura 6. Concentração sérica do Colesterol Total em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Figura 7. Concentração sérica de Triacilgliceróis em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Figura 8. Concentração sérica da fração HDL-Colesterol em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Figura 9. Concentração sérica da fração não HDL-Colesterol em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI)

Figura 10. Atividades séricas da AST (aspartato aminotransferase) em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI).

Figura 11. Atividades séricas da ALT (alanina aminotransferase) em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI)

Abreviaturas

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

CETP - Proteína de transferência de éster de colesterol

DAC - Doenças arteriais coronarianas

DCV - Doenças cardiovasculares

DMT1 - Transportador de metal divalente 1

ERO - Espécies reativas do oxigênio

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HMG CoA - 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A

IRE - Elementos responsivos ao ferro

IRP - Proteínas reguladoras do ferro

LCAT - Lecitina colesterol acil transferase

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LPL - Lipoproteína lipase

NO - Óxido nítrico

PON - Paraoxonase

PPAR - Receptores ativados da proliferação dos peroxisomos

PPRE - Elementos responsivos de proliferação dos peroxisomos

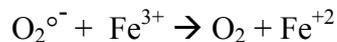
RXR - Receptor retinóide X ativado

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

1- Introdução

Há um número crescente de evidências indicando que a diminuição nas defesas antioxidantes e aumento de espécies reativas do oxigênio promovem danos às macromoléculas tais como proteínas, lipídios e DNA e estes danos estão relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças. Mecanismos endógenos de defesas antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, têm importante papel em transformar espécies reativas em espécies inertes (Bunker, 1992), mas componentes da dieta podem também modificar o status redox aumentando ou diminuindo a capacidade redox do organismo. O ferro está entre os nutrientes que afetam tal capacidade.

O ferro é essencial para o metabolismo celular e respiração aeróbica por atuar como cofator de diversas proteínas. Entretanto, em concentração elevada pode levar à toxicidade celular e lesão oxidativa dos componentes celulares devido ao seu envolvimento na formação de radicais livres (Leonarduzzi *et al*, 1997). O papel dos metais na formação *in vitro* das espécies reativas do oxigênio (ERO) é justificado pelas reações de Fenton e de Haber- Weiss (Dunford , 1987).



A toxicidade do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\circ-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aparecem pelas conversões dependentes de ferro ao radical hidroxil (OH°) que é muito reativo e causa danos graves às membranas, proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 1984). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{2+} (Scott *et al.*,1991). Assim, é altamente tóxico para as células; esta toxicidade pode ser aumentada em até dez mil vezes quando em presença de ferro (Eaton, 1991).

Doenças arteriais coronarianas (DAC), uma das principais causas de morbidade e mortalidade em sociedades ocidentais, estão associadas a diversos fatores de risco, dentre eles o tabagismo, hipertensão arterial, Diabetes Mellitus, sedentarismo e

dislipidemias. Mais recentemente tem sido proposta a hipótese oxidativa, segundo a qual o aumento da formação de radicais livres por espécies reativas de oxigênio e diminuição das defesas antioxidantes são responsáveis pela aterosclerose (Navab *et al.*, 2004). Experimentalmente, a modificação da LDL que pode ser obtida pela sua oxidação por espécies reativas de oxigênio, na presença de metais de transição (Halliwell *et al.*, 1992) tem sido considerada um importante fator de risco para aterosclerose.

Em 1981, Sullivan propôs a “hipótese do ferro” segundo a qual a deficiência de ferro poderia proteger contra distúrbios cardiovasculares, como uma possível explicação para a diferença de risco para doenças cardiovasculares entre homens e mulheres. Essa hipótese sugere que o desenvolvimento de doenças cardiovasculares poderia estar relacionado a estoques de ferro elevados. Evidências no suporte dessa hipótese surgiram em 1992, quando resultados publicados pela “Finnish Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study” mostraram a relação linear entre o risco de ataque cardíaco em homens e níveis de ferritina e reportaram que homens com ferritina sérica ≥ 200 $\mu\text{g/L}$ tinham duas vezes mais risco de apresentar problemas cardiovasculares, quando comparados com aqueles que tinham baixos níveis de ferritina (Salonen *et al.*, 1982).

Ao lado do provável papel do ferro na etiologia da aterosclerose, tem sido proposto seu papel na etiologia de outras doenças crônicas incluindo diabetes tipo II (Jiang *et al.* 2004), síndrome de resistência à insulina e esteato-hepatite não alcoólica (Mendles *et al.*, 1999). Estudos cross-sectionais têm encontrado que níveis elevados de ferritina estão associados à obesidade central (Gillum, 2001) e dislipidemia (Willians *et al.*, 2002).

A deficiência de ferro é um problema nutricional mais comum, mas recentemente alguns pesquisadores têm sugerido que a população está consumindo excesso de ferro devido à utilização de alimentos fortificados e suplementos alimentares. Há no organismo dos mamíferos um sofisticado e complexo mecanismo regulatório do metabolismo de ferro, evitando seu acúmulo, pois uma vez absorvido, o ferro não é ativamente excretado. De forma simplificada, a absorção de ferro é regulada por *feedback*, ou seja, a absorção de ferro depende das necessidades metabólicas, aumentando quando os estoques estão baixos e vice-versa (Beard, 2002). Apesar disso, tem-se demonstrado que existem situações em que esta regulação parece não ocorrer perfeitamente e o excesso de ferro pode ocorrer. Ele acontece, por exemplo, em

indivíduos com doenças hereditárias como a hemocromatose, doença comum em indivíduos de descendência Européia e nas populações do sub-Sahara (Sheth & Brand, 2000), em que ocorre intenso depósito de ferro em diversos órgãos ou tecidos, principalmente no fígado, devido ao aumento da absorção de ferro no intestino. Existem situações menos drásticas em que o excesso de ferro pode também ocorrer, como observada na Suécia, onde a suplementação dos alimentos com ferro foi obrigatória por 50 anos e 5% dos homens tiveram níveis aumentados de ferro e 2% níveis iguais aos encontrados em estágios iniciais de hemacromatose (Olsson *et al.*, 1978; 1995). A alta ingestão de ferro por idosos, através do consumo de grandes quantidades de carne, ou a ingestão de suplementos nutricionais também são consideradas causas potenciais de excesso de ferro (Fleming *et al.* 2002); um estudo conduzido na Austrália (Whitfield *et al.*, 2001) mostrou que o consumo de álcool mesmo em baixas doses, 8 a 14 drinks por semana – aumenta a ferritina sérica e por inferência os estoques de ferro. Assim estes trabalhos sugerem que a absorção de ferro da dieta não é tão firmemente controlada, como se pensava, principalmente em idosos. Isto mostra a relevância de estudos que relacionem ferro e desenvolvimento de doenças.

Tentando contribuir para o esclarecimento da interação entre excesso de ferro e os fatores de risco para a aterosclerose e doenças cardiovasculares, foi verificado em nosso laboratório que, em ratos hipercolesterolêmicos, que receberam 10% de colesterol na dieta, o excesso de ferro diminui níveis de colesterol total e aumenta HDL (Turbinho-Ribeiro *et al.*, 2003). A partir desses achados foi utilizado o hamster como modelo experimental, pois apesar do rato ser uma espécie muito usada para a detecção e agentes que afetam o metabolismo, há diferenças na distribuição de lipídios e lipoproteínas entre ratos e humanos. O metabolismo do colesterol do hamster é mais parecido com o do homem, e esta espécie tem sido usada para estudar metabolismo de lipídios hepático e de lipoproteínas (Nistor *et al.*, 1987; Fernandez *et al.*, 1999).

Ao se utilizar hamsteres como modelo experimental, Silva *et al.* (2005) verificaram que a sobrecarga de ferro aumentava a concentração do colesterol total, indicando que o excesso de ferro pode influenciar o metabolismo de lipídios e lipoproteínas desencadeando dislipidemia metabólica e dessa forma corroborando a hipótese de que o ferro pudesse aumentar o risco para aterosclerose.

O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos do bezafibrato sobre a homeostase de lipídios séricos, outros metabólitos séricos e enzimas relacionadas às defesas antioxidantes em hamsteres hipercolesterolêmicos e com excesso de ferro.

Os fibratos, são compostos derivados do ácido fibrico e têm sido usados no tratamento de hiperlipidemias. O bezafibrato, fenofibrato e gemfibrozil são amplamente prescritos para tratar pacientes com hipertrigliceridemia e baixo nível de HDL (Staels *et al* 1998). A ação dos fibratos sobre o metabolismo de lipídios é mediada principalmente pelos receptores ativadores da proliferação peroxisomal alfa (PPAR) α , levando à expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e lipoproteínas (Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2005; Kota *et al.*, 2005; Perrone *et al.*, 2005). A expressão do PPAR α ocorre principalmente no fígado, coração e rim. PPAR α se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR) para se ligar ao elemento responsivo ao PPAR (PPER) em regiões promotoras de genes envolvidos na homeostase metabólica. PPAR α regula genes alvos que codificam para o metabolismo de ácidos graxos (β oxidação), enzimas transportadoras de ácidos graxos, homeostase do colesterol e metabolismo de lipoproteínas (Schoonjans *et al.*, 1996; Motojima *et al.*, 1998 e Dreyer *et al.*, 1992). Dentre eles, o gene responsável pela enzima colesterol 7- α hidroxilase (CYP7- α), é considerada como enzima limitante da velocidade síntese dos ácidos biliares (Cheema & Agellon, 2000).

Considerando que a conversão de colesterol a ácidos biliares no fígado representa uma rota importante pela qual o colesterol é eliminado do corpo, como Marcil *et al* (2006) sugeriram que o estresse oxidativo diminui a expressão de PPAR e uma vez que, experimentos anteriores em hamsteres mostraram que o ferro potencializava a hipercolesterolemia induzida pela dieta, resolvemos avaliar se o efeito do excesso de ferro sobre a concentração de colesterol pode ser revertido pela bezafibrato e se existem outros efeitos quando estes agentes são utilizados em hamsteres.

2- Revisão da Literatura

2.1 Captação e Transporte de Ferro

O ferro é o metal de transição mais abundante no corpo. É um elemento essencial para o transporte e a utilização do oxigênio, bem como componente de numerosas oxidases e oxigenases. Em adultos normais que ingerem uma dieta livre de suplementos de ferro, o corpo contém de 3-4 gramas de ferro e é suficientemente balanceado entre os componentes funcionais, complexos estocados, transportes quelados, ingestão e excreção.

A absorção do ferro é um importante processo no controle dos níveis de ferro corporal, porque não existe uma via específica para excreção do ferro do organismo. Sua eliminação pode ocorrer somente por renovação de tecidos que não são reutilizados (por exemplo, células de epiderme e mucosa gastrintestinal), menstruação e outras perdas sangüíneas (Devlin, 2002).

Na dieta, o ferro é encontrado na forma hemínica e iônica (não-hemínica) e sua absorção ocorre no duodeno. O ferro não-hemínico existe principalmente na forma oxidada (Fe^{3+}) que não é biodisponível e deve ser reduzido a Fe^{2+} para ser transportado através do epitélio intestinal (figura 1). A redução do íon férrico para ferroso ocorre no enterócito principalmente pela ferri-redutase (Dcytb), presente na borda em escova do duodeno. O transporte do ferro ferroso através da membrana apical do enterócito ocorre pelo transportador de metal divalente 1 (DMT1). O ferro absorvido pode ser estocado intracelularmente como ferritina ou liberado para a circulação pela ferroportina, um transportador basolateral, e é então oxidado pela hefaestina, uma cobre-oxidase, e então ligado à transferrina (Fleming *et al.*, 2005). O ferro hemínico é absorvido no enterócito por um receptor específico, uma vez internalizado é liberado do heme por uma heme-oxigenase e então estocado ou transportado do enterócito por mecanismo similar ao do ferro iônico (Siah *et al.*, 2005)

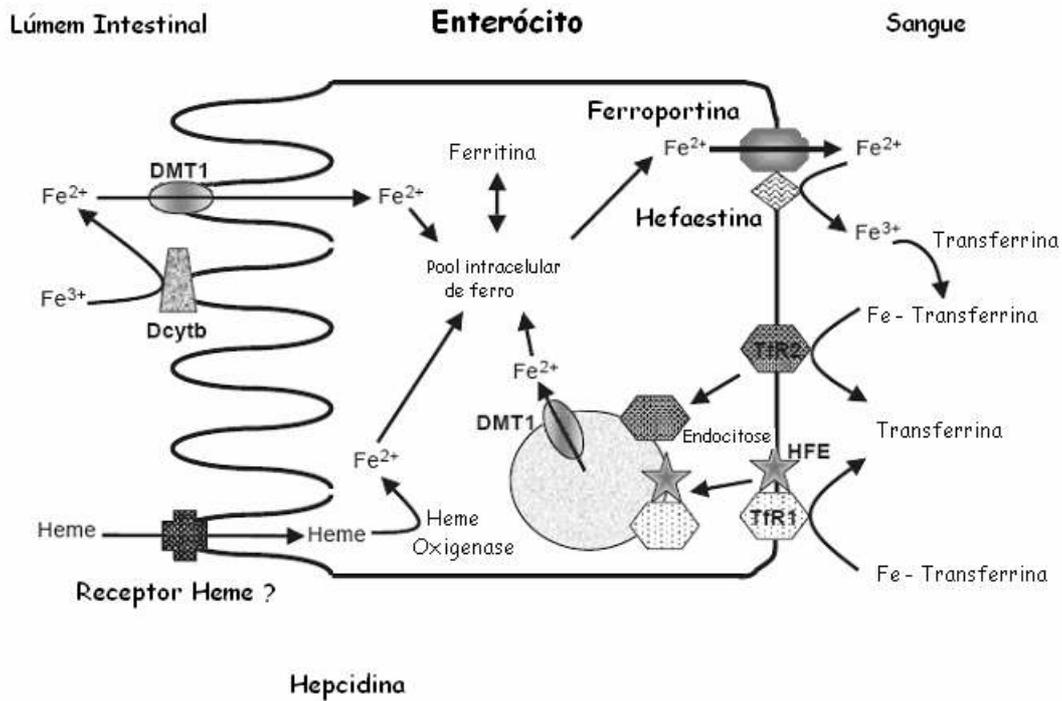


Figura I - Mecanismo de transporte gastrointestinal do ferro. DMT1 (transportador de metal divalente 1); Dcytb (ferri-redutase); TfR1 (receptor de transferrina 1). TfR2 (receptor de transferrina 2)
Adaptado de : Siah *et al.*, (2005).

Ferroportina é também a mediadora de transporte do ferro para fora do hepatócito (Abboud *et al.*, 2000) o qual é oxidado pela ceruloplasmina e liga-se à transferrina (Randell *et al.*, 1994) (figura 2).

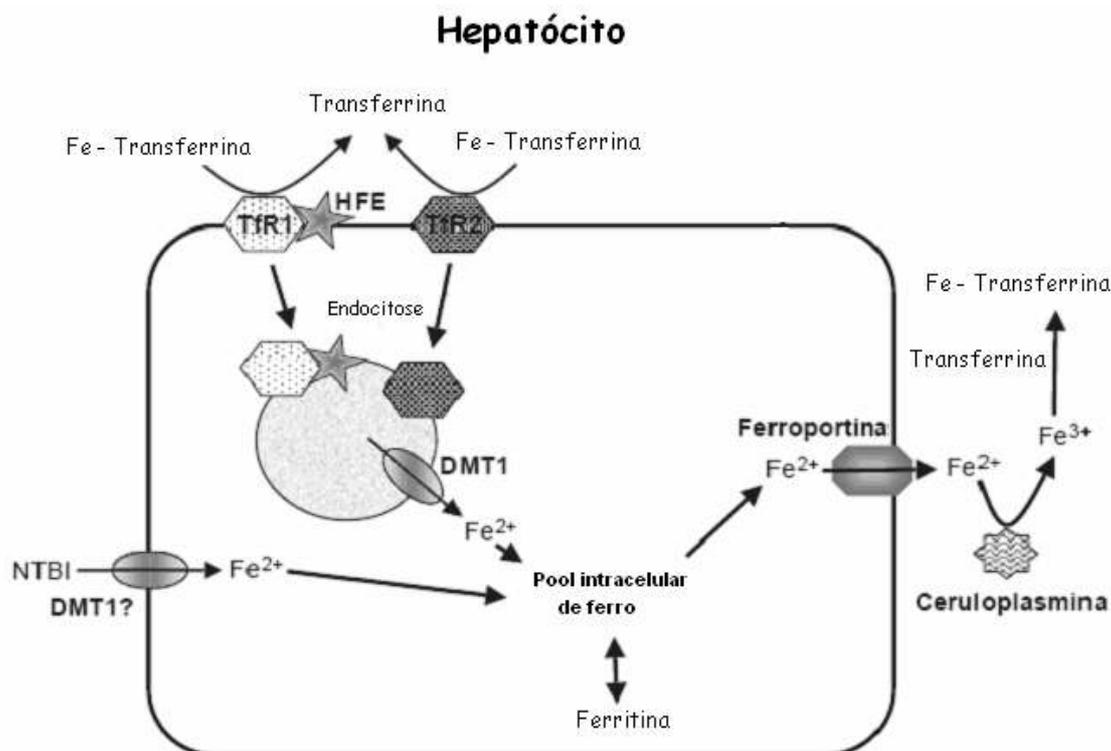


Figura II - Mecanismo de transporte do ferro dentro dos hepatócitos

Adaptado de: Siah *et al* (2005).

O ferro é transportado e estocado por proteínas específicas (transferrina, lactoferrina, ferritina e hemoproteínas) (Ferrali *et al.*, 1992). Transferrina sérica, uma glicoproteína monomérica de 80 kDa, é a transportadora do ferro no sangue e se liga no ferro na forma férrica (Fe^{3+}) com alta afinidade (Ponka *et al.*, 1998). Através de estudos cinéticos e por termodinâmica, sabe-se que a transferrina pode estar presente no plasma sob quatro formas: apotransferrina livre do ferro, transferrina diférrica totalmente saturada e transferrina monomérica contendo ferro ligado ao terminal N ou terminal C (Ponka *et al.*, 1998). Em condições fisiológicas, somente 30% da transferrina está saturada com ferro (Pantopoulos & Hentze, 2000).

A captação celular de ferro ocorre através dos receptores da transferrina na superfície da célula. Íon férrico é reduzido para a forma ferrosa e liberada por um endossomo no citosol. A fração de ferro liberada permanece ligada em quelatos de baixo peso molecular, como citrato, ATP, pirofosfatos e ácido ascórbico e determinam a quantidade de ferro da célula, conhecido como “pool lábil de ferro” (Pantopoulos & Hentze, 2000). Excesso de ferro é seqüestrado pela ferritina, a principal proteína intracelular de estocagem do ferro, a qual é composta de 24 subunidades de cadeias H e L (21 e 19kDa, respectivamente) e podem estocar até 4500 átomos de ferro por

molécula (Ponka *et al.*, 1998). A ferritina desempenha um papel chave na prevenção da toxicidade porque ela tem a habilidade de sequestrar milhares de átomos de ferro em sua cavidade central, na forma solúvel, não tóxica e biodisponível (Lobreaux *et al.*,1993). A incorporação do ferro na ferritina requer a atividade ferroxidase associada com as subunidades H e o centro de nucleação associada com as subunidades L.

