

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO EXCESSO DE FERRO E  
DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA  
SOBRE O PERFIL DE LIPÍDIOS  
SÉRICOS E ESTRESSE OXIDATIVO  
EM HAMSTERS**

**AUTORA: JACQUELINE COELHO AUGUSTO DA SILVA**

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Pedrosa

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO EXCESSO DE FERRO E DIETA  
HIPERCOLESTEROLÊMICA  
SOBRE O PERFIL DE LIPÍDIOS SÉRICOS E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM HAMSTERS**

**AUTORA: JACQUELINE COELHO AUGUSTO DA SILVA**

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Pedrosa

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

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

Ouro Preto, julho de 2005

**S586e Silva, Jacqueline Coelho Augusto da.**

Efeito do excesso de ferro e dieta hipercolesterolêmica sobre o perfil de lipídios sérios e estresse oxidativo em Hamsters [manuscrito] / Jacqueline Coelho Augusto da Silva. – 2005.

xviii, 112f.: il., color; graf., tabs.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pedrosa.

Co-Orientador Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

Área de concentração: Bioquímica estrutural e fisiológica.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de pesquisas em ciências Biológicas.

1. Bioquímica - Teses. 2. Hamster como animal de laboratório – Teses. 3. Ferro no organismo – Teses. 4. Transferrina - Teses. 5. Antioxidante – Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de pesquisas em Ciências Biológicas.

II Título

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

## **APOIO FINANCEIRO**

### **Projeto financiado:**

CNPq: processo nº 473445/2003-4

### **Bolsas:**

Programa PIBIC\_CNPq/UFOP com a participação das estudantes Carla Evelyn C.

Nuñes (2003) e Maísa Silva (2004)

## DEDICATÓRIA

A Deus, por tudo, dando graças e louvores.

Aos meus pais, grandes modelos de vida.

Ao José Augusto, Carolina, Flávia e Rafael pelo amor, carinho, atenção, apoio e por estarem comigo nessa caminhada.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Lúcia Pedrosa e ao Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva que durante a tarefa de construir este trabalho ensinaram-me os primeiros passos para a pesquisa. Agradeço pelo exemplo fiel de orientadores, respeito, amizade, carinho e pela dedicação.

“Ninguém e nada cresce sozinho. Sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de segurança. Devemos, assim, ser gratos aos que nos ajudaram a crescer e ter o propósito de não parar e não passar em vão pela vida”.(*autor desconhecido*) Fica meu eterno agradecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

“O mais importante e bonito da vida é isto: que as pessoas não são sempre iguais, não foram terminadas – mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou”. (João Guimarães Rosa)

**Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas** pela atenção e dedicação.

**Ao professor José Armando Ansaloni** pelo grande incentivo.

**Ao Heberth de Paula** pelo incentivo, apoio e interesse.

**Ao Jair Pastor Mota** pela incansável ajuda.

**À Maria Aparecida Reis** pela competência como funcionária e amizade.

**Aos meus colegas do mestrado:** Maria Luísa, Marcus Vinícius, Jaila, Kátia, Jorgino, Marcelo, Juciane, Marília, Maia das Graças, Regina, Valdinéia, Lisvane, Anamaria, Daniela, Eduardo, Ângelo, Helen pela agradável convivência.

**À Carla, Máisa e Keila** pela ajuda técnica.

**À Luci** pela paciência.

**Aos amigos do CEFET- Ouro Preto** pela compreensão, amizade, paciência, apoio.

## RESUMO

O aumento nos níveis de LDL e a diminuição de HDL têm sido apontados como fatores de risco para a aterosclerose e contribuído para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Por outro lado, estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que o excesso de ferro, também, pode contribuir para o desenvolvimento dessas doenças. O objetivo do trabalho foi investigar o efeito do excesso de ferro sobre as diversas frações de lipídios séricos e homeostase do ferro em hamsters alimentados com dieta controle ou contendo colesterol. *Golden Syrian Hamsters* machos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento recebido: grupo controle (C) recebeu dieta controle; grupo CF recebeu dieta controle e excesso de ferro; grupo H recebeu dieta hipercolesterolêmica contendo 0,5g/100g de colesterol e grupo HF recebeu dieta hipercolesterolêmica e excesso de ferro. O experimento durou nove semanas e o excesso de ferro foi obtido através de injeções de ferro-dextran, na sétima semana na dose de 10mg/dia durante 5 dias. Os dados foram testados pela ANOVA, análise bivariada. Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi feito para determinar as diferenças específicas entre as médias. A diferença de  $p < 0,05$  foi considerada significativa. O excesso de ferro aumentou ( $p < 0,05$ ) os níveis de colesterol plasmáticos em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica ( $4,37 \pm 0,73$  mmol/L e  $7,07 \pm 2,22$  mmol/L para H e HF, respectivamente). O colesterol sérico não foi diferente entre os grupos C e CF ( $1,68 \pm 0,29$  mmol/L e  $1,93 \pm 0,37$  mmol/L para C e CF, respectivamente). O excesso de ferro associado à dieta hipercolesterolêmica também aumentou as frações HDL e LDL colesterol ( $p < 0,05$ ). O tratamento com ferro-dextran aumentou o ferro sérico, a saturação de transferrina e a capacidade de ligação do ferro nos grupos CF e HF. A dieta hipercolesterolêmica aumentou o estresse oxidativo, avaliado pelos níveis séricos de 4-hidroxi-alquenal, mas o excesso de ferro não alterou as concentrações de 4-hidroxi-alquenal, malondialdeído, ou o *status* antioxidante total. Nossos resultados sugerem que a dieta hipercolesterolêmica aumenta o colesterol sérico e proporcionalmente as demais frações nos hamsters e que o tratamento com ferro, quando associado à dieta hipercolesterolêmica, potencializa tais aumentos, que o excesso de ferro não afeta o *status* antioxidante e que o hamster pode ser um bom



modelo para explorar mecanismos que favorecem nosso entendimento sobre a relação ferro/lipídios.

**ABSTRACT**

Epidemiological and experimental data suggest that iron excess may contribute to the development of cardiovascular diseases (CVD). As increased LDL-cholesterol, decreased HDL-cholesterol has been implicated as risk factors for atherosclerosis; the aim of this study was to investigate the effects of iron overload on serum lipid profile in hamsters fed control or hypercholesterolemic diets. Male Golden Syrian Hamsters were divided into four groups. The control group (C) was fed a control diet, the CI group was fed the control diet and given iron dextran injections, the hypercholesterolemic group (H) was fed a 0,5g/100g cholesterol diet, and the HI group was fed the cholesterol diet and given iron dextran injections. The hamsters were fed the diets for 9 wk and iron dextran injections were given during the wk 7 at doses of 10mg/d for five days. Data were tested by two-way ANOVA. When interactions were significant, Tukey's test was done to determine the specific differences between means. A difference of  $P < 0,05$  was considered significant. Excess iron increased ( $P < 0,05$ ) plasma total cholesterol in hamsters fed the cholesterol diet ( $4,37 \pm 0,73$  mmol/L and  $7,07 \pm 2,22$  mmol/L for H and HI, respectively). Serum total cholesterol did not differ between groups C and CI ( $1,68 \pm 0,29$  mmol/L and  $1,93 \pm 0,37$  mmol/L for C and CI, respectively). Excess iron also increased HDL and LDL-cholesterol fractions ( $P < 0,05$ ). Iron dextran treatment increased serum iron, transferrin saturation and iron-binding capacity in CI and HI groups. The hypercholesterolemic diet increased 4-hydroxyalkenal levels in serum, and iron overload did not influence the serum concentration of malondialdehyde, 4-hydroxyalkenal or total antioxidant status. Our experiment suggests that iron overload does not affect oxidative stress but hypercholesterolemic diet and iron interact to affect serum cholesterol and that the hamster appears to be a good model to explore underlying mechanisms that could expand our understanding of iron/lipid relationship.

## SUMÁRIO

<a href="#">APOIO FINANCEIRO</a> .....	III
<a href="#">DEDICATÓRIA</a> .....	IV
<a href="#">AGRADECIMENTO ESPECIAL</a> .....	V
<a href="#">AGRADECIMENTOS</a> .....	VI
<a href="#">RESUMO</a> .....	VII
<a href="#">ABSTRACT</a> .....	IX
<a href="#">SUMÁRIO</a> .....	X
<a href="#">LISTA DE TABELAS</a> .....	XIII
<a href="#">LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS</a> .....	XV
<a href="#">LISTA DE ABREVIATURAS</a> .....	XVII
<a href="#">1 INTRODUÇÃO</a> .....	1
<a href="#">2 REVISÃO DA LITERATURA</a> .....	4
<a href="#">2.1 Colesterol</a> .....	4
<a href="#">2.1.1 Importância no organismo</a> .....	4
<a href="#">2.1.2 Estrutura</a> .....	5
<a href="#">2.1.3 Vias de obtenção</a> .....	6
<a href="#">2.1.4 Absorção</a> .....	6
<a href="#">2.1.5 Biossíntese</a> .....	7
<a href="#">2.1.6 Regulação da síntese do colesterol</a> .....	8
<a href="#">2.1.7 Transporte</a> .....	9
<a href="#">2.2 Aterosclerose e estresse oxidativo</a> .....	14
<a href="#">2.3 Metabolismo do ferro</a> .....	16
<a href="#">2.4 Efeitos deletérios do ferro</a> .....	20
<a href="#">2.4.1 Ferro e formação de radicais livres</a> .....	20
<a href="#">2.4.2 Relação entre ferro e risco de doenças cardiovasculares</a> .....	23
<a href="#">2.4.3 Estudos em humanos que não corroboram com a hipótese do ferro</a> .....	25
<a href="#">2.4.4 Estudos em modelos animais</a> .....	26
<a href="#">2.5 Hamster como modelo no estudo de hipercolesterolemia e aterosclerose</a> .....	27
<a href="#">3 OBJETIVOS</a> .....	30
<a href="#">3.1 Objetivo geral</a> .....	30