2.2 Regulação do Metabolismo do Ferro

No citosol existem duas proteínas que respondem a alterações na concentração de ferro chamadas proteínas reguladoras do ferro (IRPs), que se ligam em mRNA conhecidos como elementos responsivos ao ferro (IREs). Quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos, as IRPs ligam-se aos IREs presentes na região flanqueadora 5' do mRNA da ferritina e na região flanqueadora 3' do mRNA do receptor de transferrina, bloqueando a tradução do mRNA da ferritina e estabilizando o do receptor de transferrina, prevenindo sua clivagem por uma endonuclease, favorecendo sua tradução (Ponka,1999; Kaur & Andersen, 2004). A presença de elementos responsivos ao ferro em regiões que codificam os mRNA da DMT-1 e ferroportina sugere que a expressão dessas proteínas pode ser susceptível à regulação pós-transcricional pelos elementos responsivos ao ferro (Gunshin *et al.*, 2001).

Hepatócitos servem como estocagem e reservatórios de ferro, captando ferro da dieta via circulação porta e quando há aumento na demanda do ferro, libera este na circulação pela via ferroportina. A liberação do ferro mediada pela ferroportina, pelos enterócitos, hepatócitos e macrófagos é reconhecida como determinante importante na homeostase do ferro. A descoberta da hepcidina revelou um importante papel do hepatócito na sensibilidade do status do ferro corpóreo e a modulação da liberação celular do ferro mediada pela ferroportina.

Hepcidina é um polipeptídeo com 25 resíduos de aminoácidos, produzida pelos hepatócitos, e apresenta papel chave no metabolismo do ferro (Ganz , 2003). A hepcidina regula dois passos chave no metabolismo do ferro, reciclando este nos macrófagos (Deicher & Hörl , 2004). Estoques de ferro, atividade eritropoiética, hemoglobina, disponibilidade de oxigênio e inflamação, regulam a absorção intestinal do ferro e também regulam a expressão da hepcidina pelo fígado. Quando cada um desses fatores sofre mudança, a absorção intestinal varia inversamente com a expressão da hepcidina hepática. A hepcidina diminui a atividade funcional da ferroportina pela ligação direta, levando à sua internalização pela superfície celular e sua posterior

degradação (Nemeth *et al.*, 2004). No enterócito essa ação levará à diminuição da transferência do ferro basolateral e sua absorção na dieta. No macrófago do reticuloendotelial e no hepatócito a hepcidina leva à diminuição da exportação do ferro e o aumento no seu estoque. Anormalidades na regulação da hepcidina têm sido relacionadas com duas condições clínicas importantes: hemocromatose hereditária e anemia da inflamação. As anormalidades da homeostasia do ferro observadas na hemocromatose hereditária são opostas daquela observada na anemia da inflamação. Hepsidina é inapropriadamente baixa em pacientes com hemocromatose hereditária, enquanto há um aumento em pacientes com condições inflamatórias. Na hemocromatose hereditária, há um aumento na absorção dietética do ferro, com relativamente baixo ferro nos macrófagos do reticuloendotelial e um aumento na saturação pelo ferro da transferrina circulante. Hepatócitos tornam-se liberadores de ferro nesse cenário, presumivelmente porque a captação do ferro através da circulação excede sua exportação mediada pela ferroportina. De modo oposto, na anemia da inflamação, a retenção de ferro pelos enterócitos e macrófagos do reticuloendotelial leva marcadamente à baixa saturação da transferrina, restrição da eritropoiese e moderada anemia. Dessa forma a hepcidina oferece uma explicação unificada para as anormalidades no metabolismo do ferro nessas duas condições clínicas comuns.

2.3 Situações em que Ocorre Excesso de Ferro

Apesar do sofisticado e complexo mecanismo regulatório do metabolismo de ferro de forma a atender as demandas das células e ao mesmo tempo evitar seu acúmulo, há algumas situações em que o excesso de ferro pode ocorrer. Excesso de ferro ocorre principalmente em indivíduos com doenças hereditárias como hemocromatose, caracterizada por uma sobrecarga de ferro maciça, causada pelo aumento da absorção de ferro no duodeno com conseqüente acúmulo de ferro nos tecidos acarretando danos irreversíveis aos órgãos. Em outras doenças hereditárias, como na atransferrinemia onde se tem escassa transferrina circulante, e durante o tratamento da talassemia. Talassemias são doenças genéticas em que a taxa de síntese de uma ou mais cadeias da hemoglobina está diminuída. Pacientes não tratados morrem de anemia na infância, mas podem ser mantidos com vida, com regulares transfusões

sangüíneas. Uma vez que cada unidade de sangue contém em torno de 0,2g de ferro, pacientes tornam-se sobrecarregados com ferro e o pool lábil de ferro é drasticamente aumentado. Isso é consistente com as seguintes observações sobre o excesso de ferro no plasma: o pool de ferro lábil é detectado através de ensaio de bleomicina, a produção de $^{\circ}\text{OH}$ é estimulada, a proliferação de lipossomas de fosfolípidios é estimulada, a transferrina é completamente saturada, e além disso, a apotransferrina é completamente protegida (Fontecave & Pierre, 1993).

Existem situações menos drásticas onde o excesso de ferro pode ocorrer como no caso da Suécia onde o governo obrigou a suplementação de ferro por 50 anos e 5% dos homens tiveram níveis aumentados de ferro e 2% níveis iguais aos encontrados em estágios iniciais de hemacromatose (Olsson *et al.*, 1978; 1995). A alta ingestão de ferro através do consumo de grandes quantidades de carne ou a ingestão de suplementos nutricionais também é considerada causa potencial de excesso de ferro (Fleming *et al.*, 2002).

2.4 Estresse Oxidativo e Ferro

O metabolismo oxidativo é o principal suporte da vida aeróbica. Nutrientes servem para produção de energia pela fosforilação oxidativa e formação de intermediários no metabolismo, incluindo a incorporação de átomos de oxigênio através do oxigênio molecular nas biomoléculas. A utilização do oxigênio em sistemas biológicos inclui a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem causar danos às moléculas biológicas. Dessa maneira, processos biológicos levam a geração de produtos oxidantes, um foco interessante particular está na oxidação do DNA, proteínas e lipídeos. Por outro lado, há uma estratégia de defesa contra danos oxidativos incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos bem como resposta adaptativa (Sies, 1993). No balanço entre oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros potencialmente levará a degenerações e é chamado de estresse oxidativo (Sies, 2000). O termo descreve a condição metabólica de células, órgãos, ou o organismo inteiro caracterizando a oxidação generalizada.

Em baixos níveis, ERO medeiam as funções celulares via sinalização intracelular, ativadas pelo estímulo que influenciam o estado redox celular. Mudanças

no estado de tióis intracelulares, especialmente a glutathiona, desempenham um papel chave na regulação da transcrição gênica (Wu *et al.*, 2004). Dependendo da via de geração ou a maior quantidade de ERO formadas, o fenômeno do estresse oxidativo pode ser estresse metabólico oxidativo, estresse fotooxidante (Sies & Stahl, 2004), estresse oxidativo dependente de medicamento ou estresse nitroativo (Sies, 2000). O aumento no estresse oxidativo tem sido associado com doenças como diabetes, fibrose cística, catarata ou infecções (Willcox *et al.*, 2004).

Acredita-se que o excesso de ferro possa gerar estresse oxidativo, uma vez que ele promove o aumento na concentração das ERO e nitrogênio. A toxicidade do ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aparecem pelas conversões dependentes de ferro do radical hidroxil ($^{\circ}OH$) que causam graves danos nas membranas, proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 1984).

2.5 Efeito do Estresse Oxidativo no Metabolismo do Ferro

Estudos em lisados de fígados de ratos têm mostrado que H_2O_2 ou O_2^- sozinhos têm fraca reatividade na proteína responsiva ao ferro-1 (IRP-1), mas a ação combinada das duas espécies induz a inativação reversível da IRP-1 (Cairo *et al.*, 1996). A inativação da IRP-1 tem sido subsequente observada em fibroblastos murinos expostos em menadiona (Gehring *et al.*, 1999), dioxina (Smith *et al.*, 1998), forane (Cairo *et al.*, 1995) e ratos sujeitos à isquemia de reperfusão (Tacchini *et al.*, 1997). Assim, tem sido conclusivo que a regulação aumentada da atividade da IRP pode ser uma resposta comum ao aumento da formação de H_2O_2 e O_2^- , levando uma diminuição dos níveis dos receptores de transferrina enquanto há também o aumento dos níveis da transferrina. Do mesmo modo a resposta poderá eventualmente reduzir o pool de ferro lábil antes da conversão de H_2O_2 e O_2^- em $^{\circ}OH$. O ponto fraco para essa hipótese é que o O_2^- pode ser responsável pela liberação do ferro da ferritina (Puntarulo & Cederbaum, 1996). Esse efeito pode expandir o pool de ferro lábil e agir na redução induzida pela inativação da IRP-1/ síntese de ferritina. Esse efeito totalmente oposto pode ser reconciliado através da suposição que a taxa de liberação de ferro incorporado na apoferritina (recentemente sintetizada) excede a taxa de liberação do ferro pela ferritina pré-existente (Cairo *et al.*, 2002). O peróxido de hidrogênio não ativa a IRP-1 ligando diretamente (Brazzalotto *et al.*, 1999), mas ele induz a rápida ativação dos elementos

responsivos ao ferro ligando com habilidade em células intactas, assim os ampliam extracelularmente (Pantopoulos *et al.*, 1997). A ativação da IRP-1 pela H_2O_2 é acompanhada pela inibição da síntese da ferritina e pela estabilização do RNAm do receptor da transferrina. Recentemente, foi proposto que a H_2O_2 exógena atua através de transdução de sinal na membrana (Muller *et al.*, 2001).

IRP-2 é um alvo adicional para a produção de radicais de oxigênio sob condições de estresse oxidativo. IRP-2 é facilmente degradada em fígados de ratos expostos a depleção de glutathiona ou isquemia de reperfusão (Tacchini *et al.*, 1997) e em células expostas em menadiona (Gehring *et al.*, 1999). No entanto, IRP-2 não foi afetada em células por pulsos exógenos de H_2O_2 (Pantopoulos *et al.*, 1995). Correntemente há poucas evidências conclusivas que ambos IRP-1 e IRP-2 sejam alvos em condições do aumento da formação de radicais livres na célula, promovendo nela uma regulação que diminui redução do pool lábil de ferro e prevenindo a amplificação do dano oxidativo.

2.6 Colesterol, Estresse Oxidativo e Aterosclerose

LDL oxidadas e os produtos gerados por esta oxidação estão associados com o estresse oxidativo e podem acumular-se nas paredes arteriais e acelerar o processo de aterosclerose. Em 1979, Chisolm *et al.* reportaram que a oxidação da LDL provocava danos nas células da parede arterial, sugerindo que a oxidação da LDL poderia ser importante na aterogênese. Eles demonstraram também que a HDL inibia a citotoxicidade induzida pela LDL. Depois de duas décadas, esse grupo elucidou a base dessas observações e estabeleceu a importância do papel dos produtos de oxidação do colesterol, especialmente, os hidroperóxidos de colesterol (Colles *et al.*, 2001). Em 1988 e 1999, trabalhos foram publicados indicando que LDL oxidadas estavam presentes nas paredes arteriais de animais com aterosclerose (Haberland *et al.*, 1988; Palinski *et al.*, 1989; Yla-Herttuala, 1989). Napoli *et al.*(1997) demonstraram que o acúmulo de LDL oxidadas precedia a entrada dos monócitos nas paredes arteriais. Em estudo em fetos humanos foi encontrado que as LDL estavam presentes e foram oxidadas antes da entrada dos monócitos. HDL e seu principal componente estrutural, apolipoproteína A1, podem prevenir a oxidação das LDL (Navab *et al.*, 2004). Um

número de mecanismos moleculares pode aparecer depois da transferência de hidroperóxidos de éster de colesterol (CEOOH) da LDL para HDL, num processo parcialmente determinado pela atividade enzimática da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) (Serdyuk & Morton, 1999). No entanto, o papel da CETP é potencialmente aterogênico e inibidores de CETP (JTT-705 e torcetrapib) têm mostrado como protetor em várias triagens clínicas (Brousseau *et al.*, 2004). Porém deve ser lembrado que o mecanismo de transferência do colesterol pela HDL da apolipoproteína B (num processo que leva a troca de triacilgliceróis) opera em ambas as vias e depende da concentração das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (Serdyuk & Morton, 1999). A renovação da HDL especialmente é mais importante que sua alta concentração na proteção vascular. Em particular, a ação da CETP na HDL facilita a esterificação pela lecitina colesterol acil transferase (LCAT) e assim o efluxo do colesterol. A ação combinada CETP e lipase hepática na HDL madura (HDL₂) gera frações de HDL que contêm baixas concentrações de lipídios e são melhores aceptoras de colesterol (Brousseau *et al.*, 2004).

O mecanismo de formação da LDL oxidada compreende no mínimo três passos. O primeiro consiste nas partículas de LDL com ácido araquidônico e hidroperóxidos de ésteres de colesterol (CEOOH) (Navab *et al.*, 2000). O segundo passo, a LDL atravessa o espaço subendotelial, onde há um acúmulo adicional de espécies reativas de oxigênio. O terceiro passo envolve a oxidação de fosfolípidos das LDL através da reação com as altas concentrações de espécies reativas de oxigênio. A atividade da paraoxonase presumivelmente interfere no primeiro desses passos.

Numerosos estudos clínicos e epidemiológicos têm relacionado fortemente a diminuição da concentração plasmática da lipoproteína de alta densidade (HDL) com o desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) (Young *et al.*, 2004). Baixa concentração de HDL circulante é um fator de risco independente para DAC (Assmann & Nofer, 2003). Esse efeito também é observado na síndrome metabólica (Brinton, 2003), que inclui resistência à insulina (Rashid *et al.*, 2003), intolerância à glicose (Borggreve *et al.*, 2003) e hipertensão arterial (Schillaci *et al.*, 2001). Além disso, o aumento das concentrações plasmáticas das lipoproteínas aterogênicas, incluindo a VLDL e a LDL, está freqüentemente associado à diminuição da concentração da HDL. O efeito antiaterogênico da HDL se dá, sobretudo, devido à sua propriedade de transportar lipídios, principalmente ésteres de colesterol, dos tecidos periféricos para o fígado, o que é conhecido como transporte reverso do colesterol (TRC). Contudo, outras

ações protetoras importantes da HDL, além do TRC, têm sido descritas em diversos modelos experimentais e estudos epidemiológicos. Essas ações incluem: proteção antioxidante, mediação do efluxo de colesterol, inibição da expressão de moléculas de adesão celular, ativação de leucócitos, indução da produção de óxido nítrico (NO), regulação da coagulação sanguínea e da atividade plaquetária.

2.6 Paraoxonase

A paraoxonase/arilesterase humana (PON-1) (EC 3.1.1.2) é uma glicoproteína cálcio dependente que está presente ligada às partículas de HDL. Investigações têm demonstrado que a paraoxonase sérica diminui o risco de doença arterial coronariana através da destruição de moléculas próinflamatórias envolvidas no início da progressão das lesões ateroscleróticas (Kujiraoka *et al.*, 2000). O potencial antiaterogênico da paraoxonase vem de sua capacidade de hidrolisar lipídeos oxidados, fosfolípidos, e hidroperóxidos de éster de colesterol (CEOOH), prevenindo assim que eles se acumulem nas partículas de LDL. Além da inibição da oxidação da LDL, há evidências em animais e modelos *in vitro* que a paraoxonase pode proteger a HDL contra sua auto-oxidação e assim manter sua integridade (Oda *et al.*, 2002). Devido a HDL ter funções atero-protetoras, a qual remove o excesso de colesterol dos tecidos (transporte reverso do colesterol) e pode inibir o processo inflamatório, a preservação da partícula de HDL pode ser o papel benéfico da paraoxonase.

No sangue, a paraoxonase pode hidrolisar homocisteína tiolactona, um metabólito da homocisteína (Jakubowski, 2000). Homocisteína tiolactona pode ter efeitos adversos na síntese de proteínas e pode levar à disfunção endotelial e dano vascular (Jakubowski, 2005). A detoxicação da homocisteína tiolactona pode ser a função cardioprotetora da paraoxonase.

Resultados em modelos animais demonstram a proteção antiaterogênica da PON. Camundongos deficientes em PON não protegiam suas LDL do processo de oxidação (Shih *et al.*, 1998), enquanto camundongos transgênicos com HDL isoladas de humanos (tinham de duas a quatro vezes aumento de PON no plasma) eram mais protegidos contra a oxidação das LDL de maneira dose dependente (Tward *et al.*, 2002). Outra forte evidência no papel da PON, é que camundongos deficientes de PON são mais propensos a desenvolver a aterosclerose que o tipo selvagem, quando alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol.

2.7 Fibratos e hipercolesterolemia

Os fármacos para o tratamento da hipercolesterolemia podem agir de duas formas: inibindo a síntese de colesterol ou afetando a absorção gastrointestinal do mesmo. As vastatinas podem inibir a síntese de colesterol pela inibição da enzima chave da síntese do colesterol, a 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase. Esta classe de fármacos vem sendo empregada com grande sucesso desde o seu surgimento e já demonstrou efeitos benéficos na redução da morbimortalidade cardiovascular (Gould *et al.*, 1998). Apesar deste formidável avanço, as pesquisas ainda prosseguem e novas vastatinas estão sendo avaliadas.

Outra classe de fármacos promissora é a das 2-azetidionas, potentes inibidores da absorção intestinal do colesterol dietético e biliar. Seu mecanismo de ação ainda não se encontra plenamente esclarecido, porém têm demonstrado ser bem tolerados e eficazes em doses baixas. Parecem inibir o transportador responsável pela captação do colesterol nas células intestinais. Um representante desta classe, já comercializado no Brasil é o ezetimibe. Pode ser usado isoladamente ou em associação com as vastatinas e, diferentemente de outros agentes de ação sistêmica, não interferem na absorção das vitaminas lipossolúveis (Salen *et al.*, 2004)

Fibratos e seus derivados (Bezafibrato, fenofibrato, clofibrato, gemfibrozil) são ligantes sintéticos dos PPAR- α . PPARs ativados heterodimerizam com o receptor retinóide X ativado (RXR) e se ligam especificamente aos Elementos Responsivos de Proliferação dos Peroxisomos (PPREs), os quais estão localizados no promotor de genes alvos. PPREs são constituídos de repetições diretas (DR) de seqüências hexaméricas as quais são separadas por um ou dois nucleotídeos (DR1 e DR2). Enquanto a geometria do PPRE assegura a especificidade do heterodímero PPAR/RXR, PPREs DR1 e DR2 são também reconhecidos por homodímeros RXR ou heterodímeros de receptores de ácido retinóico (RAR)/RXR, sugerindo que a ligação de RARs e RXRs podem influenciar no controle metabólico (Ijpenberg *et al.*, 2004). A ligação dos PPARs nos PPREs induz a expressão de genes alvos (figura III).

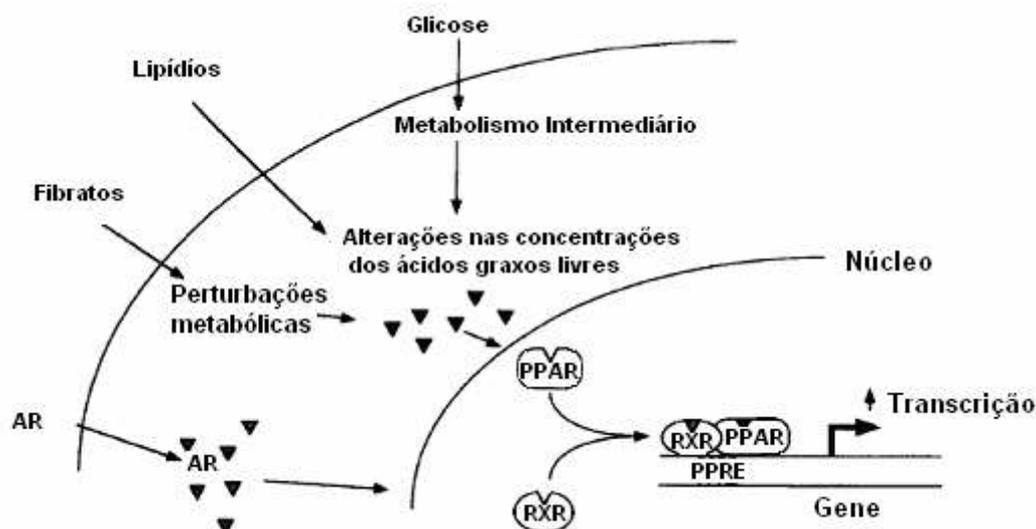


Figura III - Esquema sumarizado da ativação do PPAR. AR - ácido retinóico; PPAR - receptor ativado da proliferação peroxissomal; RXR - receptor X retinóide; PPRE - elementos responsivos da proliferação peroxissomal; Adaptado de Schoonjans *et al.*, (1996)

Quando esses elementos de ativação se ligam a um receptor do PPAR- α , situado no gene que regula o metabolismo do HDL-colesterol, ocorre aumento da transcrição dos genes da apo A-I (apoproteína A-I), apo A-II (apoproteína A-II), LPL (lipoproteína lipase) e SR-B1 (*receptores scavenger B1*), além de aumento da produção, maturação e catabolismo do HDL-colesterol. A estimulação do SR-B1 favorece ainda a saída de colesterol dos macrófagos (Tontonoz & Nagy, 1999). Ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados e seus derivados eicosanóides também são ativadores naturais dessa subclasse de receptores.

Dados pré-clínicos sugerem que o PPAR α tem papel no controle de peso corporal, apoiando o uso de agonistas de PPAR α no tratamento da obesidade (Fu *et al.*, 2003). Camundongos deficientes de PPAR α exibem uma resposta prejudicada ao estímulo inflamatório (Devchand *et al.*, 1996). Várias triagens clínicas demonstram a eficiência dos fibratos na diminuição de marcadores inflamatórios e reduzindo a progressão das lesões ateroscleróticas das coronárias. A habilidade do PPAR α de melhorar os sintomas da síndrome metabólica (obesidade visceral, resistência à insulina, dislipidemia, aterosclerose e inflamação) sugere que os PPAR α podem ser benéficos na prevenção ou tratamento do diabetes mellitus tipo 2 e complicações associadas.

Triagens clínicas bem como dados *in vitro* fornecem evidências convincentes que os PPAR α atuam como fatores antiaterogênicos por meio de interferências em múltiplos estágios do processo da aterosclerose. Resultados de modelos animais têm rendido

resultados conflitantes, os quais podem ser devido às diferenças naturais em modelos, e espécies diferentes encontradas em metabolismos de roedores e humanos (Tordjman *et al.*, 2001), (Duez *et al.*, 2002) e (Li *et al.*, 2004). Na ausência de estímulo inflamatório, PPAR α podem promover resposta pró-aterogênica. A expressão no nível de proteínas quimiotáticas de monócitos 1 (MCP-1) e interleucina 8 (IL-8) em células endoteliais sofrem *upregulation* pela ativação do PPAR α (Lee *et al.*, 2000). Além disso ligantes de PPAR α exercem efeito gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) em macrófagos não ativados (Teissier *et al.*, 2004). Além disso fibratos aumentam Cu-Zn superóxido dismutase e aumentam NADPH oxidase em células endoteliais, aumentando potencialmente a oxidação das LDL (Inoue *et al.*, 2001). PPAR α tem papel crítico no controle do ciclo do colesterol em macrófagos. A expressão de ABCA1 é estimulada pelo PPAR α em células espumosas no receptor X hepático de maneira dependente, promovendo o efluxo do colesterol mediado pela Apo A1. SR-B1, o qual tem papel em ambos, captação de HDL-CE pelo fígado e efluxo de colesterol pelos macrófagos, sofrem *upregulation* pelos ligantes de PPAR α em macrófagos (Chinetti *et al.*, 2000) favorecendo a remoção do colesterol.

3- Objetivos

3.1- Objetivo geral

Avaliar o efeito do bezafibrato e ferro sobre o perfil sérico de lipídios, defesas antioxidantes e atividades das aminotransferases em hamsteres hipercolesterolêmicos.

3.2 – Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da dieta hipercolesterolemia sobre a atividade das aminotransferases e concentração de metabólitos séricos, peso corporal e de órgãos em hamsteres.

2. Nos animais submetidos ao tratamento com bezafibrato, ferro dextran ou ambos, avaliar:

- Os níveis de ferro no soro e fígado;
- O perfil de lipídios no soro;
- Defesas antioxidantes: atividade da catalase, paraoxonase e concentração de sulfidrilas;
- A função hepática pela determinação das atividades das aminotransferases e outros metabólitos séricos.

4. Materiais de Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 45 hamsteres, *Golden Syrian*, albinos, machos, com cerca de 60 dias e 100g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Durante o experimento, os animais foram mantidos de acordo com as normas descritas em Canadian Council on Animal Care (1984)

4.2 Dietas

Segundo as recomendações AOAC, 1980, foi preparada a dieta controle. A quantidade de óleo de soja, colesterol e fibra da dieta hipercolesterolemiantes foram diferentes da dieta controle. As dietas foram isocalóricas, para isso, uma maior quantidade de fibras foi adicionada na dieta hipercolesterolemiantes. As dietas foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto e foram acondicionadas em vasilhas plásticas e armazenadas a 20°C negativos. O excesso de ferro foi obtido com injeções de ferro dextran. As dietas, durante o experimento foram oferecidas *ad libitum*.

Quadro 1: Composição das dietas controle e hipercolesterolemiantes em gramas para cada 1000g de dieta

	Controle	Hiper	Hiper +Bezafibrato
Caseína	120	120	120
Mistura de sais ^a	50	50	50
Mistura de Vitaminas ^b	10	10	10
Óleo de soja	80	170	170
Colesterol	-	5	5
Colina	0,4	0,4	0,4
Celulose	10	120	120
Amido	729,6	524,6	524,1
Bezafibrato	-	-	5
Calorias	4.118,4	4.153,4	4.151,4

^a Mistura de Sais (expresso por g/Kg da mistura): NaCl – 139,3/ MgSO₄.7H₂O – 57,3/ CaCO₃ – 381,4/ MnSO₄.H₂O/ - 4,01/ FeSO₄.7H₂O – 27,0/ ZnSO₄.7H₂O – 0,548/ CuSO₄.5H₂O – 0,477/ CoCl₂.6H₂O – 0,023/ KH₂PO₄. – 389,0. Mistura de Vitaminas (expresso em g/Kg da mistura): acetato de retinol – 2.000.000 UI/ colecalciferol – 200.000 UI/ ácido *p*-amino benzóico – 10,00/ I- inositol – 10,00/ niacina – 4,00/ pantotenato de cálcio – 4,00/ riboflavina – 0,80/ tiamina HCl – 0,50/ piridoxina HCl – 0,50/ ácido fólico – 0,20/ biotina – 0,40/ vitamina B₁₂ – 0,003/ α - tocoferol – 10.000 UI sacarose qsp – 1000.

4.3 - Delineamento Experimental

45 Hamsteres *Golden Syrian* machos, foram divididos em cinco grupos com nove animais cada de acordo com a dieta recebida, bezafibrato e injeções de ferro dextran intraperitoniais: grupo C recebeu dieta controle; grupo H recebeu dieta hipercolesterolemiantes; grupo HFE recebeu dieta hipercolesterolemiantes e injeções de ferro dextran (25 mg via intraperitoneal divididas em cinco doses); grupo HFI recebeu dieta hipercolesterolemiantes mais bezafibrato na dieta (0,5%); grupo HFEFI recebeu dieta hipercolesterolemiantes mais ferro dextran e bezafibrato na dieta. As injeções de ferro dextran foram administradas diariamente a partir do 28º dia de experimento, em 5 doses de 5mg, totalizando 25mg de ferro. Nos grupos que não receberam ferro, foram administradas injeções de salina. Os animais dos grupos HFI e HFEFI receberam o bezafibrato a partir do 42º dia de experimento. Após 60 dias de experimento os animais foram anestesiados e sacrificados, os parâmetros bioquímicos e stress oxidativo foram determinados. Os animais do grupo C, foram utilizados para certificar o efeito da dieta hipercolesterolemiantes, garantindo assim que a hipercolesterolemia estivesse presente nos hamsteres

4.4 - Dosagem de Parâmetros Séricos

Depois de 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com éter, o sangue foi coletado através de plexo axilar e centrifugado por 15 minutos a 3000g. Após a centrifugação o soro foi removido e diversas dosagens foram feitas em até 3 dias. As dosagens de ferro sérico, capacidade de ligação de ferro, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol HDL, proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose e uréia foram feitas utilizando-se kits comerciais da Labtest, MS10009010021, Lagoa Santa, MG, Brasil, seguindo seus respectivos protocolos. As atividades de paraoxonase (arilesterase), paraoxonase (paraoxon) foram determinadas como descrito por Beltowski *et al.*, em 2002 e a atividade da catalase foi determinada seguindo protocolos descritos por Beutler *et al.*, (1975) e as concentrações de sulfidrilas livres e sulfidrilas totais foram feitas seguindo a técnica utilizada por Sedlak *et al.* (1968).

O fígado, coração e os rins foram retirados e pesados.

4.4.1 - Colesterol total

O colesterol total foi dosado pelo método enzimático – trinder.

Os ésteres de colesterol são hidrolisados, pela colesterol esterase, a colesterol livre e ácido graxo. A colesterol oxidase promove a oxidação de colesterol livre para a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. O fenol e a 4 aminoantipirina, contidos no reagente, na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio formam a antipirilquinoneimina, que tem absorvância máxima em 500nm. Além do reagente de cor, o Kit fornece tampão e padrão de colesterol com concentração de 200mg/dL.

4.4.2 - Colesterol HDL

O colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL) é determinado após centrifugação no sobrenadante de uma reação onde as lipoproteínas de densidade muito baixas (VLDL) e as lipoproteínas de densidade baixa (LDL) são precipitadas com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, que estão contidos no precipitante do Kit. Posteriormente o colesterol HDL é dosado como no método para colesterol total.

Foram misturados 125 μ L de soro a 125 μ L de precipitante e misturado por 30 segundos vigorosamente, depois foi centrifugado por 15 minutos a 3000 g para se obter o sobrenadante límpido. O sobrenadante foi utilizado para se dosar o colesterol como no método para colesterol total. O padrão fornecido pelo Kit tinha concentração de 20mg/dL.

4.4.3 - Colesterol não HDL

Foi calculado subtraindo o colesterol HDL do colesterol total.

4.4.4 - Triacilgliceróis

Por meio da lipase lipoprotéica, o glicerol é liberado dos triacilgliceróis e convertido em glicerol - 3- fosfato pela gliceroquinase. O glicerol - 3- fosfato na presença da glicerolfosfato oxidase é oxidado a diidroxicetona e peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio sofre uma reação de acoplamento com a 4-aminoantipirina e 4-clorofenol catalisada pela peroxidase, produzindo a

antipirilquinoneimina que tem máximo de absorvância em 500nm. Um padrão de glicerol correspondente a 200mg/dL de triacilgliceróis foi fornecido.

4.4.5 - Ferro Sérico

Em pH ácido os íons férricos são dissociados da transferrina e reduzidos a íons ferrosos por ação da hidroxilamina. A intensidade da cor magenta brilhante formada após a adição de Ferrozine tem absorvância máxima em 560 nm e é proporcional à quantidade de ferro na amostra. Um padrão de ferro correspondente a 500µg/dL foi fornecido.

4.4.6 - Capacidade de ligação de ferro

Uma alíquota de ferro com concentração conhecida (500µg/dL) foi incubada com o soro em um tampão de pH 8,3. Ocorre então a saturação dos sítios disponíveis para o ferro na proteína transportadora (transferrina). O ferro livre forma um complexo magenta brilhante com a adição de Ferrozine. Através dos cálculos, encontra-se a capacidade latente de ligação de ferro (CLLF), que são os sítios disponíveis para ligação de ferro na transferrina. O procedimento adotado foi o seguinte: 500 µL de tampão foram adicionados aos tubos de teste e branco, 170 µL de padrão foram adicionados aos tubos de teste e padrão, foram adicionados 340 µL de água destilada no branco, 120 µL nos tubos de teste e 1670µL no tubo padrão e 50µL de soro nos tubos de amostra . Foram misturados e incubados à 37 °C em banho-maria por 10 minutos. O aparelho foi zerado com o branco e a 560 nm foi obtida a absorvância A1. Logo após foram adicionados 20 µL de ferrozine. Foram misturados e incubados a 37 °C em banho-maria por 10 minutos. E determinadas as absorvâncias (A2) do teste e do padrão a 560 nm. Para se calcular a capacidade latente de ligação do ferro foi adotada a seguinte fórmula:

$$CLLF = 500 - [(A2-A1) \times 500.] / \text{Abs. Padrão}$$

Após calcula-se a capacidade de ligação total de ferro (CTLF), a insaturação de transferrina (IST%) e transferrina.

$$CTLF = \text{Ferro sérico} + CLLF$$

$$\text{IST\%} = \frac{\text{Ferro sérico} \times 100}{\text{CTLF}}$$

$$\text{Transferrina} = \text{CTLF} \times 0,70$$

4.4.7 - Proteínas Totais

As proteínas do soro reagem com o reagente biureto, os íons de cobre contidos nele reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas, assim a quantidade de proteínas da amostra é proporcional à cor formada, a qual tem absorvância máxima em 545 nm. O Kit fornece um padrão com concentração 4,0 g/dL.

4.4.8 - Aspartato aminotransferase (AST)

Sua atividade é determinada pelo método cinético de tempo fixo e medição de ponto final – Reitman e Frankel. Ela promove a transferência de grupamentos amina de alfa aminoácidos para acetoácidos, que são contidos no substrato fornecido pelo Kit.



O oxalacetato reage com a 2,4 difenilhidrazina contida no reagente de cor e produz hidrazona que possui cor intensa em meio alcalino, que é conseguido quando adiciona-se o NaOH. A solução tem absorvância máxima em 505 nm.

O kit também contém um padrão com concentração de 2mmol/L , com o qual foi construída uma curva para obtenção das atividades enzimáticas.

A curva de calibração foi realizada seguindo a metodologia do fabricante Labtest.

4.4.9 - Alanina aminotransferase (ALT)

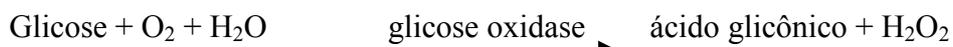
Semelhante ao procedimento seguido em AST (descrito anteriormente), há somente a mudança no substrato, onde o aspartato é substituído pela alanina e segue-se a seguinte reação.



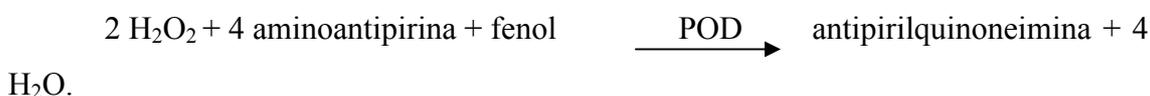
O piruvato formado reage com a 2,4 difenilhidrazina, contida no reagente, produzindo a hidrazona. Com a adição de hidróxido de sódio obtém coloração máxima, medida em 505 nm. O Kit também fornece um padrão possui concentração de 2mmol/L.

4.4.10 - Glicose

Usa-se um método cinético ou de ponto final – trinder.



A glicose é oxidada pela glicose oxidase (GOD) formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Este reage com 4- aminoantipirina e fenol e pela ação da peroxidase (POD) produz, através de uma reação oxidativa de acoplamento, a antipirilquinoneimina vermelha cuja cor, medida em 505 nm, é proporcional à concentração de glicose na amostra. O Kit também fornece um padrão com concentração de 100mg/dL.



4.4.11 - Albumina

O procedimento utiliza o método de ponto final Verde de Bromocresol.

A albumina tem a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions e moléculas complexas de corante. Esse sistema baseia-se no desvio do pico de absorvidade máxima do verde de bromocresol, contido no reagente de cor, quando se liga à albumina. A cor formada é proporcional à concentração de albumina na amostra e é medida em 630 nm. O kit fornece um padrão de 3,8g/dL.

4.4.12 - Uréia

A uréia é hidrolisada pela urease, fornecida no Kit, a íons amônio e CO₂. Os íons amônio reagem, em pH alcalino, com salicilato e hipoclorito de sódio sob a ação

catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol, a intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra e tem absorvidade máxima em 600 nm.

4.4.13 - Determinação de radicais sulfidrilas

A concentração de grupos sulfidrilas (SH), os grupos sulfidrilas ligados a proteína e os grupos sulfidrilas ligados a compostos de baixo peso molecular e chamados de sulfidrilas livres, foram determinados usando ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzoico) - DTNB (reagente de Ellman) segundo Sedlak *et al* , (1968). Os grupos tióis reagem com o DTNB formando um composto que tem absorvância máxima em 412nm. Para se determinar a concentração dos grupos sulfidrilas livres, as proteínas são precipitadas usando ácido tricloroacético (TCA) 10% p/v, e é usado o sobrenadante para a dosagem.

Para se determinar o SH total foram misturados 40 µL de soro, 150 µL de Tris.HCl 30mM pH 8,2, 50 µL de DTNB (Sigma) e 800 µL de metanol. Centrifugou-se a 3000g por 5 minutos e foi feita a leitura em 412 nm no espectrofotômetro Fenton 600.

Para se determinar o SH livre foram utilizados 200 µL de amostra, 200 µL de ácido tricloroacético (TCA), centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm, Após esse procedimento foram colocados 150 µL do sobrenadante em um tubo de ensaio, adicionou-se 600 µL de TrisHCl pH 8,9, 60 µL de DTNB, e foi feita a leitura a 412 nm no espectrofotômetro.

Foi feita uma curva padrão para o SH livre e para o SH total usando glutationa estoque (20mM) que foi diluída em Trietanolamina-HCl (TEA), preparada com 1,33 mL de TEA em 500 mL de água destilada. Para se obter a quantidade de SH ligado às proteínas foi subtraída o SH total do SH livre. As concentrações são obtidas em µmol/L.

4.4.14 - Paraoxonase – atividade arilesterase

A atividade arilesterase da paraoxonase foi determinada como previamente descrito por Beltowski J *et al*, (2002), tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato.

Para o procedimento do teste, foi preparada uma solução contendo 1µL de fenilacetato e 1500 µL de Tris HCl 9mM pH 8, dessa solução foi retirado 0,5mL e

misturados com 2mL de Tris HCl 9mM pH 8, contendo CaCl₂ 0,9mM. Foram colocados 5 µL de soro e a absorvância foi monitorada a 270nm e obtida em 3 minutos exatamente. O branco foi feito como descrito acima, porém sem amostra e foi subtraído das absorvâncias obtidas. Foi usado o coeficiente de extinção molar, do fenilacetato, 1.310 (M⁻¹ cm⁻¹) e os resultados foram expressos em U/mL, onde uma U hidrolisa 1 µmol de fenilacetato por minuto.

$$C = A/\varepsilon$$

C = Concentração

A = Absorvância

ε = Coeficiente de extinção molar

4.4.15 - Paraoxonase - atividade paraoxonase

A atividade paraoxon da paraoxonase foi determinada como previamente descrito por Beltowski J *et al*, (2002), tendo como base a velocidade de hidrólise do paraoxon.