<a href="#">3.2 Objetivos específicos</a>	30
<a href="#">4 MATERIAIS E MÉTODOS</a>	31
<a href="#">4.1 Animais</a>	31
<a href="#">4.2 Dietas</a>	31
<a href="#">4.3 Desenho experimental</a>	32
<a href="#">4.4 Parâmetros biológicos</a>	33
<a href="#">4.4.1 Peso corporal, ingestão alimentar</a>	33
<a href="#">4.4.2 Peso do fígado, do baço, do coração, dos rins</a>	34
<a href="#">4.5 Lipídios no soro</a>	34
<a href="#">4.5.1 Obtenção do soro</a>	34
<a href="#">4.5.2 Dosagem de colesterol total</a>	34
<a href="#">4.5.3 Dosagem do colesterol HDL</a>	35
<a href="#">4.5.4 Dosagem do colesterol VLDL e do colesterol LDL</a>	36
<a href="#">4.5.5 Dosagem de triglicérides</a>	37
<a href="#">4.6 Ferro no soro e no baço</a>	38
<a href="#">4.6.1 Níveis de ferro no baço</a>	38
<a href="#">4.6.2 Dosagem de ferro sérico</a>	39
<a href="#">4.6.3 Dosagem da capacidade de ligação do ferro</a>	40
<a href="#">4.7 Metabólitos séricos</a>	42
<a href="#">4.7.1 Dosagem de albumina</a>	42
<a href="#">4.7.2 Dosagem de proteínas totais</a>	43
<a href="#">4.7.3 Dosagem de ácido úrico</a>	43
<a href="#">4.7.4 Dosagem de aspartato aminotransferase (AST)</a>	45
<a href="#">4.7.5 Dosagem de alanina aminotransferase (ALT)</a>	46
<a href="#">4.8 Estresse oxidativo: níveis séricos e no fígado de malondialdeído, hidroxialquenal e status sérico de antioxidante total</a>	4-
<a href="#">4.8.1 Dosagem de malondialdeído (MDA) no soro</a>	47
Princípio da Técnica	47
<a href="#">4.8.2 Dosagem de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxialquenal (HAE) no soro</a>	48
Princípio da Técnica	48
<a href="#">4.8.3 Dosagem de malondialdeído (MDA) no fígado</a>	49
<a href="#">4.8.4 Dosagem de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxialquenal (HAE) no fígado</a>	49

<a href="#">4.8.5 Status sérico de antioxidante total</a> .....	50
<a href="#">4.9 Análise Estatística</a> .....	51
<a href="#">5 RESULTADOS</a> .....	53
<a href="#">5.1 Resultados do primeiro experimento</a> .....	53
<a href="#">5.1.1 Parâmetros biológicos: peso do fígado, ingestão alimentar, ganho de peso</a> .....	53
<a href="#">5.1.2 Lipídios: níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL</a> .....	55
<a href="#">5.1.3 Atividade das enzimas no soro: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT)</a> .....	63
<a href="#">5.2 Resultados do segundo experimento</a> .....	65
<a href="#">5.2.1 Parâmetros biológicos: peso corporal final, do fígado, do coração e dos rins</a> .....	65
<a href="#">5.2.2 Lipídios: níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL</a> .....	68
<a href="#">5.2.3 Concentração de ferro, capacidade latente de ligação de ferro (CLLF), capacidade total de ligação de ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (%IST), transferrina, ferro no baço</a> .....	70
<a href="#">5.2.4 Metabólitos séricos: níveis séricos de proteínas totais, albumina e ácido úrico</a> .....	79
<a href="#">5.2.5 Estresse oxidativo: níveis séricos e no fígado de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxiacetalquenal (HAE) e status sérico de antioxidante total</a> .....	81
<a href="#">6 DISCUSSÃO</a> .....	83
<a href="#">6.1 Discussão sobre o primeiro experimento</a> .....	83
<a href="#">6.2 Discussão sobre o segundo experimento</a> .....	87
<a href="#">7 CONCLUSÕES</a> .....	92
<a href="#">8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</a> .....	93
<a href="#">9 ANEXOS</a> .....	109

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição das dietas controle e hipercolesterolêmica em gramas para cada 1000g da dieta.....32

**Tabela 2:** Peso do fígado, peso corporal final, ganho de peso e ingestão alimentar em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....53

**Tabela 3:** Atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....62

**Tabela 4:** Peso corporal final, do fígado e do coração em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....64

**Tabela 5:** Peso dos rins em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....65

**Tabela 6:** Níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....67

**Tabela 7:** Peso do baço, quantidade de ferro no baço ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$  de tecido) e quantidade total de ferro no baço em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....76

**Tabela 8:** Níveis séricos de proteínas totais, albumina e ácido úrico em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....78

**Tabela 9:** Níveis séricos e no fígado de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxiálquenos (HAE) e *status* de antioxidante total em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....80

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do colesterol.....	06
<b>Figura 2:</b> Resumo da biossíntese do colesterol (Lehninger, 2002 ).....	08
<b>Figura 3:</b> Mecanismo do efluxo do colesterol não esterificado ( Yancey, 2003).....	12
<b>Figura 4:</b> Esquema do Transporte Reverso de Colesterol (TRC). Adaptado de Baynes, 2000.....	13
<b>Figura 5:</b> Esquema da absorção de ferro proveniente da dieta em mamíferos (adaptado de Beard, J.L., 1996).....	18
<b>Figura 6:</b> Esquema da regulação da homeostase de ferro (adaptado de Kaur & Andersen, 2004).....	19
<b>Gráfico 1:</b> Níveis séricos de triglicérides em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....	55
<b>Gráfico 2:</b> Níveis séricos de colesterol em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....	56
<b>Gráfico 3:</b> Níveis séricos de HDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....	58
<b>Gráfico 4:</b> Níveis séricos de LDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....	59



**Gráfico 5:** Níveis séricos de VLDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....60

**Gráfico 6:** Níveis séricos de Ferro em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....69

**Gráfico 7:** Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF) em hamsters alimentados com dieta controle (c) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....70

**Gráfico 8:** Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF) em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....71

**Gráfico 9:** Índice de Saturação da Transferrina (IST%) em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....73

**Gráfico 10:** Níveis séricos de Transferrina em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.....74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ACAT</b>	Acil-coA-colesterol-acil-transferase
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>Apo B-100</b>	Apolipoproteína B-100
<b>Apo B-48</b>	Apolipoproteína B-48
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>CETP</b>	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
<b>CF</b>	Grupo controle tratados com ferro dextran
<b>C</b>	Grupo controle
<b>CLLF</b>	Capacidade Latente de Ligação do Ferro
<b>CTLF</b>	Capacidade Total de Ligação do Ferro
<b>CYP7AI</b>	Colesterol 7 $\alpha$ hidroxilase
<b>DCV</b>	Doença cardiovascular
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>HAE</b>	Hidroxiálquenal
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HF</b>	Grupo hipercolesterolêmico tratados com ferro dextran
<b>H</b>	Grupo hipercolesterolêmico
<b>IDL</b>	Lipoproteína de densidade intermediária
<b>IRES</b>	Elementos Responsivos ao Ferro
<b>IRP</b>	Proteínas Responsivas ao Ferro
<b>IST</b>	Índice de Saturação da Transferrina
<b>LCAT</b>	Lecitina-colesterol acil- transferase
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Proteína ABCA1</b>	Proteínas transportadoras que possuem local de ligação para ATP
<b>SR-BI</b>	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
<b>TfR</b>	Receptor de transferrina
<b>Tf</b>	Transferrina

<b>TRC</b>	Transporte reverso de colesterol
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade

# 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde - OMS - ressalta que o aumento da expectativa de vida de uma população tem relação direta com a prevenção das doenças cardiovasculares (OMS, 1982).

Nos dias atuais, a doença cardiovascular secundária à aterosclerose destaca-se como a principal causa de morbidade e mortalidade nas sociedades industrializadas (Romaldine, 2004). Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, em 2002, das 982.807 mortes por causa determinada, 267.496 (27,22%) ocorreram devido a doenças do aparelho circulatório. Em Minas Gerais, das 96.942 mortes por causa determinada, 28.337 (29,23%) foram devidas a doenças do aparelho circulatório. Na região de Ouro Preto, das 700 mortes por causa determinada, 238 (34%) foram devidas a doenças do aparelho circulatório.

A aterosclerose é a principal causa de doenças cardíacas e acidente vascular cerebral isquêmico que são responsáveis pela metade de todas as mortes na sociedade ocidental. Alterações no metabolismo de colesterol mostram uma ligação direta no desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Romaldine, 2004).

Durante as últimas duas décadas, a hipótese de que o estoque de ferro corporal está associado com o risco de doenças cardiovasculares (DCV) tem gerado debates extensivos. Os estoques de ferro aumentam o risco de doenças cardiovasculares? A depleção de ferro reduz o risco de doenças cardiovasculares? Essas questões têm implicações importantes devido à prática comum de fortificação de alimentos e suplementação com ferro em países industrializados (Ma e Stampfer, 2002). Este fato levou à produção de diversos trabalhos relatando que várias doenças estão relacionadas à exposição, a curto ou longo prazo, ao ferro, em quantidades que excedem à capacidade do organismo de se proteger contra sua capacidade de catalisar reações de formação de radicais livres do oxigênio (Weinberg, 1990 e Crawford, 1995). A Suécia obrigou o enriquecimento em ferro por 50 anos e cerca de 42% da ingestão diária de ferro é derivada dessas fontes. Porém, 5% dos homens tiveram elevação dos valores de ferro sérico, com 2% tendo reservas de ferro consoante com a distribuição encontrada em estágios iniciais de hemocromatose (Devilin, 2002).

Anterior a essas discussões, Sullivan, em 1981, relacionou estoques de ferro corporal à doença cardiovascular (Sullivan, 1981). Evidências que suportam essa hipótese emergiram, em 1992, de resultados publicados do *Finnish Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study* mostrando uma relação positiva entre risco de ataque cardíaco e níveis de ferritina sérica acima de 200 µg/L em homens (Binkoski *et al*, 2003). Estudos realizados por Stampfer *et al* (1993), Frey *et al* (1994) e Manttari *et al* (1994) mostraram não haver nenhuma associação entre níveis de ferritina sérica e DCV.