Inicialmente preparou-se uma solução contendo: 4,8mL de tampão glicina/NaOH pH 10,6, CaCl₂ 0,9 mM, 1,06 mL de paraoxon. Para cada amostra utilizou-se 780 µL dessa solução e adicionou-se 20 µL de plasma heparinizado, homogeneizou-se a solução, colocou-se no espectrofotômetro em 412 nm e fez-se três leituras, a cada minuto, obtendo-se a liberação do para-nitrofenol por minuto. O branco foi feito como descrito acima, porém sem amostra e foi subtraído das absorvâncias obtidas. Foi usado o coeficiente de extinção molar do paraoxon, 18290 M⁻¹ · cm⁻¹. Os resultados foram expressos em U/mL; 1 U da enzima hidrolisa 1 µmol de paraoxon por minuto.

4.4.16 - Catalase

A atividade da catalase foi determinada baseado na sua capacidade de hidrolisar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular.

Em um tubo de ensaio colocou-se 900 µL de H₂O₂ 10 mM, 50 µL de tampão fosfato pH 7,2, 40 µL de H₂O destilada e 10 µL do soro. Homogeneizou-se a solução, zerou-se o espectrofotômetro a 240 nm e determinou-se as absorvâncias a cada minuto,

durante cinco minutos. Foi usado o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 , $39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em μkat ; 1 μkat da enzima hidrolisa 1 mol de H_2O_2 por minuto.

4.4.17 - Digestão e dosagem de ferro no fígado

Usando o método de orto-fenantrolina, de acordo com a AOAC (1980), foi dosado o ferro nos tecidos.

Cerca de 100mg de tecido foram colocados em tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL de ácido nítrico concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados no digestor Kieldahl a 110°C de modo que ocorresse a digestão dos tecidos e a evaporação total do ácido. Posteriormente o resíduo foi ressuscitado com 2 mL de ácido clorídrico concentrado, esse material foi transferido para um balão volumétrico, com capacidade para 10 mL e o volume foi completado com água deionizada.

A 0,5 mL da solução obtida foram adicionados 200 μL de solução de hidroxilamina 10%, 4,1 mL de tampão acetato 4M pH 3,5 e 200 μL de orto-fenantrolina 0,1%. Foi feito um branco para leitura no espectrofotômetro contendo 0,5 mL de água deionizada, 200 μL de hidroxilamina, 4,1 mL de tampão acetato pH 3,5 e 200 μL de orto-fenantrolina. A leitura foi feita a 510 nm. Os valores obtidos em unidades convencionais ($\mu\text{g}/\text{dL}$) foram transformados em unidades internacionais ($\mu\text{mol}/\text{L}$), pela multiplicação por 0,179.

4.5- Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média \pm desvio padrão. Para a comparação entre os grupos controle e hiper, foi utilizado o teste *t* de *student* com nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Os resultados dos grupos H, HFE, HFI e HFEFI foram analisados pela ANOVA, análise univariada. Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi feito para se determinar as diferenças específicas entre as médias. A diferença de $p < 0,05$ foi considerada significativa.

5. Resultados

5. 1 Ensaio - 1. Efeito da dieta hipercolesterolemiantes (H) sobre enzimas, metabólitos séricos, pesos corporal e de órgãos em hamsteres alimentados com dietas controle e hipercolesterolemiantes

5.1.1 Capacidades Total e Latente de Ligação ao Ferro, Ferro Sérico e Índice de Saturação da Transferrina e ferro hepático.

Os hamsteres que receberam diferentes dietas sofreram modificações em vários parâmetros envolvidos no metabolismo do ferro (Tabela 1). Com relação à Capacidade Total de Ligação ao Ferro (CTLF), os animais que receberam a dieta hiper (grupo H) tiveram uma redução de cerca de 34%, quando comparados aos animais que receberam a dieta controle (grupo C). Já os níveis de ferro sérico foram maiores no grupo H, aumento de cerca de 31%. A Capacidade Latente de Ligação ao Ferro (CLLF) foi reduzida em torno de 44 % com a dieta hiper e o Índice de Saturação da Transferrina (IST) foi duas vezes maior nos animais do grupo H.

Tabela 1. Capacidade Total de Ligação ao Ferro (CTLF), Ferro Sérico, Capacidade Latente de Ligação ao Ferro (CLLF) e Índice de Saturação da Transferrina (IST), de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H)^{1,2}.

	Ferro µg/dL	CLLF µg/dL	CTLF µg/dL	IST (%)
C	169,41 ± 17,35 ^b	1006,86 ± 65,41 ^a	1182,18 ± 65,84 ^a	14,59 ± 1,34 ^b
H	208,04 ± 74,97 ^a	621,49 ± 193,84 ^b	829,53 ± 189,14 ^b	26,12 ± 11,52 ^a

1 . Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

A dieta hipercolesterolemiantes reduziu os estoques de ferro hepático (Figura 1) onde os animais que receberam a dieta controle tiveram 2,7 vezes mais ferro no fígado quando comparados com aqueles que receberam a dieta hiper.

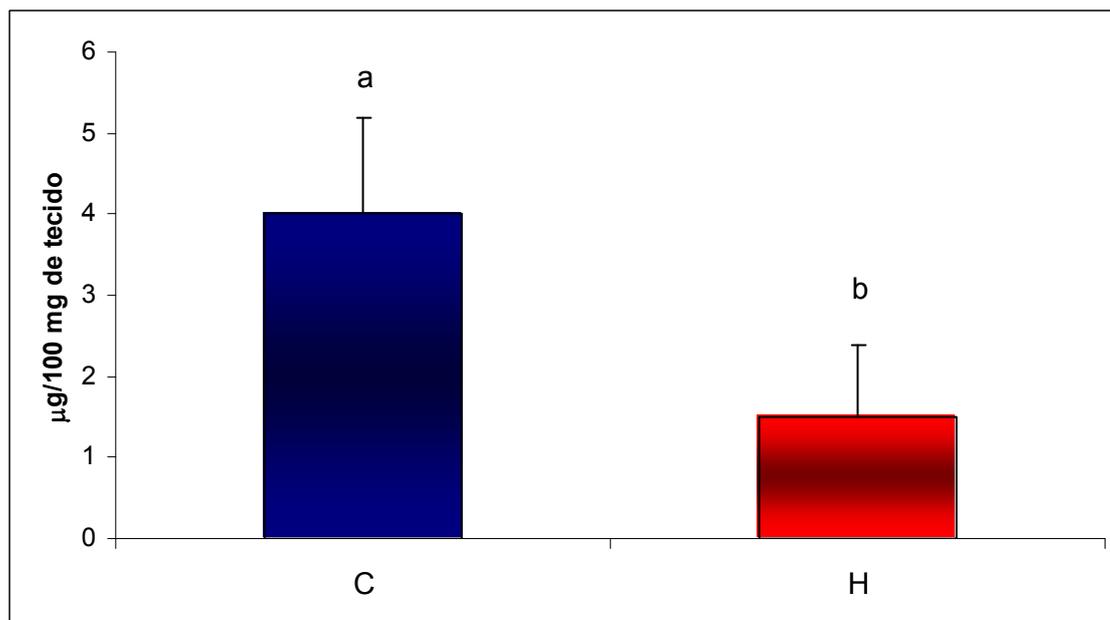


Figura 1. Ferro no fígado de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemia (H). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.1.2 - Perfil lipídico.

A dieta hipercolesterolemia provocou o aumento de cerca de 94% do colesterol total no nosso modelo animal (Tabela 2). Tanto a fração HDL-colesterol, quanto a não HDL-colesterol foram maiores nos grupos H, quando comparadas ao grupo C. Nos Triacilgliceróis, a dieta não influenciou significativamente os resultados.

Tabela 2. Concentração de Colesterol Total, Triacilgliceróis, Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e Colesterol não HDL em de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemia (H)^{1,2}.

	Triacilgliceróis (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Não HDL (mg/dL)
C	151,33 ± 55,55	132,7 ± 26,62 ^b	45,34 ± 23,45 ^b	87,36 ± 31,52 ^b
H	112,99 ± 20,93	257,06 ± 64,75 ^a	69,74 ± 7,89 ^a	187,32 ± 68,58 ^a

1. Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.1.3 - Defesas antioxidantes

Os hamsteres que receberam dietas controle (C) e hipercolesterolemiantes (H) não apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros PON (fenilacetato) e catalase (Tabela 3). Os hamsteres do grupo H apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na atividade da PON (paraoxon) em cerca de 36%.

Tabela 3. Atividade da Paraoxonase (PON-fenilacetato), Paraoxonase- (PON - Paraoxon), Catalase de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H)^{1,2}.

	PON fenilacetato (U/mL)	PON paraoxon (U/mL)	Catalase (U/mL)
C	934,29 ± 269,45	70,62 ± 11,38 ^a	19,87 ± 4,39
H	988,02 ± 110,32	45,46 ± 6,75 ^b	24,75 ± 5,27

1 . Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

Com relação às sulfidrilas totais, a dieta Hiper também teve efeito e nesse parâmetro, a redução causada pela dieta foi em torno de 27% (Tabela 4). O mesmo ocorreu para as sulfidrilas ligadas à fração protéica, onde a redução foi de 52%. Já para as sulfidrilas livres a dieta não teve efeito.

Tabela 4. Concentração de sulfidrilas totais, sulfidrilas livres e sulfidrilas ligadas à fração protéica em hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H)^{1,2}.

	Sulfidrilas Totais ($\mu\text{mol/L}$)	Sulfidrilas livres ($\mu\text{mol/L}$)	Sulfidrilas Fração Protéica($\mu\text{mol/L}$)
C	251,41 ± 57,51 ^a	50,55 ± 3,86	200,86 ± 55,9 ^a
H	183,11 ± 15,39 ^b	50,42 ± 3,66	132,13 ± 17,42 ^b

1 . Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.1.4 – Atividade das aminotransferases

A dieta hipercolesterolemiantes não alterou os valores da atividade da AST (aspartato aminotransferase) e da ALT (alanina aminotransferase) (Tabela 5).

Tabela 5. Atividades séricas das aminotransferases AST e ALT de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H)^{1,2}.

	AST (aspartato aminotransferase) U/L	ALT (alanina aminotransferase) U/L
C	19,65 ± 4,11	21,04 ± 5,05
H	17,27 ± 3,61	24,51 ± 4,75

1 . Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; n = 9; 2. não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

5.1.5 – Albumina, proteínas totais, glicose, bilirrubinas e uréia

A glicemia dos hamsteres do grupo H apresentou um aumento significativo (cerca de 29%) em relação ao grupo C (Tabela 6). Para os valores de Albumina, Proteínas Totais, Bilirrubinas, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 6. Concentração de Albumina, Proteínas Totais, Glicose, Bilirrubinas e Uréia de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H)^{1,2}.

	Albumina (g/L)	Proteínas Totais (g/L)	Bilirrubinas (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
C	23,9 ± 0,7	62,0 ± 3,0	0,22 ± 0,05	93,66 ± 14,09 ^b	44,91 ± 4,81
H	24,8 ± 1,9	61,3 ± 4,0	0,26 ± 0,12	120,66 ± 21,81 ^a	46,35 ± 4,8

1 . Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); n = 9.

5.1.6 – Pesos relativos dos órgãos e peso corporal

Na Tabela 7 estão apresentados os valores dos pesos relativos dos órgãos e peso corporal. Fígado e peso corporal não tiveram diferenças significativas ao fim do experimento. Os pesos relativos dos fígados foram cerca de 60% maiores nos animais que receberam a dieta hipercolesterolemiantes. O mesmo aconteceu para os pesos relativos dos rins, os hamsteres do grupo H apresentaram aumento de cerca de 7%.

Tabela 7. Pesos relativos do Fígado, Rins, Coração e valor do Peso Corporal de hamsteres alimentados com dieta controle (C) e hipercolesterolemiantes (H) ^{1,2}.

	Fígado (%p/p)	Rins (%p/p)	Coração (%p/p)	Peso Corporal (g)
C	3,00 ± 0,16 ^b	0,72 ± 0,03 ^b	0,35 ± 0,02	102,86 ± 5,12
H	4,79 ± 0,24 ^a	0,77 ± 0,05 ^a	0,34 ± 0,03	94,64 ± 9,71

1. Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.2 - Ensaio 2- Avaliação do efeito do bezafibrato no perfil lipídico, parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo em hamsteres hipercolesterolêmicos induzidos por dieta e excesso de ferro.

5.2.1 – Concentração de Ferro, Capacidade Latente de Ligação ao Ferro (CLLF), Capacidade Total de Ligação ao Ferro (CTLF), Índice de Saturação da Transferrina (%IST).

As injeções de ferro dextran tiveram efeito nos níveis de ferro sérico (Tabela 8), sendo que os grupos HFE e HFEFI tiveram maiores concentrações médias de ferro sérico e os menores níveis de ferro sérico foram encontrados nos grupos H e HFI. O ferro dextran influenciou na capacidade latente de ligação ao ferro (CLLF), onde as médias dos grupos HFE e HFEFI, foram cerca de 29% superiores aos grupos H e HFI, porém essa diferença não foi significativa. O ferro dextran também aumentou a capacidade total de ligação ao ferro (CTLF) em cerca 42% nos grupos HFE e HFEFI, quando comparados com os grupos H e HFI.

Tabela 8. Ferro sérico, Capacidade Latente de Ligação ao Ferro (CLLF) e Capacidade Total de Ligação ao Ferro (CTLF), em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI) ^{1,2}.

	Ferro sérico µg/dL	CLLF µg/dL	CTLF µg/dL
H	208,04 ± 74,97 ^b	621,49 ± 193,84	829,53 ± 189,14 ^b
HFE	485,77 ± 84,45 ^a	776,95 ± 184,7	1262,72 ± 149,54 ^a
HFI	281,98 ± 54,53 ^b	642,59 ± 249,92	924,57 ± 238,82 ^b
HFEFI	417,34 ± 76,12 ^a	852,12 ± 74,41	1269,46 ± 106,63 ^a

1 . Os resultados são indicados como a média \pm desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

Para o índice de saturação de transferrina (IST%) não houve efeito do ferro e nem do bezafibrato (Tabela 9). Os valores de transferrina dos animais que receberam ferro dextran foram maiores quando comparados aos que não receberam. No grupo HFE em relação ao grupo H, houve um aumento de 52% enquanto que os animais do grupo HFI e HFEFI o aumento foi de 37%.

Tabela 9. Transferrina sérica, Índice de Saturação da Transferrina (IST) e Ferro Hepático em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI)^{1,2}.

	Transferrina $\mu\text{g/dL}$	IST (%)
H	580,67 \pm 132,4 ^b	26,12 \pm 11,52
HFE	883,9 \pm 104,68 ^a	39,18 \pm 9,33
HFI	647,2 \pm 167,18 ^b	32,65 \pm 12,07
HFEFI	888,62 \pm 74,64 ^a	32,75 \pm 4,36

1 . Os resultados são indicados como a média \pm desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

Em relação ao ferro depositado no fígado (Figura 2), os animais dos grupos HFE e HFEFI apresentaram maiores valores que os grupos que não receberam o ferro, H e HFI, cerca de 13 e 12 vezes maiores, respectivamente.

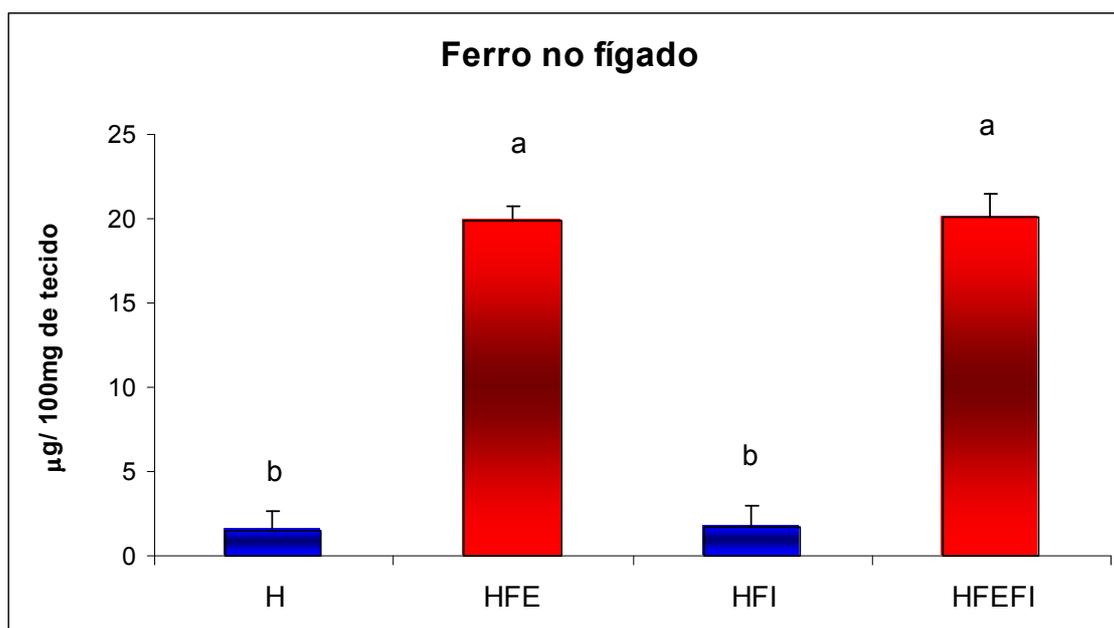


Figura 2. Ferro no fígado em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemia (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.2.2 – Defesas antioxidantes

5.2.2.1 - Atividade da Paraoxonase para fenilacetato

Na paraoxonase fenilacetato (Figura 3), os grupos H e HFE tiveram as maiores atividades enzimáticas que os grupos HFI e HFEFI, o bezafibrato reduziu em 33% na atividade. Além disso, o grupo que recebeu somente o bezafibrato, teve o menor valor de atividade da PON.

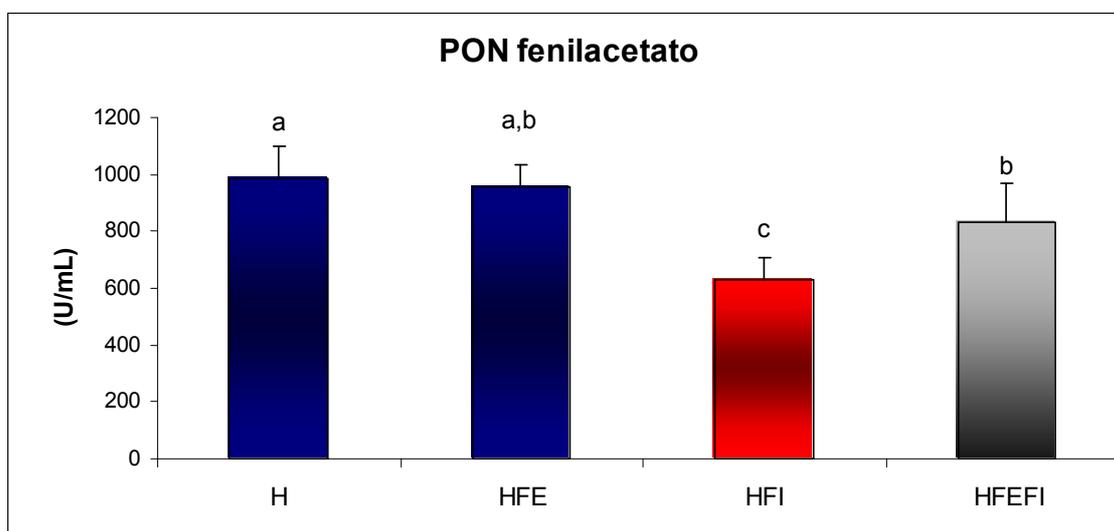


Figura 3. Atividade sérica da paraoxonase fenilacetato em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemia (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.2.2.2 - Atividade da Paraoxonase para paraoxon

Em relação às atividades da paraoxonase paraoxon (Figura 4), o grupo H teve as maiores atividades, seguido dos grupos HFE e HFEFI, sendo que as menores atividades foram encontradas no grupo que só recebeu bezafibrato na dieta, HFI.