Em termos mecanísticos, o ferro é um elemento traço que pode participar da produção de radicais livres, em particular, o radical hidroxil produzido na reação de Fenton. Salonen *et al* (1992) têm sugerido que o excesso de ferro corporal promove aterosclerose e contribui para doenças cardiovasculares por favorecer as modificações oxidativas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Tuomainen, 2003). Quando a LDL se torna oxidada, ela não é mais reconhecida pelos seus receptores e é internalizada pelos macrófagos por meio de receptores *scavengers*, formando as células em espuma que irão desenvolver lesões ateroscleróticas (Stocker, 2004).

Outro fato que demonstra a associação entre ferro e DCV é a maior quantidade de ferro no homogenato de material aterosclerótico humano obtido de aneurisma e da aorta abdominal obtida por autópsia do que em tecido vascular sem aterosclerose. Além disso, o ferro nas lesões ateroscleróticas recentes está localizado no lisossomo da célula em espuma e, também, a quantidade de ferro aórtico depositado está diretamente associado à gravidade da aterosclerose (Meyers, 2000).

Em relação à aterosclerose, Martin & Frei, 1997, demonstraram, em estudos realizados *in vitro*, que ferro e cobre são necessários para oxidação de LDL em células endoteliais e macrófagos (Leake *et al*, 1990 e Nistor *et al*, 1987). O ferro também reduz os níveis de antioxidantes no plasma (Dabbagh *et al*, 1994) o que também pode favorecer a oxidação de LDL, e nos dois casos o ferro favoreceria o desenvolvimento de aterosclerose. Por outro lado, Brunet *et al*, 1999, observaram que a adição de ferro ascorbato em frações microssomais hepáticas resulta em uma extensiva inibição da HMG-CoA redutase, colesterol-7 alfa-hidroxilase e acil CoA colesterol aciltransferase (ACAT). O ferro ainda pode promover aterogênese por afetar as concentrações de lipídios séricos.

Kraml *et al*, 2004, demonstraram associação positiva entre estoque de ferro corporal - representado pela ferritina sérica - e aterosclerose. Os resultados são consistentes com a hipótese de que altos níveis de ferro estocados, mensurados pelas altas concentrações de ferritina sérica, podem contribuir para o estresse oxidativo e, assim, elevar o risco de doenças cardiovasculares. Contudo, Tuomainen *et al*, 2003, estudando as concentrações de ferritina sérica associada aos níveis de produtos de oxidação de colesterol em homens, argumentaram que uma das limitações de se estudar excesso de ferro utilizando a ferritina sérica como parâmetro, é que ela se encontra elevada nas infecções e inflamações, ambas estão associadas à aterosclerose e, portanto, níveis de ferritina podem não ser indicativos fiéis dos estoques de ferro.

Pelo que foi exposto, notamos que o ferro poderia influenciar o aparecimento e/ou desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Nosso estudo foi delineado para testar se o excesso de ferro pode afetar fatores de risco para aterosclerose em hamster. Essa verificação é importante, pois hamster é a espécie que apresenta metabolismo lipoprotéico mais próximo ao do homem comparado ao de outros roedores (Bravo *et al*, 1994; Otto *et al*, 1995; Moghadasian, 2002). Esse animal tem sido usado como modelo no estudo do metabolismo de lipoproteínas e dietas que induzem aterosclerose desde 1980. Vantagens para esse modelo animal em relação a outros é que o hamster possui atividade da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) (Dorfman, 2003), fenótipo de hiperlipidemia e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas quando alimentados com dieta rica em gordura saturada. Além disso, não encontramos, na literatura, trabalho a respeito do efeito do excesso de ferro sobre fatores de risco para aterosclerose em hamsters.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Colesterol

#### 2.1.1 Importância no organismo

O colesterol é um lipídio que está presente no organismo animal, tanto nos tecidos como nas lipoproteínas plasmáticas, seja sob a forma livre ou combinada (com ácidos graxos) como éster de colesterol (Murray,1994). Ele é componente essencial das membranas celulares de mamíferos. Além disso, ele é precursor de três classes importantes de compostos biologicamente ativos - os ácidos biliares, os hormônios esteroidais e a vitamina D (Baynes,2000).

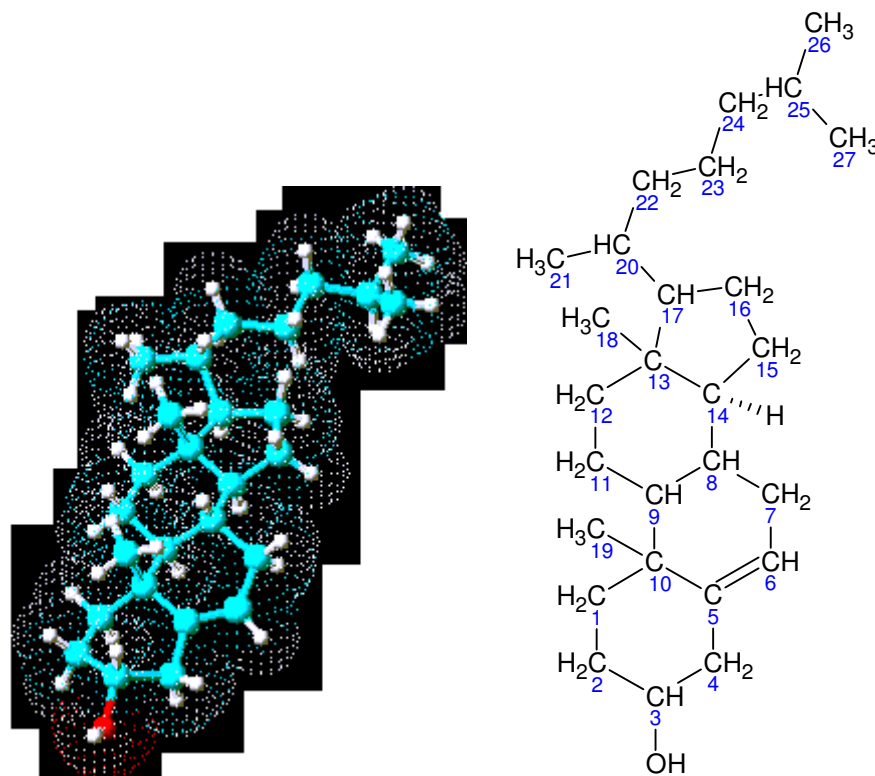
Há grande quantidade de colesterol tanto na membrana celular quanto nas membranas das organelas internas de todas as células. A proporção entre colesterol e os fosfolipídios nas membranas é particularmente importante para determinar a fluidez das membranas celulares (Guyton & Hall, 2002).

O maior uso do colesterol que não está presente em membrana do corpo consiste na formação de sais biliares no fígado. Até 80% do colesterol são convertidos em sais biliares. Por sua vez, uma pequena quantidade de colesterol é utilizada pelas glândulas supra renais para formar os hormônios córtico-supra-renais, pelos ovários, na formação de progesterona e de estrogênio, e pelos testículos para formar testosterona (Guyton & Hall, 2002).

Grande quantidade de colesterol se precipita na camada córnea da pele. Esse colesterol, juntamente com outros lipídios, torna a pele altamente resistente à absorção de substâncias hidrossolúveis, bem como a ação de agentes químicos, visto que o colesterol e outros lipídios da pele são muito inertes a ácidos e a diferentes solventes que, de outro modo, poderiam penetrar no corpo. Além disso, estas substâncias lipídicas ajudam a evitar a evaporação da água pela pele. Sem essa proteção, a quantidade de evaporação (como a que ocorre em pacientes queimados que perdem pele) pode atingir 5 a 10 litros por dia, em lugar dos 300 a 400 mL habituais (Guyton & Hall, 2002).

### 2.1.2 Estrutura

O colesterol tem peso molecular de 386 Da e 27 átomos de carbono, dos quais 17 são incorporados em quatro anéis fusionados (o núcleo ciclopentano-perhidrofenantreno), dois estão ligados aos grupamentos metila angulares unidos nas junções dos anéis AB e CD, e 8 encontram-se na cadeia lateral. O colesterol é quase que inteiramente composto de átomos de carbono e de hidrogênio, com um grupo hidroxila isolado ligado ao átomo de carbono-3. O colesterol é quase que totalmente saturado, possuindo apenas uma única dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. Em termos tridimensionais, o anel estrutural do colesterol é praticamente planar. Os dois grupamentos metila angulares e a cadeia lateral projetam-se acima deste plano. Esta estrutura confere ao colesterol uma baixa hidrossolubilidade (aproximadamente 5µmol/L). Apenas 30% do colesterol circulante encontram-se na forma livre contra uma maior parte esterificada através do grupamento hidroxila e uma ampla gama de ácidos graxos de cadeias longas. Os ésteres de colesterol são ainda menos hidrossolúveis que o colesterol livre (Baynes, 2000).



**Figura 1:** Estrutura do colesterol



### 2.1.3 Vias de obtenção

Em humanos, o colesterol pode ser derivado de duas fontes: síntese endógena e colesterol dietético – exógeno - (Salisbury *et al*, 1995). A maior parte do colesterol do organismo origina-se da síntese (1g/dia), enquanto cerca de 0,3 g/dia são fornecidos pela dieta (Murray, 1984).

A homeostase do colesterol é mantida pelo balanço da absorção do colesterol intestinal e síntese do colesterol endógeno (Ros, 2000). Assim, o fígado e o intestino são os principais órgãos responsáveis pela homeostase. Entre 1000 a 1500 mg de colesterol por dia transitam através do trato intestinal no homem adulto (Salisbury *et al*, 1995).

### 2.1.4 Absorção

Como o colesterol é uma molécula lipossolúvel, sua absorção intestinal requer a emulsificação, hidrólise da ligação éster (quando esterificado) pela colesterol esterase pancreática, solubilização micelar, absorção no jejuno proximal, reesterificação nas células intestinais e transporte para a linfa nos quilomícrons. Apenas 10-15% do colesterol dietético encontram-se como éster de colesterol. Assim, a fração considerável do colesterol dietético não requer hidrólise por enzimas pancreáticas. Há duas importantes fontes endógenas de colesterol intestinal: colesterol biliar e a descamação das células epiteliais do intestino. Aproximadamente 40-60% do colesterol dietético é absorvido. Colesteróis são captados pelas células intestinais em uma taxa menor que os ácidos graxos (Ros, 2000).