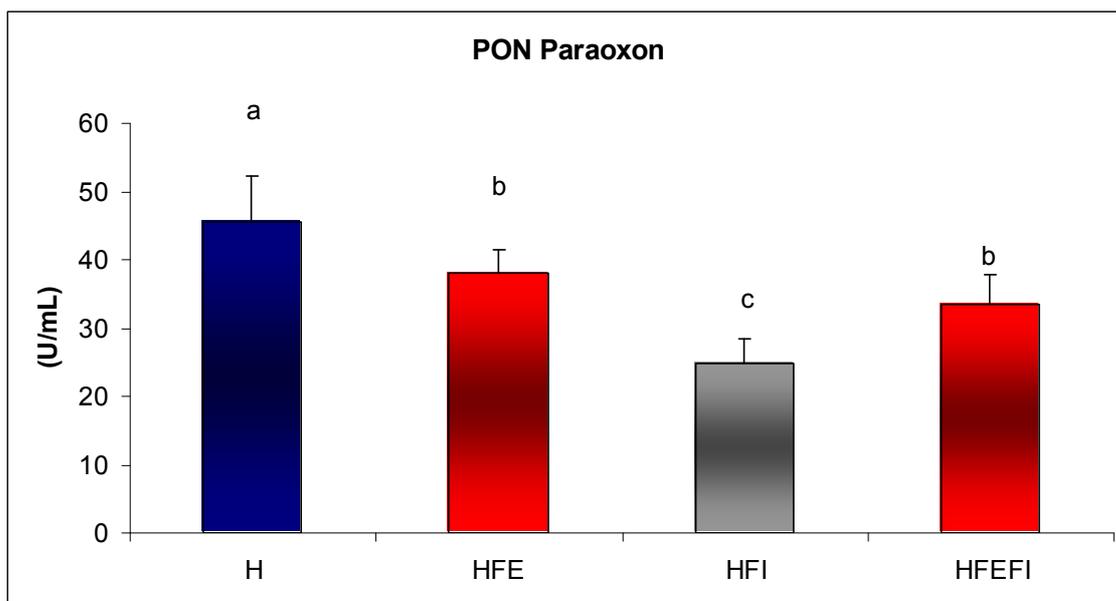


Figura 4. Atividade sérica da Paraoxonase paraoxon em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemia (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.2.2.3 - Atividade da Catalase

A atividade da Catalase foi maior no grupo H. O ferro provocou uma redução em cerca de 48% na atividade enzimática quando comparado com o grupo H. O bezafibrato reduziu a atividade da catalase em relação ao grupo H, embora em menor intensidade que o ferro (redução de cerca 30%). E juntos bezafibrato e ferro também reduziram a atividade catalase (Figura 5).

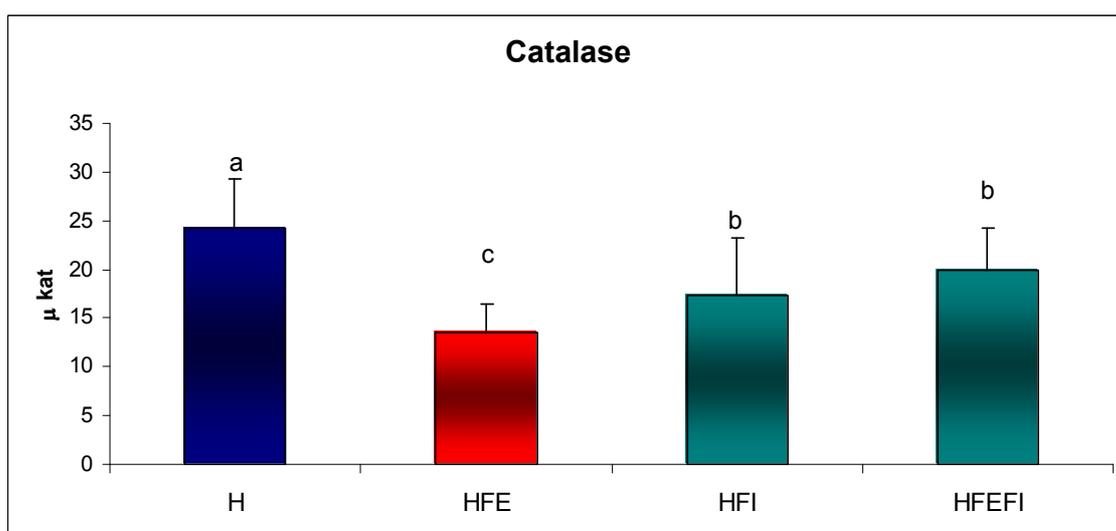


Figura 5. Atividade sérica da Catalase em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemia (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

Nenhum grupo apresentou diferença significativa nas dosagens das Sulfidrilas Totais e na Fração Protéica (Tabela 10). No entanto, os animais do grupo HFE apresentaram os maiores valores para as sulfidrilas livres e os hamsteres dos grupos H, HFI e HFEFI não tiveram diferenças significativas.

Tabela 10. Concentrações de Sulfidrilas Totais, Livres, e Protéica em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI)^{1,2}

	Sulfidrilas Totais ($\mu\text{mol/L}$)	Sulfidrilas livres ($\mu\text{mol/L}$)	Sulfidrilas Fração Protéica($\mu\text{mol/L}$)
H	183,11 \pm 15,39	51,14 \pm 4,06 ^b	132,13 \pm 17,42
HFE	196,81 \pm 25,7	58,31 \pm 7,2 ^a	144,56 \pm 31,67
HFI	196,81 \pm 20,72	45,21 \pm 5,1 ^b	153,11 \pm 20,24
HFEFI	194,84 \pm 17,06	50,68 \pm 4,34 ^b	144,16 \pm 15,64

1 . Os resultados são indicados como a média \pm desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

5.2.3 – Valores do perfil lipídico

Para os níveis de colesterol total, os animais do grupo H e HFI apresentaram os menores valores (Figura 6). Os hamsteres que receberam injeções de ferro dextran (HFE) apresentaram aumento significativo em cerca de 43% em relação ao grupo H. E também em relação ao grupo H, os hamsteres que receberam o ambos bezafibrato e ferro dextran isoladamente aumento de cerca de 22%. Ambos bezafibrato e ferro (HFEFI) reduziram parcialmente a hipercolesterolemia potencializada pelo ferro.

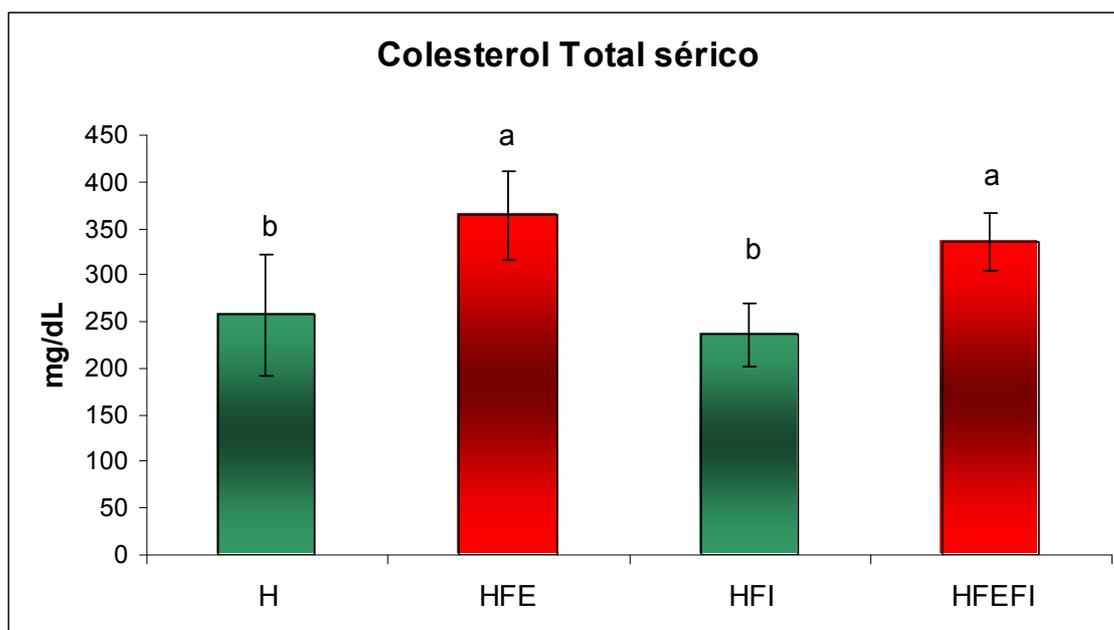


Figura 6. Concentração sérica do Colesterol Total em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemia (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

Os níveis de Triacilgliceróis não apresentaram valores significativamente diferentes entre os grupos estudados (Figura 7).

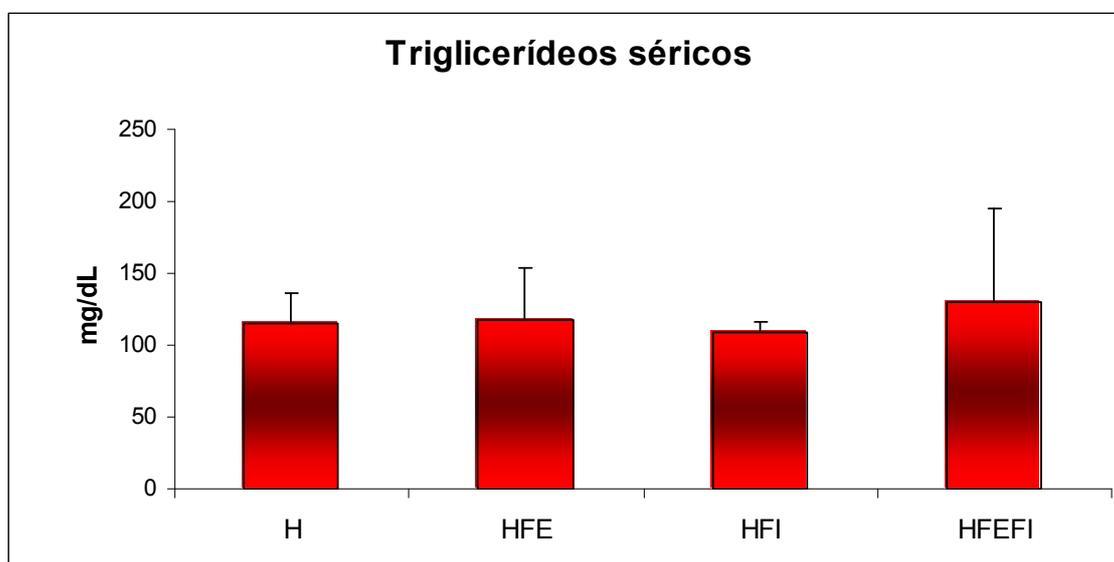


Figura 7. Concentração sérica Triacilgliceróis em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemia (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

Para a fração HDL- Colesterol (Figura 8), os animais grupo HFE apresentaram os maiores valores. Os demais grupos (H, HFI e HFEFI) não apresentaram diferenças significativas.

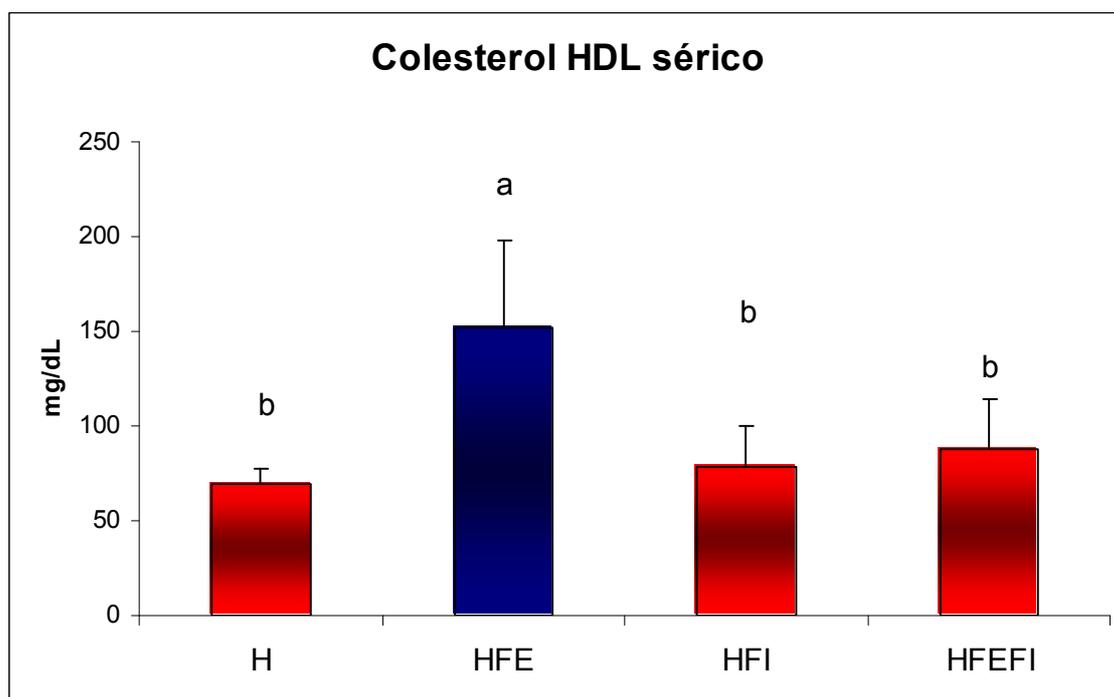


Figura 8. Concentração sérica da fração HDL-Colesterol em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); $n = 9$.

Os hamsteres do grupo HFI apresentaram os menores valores para o colesterol não HDL (figura 9), comparados ao grupo H, a redução foi de cerca de 15 %. Os hamsteres que receberam ambos, o bezafibrato e ferro (HFEFI) apresentaram os maiores valores de colesterol não HDL, cerca de 22%, quando comparados com o grupo H. E os animais que isoladamente receberam o ferro (HFE) também apresentaram aumento, cerca de 15%, em relação ao grupo H.

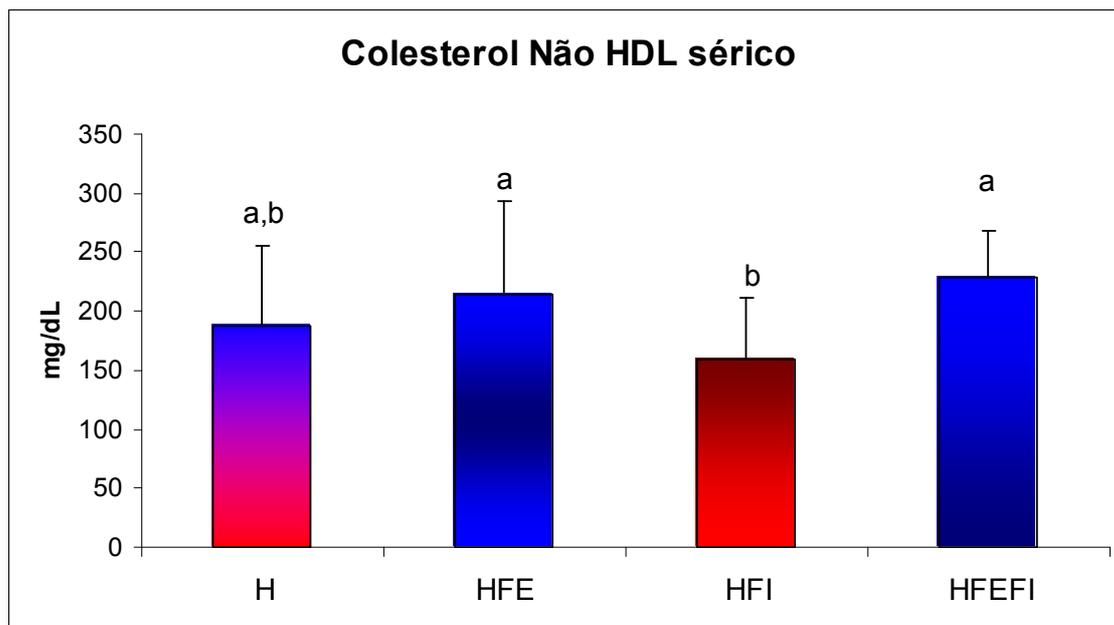


Figura 9. Concentração sérica da fração não HDL-Colesterol em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI); n = 9

5.2.4 – Atividades da Aspartato e Alanina Aminotransferase

A Figura 10 mostra as atividades séricas da aspartato aminotransferase. Os grupos H e HFE apresentaram as menores atividades, o grupo HFEFI apresentou valores intermediários. E as maiores atividades séricas foram encontradas no grupo HFI. Quando comparados com o grupo H, os animais do grupo HFI apresentaram atividades enzimáticas 7 vezes maiores.

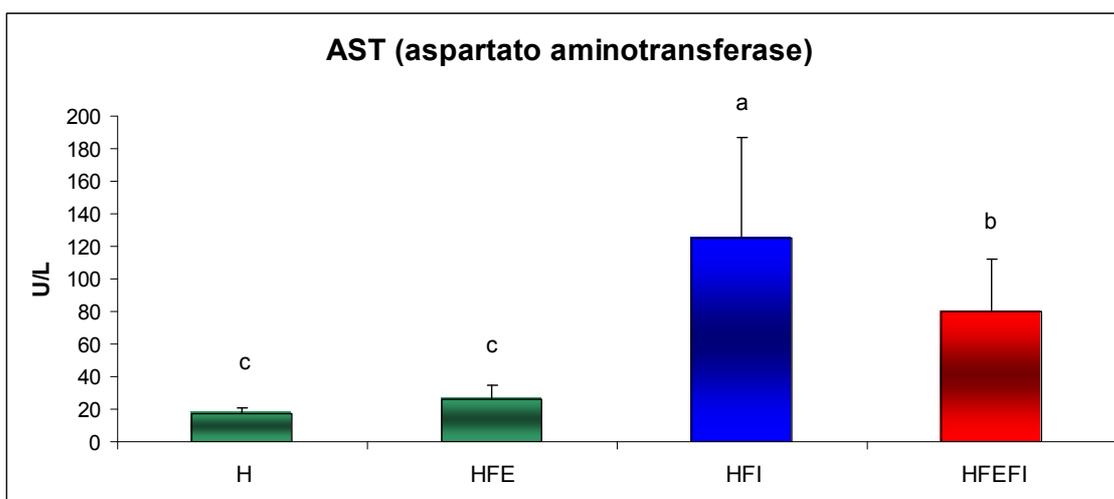


Figura 10. Atividades séricas da AST (aspartato aminotransferase) em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); n = 9

As atividades séricas da ALT (alanina aminotransferase) não sofreram influência nem do ferro nem do bezafibrato (Figura 11). Apesar dos hamsteres do grupo HFI terem apresentado os maiores valores de atividade, sem diferença significativa.