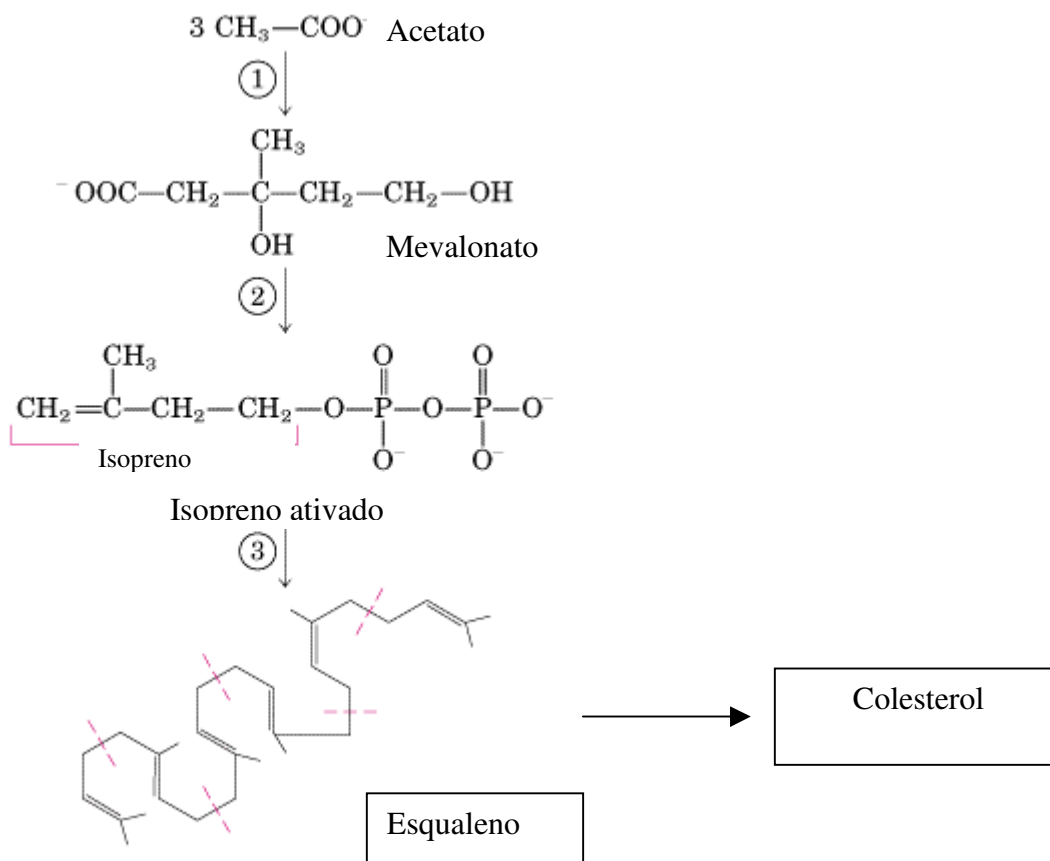
Como a estrutura em anel do colesterol não pode ser metabolizada a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em seres humanos, o anel esterol intacto é eliminado do corpo por conversão em ácidos biliares. Assim, a síntese e a excreção dos ácidos biliares compreendem a principal via de eliminação do colesterol em mamíferos (Champe, 2000).

Após a entrada no enterócito, a maioria do colesterol livre é convertida novamente em ésteres de colesterol pela enzima acil-CoA colesterol acil transferase (ACAT) e, juntamente com outros lipídios reesterificados e proteínas específicas são incorporados aos quilomícrons. Duas formas de ACAT, ACAT1 e ACAT2, são codificadas por dois genes diferentes. O intestino expressa, predominantemente, ACAT2, enquanto macrófagos expressam ACAT1. O fígado humano expressa ambas

com predominância da ACAT1. A redução na formação de ésteres de colesterol no intestino, através da inibição de ACAT2, pode reduzir a absorção de colesterol, resultando em uma redução dos níveis de colesterol na circulação (Shah, 2003).

### 2.1.5 Biossíntese

O colesterol é sintetizado a partir da acetil CoA citossólica. Duas moléculas de acetil-CoA condensam-se, formando acetoacetil-CoA, que se condensa com uma terceira molécula de acetil-CoA liberando um composto com 6 átomos de carbono, o  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Estas duas primeiras reações, catalisadas pela tiolase e HMG-CoA sintetase, são reversíveis. A terceira reação, entretanto, é irreversível. A HMG-CoA é reduzida a mevalonato, duas moléculas de NADPH doam, cada uma delas, dois elétrons; essa reação é catalisada pela HMG-CoA redutase (principal ponto de regulação). No próximo passo, o mevalonato é convertido em duas moléculas de isopreno ativadas. Em seguida, há a condensação de seis unidades de isopreno ativadas e o esqualeno é formado. O estágio final da biossíntese de colesterol começa com a ciclização do esqualeno. Esse estágio, ao contrário dos outros, requer oxigênio molecular. O epóxido de esqualeno, o intermediário reativo, é formado em uma reação que utiliza o  $O_2$  e NADPH. O epóxido de esqualeno é ciclizado a lanosterol por uma ciclase. Finalmente, o lanosterol é convertido a colesterol.(Lehninger, 2002).



**Figura 2:** Resumo da biossíntese do colesterol (Lehninger, 2002).

### 2.1.6 Regulação da síntese do colesterol

Nos mamíferos, a produção de colesterol é regulada pela concentração de colesterol intracelular e pelos hormônios glucagon e insulina. O passo limitante na via do colesterol é a conversão do  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) em mevalonato. A HMG-CoA redutase é regulada por inibição retroativa (*feedback*), altos níveis de esterol não identificados promovem a degradação rápida dessa enzima e inibem a transcrição de seu gene. A segunda forma de regulação é através de controle hormonal. Essa enzima existe na forma fosforilada (inativa) e desfosforilada (ativa). O glucagon estimula a fosforilação (inativação) e a insulina promove a desfosforilação ativando a enzima e favorecendo a síntese de colesterol (Lehninger, 2002). A síntese do colesterol pode, também, ser inibida por drogas (Champe, 2000).

Por outro lado, metabolismo de colesterol é regulado transcricionalmente por várias classes de receptores nucleares órfãos; em particular, os receptores X do fígado,

LXR $\alpha$  e LXR $\beta$ , que controlam a absorção, estoque, transporte e eliminação. LXRs são sensíveis aos níveis de colesterol intracelulares que mantêm a homeostase do colesterol, aumentando a excreção de ácidos biliares, reduzindo a absorção de colesterol e aumentando o transporte reverso de colesterol para o fígado onde será feito o catabolismo e o armazenamento. A colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase (CYP7A1) é induzida por LXR. Essa enzima converte o colesterol em ácidos biliares. Por exemplo, camundongos LXR $\alpha$  nulos perdem a habilidade de regular a expressão do gene CYP7A1 e, assim, acumulam ésteres de colesterol no fígado que, eventualmente, resultam em função hepática prejudicada. No intestino delgado, há três proteínas transportadoras ABC (proteínas transportadoras que possuem local de ligação para ATP) que são também reguladas transcricionalmente por LXRs e limitam a absorção de colesterol bombeando colesterol de volta ao lúmen do intestino (Zhang & Mangelsdorf, 2002).

### 2.1.7 Transporte

Os lipídios são transportados no plasma sob a forma de estruturas organizadas, microagregados moleculares, denominados lipoproteínas (Schiavo *et al*, 2003).

As apolipoproteínas são proteínas que se ligam aos lipídios para formar várias classes de partículas lipoprotéicas. Estas são complexos esféricos com lipídios hidrofóbicos no centro e as cadeias laterais hidrofílicas dos aminoácidos das proteínas na superfície (Lehninger, 2002). As apolipoproteínas A foram primeiramente associadas à lipoproteína de alta densidade (HDL); as apolipoproteínas B à lipoproteína de baixa densidade (LDL) e ao quilomícron. As apolipoproteínas C a todas as lipoproteínas, exceto LDL, e as apolipoproteínas E à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), ao quilomícron, à lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e à HDL. A maioria das apolipoproteínas é sintetizada no fígado ou intestino, porém a apo E é sintetizada em todas as células, exceto, no intestino. As apolipoproteínas interagem com os receptores celulares e determinam o destino metabólico das partículas de lipoproteínas, atuando, também, como ativadores ou inibidores das enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas. A apo E é reconhecida pelos receptores de LDL (Olson, 1998).

Os quilomícrons são sintetizados no retículo endoplasmático das células epiteliais que recobrem a superfície interna do intestino delgado. Partículas de quilomícrons são as maiores de todas as subclasses de lipoproteínas. O núcleo da partícula é composto principalmente de triglicerídeos e quantidades pequenas de ésteres de colesterol. Os triglicerídeos são transferidos do retículo endoplasmático das células intestinais para os quilomícrons através de uma proteína transferidora de lipídios. A superfície da partícula contém fosfolipídeos, apolipoproteínas e colesterol livre. A maior apolipoproteína na partícula de quilomícrons é a B-48. (Shah, 2003; Ros, 2000; Lichtenstein *et al*, 1996).

Os quilomícrons são transportados através do sistema linfático e entram na corrente sanguínea através da veia subclávia. As apolipoproteínas dos quilomícrons incluem a apo B-48, a apo E e a apo C-II. A apo C-II ativa a lipase lipoprotéica nos capilares dos tecidos adiposo, cardíaco, músculo esquelético e glândula mamária em lactação permitindo a liberação de ácidos graxos livres para esses tecidos. Dessa forma, os quilomícrons transportam os ácidos graxos obtidos na dieta para os tecidos em que serão consumidos ou armazenados como combustíveis. Os remanescentes dos quilomícrons, privados da maior parte de seus triglicerídeos, mas ainda contendo colesterol, apo E e apo B-48, movem-se da corrente sanguínea até o fígado. No fígado, existem receptores que reconhecem a apo E e essa ligação promove absorção dos quilomícrons por endocitose. O endossomo liga-se ao lisossomo que hidrolisa os lipídios e as proteínas (Lehninger, 2000; Crawford, 1999 e Cooper, 1997).