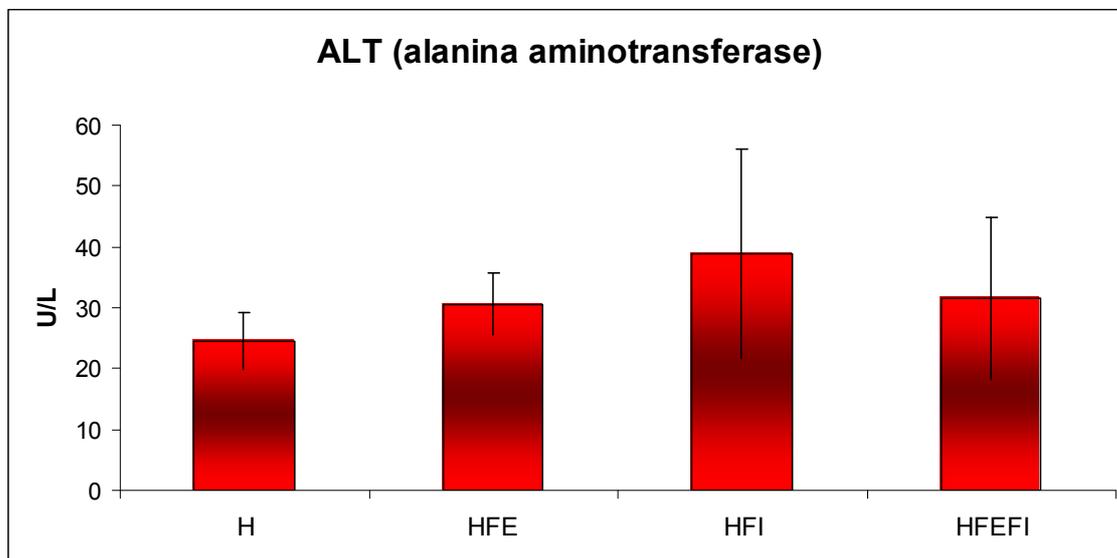


Figura 11. Atividades séricas da ALT (alanina aminotransferase) em hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes (H), tratados com ferro (HFE), com bezafibrato (HFI) ou ambos (HFEFI); n = 9

5.2.5 – Pesos relativos dos órgãos e peso corporal

O peso relativo do fígado dos animais que receberam ferro e bezafibrato (HFEFI) foram maiores, seguidos do grupo HFE e HFI, sendo que os menores pesos relativos apresentaram os hamsteres do grupo H (Tabela 11). Os hamsteres que receberam ferro (grupos HFE e HFEFI) tiveram os pesos relativos de seus fígados em 27%. Com relação ao peso relativo dos rins, os hamsteres que receberam o bezafibrato HFI e HFEFI foram maiores que os grupos que não receberam H e HFE, aumento de 32%. Não houve diferença significativa nos pesos dos corações dos animais estudados. Nem bezafibrato nem as injeções de ferro dextran influenciaram nos pesos corpóreos finais dos animais no final do experimento.

Tabela 11. Porcentagem dos pesos dos órgãos em relação ao peso final dos hamsteres alimentados com dieta hipercolesterolemiantes, com ou sem ferro dextran e bezafibrato. FE(ferro), FI (Bezafibrato) no final do experimento^{1,2}.

	Fígado (%p/p)	Rins (%p/p)	Coração (%p/p)	Peso Total (g)
H	4,79 ± 0,24 ^c	0,77 ± 0,05 ^b	0,33 ± 0,02	94,64 ± 9,71
HFE	6,39 ± 0,73 ^b	0,75 ± 0,09 ^b	0,33 ± 0,04	92,89 ± 9,02
HFI	5,81 ± 0,36 ^b	0,99 ± 0,07 ^a	0,36 ± 0,02	93,43 ± 13,12
HFEFI	7,06 ± 0,48 ^a	1,02 ± 0,05 ^a	0,37 ± 0,02	85,03 ± 7,08

1 . Os resultados são indicados como a média ± desvio padrão; 2 letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$); $n = 9$.

6- Discussão

6.1 FERRO

A associação sinérgica entre os aumentos da ferritina e LDL-colesterol séricos com o risco do infarto agudo do miocárdio sustenta a teoria de que o aumento do ferro pode aumentar o risco do infarto agudo do miocárdio através da promoção da oxidação do LDL colesterol. Acúmulo de LDL oxidadas leva ao desenvolvimento de células espumosas, resultando na formação de placas nas paredes arteriais. Por outro lado, tem-se questionado que em indivíduos saudáveis o ferro livre não foi realmente mensurado, pois o ferro pode estar ligado à transferrina ou estocado como ferritina (Meyers, 2000), assim o organismo estaria protegido contra seus efeitos deletérios. No entanto, o radical superóxido é capaz de liberar o ferro da ferritina (Biemond *et al.*, 1984). Essa liberação forma Fe^{+2} que inicia a formação de radicais livres do oxigênio, via reações de Haber-Weiss, e conseqüentemente leva à peroxidação de lipídios.

Ao lado do possível papel do ferro na oxidação de LDL, o ferro pode alterar a concentração de colesterol sérico e distribuição de suas frações o que também tem importância na determinação da aterogênese. Colesterol na fração LDL é considerado aterogênico, enquanto a fração HDL está associada a mecanismo de proteção contra lesões ateroscleróticas. A homeostase intracelular do metabolismo do colesterol é, portanto, importante para a prevenção de doenças cardiovasculares e diversos artigos mostram os efeitos benéficos dos inibidores de HMG-CoA redutase e fibratos sobre hipercolesterolemia e aterosclerose. O excesso de ferro pode afetar o metabolismo de colesterol e suas frações, uma vez que o fígado é o principal órgão tanto de armazenamento de ferro e como também um importante órgão na manutenção da homeostasia do colesterol e lipoproteínas plasmáticas. Indicação da relação entre ferro e metabolismo de colesterol foi feita pela observação que microssomos de células hepáticas submetidos à peroxidação catalisada por ferro-ascorbato apresentavam redução da atividade da HMG-CoA- redutase, ACAT e CYP7-alfa, três enzimas chaves na regulação do metabolismo do colesterol (Brunet *et al.*, 2000). Além disso, macrófagos humanos submetidos ao excesso de ferro apresentam expressão diminuída de PPAR- α , receptor nuclear, que tem importante papel no controle da expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídios (Marcil *et al.*, 2006)

Neste trabalho nós utilizamos hamsteres para avaliar o efeito do tratamento com ferro dextran e sua combinação com fibrato, um agonista da PPAR- α , sobre o perfil lipídico e defesas antioxidantes. Embora já se tenha avaliado o efeito de fibratos em hamsteres (Rizvi *et al.*, 2003 e Guo *et al.* 2002) e o efeito do excesso de ferro em outros modelos animais (Araújo *et al.*, 1995 e Dabbagh *et al.*, 1994), não há na literatura trabalhos que relacionem o efeito do ferro e fibrato em hamsteres.

A necessidade de um modelo experimental que se aproxime dos humanos é muito importante, uma vez que espécies diferentes podem se comportar de maneiras distintas frente ao transporte do colesterol. Várias espécies têm sido usadas como: macaco, cobaia, porco, rato, coelho e hamster (Scanu *et al.*, 1988). Dentre os roedores, o hamster apresenta algumas vantagens – como humanos, possui LDL como principal lipoproteína carreadora do colesterol (Spady & Dietschy, 1983). Nesses animais, há a presença da apoproteína (apo) B-48 de origem exclusivamente intestinal e a apo-B-100 de origem exclusivamente hepática, da mesma forma que em humanos, o que não é observado em ratos e camundongos (Arbeeny *et al.*, 1992) e também desenvolvem placas ateroscleróticas (Sima *et al.*, 2001). O hamster tem sido utilizado em nosso laboratório em experimentos com hipercolesterolemia, induzida por uma dieta contendo 0,5% de colesterol (Silva *et al.*, 2005), com uma resposta satisfatória. No presente trabalho, os animais do grupo hiper (H) desenvolveram a hipercolesterolemia, e como padrão de comparação, os animais do grupo controle (C) apresentaram aumento de 94%.

Para aumentar os estoques de ferro, em hamsteres, utilizamos injeções intraperitoniais de ferro dextran. Com isso tentamos evitar que os mecanismos indiretos de regulação dificultassem a absorção do nutriente dificultando o aumento dos estoques. Na literatura não há relatos sobre o metabolismo do ferro dextran em hamsteres. Em camundongos, o ferro ligado a esse polímero de glicose é rapidamente removido da circulação pelas células do sistema retículo endotelial. Existem dois períodos importantes que se seguem à administração do ferro: nas primeiras 6 horas o conteúdo de ferro sérico se encontra elevado, depois de 24 horas da injeção há diminuição do ferro no soro e aumento nas células do sistema retículo endotelial do fígado e baço; o ferro ligado ao dextran é processado pelas células do sistema retículo endotelial antes de ser liberado para o *pool* de transferrina, sendo distribuído aos demais tecidos (Holbein, 1980). No presente trabalho, os animais que receberam as injeções de ferro dextran,

grupos HFE e HFEFI, apresentaram níveis de ferro plasmático maiores do que aqueles que não receberam, grupos H e HFI, e o mesmo perfil foi observado para a capacidade total de ligação ao ferro (CTLF). O excesso de ferro fez com que o hamster aumentasse sua capacidade de transporte do metal na corrente sanguínea, uma vez que sua CTLF ficou aumentada nos grupos com excesso de ferro. Essa capacidade aumentada pode ser entendida pelo aumento da concentração da transferrina, o mais importante carreador de ferro na circulação. No hamster, entendemos que esse excesso de ferro circulante pode deixar o animal mais exposto ao excesso de ferro livre, e conseqüentemente levar à maior formação de ERO. Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) verificaram que ratos que receberam dieta hipercolesterolemiantes e ferro dextran apresentam concentração de ferro sérico semelhante aos ratos hipercolesterolêmicos, sugerindo que o rato parece eliminar o metal mais rapidamente da circulação, enquanto que em nosso modelo experimental, o ferro permanece na circulação por um período de tempo maior. Dessa forma, o hamster pode estar mais exposto à formação de radicais livres induzidos pelo ferro, enquanto o rato mais protegido. Assim o hamster pode ser um modelo mais sensível para se estudar as alterações provocadas pelo ferro, quando comparado ao rato.

Com relação à saturação da transferrina, não observamos diferenças estatísticas ao final do experimento, ainda que os animais do grupo H tenham apresentado menor valor de saturação e o grupo HFE ter o maior grau, as diferenças não foram significativas ($26,12 \pm 11,52$ e $39,18 \pm 9,33$ %, respectivamente). Normalmente, no plasma, a transferrina está saturada em média 30% com o ferro. Por meio de estudos cinéticos e por termodinâmica, sabe-se que a transferrina pode estar presente no plasma sob quatro formas: apotransferrina livre do ferro, transferrina diférrica totalmente saturada e transferrina monomérica contendo ferro ligado ao N- terminal ou C-terminal (Ponka *et al.*, 1998). Os hamsteres que receberam ferro tiveram os maiores valores de transferrina, o que pode proteger o organismo, desde que transferrina mais saturada poderia levar a uma liberação maior de ferro no plasma, favorecendo então a formação das espécies reativas de oxigênio. Em hamsteres, Silva *et al.* (2005) utilizando o ferro dextran na mesma dose utilizada neste trabalho, observaram aumento de ferro sérico de 2,3 vezes, resultado compatível ao deste trabalho, e no baço de 7,8 vezes. Os fígados dos animais de nosso experimento que receberam as injeções de ferro (HFE) tiveram valores 13 vezes superiores daqueles que não receberam (H), mostrando que esse órgão comporta-se como depósito desse metal, armazenando o ferro após o processamento do

ferro dextran nos macrófagos. Esse valor está abaixo do nível considerado tóxico (> 22 vezes de aumento) onde foi observada injúria hepática (Park *et al.*, 1987).

6.2 Lipídios

A hipercolesterolemia foi aumentada nos grupos de animais que receberam excesso de ferro, dados que corroboram com os dados obtidos por Silva *et al.* (2005). Por outro lado, em ratos, o excesso de ferro não potencializou a hipercolesterolemia induzida pela dieta, pelo contrário houve uma redução do colesterol total (Turbino-Ribeiro *et al.*, 2003), dados também encontrados por Dabbagh *et al.* (1994) em coelhos. Sustentamos então, que o ferro em espécies diferentes pode modificar o metabolismo do colesterol de maneiras distintas. Por outro lado não podemos descartar a hipótese que estas diferenças sejam derivadas dos diferentes níveis de ferro nos fígados nos diversos modelos animais. Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) encontraram para ratos hipercolesterolêmicos tratados com ferro dextran um aumento de cerca 5 vezes no conteúdo de ferro hepático, conteúdo portanto inferior ao obtido no presente trabalho.

De qualquer forma, isoladamente, o ferro potencializou a hipercolesterolemia induzida pela dieta. O excesso de ferro pode diminuir a atividade da enzima 7- α -hidroxilase (Brunet *et al.*, 2000). O ferro também leva à diminuição da atividade da acilcolesterol aciltransferase (ACAT) e da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase (Brunet *et al.*, 2000). A diminuição da atividade da ACAT está relacionada com o aumento do colesterol sérico, enquanto a inibição da HMG CoA redutase o contrário. Interessante mencionar que Brunet *et al.* (2000) observaram que mecanismos diferentes justificam as inibições das enzimas expostas ao excesso de ferro, uma vez que ao usarem o tocoferol como antioxidante, a inibição da ACAT era revertida, enquanto o mesmo não acontecia com a 7- α -hidroxilase, mostrando que a peroxidação lipídica era fundamental para a diminuição da atividade enzimática da ACAT, mas o mesmo não acontecia com a 7- α -hidroxilase e uma possibilidade sugerida pelos autores foi que nesta última haveria uma ligação direta do ferro à enzima, inativando-a. Nesse sentido, podemos supor que o efeito predominante que justifica o aumento de colesterol, seja a inibição da ACAT e 7- α -hidroxilase e em menor intensidade a inibição da HMG-CoA redutase, desde que, quando há excesso de colesterol na dieta espera-se uma redução da atividade da HMG-CoA-redutase, assim

uma diminuição da esterificação do colesterol pela ACAT e uma diminuição da formação de sais biliares pela redução da 7- α -hidroxilase levaria ao aumento da concentração de colesterol intracelular levando ao aumento da concentração do colesterol circulante.

Os animais que receberam o bezafibrato apresentaram valores menores no colesterol total (cerca de 9%). Guo *et al.* (2001) observaram que a administração de fenofibrato em hamsteres levou à redução da concentração de colesterol e redução das atividades das enzimas HMG-CoA redutase e HMG-CoA-sintase. Por outro lado, com relação ao bezafibrato, Cheema *et al.*, (2000) demonstraram que agonistas PPAR- α diminuem a atividade da enzima chave na síntese dos ácidos biliares, 7- α -hidroxilase.

A síntese dos ácidos biliares é a principal rota de excreção do colesterol, porém ao sintetizar menos ácidos biliares, a quantidade de colesterol absorvida da dieta pode ser prejudicada, como no modelo utilizado no presente estudo, onde a hipercolesterolemia foi induzida pela adição de colesterol à dieta. Esse fato pode explicar, até certo ponto, a discreta redução do colesterol induzida pelo bezafibrato no presente trabalho.

No grupo HFEFI, o efeito do ferro parece ter predominado sobre o bezafibrato, embora os valores do grupo HFEFI fossem menores que os hamsteres do grupo HFE. Esses resultados sugerem que as inibições da ACAT e 7- α -hidroxilase devem ter sido mais importantes levando ao aumento do colesterol. Contudo, os dados também sugerem algum efeito do bezafibrato sobre a concentração do colesterol quando associado ao ferro. Marcil *et al.*, (2006) utilizando macrófagos humanos observaram que o excesso de ferro pode diminuir a expressão para o mRNA de PPAR- α o que pode explicar também o aumento do colesterol. Na presença de um agonista de PPAR- α este efeito seria atenuado, explicando dessa forma porque o bezafibrato conseguiu reverter parcialmente a hipercolesterolemia induzida pelo ferro.

Em nosso modelo, os hamsteres que receberam o ferro dextran, (HFE) apresentaram aumento na concentração do HDL colesterol em 2,2 vezes em relação ao grupo H. Os animais que receberam somente o bezafibrato (HFI) apresentaram valores comparados com o grupo H. Porém, ambos bezafibrato e excesso de ferro apresentaram valores comparáveis com o grupo H e não com o grupo HFE. Quando consideramos os efeitos do excesso de ferro sobre os níveis de HDL, há consenso na literatura de que o excesso de ferro aumenta HDL colesterol, como foi observado por Dabbagh *et al.*,

(1994) , Brunet *et al.*, (2000), Turbino-Ribeiro *et al.*, (2003) e Silva *et al.* (2005). O perfil do colesterol neste trabalho mostrou que o ferro dextran aumentou o colesterol total em 42% e a fração HDL em 217%, bezafibrato reduziu o colesterol total em cerca de 9%, portanto as alterações nas concentrações de HDL observadas neste trabalho não refletem as alterações do colesterol total. Apesar de não observarmos efeito do bezafibrato isoladamente, a redução da fração colesterol-HDL no grupo HFEFI sugere que o ferro pode interferir no metabolismo de HDL e este efeito pode ser revertido diretamente ou indiretamente, via PPAR. Agonistas de PPAR- α impactam a concentração de HDL-C de várias maneiras - eles aumentam a síntese de Apo AI e Apo AII, principais apoproteínas da partícula da lipoproteína de alta densidade (HDL) (Staels *et al.*, 1998) e (Fruchart, 2001) e também aumentam a expressão para o gene que codifica o transportador ABCA1 (ATP- binding cassette transporter A1) (Chinetti *et al.*, 2001). Todos esses efeitos contribuem para a elevação da concentração de HDL. A ativação de PPAR- α por fibrato aumenta a síntese de SR-BI. Isto aumenta a captação hepática de ésteres de colesterol de HDL e portanto tende a reduzir o nível de HDL. A influência de fibratos sobre HDL -C é, portanto, o efeito líquido de vários fatores. Assim é provável que o ferro comprometa a expressão e ou a função de SR-BI contribuindo para um aumento da fração HDL, efeito este revertido pelo bezafibrato.

Agonistas PPAR α têm seu grande emprego na hipertrigliceridemia, pois aumentam a expressão da lipoproteína lipase (LPL) e reduzem a expressão do gene que codifica a Apoproteína CIII (Apo CIII), a qual inibe a LPL (Staels *et al.*, 1998). Porém, nosso modelo não desenvolveu a hipertrigliceridemia, portanto não ocorrendo diferenças estatísticas entre os quatro grupos (H, HFE, HFI e HFEFI). Além disso, Guo *et al.* (2001) observaram redução de lipídios séricos pela administração de fenofibrato, de forma dose-dependente, assim pode ser que a dose de bezafibrato no presente estudo não tenha sido suficiente para que seus efeitos fossem observados isoladamente, mas quando associado ao ferro.

Em relação ao colesterol não HDL (onde a fração predominante relaciona-se ao LDL), os animais do grupo HFI apresentaram os menores valores médios. Podemos notar o efeito do bezafibrato, provavelmente nas inibições da HMG-CoA redutase e 7- α -hidroxilase. Os hamsteres do grupo HFEFI não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo HFE sugerindo que o aumento do colesterol total é devido principalmente à fração HDL.