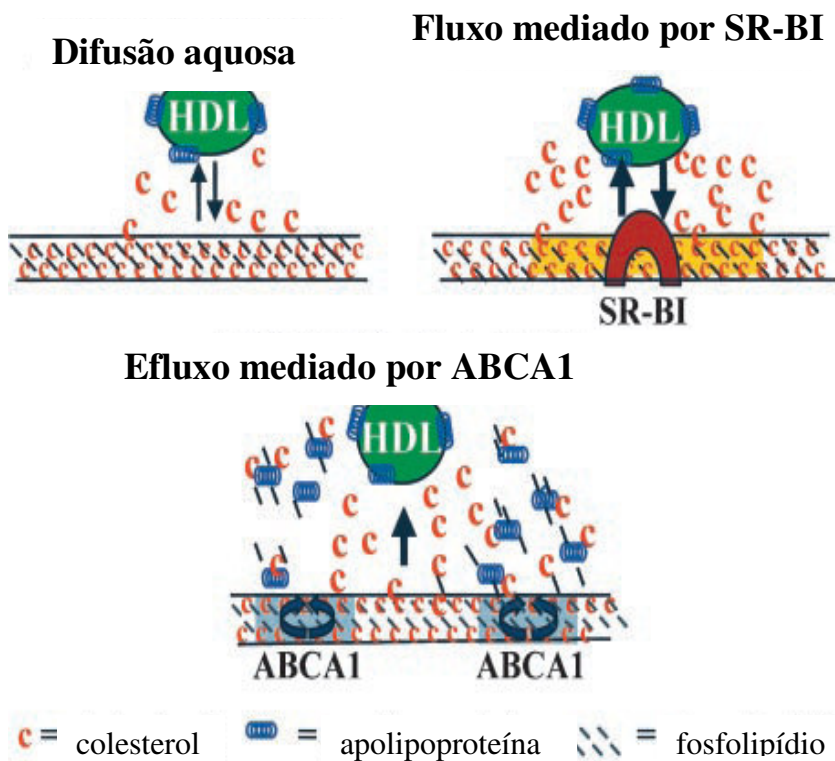
As VLDL são produzidas no fígado e contêm triglicerídeos, colesterol e ésteres de colesterol, bem como apo B-100, apo C-I, apo C-II, apo C-III e apo E. A ativação da lipase lipoprotéica pela apo C-II provoca a liberação de ácidos graxos livres dos triglicerídeos das VLDL (Lehninger, 2002 e Olson, 1998). O *turnover* normal para os triglicerídeos dos quilomícrons no sangue é de 7 minutos e para a VLDL é de 20 minutos (Olson, 1998). Como resultado da perda gradual de triglicerídeos das partículas de VLDL e transferência de alguns dos componentes de apolipoproteína, as partículas mudam de ricas em triglicerídeos para ricas em colesterol. Nesse processo, a densidade das partículas aumenta devido à perda de lipídios. As partículas são reclassificadas como IDL. Elas são uma classe heterogênea de partículas que normalmente não se acumulam no plasma (Lichtenstein *et al*, 1996). Algumas das partículas de IDL são

removidas através da interação da apolipoproteína E com o receptor de LDL, na superfície do fígado. A partícula de LDL é aproximadamente esférica e é composta de apo-B, junto com aproximadamente 500 moléculas de fosfatidilcolina, 200 moléculas de esfingomiélin e 400 moléculas de colesterol não esterificado. LDL é heterogênea em tamanho, composição e conformação de apoB-100. (Austin *et al* 1988). A LDL tem um *turnover* de 3 dias (Olson,1998). Ela é a principal lipoproteína transportadora de colesterol na circulação e fornece colesterol para os tecidos periféricos pelo receptor LDL (LDLr) mediado por endocitose (Brown & Goldstein 1986). A LDL e seu receptor penetram no interior da célula dentro de um endossomo o qual se liga a um lisossomo que digere a proteína e os lipídios da LDL para produzir monômeros que difundem no interior do citosol. O excesso de colesterol livre tem o seguinte efeito: incorporação nas membranas, inibição da síntese de novos receptores de LDL, inibição da síntese de colesterol pela redução da síntese de HMG CoA redutase e ativação da ACAT (Olson,1998).

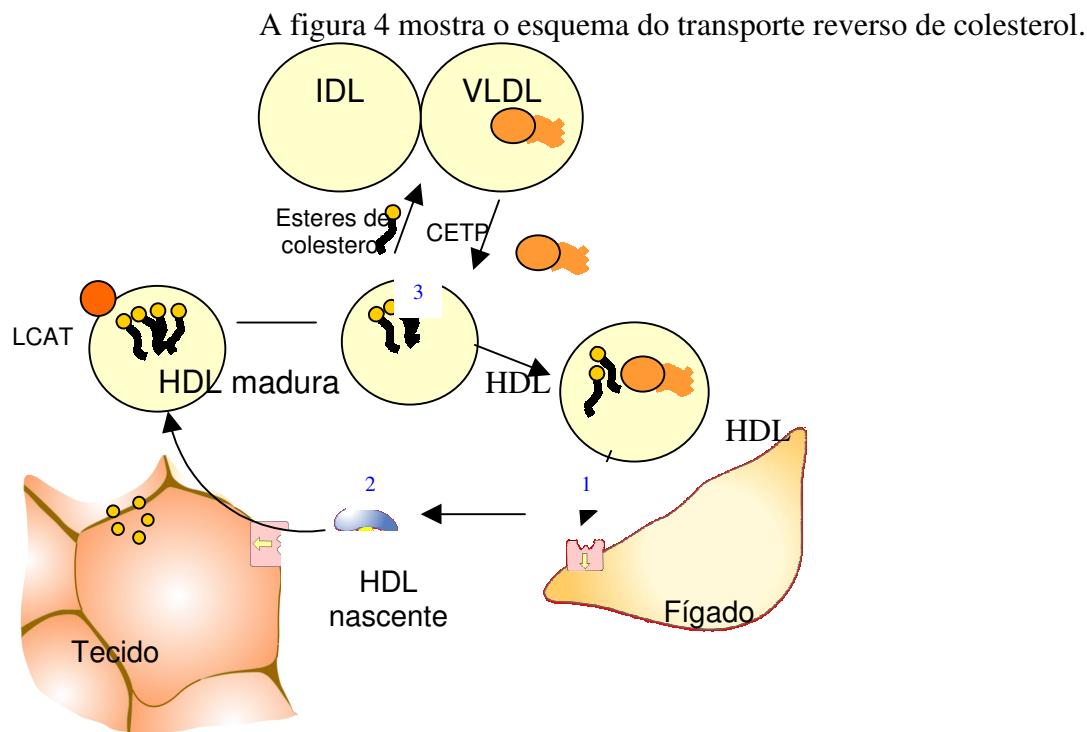
As HDLs são uma subclasse de partículas lipoprotéicas originárias do intestino e fígado (Lichtenstein *et al*, 1996). Essas lipoproteínas são um grupo heterogêneo de lipoproteínas isoladas do plasma humano com densidade de 1.063 a 1.125 g/mL. As principais HDLs circulantes são esféricas com um diâmetro de 7 a 14 nm. As proteínas representam aproximadamente 50% da massa do HDL, o restante é composto de lipídios. A principal proteína associada a HDL é a apolipoproteína AI (70%) e apo A-II (20%). Outras proteínas estão, também, associadas a HDL como apo A-IV, apo E, paraoxanase (PON), a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) (O'Connell & Genest, 2001).

A HDL faz o transporte reverso de colesterol (TRC), ou seja, transporta-o dos tecidos periféricos ao fígado (Yancey, 2003). No TRC, HDL ou suas apolipoproteínas promovem a remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos. Como mostrado na figura 3, há três caminhos conhecidos: difusão aquosa, fluxo de colesterol mediado pelo receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI) e efluxo mediado por proteínas transportadoras que possuem local de ligação para ATP (ABCA1). A difusão aquosa, um caminho que ocorre em todos os tipos de células, é relativamente ineficiente. Neste processo as moléculas de colesterol devem sair da membrana plasmática para a camada aquosa e são subsequenteiramente incorporadas em aceptores contendo fosfolipídios. O

mecanismo de difusão aquosa envolve um processo de difusão simples, e, como tal, a transferência de colesterol é passiva e dirigida pelo gradiente de concentração de colesterol. Células que expressam SR-BI na membrana plasmática sofrem efluxo de colesterol por esse receptor. O efluxo de colesterol é acelerado quando receptores SR-BI estão presentes na membrana plasmática celular. Ambos efluxo mediado por difusão e SR-BI ocorrem com aceptores contendo fosfolipídios; em ambos os casos, o fluxo de colesterol é bidirecional, com a direção do fluxo dependendo do gradiente de colesterol. Na outra via, a ABCA1 promove o efluxo unidirecional do colesterol e fosfolipídios para apolipoproteínas livres ou pobres em lipídios. A ABCA1 também está envolvida na formação da HDL nascente. A apo AI liga-se à proteína ABCA1 onde é captada e adquire colesterol; em seguida, é secretada como HDL nascente. (Lawn, 2001; Yancey, 2003; Chen, 2000; Bruce *et al*, 1998).



**Figura 3:** Mecanismo do efluxo do colesterol não esterificado (Yancey, 2003)



**Figura 4:** Esquema do Transporte Reverso de Colesterol (TRC). Adaptado do Baynes, 2000

(1) A HDL nascente tem formato discóide. (2) A apo A1 estimula a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) esterificando o colesterol adquirido que é acomodado da HDL nascente, convertendo-a em HDL madura. (3) A HDL troca ésteres de colesterol com as lipoproteínas contendo apo-B mediada pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). (4) O colesterol derivado do tecido na HDL é distribuído para o fígado pelo receptor LDL e pela captação seletiva pelo receptor SR-BI. (Yancey, 2003; Krause, 2001; Bruce *et al*, 1998). Obs: o mecanismo pelo qual a HDL adquire colesterol dos tecidos periféricos é mostrado na figura 3.