6.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Como descrito anteriormente, o potencial antiaterogênico das HDL colesterol tem sido atribuído à paraoxonase (PON), uma glicoproteína cálcio dependente. Esse potencial vem de sua capacidade de hidrolisar lipídeos oxidados, fosfolípidos, e hidroperóxidos (CEOOH), impedindo assim que eles se acumulem nas partículas de LDL (Oda *et al.*, 2002). Em nosso experimento, o bezafibrato promoveu diminuição da atividade da PON arilesterase nos hamsteres. O ferro não interferiu na atividade enzimática isoladamente, apesar do grupo HFE ter tido valores menores que o H, essa diferença não foi significativa. No entanto, quando os animais receberam, ao mesmo tempo, o ferro e o bezafibrato, a atividade enzimática não sofreu tal redução. Utilizando fenofibrato, Beltowski *et al.*, (2002) observaram a diminuição da atividade enzimática da PON arilesterase em plasma de ratos, corroborando nosso estudo com hamsteres, enquanto Gouédard *et al.*, (2003) utilizando células de hepatomas humanos demonstraram um aumento na atividade da PON arilesterase utilizando tanto fenofibrato como bezafibrato, porém o mesmo não ocorreu quando utilizaram o gemfibrozil, outro agonista PPAR α . Dessa maneira, podemos salientar que o nosso modelo experimental não corroborou o estudo em células humanas em relação à atividade enzimática arilesterase da PON, demonstrando assim que em espécies diferentes podem ser encontradas respostas distintas nas ações dos agonistas PPAR α .

Quando se determinou a atividade da PON utilizando-se como substrato o paraoxon (atividade paraoxonase), o bezafibrato novamente atuou diminuindo a atividade enzimática. O ferro isoladamente também reduziu, em menor intensidade, a atividade enzimática da PON. O ferro através da catálise da peroxidação lipídica pode diretamente modular a atividade enzimática pelo ataque aos ácidos graxos poliinsaturados, resultando em mudanças nas propriedades físicas e na fluidez da membrana, a qual a PON é ancorada (Getz e Reardon, 2004). Além disso a catálise pelo ferro da peroxidação lipídica pode afetar a proteína PON desestabilizando sua estrutura terciária e acelerando sua degradação (Levyl *et al.*, 2005). E quando ao mesmo tempo foram administrados nos hamsteres o ferro e o bezafibrato, o ferro reverteu parcialmente o efeito do bezafibrato, novamente os resultados mostram que o ferro interfere na sinalização do PPAR- α . O aumento da HDL com redução da atividade

PON sugere que o ferro converte a HDL de novo numa forma mais pró-aterogênica, desde que há menor capacidade antioxidante e supostamente um transporte reverso prejudicado. Dessa maneira, no hamster o ferro parece desestabilizar a estrutura da paraoxonase mais em relação à sua atividade paraoxonase que em sua atividade arilesterase.

A superexpressão da catalase (enzima que degrada a H_2O_2) inibe a adesão leucocitária mediada por LDL oxidadas (Shi *et al.*, 2004), agindo portanto como uma das defesas antioxidantes do organismo e suporta ainda a hipótese de que a H_2O_2 desempenha um papel na patogênese da aterosclerose. Os hamsteres que receberam ferro, bezafibrato, ambos ou isoladamente (grupos HFE, HFI e HFEFI) tiveram menores valores de catalase, dessa maneira podemos supor que tanto ferro quanto bezafibrato atuaram em nosso modelo como nocivos a essa defesa antioxidante do animal. O ferro ao promover danos à membrana celular, proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 1984), poderia atuar na deterioração da enzima catalase, como demonstrado na diminuição de sua atividade.

Tióis de baixo peso molecular e dissulfetos, incluindo homocisteína, cisteína e glutathiona, são componentes celulares críticos e desempenham importantes papéis no metabolismo e homeostase do organismo. Glutathiona, cisteína e cisteinilglicina compõem a maioria dos aminotióis do plasma humano (Kleinman *et al.*, 2000). Em nosso experimento não houve diferenças significativas com relação as sulfidrilas totais e nem nas sulfidrilas relacionadas à fração protéica. Porém, com relação as sulfidrilas livres, os hamsteres que receberam ferro (HFE) tiveram um aumento de 14% em relação àqueles que não receberam (H) e os animais dos grupos que receberam o bezafibrato, com ou sem ferro (HFEFI e HFI, respectivamente) não foram estatisticamente diferentes do grupo H. Enquanto os esforços têm direcionado para a homocisteína como importante indicador de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, pouca atenção tem sido dada à cisteína, um dos mais abundantes tióis no plasma, metabólica e estruturalmente relacionada com a homocisteína. Outras investigações têm apontado altos níveis de diferentes formas de cisteínas em pacientes com doenças vasculares periféricas e cerebral (Araki *et al.*, 1989) e (Andersson *et al.*, 1995). Ambos, homocisteína total e cisteína são compostos que interagem e que promovem trocas de pontes dissulfeto. Cisteína, homocisteína e glutathiona compreendem o maior sistema redox. Alteração em algum desses tióis pode afetar outros (Ueland, 1995). Eles também

exibem propriedades autooxidantes na presença de íons metálicos, resultando na geração de radicais livres e peróxido de hidrogênio (Saez *et al.*, 1982). O ferro, ao influenciar o aumento das sulfidrilas livres, as quais em sua maioria homocisteína, cisteína e cisteinilglicina, poderia via sistema redox tióis em hamsteres aumentar o estresse oxidativo. Isso pode suportar a modificação superóxido-mediada da LDL, facilitando assim a formação de células espumosas (Heinecke *et al.*, 1987). Jacob *et al.*, (1999) mostraram uma associação entre cisteinemia e doença cardiovascular. Um dos leves efeitos da hiperhomocisteinemia é o deslocamento da cisteína da albumina, o que presumivelmente libera cisteína no plasma. Nesse seguimento, se a transição das reações de oxidação dependente íon metálico, desempenham um papel na propensão aterogênica da hiperhomocisteinemia, então a cisteína plasmática poderá levar a mais efeitos deletérios que protetores (Ueland *et al.*, 1996).

6.4 AMINOTRANSFERASES

A aspartato aminotransferase (AST) está distribuída nos tecidos orgânicos, incluindo o fígado, o coração e os músculos, enquanto que a alanina aminotransferase (ALT) é principalmente encontrada no fígado, embora quantidades significativas possam ser encontradas nos rins. Parece que aproximadamente 80% as AST dos hepatócitos está localizada na mitocôndria, enquanto acredita-se que a ALT seja predominante extra-mitocondrial. Foi postulado que na lesão hepatocelular leve, quando a membrana plasmática do hepatócito é lesada e a membrana mitocondrial permanece íntegra, a ALT e a AST citoplasmáticas são liberadas no soro. Nas lesões hepatocelulares mais graves, a lesão celular pode resultar na liberação da AST mitocondrial, elevando a proporção AST/ALT (Henry, 1999).

Os valores para a ALT dos hamsteres que receberam excesso de ferro (HFE e HFEFI) não foram diferentes dos demais (H e HFI). O mesmo não ocorreu com a AST, onde os animais que receberam bezafibrato (HFI) tiveram aumento de cerca de 7 vezes na atividade dessa enzima, quando comparado com os que não receberam o bezafibrato (H). Interessantemente, os hamsteres do grupo HFE não foram estatisticamente diferentes do grupo H, no entanto quando os animais receberam tanto bezafibrato como o ferro (HFEFI) houve um aumento na atividade em relação ao grupo H, porém em menor intensidade (4,6 vezes), quando comparada com o grupo HFI.

Cornwell *et al.*, (2004) ao avaliar o perfil de genes expressos em ratos com o uso de seis análogos do ácido fibríco observaram que essas substâncias induziam a hepatomegalia e esta foi correlacionada com: a proliferação dos peroxissomos e hipertrofia hepatocelular e um dos compostos na maior dosagem aumentou a atividade de ALT e AST. Essa observação foi justificada principalmente devido à maior expressão dos genes de muitos citocromos P450 (Cyp4A3, Cyp4A10, Cyp11B2, Cyp2C22, Cyp2J3, Cyp 2J4, Cyp17 α e citocromo P-450e). No presente trabalho, os hamsteres do grupo HFI apresentaram aumento de cerca de 21% no peso do fígado quando comparado ao grupo H, demonstrando que o bezafibrato pode ter modificado a expressão gênica nesse sentido. Podemos salientar que o ferro pode ter interferido na ação do bezafibrato, fazendo com que a expressão gênica apresentasse menor intensidade e causasse assim a menor hepatomegalia, representada no hamster por menor aumento da AST no grupo HFEFI quando comparado ao grupo HFI. Embora os animais do grupo HFEFI tenham apresentado as menores atividades de AST, eles apresentaram os maiores valores para o peso hepático. Se por um lado o ferro poderia interferir na via PPAR- α , por outro, o fígado atua como o depósito desse metal e essas alterações poderiam estar relacionadas com o acúmulo de ferro no tecido hepático e outros mecanismos independentes de PPAR- α .

6.5 PESO DOS ÓRGÃOS

Ao final do experimento não foi constatada diferença significativa no peso corpóreo dos animais, dessa forma, verificamos que a dieta, o ferro ou o bezafibrato interferiram no desenvolvimento dos animais. Todavia, os fígados dos animais que receberam a dieta hipercolesterolemia foram maiores que os animais do grupo controle, órgão este responsável pelo processamento dos lipídios e ferro. A concentração da uréia dos hamsteres dos grupos HFI e HFEFI foram maiores (49,91 e 56,54 mg/dL) do que aqueles que não consumiram o bezafibrato, grupos H e HFE (46,36 e 41 mg/dL, respectivamente). Alguns relatos mencionam que os fibratos podem alterar a função renal (Hirai *et al.*, 1996). Moléculas também excretadas pelos rins, como a cistatina C e homocisteína sofreram aumentos após terapia com fibratos (Dierkes *et al.*, 1999). Isso sugere que esses fibratos reduzem a taxa de filtração glomerular. Fibratos prejudicam a geração de prostaglandinas vasodilatadoras *in vitro* e

in vivo, processo pelo qual obviamente pode contribuir para a disfunção renal (Wilson *et al.*, 1995) e (Ledwith *et al.*, 1997). O gemfibrozil, em contraste com fenofibrato, para o bezafibrato e ciprofibrato, não tem sido demonstrada causa de disfunção renal. Uma das hipóteses da ausência desse efeito nefrotóxico pela molécula de gemfibrozil, em contraste com os outros fibratos, é que ele falha ao se ligar PPAR (Krey *et al.*, 1999). De fato, esses receptores nucleares uma vez ligados aos fibratos, diminuem a expressão gênica para a indução da enzima COX-2 (Wilson *et al.*, 1995) e (Ledwith *et al.*, 1997), a qual tem papel crítico na manutenção das prostaglandinas vasodilatadoras no rins. Como suporte para essa hipótese, clofibrato e ciprofibrato, mas não gemfibrozil, inibiram a produção de prostaglandinas vasodilatadoras (Ledwith *et al.*, 1997) e (Yoshinari *et al.*, 1998). Dessa maneira, assim como em humanos, em nosso modelo experimental, o bezafibrato pode ter induzido uma disfunção renal, demonstrado pela elevação da uréia e aumento do peso dos rins nos animais alimentados com o bezafibrato. Na ausência do bezafibrato, os animais que somente receberam as injeções de ferro dextran (HFE) tiveram menores valores de uréia quando comparados àqueles que não receberam nem o bezafibrato e nem o ferro. Todavia os animais que receberam ambos ferro dextran e bezafibrato, tiveram os maiores valores para uréia sugerindo efeitos independentes do ferro e bezafibrato sobre a função renal.

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Nossos resultados confirmaram que o ferro potencializa o efeito hipercolesterolêmico da dieta, uma vez que os animais dos grupos que receberam excesso de ferro tiveram maiores valores de colesterol, quando comparados aos que não receberam. Esses dados sugerem que o ferro interfere no metabolismo lipídico, no entanto até o momento, na literatura não há dados que expliquem esses resultados. A via de sinalização de PPAR- α parece ser uma possibilidade marcante a ser explorada.

A presença do bezafibrato (agonista PPAR- α) interferiu no metabolismo do colesterol no hamster e sua interação com o excesso de ferro pode estar envolvida com as enzimas chaves no metabolismo do colesterol (7- α -hidroxilase, HMG CoA redutase e ACAT) e HDL (Apo AI, Apo AII e ABCA1). Como houve um efeito antagônico quando ferro e bezafibrato atuaram no hamster, os resultados sugerem que a atuação do ferro no metabolismo dos lipídeos pode ocorrer por meio da sinalização via PPAR- α ,

uma vez que esse metal interferiu na resposta produzida pelo agonista PPAR α . Esta suposição é apoiada pelos resultados de Marcil (2006) que mostraram que o estresse oxidativo induzido por ferro ascorbato diminui a expressão de PPAR-a e o efluxo de colesterol de macrófagos.

Embora o bezafibrato possa ter seu uso principal na hipertrigliceridemia em humanos e em roedores causar proliferação peroxisomal, mais estudos devem ser realizados com relação ao estresse oxidativo, uma vez que nos hamsteres a diminuição da atividade da catalase é um indício de depleção de uma das defesas antioxidantes. Da mesma maneira a redução da paraoxonase, enzima que tem sido relacionada como principal fator de proteção da HDL colesterol também foi reduzida nos hamsteres que receberam o bezafibrato.

De grande importância é o entendimento do metabolismo do ferro e seus efeitos no organismo quando em excesso. Uma vez que a suplementação indiscriminada desse metal tão importante ao organismo poderá aumentar o estresse oxidativo, conseqüentemente reduziu as defesas antioxidantes, representadas em nosso modelo pela PON (paraoxon) e catalase.

8- Conclusões

- ✓ O ferro interfere no metabolismo do colesterol, principalmente na fração HDL, e essa interferência pode envolver, direta ou indiretamente, a via de sinalização de PPAR- α , posto que o bezafibrato reverte parcialmente os efeitos provocados pelo ferro
- ✓ O bezafibrato provocou o aumento da AST e na presença de ferro esse efeito foi reduzido, sugerindo mais uma vez que o ferro interfere na resposta do hamster ao bezafibrato.
- ✓ O excesso de ferro reduziu a atividade de PON, quando o paraoxon foi utilizado como substrato.
- ✓ O bezafibrato reduziu a atividade da PON, quando tanto o paraoxon quanto o fenilacetato foram usados como substratos e estes efeitos foram parcialmente revertidos pelo ferro.

8 - Referências Bibliográficas

Abboud S. & Haile D.J. (2000) A novel mammalian protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, 275: 19906– 19912.

Araki A.; Sako Y.; Fukushima Y.; Matsumoto M.; Asada T. & Kita T.(1989). Plasma sulfhydryl-containing amino acids in patients with cerebral infarction and in hypertensive subjects. *Atherosclerosis*,79:139–46.

Araujo J.A.; Romano E.L.; Brito B.E.; Parthé V.; Romano M.; Bracho M.; Montaña R.F. & Cardier J. (1995) Iron overload augments the development of atherosclerotic lesions in rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 15: 1172-1180

Arbeeny, C.M.; Meyers, D.S.; Bergquist, K.E., & Gregg, R.E. (1992). Inhibition of fatty acid synthesis decreases very low density lipoprotein secretion in the hamster. *J. Lipid Res.* 33: 843-851.

Andersson A.; Lindgren A. & Hultberg B. (1995). Effect of thiol oxidation and thiol export from erythrocytes on determination of redox status of homocysteine and other thiols in plasma from healthy subjects and patients with cerebral infarction. *Clin Chem*,41:361–6.

Assmann, G & Nofer, J. R. (2003). Atheroprotective effects of highdensity lipoproteins. *Annu Rev Med.* 54: 321-341.

Association of Official Analytical Chemists (1980). *Official Methods of Analysis*. AOAC, Washington, DC.

Beard, J. (2002). Dietary iron intakes and elevated iron stores in the elderly: is it time to abandon the set-point hypothesis of regulation of iron absorption? *Am J Clin Nutr* 76, 1189-1190.

Beltowski J.; Wojcicka G. & Jamroz A. (2002). Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Polish Journal Pharmacology* 54(6): 661-671

Biemond, P., van Eijk, H. G., Swaak, A. J. & Koster, J. F. (1984) Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J. Clin. Investig.* 73: 1576–1579.

Bishop, R.W. (1992). Structure of the hamster low density lipoprotein receptor gene. Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75235.

Beutler, E.; Ho.brand; A.V. & Cook J.D., (2003). Iron deficiency and overload. *Hematology* 1: 40–61.

Borggreve, S. E., De Vries R. & Dullaart R.P., (2003). Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin, cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest*, 33(12): 1051-1069.

Brinton, E. A. (2003). Lipid abnormalities in the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*. 3: 65-72.

Brazzalotto; X.; Gaillard Z.; Pantopoulos, K.; Hentze, M.W. & Moulis, J.M., (1999). Human cytoplasmic aconitase (iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J. Biol. Chem.* 274: 21625–21630.

Brousseau M.E.; Schaefer E.J.; Wolfe M.L.; Bloedon L.T.; Digenio A.G. & Clark R.W. *et al.* (2004). Effects of an inhibitor of cholesterol ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med*. 350:1505-1515.

Brunet, S.; Thibault, L.; Lepage, G.; Seidman, E.G.; Dube, N. & Levy E. (2000). Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 28(1):46-54

Bunker. V.W. (1992). Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci*. 49(4):299-312

Cairo G.; Tacchini L.; Pogliaghi G.; Anzon E.; Tomasi A. & Bernelli-Zazzera, A., (1995). Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the “free” iron pool. *J. Biol. Chem.* 270: 700–703.

Cairo G.; Castrusini E.; Minotti E. & Bernelli-Zazzera A. (1996). Superoxide and hydrogen peroxide-dependent inhibition of iron regulatory protein activity: a protective stratagem against oxidative injury. *FASEB J*. 10: 1326–1335.

Cairo G.; Recalcati S.; Pietrangelo, A. & Minotti G. (2002). The iron regulatory protein: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radical Biol. Med*. 32, 1237–1243.

Cheema S.K. & Agellon L. B. (2000). The murine and human cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem* .275(17): 12530–12536.

Chinetti G.; Lestavel S.; Bocher V.; Remaley A.T.; Neve B. & Torra I.P. *et al.* (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 7:53–58.

- Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, & Staels B. (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation*. 101:2411–2417.
- Chinetti-Gbaguidi, Rigamonti E, Helin L, Mutka AL, Lepore M, Fruchart JC, Clavey V, Ikonen E, Lestavel S, & Staels B. . (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor controls cellular cholesterol trafficking in macrophages. *J. Lipid Res*. 46:2717–2725.
- Colles S. M.; Maxson J. M.; Carlson S. G. & Chisolm G. M. (2001). Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. *Trends Cardiovasc Med*. 11(3-4):131-138.
- Cornwell P.D. & Souza A.T. Ulrich R.G., (2004). Profiling of hepatic gene expression in rats treated with fibric acid analogs. *Mutat Res* 549: 131–145
- Dabbagh, A.J.; Mannion, T., Lynch, S.M. & Frei, B. (1994). The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *The Biochem J*, 300: 799-803.
- Danesh, J. & Appleby, P. (1999) Coronary heart disease and iron status: meta-analyses of prospective studies. *Circulation* 99: 852–854.
- Deicher, R. & Hörl, W.H. (2004). Heparin: a molecular link between inflammation and anaemia. *Nephrol Dial Transplant* 19: 521-4.
- Devchand, P.R., Keller H, Peters J.M., Vazquez M., Gonzalez F.J. & Wahli W. (1996). The PPAR α -leukotriene B-4 pathway to inflammation control. *Nature*. 384:39–43.
- Devlin T.M. (2002) Metabolismo do heme e do ferro. In: *Manual de Bioquímica e Correlações Clínicas*. Eds. Awaed, W.M.. pp, 934-937.
- Dierkes, J.; Westphal, S. & Luley. C. (1999). Serum homocysteine increases after therapy with fenofibrate or bezafibrate. *Lancet* 354: 219–220
- Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H.; Givel. F.; Helftenbein, G. & Wahli W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879 –887.
- Duez, H., Chao Y.S., Hernandez M., Torpier G., Poulain P., Mundt S., Mallat Z., Teissier E., Burton C.A., Tedgui A., Fruchart J.C., Fiévet C., Wright S.D., Staels B. (2002). Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor α agonist fenofibrate in mice. *J. Biol. Chem*. 277:48051–48057.
- Dunford, H.B.(1987). Free radicals in iron-containing systems. *Free Radic Biol Med* 3: 405-421.