A HDL também fornece colesterol para tecidos esteroidogênicos, como adrenais, ovários e testículos. (Libby, 2001).

A HDL protege contra o desenvolvimento de aterosclerose através de seu papel no transporte reverso de colesterol e por limitar a oxidação da LDL. A HDL através enzimas que são antioxidantes como a paraoxanase 1 (PON1), acetil-hidrolase agem prevenindo o acúmulo de lipídios oxidados através da hidrólise de hidroperóxidos gerados durante a oxidação de LDL. A HDL, dessa forma, possui efeito antioxidante e antiinflamatório (Barter, 2004).



A lipoproteína (a) é uma partícula de LDL, na qual a apo (a) está ligada a apo B através de uma ponte dissulfeto. A apo (a) exibe homologia de seqüência com o plasminogênio, uma proenzima envolvida na decomposição de fibrina. Concentrações de lipoproteína (a) são altamente herdadas e menos afetadas por fatores ambientais que as outras lipoproteínas (Mahan & Escott-Stump, 2003, Baynes, 2000; Olson, 1998; Lichtenstein *et al*, 1996).

## 2.2 Aterosclerose e estresse oxidativo

Aterosclerose é definida como o desenvolvimento de placas de gordura na íntima das artérias de médio e grande calibre. Ela está associada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral isquêmico, aneurisma e doença vascular periférica. Alterações no metabolismo de colesterol mostram uma ligação direta no desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Song, 2001 e Lichtenstein *et al*, 1996).

Aterosclerose é caracterizada, principalmente, pelo acúmulo, na íntima da artéria, de lipídios derivados de LDL, junto com a apo B-100. Estudos indicam que a agregação de LDL, na parede arterial, representa um passo crítico na iniciação desta doença (Kinnunen, 2002). O aumento da concentração de LDL nativa no interior da célula endotelial induz ao maior consumo de NO e mais acentuada produção de radicais livres. O aumento dos radicais livres leva à oxidação dos ácidos graxos das LDL e, também, à oxidação das proteínas apo B. A modificação oxidativa aumenta a aterogênese da LDL (Jorge, 1997).

A aterosclerose coronariana e periférica são a principal causa de morte entre homens e mulheres em quase todo o mundo. Níveis de HDL são inversamente correlacionados com a incidência de doenças cardiovasculares (Yancey, 2003). A LDL é a maior causa de injúria endotelial e pode ser modificada pelos processos de glicação, agregação, associação com proteoglicans ou incorporação a complexos imunes. Quando há, na artéria, depósito de LDLs, estas sofrem oxidações progressivas e são englobadas pelos macrófagos (Povoa *et al*, 2001).

Quando as células endoteliais sofrem injúria, elas respondem induzindo várias citocinas. As citocinas ativam e atraem os monócitos para as células endoteliais que se

diferenciam em macrófagos. Quando as células musculares lisas são ativadas pelas citocinas, elas se deslocam para a região da íntima. Estas células secretam proteínas da matriz extracelular, tais como, colágeno e proteoglicans. Todos esses eventos combinam-se para promover a formação da lesão (Itabe, 2003). O processo de acúmulo de lipídios e formação de células em espuma perpetua uma resposta inflamatória que continua o recrutamento de macrófagos e linfócitos. A lesão aterosclerótica aumenta e pode romper-se ocorrendo formação de coágulo que pode impedir o fluxo sanguíneo (Stocker, 2004)

Sendo assim, a dislipidemia, condição na qual há concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue, é um fator de risco importante para o desenvolvimento de complicações da aterosclerose (Romaldini, 2004). Portanto, o perfil desejável para humanos seria uma taxa de colesterol menor que 200 mg/dL, limite do alto 200-239 mg/dL e alto  $\geq 240$  mg/dL; LDL ótimo menor que 100 mg/dL, subótimo 100-129 mg/dL, limite do alto 130-159 mg/dL, alto 160-189 mg/dL, muito alto  $\geq 190$  mg/dL; HDL baixo  $< 40$  mg/dL, alto  $> 60$ mg/dL e triglicerídeos  $< 150$  mg/dL (National Cholesterol Education Program NCEP,2001). O “American College of Cardiology” tem proposto quatro categorias de fatores de risco que equivalem à intensidade do manejo do fator de risco com a evidência para uma associação com a doença cardiovascular, a utilidade clínica e a resposta terapêutica (Pasternak, 1996). Os fatores de risco da categoria I são aqueles em que as intervenções comprovadamente diminuem o risco de DCV (hábito de fumar, LDL-colesterol, dieta rica em gordura, hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda, fatores trombogênicos). Os fatores de risco da categoria II são aqueles para os quais as intervenções provavelmente diminuem o risco de DCV (diabetes melito, inatividade física, HDL-colesterol, triglicérides, LDL pequena, obesidade, período pós-menopausa). Os fatores de risco da categoria III são aqueles associados ao aumento do risco de DCV que, se modificados, podem diminuir o risco (fatores psicossociais, lipoproteína (a), homocisteína, estresse oxidativo). Os fatores de risco da categoria IV são aqueles associados à DCV que não podem ser modificados (sexo, idade, história familiar de doença cardiovascular prematura). A dieta é a causa ambiental predominante da aterosclerose coronária, e modificações dietéticas podem reduzir o risco de DCV. Assim, se a dieta for relacionada como fator de risco à parte,

seria um fator de risco da categoria I. O LDL é o primeiro alvo de esforços para a intervenção nos lipídios. Uma diminuição de 1 mg/dL no LDL resulta na redução de cerca de 1 a 2% no risco relativo de DCV. O HDL é um fator preditor, forte, negativo e independente, da incidência e da mortalidade de DCV em homens e mulheres (Mahan & Escott-Stump, 2003).

### 2.3 Metabolismo do ferro

O ferro é o quarto elemento terrestre mais abundante, compreendendo aproximadamente 4,7% da crosta terrestre na forma de hematita, magnetita e siderita. Compostos de ferro primordiais foram, provavelmente, responsáveis pela geração catalítica do oxigênio atmosférico. Assim, o ferro atua como um nutriente essencial para quase todos os organismos vivos, agindo como um componente essencial de co-fatores de centenas de proteínas e enzimas (Beard *et al*, 1996).

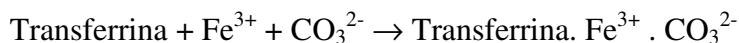
O ferro é um elemento de transição que pode existir no estado de oxidação de -2 a +6 (Beard *et al*, 1996). Em sistemas biológicos, em solução aquosa, o ferro é encontrado em dois estados de oxidação: ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Em pH alcalino e neutro, o potencial redox do ferro, em solução aquosa, favorece o estado férrico; em pH ácido, o equilíbrio favorece o estado ferroso (Devlin, 1998).

Sabe-se que uma propriedade especial do ferro é o modo como ele transita entre os estados oxidado e reduzido, sendo capaz de servir como um catalisador nas reações de oxi-redução, como doador ou aceptor de elétrons (Yip *et al*, 1996). Devido ao potencial redox do ferro, células e organismos utilizam-no para funções vitais, como transporte de oxigênio, transferência de elétrons, síntese de DNA e catálise (Lieu, 2001, Mueller *et al*, 2001).

Nos seres vivos, o ferro é encontrado na forma de proteínas hemínicas (que contêm o grupamento heme em seus sítios funcionais) ou de proteínas ditas não hemínicas. Entre as proteínas hemínicas encontramos as que transportam e armazenam oxigênio e enzimas como a catalase, peroxidases, triptofano pirrolase, prostaglandina sintetase, guanilato ciclase, NO sintetase e os citocromos microssomais e mitocondriais. Por outro lado, proteínas não hemínicas incluem transferrina, ferritina, várias enzimas redox que contêm ferro no sítio ativo e proteínas ferro enxofre (Devlin, 1998). Embora

suas propriedades expliquem porque o ferro é um constituinte essencial para várias atividades bioquímicas, o ferro também tem sua potencialidade tóxica para células e tecidos, isto é, potencial de se combinar para formar radicais livres (Lee *et al*, 1999; Mueller *et al*, 2001).

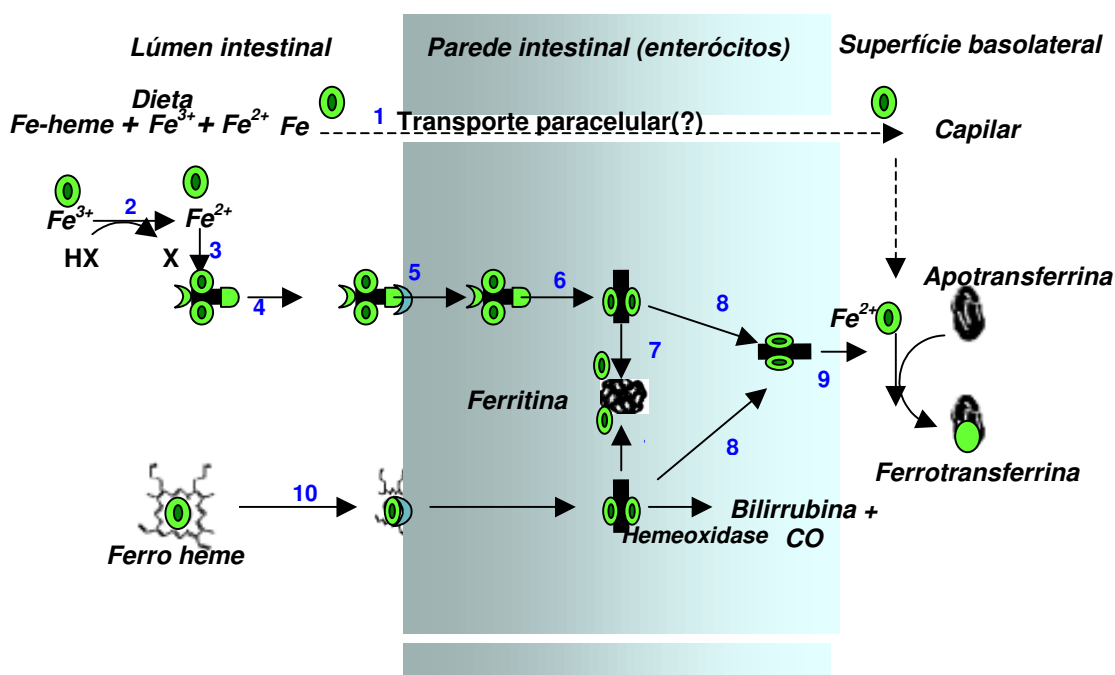
A proteína sérica envolvida no transporte de ferro é a transferrina, uma  $\beta$  glicoproteína sintetizada no fígado, consistindo de uma cadeia polipeptídica simples de 78.000 Da com dois sítios de ligação. Embora muitos outros metais liguem-se à transferrina, esta possui uma maior afinidade pelo ferro. A transferrina não se liga ao íon ferroso. A ligação de cada íon férrico é absolutamente dependente de uma ligação de ânion, que no estado fisiológico é o carbonato como indicado abaixo:



A ferritina é a principal proteína envolvida no estoque de ferro. A apoferritina consiste de 24 subunidades de mistura variada de cadeias H (21.000 Da) e cadeias L (19.000 Da) fornecendo uma variedade de formas isotópicas. A quantidade de ferro no polipeptídeo não é constante, pois a proteína tem a habilidade de ganhar e distribuir ferro de acordo com as necessidades fisiológicas. Com uma capacidade de 4.500 átomos de ferro, a molécula contém usualmente menos de 3.000. Quando o ferro está em excesso, a capacidade de armazenamento de apoferritinas recém sintetizadas pode ser excedida. Esse ferro liga-se à hemossiderina, que é outra proteína especializada no armazenamento do ferro (Devlin, 1998).

A absorção de ferro é influenciada pela biodisponibilidade de ferro da dieta, quantidade de ferro armazenada e taxa de produção de eritrócitos (Conrad *et al*, 1999). Não há absorção de ferro na boca, esôfago ou estômago. O baixo pH do conteúdo estomacal permite a redução do ferro férrico para o estado ferroso, facilitando a dissociação dos ligantes. O maior sítio de absorção do ferro é no intestino delgado com maior quantidade absorvida no duodeno, e um gradiente de absorção menor ocorre na porção distal do intestino delgado. A grande quantidade de bicarbonato secretada pelo pâncreas neutraliza o material ácido vindo do estômago e, dessa forma, favorece a

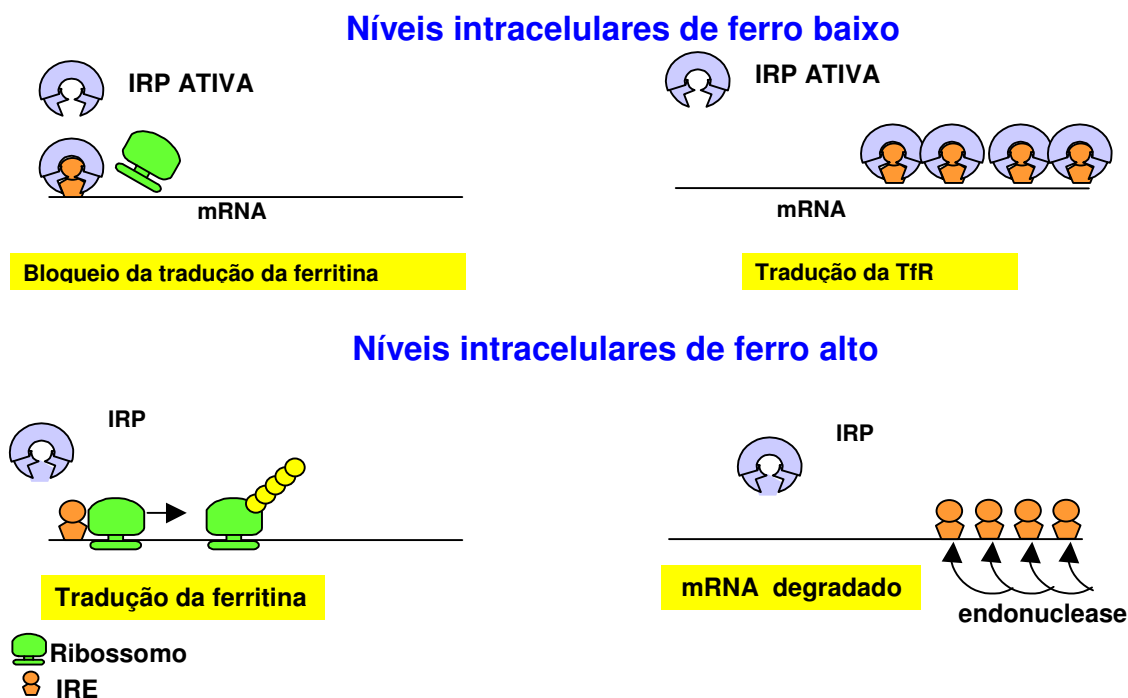
oxidação do íon ferroso para o estado férrico (Beard *et al*,1996; Devlin, 1998). A figura 5 mostra, esquematicamente, a absorção de ferro em mamíferos (Beard *et al*,1996).



**Figura 5:** Esquema da absorção de ferro proveniente da dieta em mamíferos (adaptado de Beard, J.L., 1996).

(1) Absorção do ferro via caminho paracelular. (2) Redução do ferro férrico em ferro ferroso. (3) O ferro ferroso é complexado por quelantes e é, então, transferido para uma proteína ligante fora do lúmen. (4) A proteína ligadora de ferro liga-se a um transportador específico na superfície luminal do enterócito. (5) O ferro não heme é transportado para o interior do enterócito. (6) O ferro é transferido para um quelante de baixo peso molecular ou para uma proteína como a transferrina. (7) A proteína distribui o ferro para a ferritina da célula da mucosa (8) ou para a superfície basolateral do enterócito. (9) O ferro absorvido que não foi sequestrado pela ferritina é distribuído para a superfície basolateral do enterócito e oxidado para ligar-se à transferrina. (10) O ferro heme liga-se a seu receptor e é internalizado. Após entrar na célula, o heme é degradado pela enzima hemeoxidase que libera o ferro, monóxido de carbono e bilirrubina. Esse ferro entra no pool de ferro e é processado como ferro não heme.

A figura 6 mostra o controle da captação e armazenamento celular do ferro.



**Figura 6:** Esquema da regulação da homeostase de ferro (adaptado de Kaur & Andersen., 2004).

A principal rota de captação do ferro é através do receptor de transferrina (TfR) na superfície celular. Cada TfR liga-se a uma transferrina (Tf) e internaliza-a via endocitose. O pH ácido do endossomo leva o ferro a dissociar-se da transferrina e do receptor de transferrina o qual volta à superfície celular. O ferro liberado liga-se à ferritina para o estoque e uma pequena quantidade é deixada livre na forma de um *pool* lábil de ferro. A homeostase do ferro intracelular é alcançada a nível traducional por duas proteínas citoplasmáticas, as proteínas responsivas ao ferro (IRP), IRP1 e IRP2 (Kaur e Andersen, 2004). O ferro regula a síntese de ferritina e do receptor de

transferrina através da interação IRP/mRNA. (Theil, 1990). Quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos, as IRPs ligam-se aos elementos responsivos ao ferro (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 mRNA do receptor de transferrina prevenindo sua clivagem pela endonuclease, favorecendo sua tradução (Ponka, 1999; Kaur & Andersen, 2004).

Apesar desses mecanismos de controle da absorção de ferro, os mamíferos podem deparar com uma situação onde os níveis de ferro absorvidos da dieta são maiores que suas necessidades o que pode levar a um quadro patológico. Esta questão tem implicações importantes, principalmente, porque estudo publicado, em 2002 por Fleming *et al*, demonstrou que o consumo de ferro em doses acima de 30mg/dia, consumo acima de 21 porções de fruta/semana ou acima de 7 porções de carne vermelha/semana aumentam os estoques de ferro. O que sugere que indivíduos consumidores de altas doses de suplementação de ferro, alta ingestão de carne vermelha e alto consumo de frutas apresentam altos níveis de ferritina sérica. Alguns trabalhos vêm demonstrando os mecanismos pelos quais este acúmulo de ferro pode ocorrer. Até o momento, apenas alguns elementos desse processo já foram identificados e parecem envolver a regulação ao nível molecular da síntese de proteínas e sinalizadores que controlam a liberação de ferro dos enterócitos para os capilares basais na mucosa do intestino (Brittenham, 1994; McKie *et al*, 2000).

## **2.4 Efeitos deletérios do ferro**

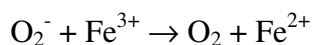
### **2.4.1 Ferro e formação de radicais livres**

As graves consequências do excesso de ferro são demonstradas por doenças genéticas humanas incluindo hemocromatose e ataxia de Friedrich. A ataxia de Friedrich é uma doença hereditária recessiva, neurodegenerativa causada pela deficiência do gene que codifica a frataxina, uma proteína mitocondrial que está envolvida na regulação do transporte de ferro para fora da mitocôndria. O decréscimo

de frataxina causa o excesso de ferro na mitocôndria (Schmitt *et al*, 2004). Já a Hemocromatose é um erro inato do metabolismo de ferro que resulta em uma absorção excessiva de ferro no intestino e depósitos no tecido podendo levar à cirrose hepática (Liu *et al*, 2005). A grande maioria dos casos são por mutação no gene HFE. A proteína HFE interage com o receptor de transferrina na superfície das células, regulando a capacidade de captação. Onde há uma mutação em HFE que impede a ligação ao receptor, mais transferrina liga-se aumentando os estoques de ferro em algumas células. (Cohen, 1998).