Eaton, J.W. (1991). Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). *J Lab Clin Med* 118: 3-4.

Fernandez, M.L.; Wilson, T.A.; Conde, K.; Vergara-Jimenez, M. & Nicolosi, R.J. (1999). Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. *J Nutr.* 129(7):1323-1332.

Ferrali, M.; Signorini, C.; Ciccoli, L. & Comporti, M. (1992). Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and souramil. *Biochem. J.* 285, 295–301.

Fleming, D.J.; Tucker, K.L.; Jacques, P.F.; Dallal, G.E.; Wilson P.W. & Wood R.J. (2002) Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *A J Clin Nutr* 6: 1375-84.

Fleming, R.E. & Bacon, B.R.(2005). Orchestration of Iron Homeostasis. *N Engl J Med* *N Engl J Med.* 352(17): 1741-1744.

Fontecave, M. & Pierre, J.L. (1993). Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie* 75: 767–773.

Fruchart, J.C. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and high-density lipoprotein metabolism. *Am J Cardiol.* 88: 24-29.

Fu, J. Gaetani S., Oveisi F., Lo Verme J., Serrano A., Rodríguez De Fonseca F., Rosengarth A., Luecke H., Di Giacomo B., Tarzia G. & Piomelli D., (2003). Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR α . *Nature.* 425:90–93.

Getz, G.S. & Reardon, C.A. (2004). Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol*, 15:261-267.

Ganz T. (2003). Hpcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102: 783-788.

Gehring, N.H.; Hentze, M.W. & Pantopoulos, K. (1999). Inactivation of both RNA binding and aconitase activities of iron regulatory protein-1 by quinone-induced oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 274: 6219–6225.

Gillum, R.F. (2001). Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men--the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 639-645

Gouédard C.; Koum-Besson N.; Barouki R.; & Morello Y.(2003). Regulation of the human paraoxonase-1 gene pon-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 63:945–956.

Gould, A.L.; Rossow, J.E.; Santanello, N.C.; Heyse, J.F. & Furberg, C.D. (1998) Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation*. 97(10):946-52.

Gunshin, H.; Allerson, C.R.; Polycarpou-Schwarz M.; Rofts A., Rogers J.T. & Kishi F. *et al.* (2001) Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *Fed Eur Biochem Soc Lett*. 509(2):309-316

Guo, Q; Wang, P.R.; Milot, D.P.; Ippolito, M.C.; Hernandez, M.; Burton, C.A.; Wright, S.D. & Chao, Y. (2001). Regulation of lipid metabolism and gene expression by fenofibrate in hamsters. *Biochim Biophys Acta*. 1533(3):220-3.

Haberland, M. E.; Fong, D. & Cheng, L. (1988). Malondialdehyde altered protein occurs in atheroma of WHHL rabbits. *Science*. 241: 215–218.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J*. 219: 1–14.

Halliwell, B. & Gutteridge J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246: 501-514.

Halliwell, B.; Gutteridge J.M.C & Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 119:568-620.

Heinecke, J.W.; Rosen, H. Suzuki, L.A. & Chait A. (1987). The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* . 262:10098–100103.

Henry, J.B. (1999) Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 19^a ed. Saunders Company.

Hirai, M.; Tatuso, E.; Sakurai, M.; Ichikawa, M.; Matsuya, F. & Saito, Y. (1996). Elevated blood concentrations of cyclosporine and kidney failure after bezafibrate in renal graft recipient. *Ann Pharmacother*. 30: 883–884

Holbein, B.E. (1980). Iron-controlled infection with *Neisseria meningitidis* in mice. *Infect Immun* 29(3): 886-91.

Inoue, I. Goto S, Matsunaga T.; Nakajima T.; Awata T.; Hokari S.; Komoda T. & Katayama S. (2001). The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and PPAR γ increase Cu²⁺, Zn²⁺- superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism*. 50:3–1.

Ijpenberg, A. Tan N.S.; Gelman L.; Kersten S.; Seydoux J.; Xu J.; Metzger D.; Canaple L.; Chambon P.; Wahli W. & Desvergne B. (2004). In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J*. 23:2083–2091.

Jacob, N.; Bruckert, E.; Giral, P.; Foglietti, M.J. & Turpin G. (1999). Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis*, 146(1):53–59.

Jakubowski, H. (2000). Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 275:3957–3962.

Jakubowski, H. (2005). Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*, 43(10):1011-1014

Jiang, R.; Manson, J.E.; Meigs, J.B.; Ma, J.; Rifai, N. & Hu, F.B. (2004). Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA*. 291(6):711-717

Kaur, D. e Anderson J. (2004). Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Research Reviews* 3: 327-343.

Kleinman, W.A. & Richie, J.P.(2000). Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol*. 60:19–29.

Kota, B.P.; Huang, T.H.E. & Roufogalis, B.D. (2005) An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* 51(2). 85-94.

Krey, G.; Braissant, O. & L'Horsset, F. (1999). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferators by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, 11: 779–791.

Kujiraoka, T.; Oka, T. & Ishihara, M. (2000). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human serum paraoxonase concentration. *J Lipid Res*. 41(8):1358-63

Ledwith, B.J.; Pauley, C.J.; Wagner, L.K.; Rokos, C.L.; Alberts, D.W. & Manam, S. (1997). Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12, 13- myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem*, 272: 3707–3714.

Lee, H. *et al.* (2000). Role for peroxisome proliferator- activated receptor α in oxidized phospholipids induced synthesis of monocyte chemotactic protein- 1 and interleukin-8 by endothelial cells. *Circ. Res*. 87:516–521.

Leonarduzzi, G.; Scavazza, A.; Biasi F.; Chiarpotto E.; Camandola S.; Vogel S.; Dargel R. & Poli G. (1997). The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2, 3-nonenal up regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J*. 11:851–857.

Levy1, E.; Trudel, K.; Sinnett, D.; James, R.W.; Delvin, E. A. & Seidman E. (2005). iron–ascorbic acid-induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase

1 in hdl and the liver: comparison between humans and rats. *J Cell Biochem.* 96:404–411.

Li, A.C. Binder, C.J.; Gutierrez, A.; Brown, K.K.; Plotkin, C.R.; Pattison, J.W.; Valledor, A.F.; Davis, R.A.; Willson, T.M.; Witztum, J.L.; Palinski, W. & Glass, C.K. (2004). Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β/δ , and γ . *J. Clin. Invest.* 114:1564–1576.

Lobreaux, S.; Hardy, T. & Briat, J.F. (1993). Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J.* 12, 651–657.

Marcil, V.; Delvin, E.; Sané A.T.; Tremblay, A. & Levy, E. (2006). Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: Role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovasc Res* 72: 473–482

Mendler, M.H.; Turlin, B.; Moirand, R.; Jouanolle, A.M.; Sapey, T.; Guyader, D.; Le Gall, J.Y.; Brissot, P.; David, V. & Deugnier, Y. (1999). Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology.* 117(5):1155-63.

Meyers, D. G. (2000). The iron hypothesis: does iron play a role in atherosclerosis? *Transfusion* 40: 1023–1029.

Motojima, K.; Passilly, P.; Peters, J.M.; Gonzalez, F.J. & Latruffe N. (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner *J. Biol. Chem.* 273: 16710 –16714.

Mueller, S.; Pantopoulos, K.; Hubner, C.A.; Stremmel, W. & Hentze, M.W. (2001). IRP1 activation by extracellular oxidative stress in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 276, 23192–23196.

Napoli, C.; P. F. D'Armiento, F. P. Mancini, A.; Postiglione, J. L.; Witztum, G, Palumbo, & Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 100: 2680–2690.

Navab, M.; Hama, S.Y.; Cooke, C.J.; Ananthramaiah, G.M.; Chadda, M. & Jin, L. *et al.* (2000). Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of midly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.*, 41: 1481-94.

Navab, M.; Ananthramaiah, G.M.; Reddy, S.T.; van Lesten, B.J.; Ansell, B.J. & Fararow, G.C. Vahabzadeh, K.; Hama, S.; Hough, G.; Kamranpour, N.; Berliner, J.A.; Lusis, A.J. & Fogelman, A.M. (2004) The oxidation hypothesis of atherosclerosis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 45:993-1007.

- Nemeth, E.; Tuttle, M.S. & Powelson, J. *et al.* (2004) Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306:2090-2093
- Nistor, A.N.; Bulla, A.; Filip, D.A. & Radu, A (1987) The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 68:159–173
- Oda, M.N.; Bielicki, J.K.; Ho, T.T.; Berger, T.; Rubin, E.M. & Forte, T.M. (2002). Paraoxonase overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 290:92 -97.
- Olsson K.S.;Heedman, P.A. & Staugard F. (1978) Preclinical hemochromatosis in a population on a high-iron-fortified diet. *JAMA* 239(19): 1999-2000.
- Olsson, K.S.; Marsell, R.; Ritter, B.; Olander, B.; Akerblom, A.; Ostergard, H. & Larsson, O. (1995). Iron deficiency and iron overload in Swedish male adolescents. *J Intern Med*. 237(2): 187-194.
- Palinski, W.; Rosenfeld M. E.; Yla-Herttuala,S.; Gurtner, G. C.; Socher, S. S. ; Butler, S. W.; Parthasarathy, S. Carew, T. E.; Steinberg, D. & Witztum, J. L. (1989). LDL undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 1372–1376.
- Pantopoulos, K.; Gray, N. & Hentze, M.W. (1995). Differential regulation of two related RNA-binding proteins, iron regulatory protein (IRP) and IRPB. *RNA* 1: 155–163.
- Pantopoulos, K.; Mueller, S.; Atzberger, A.; Ansorge, W.; Stremmel, W. & Hentze, M.W., (1997). Differences in the regulation of iron regulatory protein 1 (IRP1) by extra- and intracellular oxidative stress. *J. Biol. Chem*. 272: 9802–9808.
- Pantopoulos, K. & Hentze, M.W., (2000). Nitric oxide, oxygen radicals, and iron metabolism. *Nitric Oxide* 19: 293–313.
- Park, C. H.; Bacon, B.R.; Brittenham, G.M. & Tavill A.S. (1987) Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Lab Invest* 57: 555-563.
- Perrone, M.G.; Santandrea, E.; Dell'uomo, N.; Giannessi, F.; Milazzo, F.M., Sciarroni, A.F.; Scilimati, A. & Tortorella, V. (2005) Synthesis and biological evaluation of new clofibrate analogues as potential PPAR α agonists. *Eur J Med Chem* 40: 143–154.
- Ponka, P.; Beaumont, C. & Richardson D.R. (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35 (1):35-54.
- Ponka, P. (1999), Cellular iron metabolism. *Kidney Int Suppl* 69, 2-11.

Puntarulo, S. & Cederbaum, A.I. (1996). Role of cytochrome P-450 in the stimulation of microsomal production of reactive oxygen species by ferritin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1289: 238–246.

Rashid, S. Watanabe, T.; Sakaue, T. & Lewis, G.F. (2003). Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem*, 36(6): 421-429.

Randell, E.W.; Parkes, J.G.; Olivieri, N.F. & Templeton, D.M. (1994). Uptake of non-transferrin bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron. *J Biol Chem*, 269: 16046 - 16053.

Rizvi, F., Puri A., Bhatia G., Khanna, A.K., Wulff, E.M., Rastogi, A.K., & Chander, R. (2003) Antidyslipidemic action of fenofibrate in dyslipidemic-diabetic hamster model *Biochem. Bioph. Res Comm*, 305: 215-222

Saez, G.; Thornalley, P.J.; Hill, H.A.O.; Hems, R. & Bannister, J.V. (1982). The production of free radicals during the autooxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*, 719:24–31.

Salen, G.; von Bergmann, K.; Lutjohann, D.; Kwoiterovich, P.; Kane, J. & Patel, S.B. *et al.* (2004). Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation*, 109(8): 966-971.

Salonen, J. T.; Nyssonen, K.; Korpela, H.; Tuomilehto, J.; Seppanen, R. & Salonen, R. (1992). High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 86: 803–811.

Scanu, A. M.; A. Khalil, L.; Neven, M.; Tidore, G.; Dawson, D.; Pfaffinger, E.; Jackson, K. D.; Carey, H. C.; McGill, & Fless, G. M. (1988). Genetically determined hypercholesterolemia in a rhesus monkey family due to a deficiency of the LDL receptor. *J. Lipid Res.* 29: 1671-1681.

Sheth, S. & Brittenham, G.M. (2000). Genetic disorders affecting proteins of iron metabolism: clinical implications. *Annu Rev Med*, 51: 443-464.

Schillaci, G. *et al.* (2001). High-density lipoprotein cholesterol and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hypertens.* 19: 12, 2265-2270.

Schoonjans, K.; Staels, B. & Auwerx, J. (1996). Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37:907- 925.

Scott, M.D.; Lubin, B.H.; Zuo, L. & Kuypers, F.A. (1991). Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* , 118: 7-16.

Sedlak J. & Lindsay R.H. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 25: 192-205.

Serdyuk, A.P. & Morton, R.E. (1999). Lipid transfer inhibitor protein defines the participation of lipoproteins in lipid transfer reactions: CETP has no preference for cholesterol ester in HDL versus LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:718-26.

Shih, D.M.; Gu, L.; Xia, Y.R.; Navab, M.; Li, W.F.; Hama, S.; Castellani, L.W.; Furlong, C.E.; Costa, L.G.; Fogelman, A.M. & Lusis, A.J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394:284-287.

Shi, M.J.; Yang, H.; Motley, E.D. & Guo, Z.M. (2004). Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. *Am J Hypertens.* 17: 450–456.

Siah, C.W.; Trinder, D. & Olynyk J.K. (2005) Iron overload. *Clin Chim Acta*, 358: 24-36.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213–219.

Sies, H. (2000). Oxidative stress. In: *Encyclopedia of Stress* (Fink, G., ed.), Vol. 3, pp. 102–105. Academic Press, San Diego, CA.

Sies, H. e Stahl, W. (2004). Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 173–200.

Silva, J.C.A. (2005). Efeito do excesso de ferro e dieta hipercolesterolemia sobre o perfil de lipídios séricos e estresse oxidativo em hamsters. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

Smith, A.G.; Clothier, B.; Robinson, S.; Scullion, M.J.; Carthew, P.; Edwards, R.; Luo, J.; Lim, C.K. & Toledano, M. (1998). Interaction between iron metabolism and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice with variants of the Ahr gene: a hepatic oxidative mechanism. *Mol. Pharmacol*, 53: 52–61.

Sima, A., Stancu, C., Constantinescu, E., Olegeanu, L. & Simionescu, M. J. The hyperlipemic hamster - model for testing the anti-atherogenic effect of amlodipine (2001) *Cell Mol. Med*, 5: 153-162

Spady, D.I.C. & Dietschy, J. M. (1983). Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *Lipid Res.* 2: 303-315.

Staels, B.; Dallongeville, J.; Auwerx, J.; Schoonjans, K.; Leitersdorf, E. & Fruchart J.C. (1998) Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 98: 2088-2093.

- Sullivan, J. L. (1981). Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1: 1293–1294.
- Sung, B.; Park, S.; Yu, B.P. & Chung, H.Y. (2004) Modulation of PPAR in aging, inflammation, and calorie restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 59: 997-1006.
- Tacchini, L.; Recalcati, S.; Bernelli-Zazzera, A. & Cairo, G., (1997). Induction of ferritin synthesis in ischemic-reperfused rat liver: analysis of the molecular mechanisms. *Gastroenterology*, 113: 946–953.
- Teissier, E.; Nohara, A.; Chinetti, G.; Paumelle, R.; Cariou, B.; Fruchart, J.C.; Brandes, R.P.; Shah, A. & Staels, B. (2004). Peroxisome proliferators activated receptor α induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR- α activation properties. *Circ. Res.* 95: 1174–1182.
- Tontonoz, P.; Nagy, L. (1999). Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor A: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 10: 485-90.
- Tordjman, K.; Bernal-Mizrachi, C.; Zeman, L.; Weng, S.; Feng, C.; Zhang, F.; Leone, T.C.; Coleman, T.; Kelly, D.P. & Semenkovich, C.F. (2001). PPAR α deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in ApoE-null mice. *J. Clin. Invest.* 107: 1025–1034.
- Turbino-Ribeiro, S.M.L.; Silva, M.E.; Chianca, J.R.D.A.; Paula, H.; Cardoso, L.M.; Colombari, E. & Pedrosa, M.L. (2003). Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr* 133: 15-20.
- Tward, A.; Xia, Y.R.; Wang, X.P.; Shi, Y.S.; Park, C.; Castellani, L.W.; Lusis, A.J. & Shih, D.M. (2002). Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106: 484-90.
- Ueland, P.M.(1995). Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem*, 41(3): 340–2.
- Ueland, P.M.; Mansoor, M.A.; Guttormsen, A.B.; Müller, F.; Aukrust, P.; Refsum, H. & Svardal, A.M. (1996). Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiols status—a possible element of the extracellular antioxidant defence system. *J Nutr*, 126: 1281–1284.
- Whitfield, J.B.; Zhu, G.; Heath, A.C.; Powell, L.W. & Martin, N.G.(2001). Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcohol Clin Exp Res*, 25:1037-45.
- Wilson, M.W.; Lay, L.T.; Chow, C.K.; Tai, H.; Robertson, L.W. & Glauert, H.P. (1995). Altered hepatic eicosanoid concentrations in rats treated with the

peroxisome proliferators ciprofibrate and perfluorodecanoic acid. *Arch Toxicol*, 69: 491–497

Willcox, J. K.; Ash, S. L. & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 275–295.

Wu, G.; Fang, Y. Z.; Yang, S.; Lupton, J. R. & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134: 489–492.

Yla-Herttuala, S.; Palinski, W.; Rosenfeld, S.; Parthasarathy, S. Carew, T. E. Butler, S.; Witztum, J. L. & D. Steinberg. (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84: 1086–1095.

Young, C.E.; Karas, R.H. & Kuvin JT. (2004). High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev.* 12: 107-119.

Yoshinari, M.; Asano, T.; Kaori, S. Shi, A.H.; Wakisaka, M.; Iwase, M. & Fujishima, M. (1998). Effect of gemfibrozil on serum levels of prostacyclin and precursor fatty acids in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 42: 149–154.

O48a Oliveira, Marcos Rodrigo de.

Ação do Bezafibrato, um Agonista de PPAR- α , sobre a Hipercolesterolemia induzida por dieta e excesso de ferro, em hamsteres. [manuscrito] / Marcos Rodrigo de Oliveira. – 2007.

xvii, 68 f.: il., color; graf., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa.

Co-orientadora: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica

1. Bioquímica - Teses. 2. Ferro – Metabolismo - Teses. 3. Hipercolesterolemia - Teses. 5.PPAR alfa – Teses. 4.Hamster como animal de laboratório. I.Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. II. Título.

CDU: 577.115

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br