Embora o potencial redox do ferro explique porque o ferro é um constituinte essencial para várias atividades bioquímicas, ele também é responsável pela sua potencialidade tóxica para células e tecidos: potencial de se combinar para formar radicais livres (Hentze & Kühn, 1996; Lee *et al*, 1999; Chau, 2000; Lieu *et al*, 2001; Mueller *et al*, 2001; Papanikolaou & Pantopoulos, 2005). Concentrações de ferro livre são particularmente baixas por duas razões:  $\text{Fe}^{3+}$  não é solúvel em água e  $\text{Fe}^{2+}$  participa na formação de radicais livres. Assim, um aumento nas concentrações de ferro livre, extracelulares ou intracelulares, que pode ser o resultado de deficiência de proteína dietética, baixas concentrações de ferro ligado a proteínas, ou dano celular, promove a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica, e estresse oxidativo (Fang *et al*, 2002).

O ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) inicia a peroxidação de lipídios via a série de reações Haber-Weiss:



Radicais livres são moléculas que têm um elétron desemparelhado na órbita exterior. Em geral, são instáveis e muito reativos e reagem com diversos compostos e estruturas celulares. Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos danosos de reações dessas espécies reativas de oxigênio com diversos alvos celulares (Fang *et al*, 2002).

O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas espécies incluem radicais livres, tais como, radicais ânions superóxido ( $\text{O}_2^-$ ),

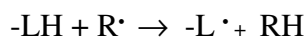


radicais hidroxilas ( $\text{OH}^\bullet$ ) e espécies não radicais livres como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Essas formas são, freqüentemente, geradas através de produtos oxidados de reações biológicas ou fatores exógenos (Cerutti 1991; Gulcin *et al*,2002).

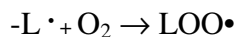
Parece que os radicais livres tiveram um papel importante na origem da vida. Por exemplo, os radicais de oxigênio mostram ações críticas tais como transdução de sinais e transcrição de gene. O NO é uma das moléculas sinalizadoras mais difundidas e participa de todas as células e funções orgânicas do corpo. O efeito citotóxico de radicais livres leva a danos nas células de mamíferos e medeia a patogênese de muitas doenças crônicas, mas também é responsável por matar o patógeno através de macrófagos ativados e outros fagócitos no sistema imune. Assim, há “duas faces” dos radicais livres na biologia; eles servem tanto como moléculas sinalizadoras e reguladoras a níveis fisiológicos, como oxidantes altamente danosos e citotóxicos a níveis patológicos (Fang *et al*, 2002).

Durante o metabolismo normal da célula, superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ) podem ser produzidos por reações enzimáticas através de vários caminhos: oxidação de NADPH pela NADPH oxidase; oxidação de xantina ou hipoxantina pela xantina oxidase; oxidação de equivalentes reduzidos (por exemplo, NADH, NADPH, e  $\text{FADH}_2$  via sistema de transporte de elétrons mitocondrial), etc. A superóxido dismutase (SOD) converte a maior parte dos  $\text{O}_2^-$  gerados em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), uma molécula menos reativa pela reação:  $2 \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$  (Fang *et al*, 2002)

Quando os radicais livres ( $\text{R}^\bullet$ ) e outras espécies reativas extraem um átomo de hidrogênio da cadeia de um ácido graxo polinsaturado, um radical lipídico carbono ( $\text{L}^\bullet$ ) é produzido



O radical carbono formado reage com o  $\text{O}_2$  e o radical peroxil é formado.



O radical peroxil formado ( $\text{LOO}^\bullet$ ) propaga a peroxidação da reação em cadeia pela abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado. O hidroperóxido de lipídio resultante ( $\text{LOOH}$ ) pode decompor-se facilmente formando um radical

lipídico alcoolxil (LO•). Essas séries de espécies reativas de oxigênio iniciadas pelas reações de peroxidação lipídica com a produção de lipídios peroxil e radicais de alcoolxil, chamada de propagação em cadeia, ocorrem em células de mamíferos (Fang *et al*, 2002).

Exposições prolongadas a radicais livres, mesmo a uma baixa concentração, podem resultar no dano de moléculas biologicamente importantes e levar à mutação de DNA, dano no tecido, e doenças. (Fang *et al*, 2002).

#### **2.4.2 Relação entre ferro e risco de doenças cardiovasculares**

Em 1981, Sullivan propôs que estoques reduzidos de ferro protegem contra doenças cardíacas. Ele discutiu que a diferença na incidência da doença cardiovascular entre homens e mulheres pudesse ser explicada através das diferenças nos níveis de ferro armazenado. Argumentou, também, em defesa de sua teoria que falha no miocárdio acontece em pacientes com desordens de armazenamento de ferro e que, em homens, há acúmulo de ferro armazenado com a idade e, depois da menopausa, em mulheres (Sullivan, 1981). Estudos anteriores ao de Sullivan mostraram que o risco de doença cardíaca em mulheres aumentava proporcionalmente com a menopausa natural ou cirúrgica. Fatores uterinos, especialmente perda de sangue menstrual, além de fatores hormonais, poderiam ser responsáveis pela proteção da mulher antes da menopausa contra doenças cardiovasculares (Kannel *et al*, 1976 e Gordon *et al*, 1978).

Em 1991, Lauffer *et al* verificaram uma relação significativa entre estoque de ferro e mortalidade cardiovascular.

Em 1992, Salonen *et al* publicaram um estudo que resgatou a hipótese do ferro e DCV, com 1931 homens finlandeses, selecionados randomicamente. Eles verificaram que altos níveis de estoque de ferro armazenado, avaliados pela concentração de ferritina sérica, eram fatores de risco para DCV. A diferença entre níveis de ferritina sérica não foi explicada pelo consumo de álcool ou processos inflamatórios, causas famosas de altos níveis de ferritina sérica. Homens com concentração de ferritina sérica acima de 200 µg/L tiveram 2,2 vezes mais chance de infarto do miocárdio que os homens com valores menores. A associação foi mais forte em homens com níveis de

LDL altos o que sugere um papel sinérgico de altos estoques de ferro e LDL que foi, também, verificado por Lauffer.

Morrison *et al*, em 1994, estudaram homens e mulheres canadenses e verificaram uma associação entre níveis de ferro sérico e risco de infarto agudo no miocárdio em pessoas de ambos os sexos. A concentração de ferritina sérica não foi utilizada. Como Salonen *et al*, eles observaram um risco maior para homens com níveis de ferro sérico mais elevado e altos níveis de colesterol sérico. Valk & Mark, 1999, questionaram este estudo e outros que usam ferro sérico como um parâmetro, alegando que níveis de ferro sérico podem ser influenciados pela inclusão de pessoas com inflamação e doenças crônicas que podem ter níveis de ferro sérico menores e taxas de mortalidade maiores. Resultados podem ser influenciados pela inclusão de pessoas que têm altos níveis de ferro devido à hereditariedade ou secundário a hemocromatose, uma subpopulação de pacientes que têm risco de DCV.

Em 1994, Kiechl *et al* realizaram um estudo assintomático de aterosclerose na carótida avaliado por sonografia e verificaram uma forte correlação entre aterosclerose e estoque de ferro em homens e mulheres que eram mais proeminentes quando associado à hipercolesterolemia. No mesmo ano, Ascherio *et al* verificaram que a incidência de infarto agudo no miocárdio foi maior entre homens que tinham maior ingestão de ferro heme que entre homens com menor ingestão.

Em 1997, Kiechl *et al* revelaram que os níveis de ferritina sérica foram um dos maiores riscos na progressão da aterosclerose. Mudanças no estoque de ferro durante um período de 5 anos modificaram o risco de aterosclerose: a redução do estoque de ferro foi benéfica e o acúmulo aumentou o risco cardiovascular. Níveis de ferritina e colesterol LDL mostraram uma associação sinérgica com a incidência de doença cardiovascular e morte.

Meyers *et al*,1997, e Tuomainen *et al*,1997, realizaram estudos sobre o efeito da doação de sangue em eventos cardiovasculares; ambos estudos apóiam a hipótese do ferro. Tuomainen *et al*,1997, verificaram que o benefício da doação de sangue era maior em homens com níveis séricos mais elevados de colesterol LDL. Nenhum efeito significativo de doação de sangue foi observado em mulheres. Eles verificaram que a doação de sangue reduziu o risco de infarto do miocárdio em 86%.

Tuomainen *et al*, em 2003, estudaram produtos de oxidação de colesterol, oxisteróis, os quais desempenham um papel no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas em humanos. Nesse estudo, eles verificaram a associação entre ferritina sérica e concentrações plasmáticas de oxisteróis. Foram examinados 669 homens. As concentrações de ferritina sérica estavam diretamente relacionadas com as medidas de oxisteróis. Eles concluíram que o excesso de ferro corporal, avaliado pela ferritina sérica, estava associado com o aumento nos níveis de oxisteróis circulantes.

Wells *et al*, em 2004, verificaram que adultos com níveis de ferro elevado, mensurado pela saturação de transferrina, e LDL elevado têm um risco aumentado de mortalidade. Pessoas com níveis de LDL e saturação de transferrina elevados tiveram um aumento significativo na mortalidade devido à DCV comparados com o grupo LDL e saturação de transferrina baixos. Os resultados de seus estudos indicaram que o risco aumentado está associado com a combinação de LDL e saturação de transferrina elevados, o que sugere que a oxidação da LDL mediada por ferro pode ser um fator significativo na progressão de doenças cardiovasculares.

#### **2.4.3 Estudos em humanos que não corroboram com a hipótese do ferro**

Stampfer *et al* (1993), Frey *et al* (1994) e Manttari *et al* (1994) mostraram não haver nenhuma associação entre níveis de ferritina sérica e DCV. Similarmente, Magnusson *et al* (1994) verificaram que a ferritina sérica não era um fator de risco, mas observaram uma relação inversa entre ferritina sérica e risco de infarto agudo do miocárdio. Eles observaram que a capacidade total de ligação de ferro foi um fator de risco negativo. Cada aumento de 1µmol/L na capacidade total de ligação de ferro estava associado com uma diminuição de 5,1% no risco de infarto do miocárdio.

Giles *et al* (1993), Liao *et al* (1994) e Sempos *et al* (1994), com base nos dados do *The First National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study*, não verificaram nenhuma associação entre *status* de ferro, mensurado pelo ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro e saturação da transferrina e risco de infarto agudo do miocárdio. Em um estudo com a população finlandesa, Takkunen *et al*,

1989, verificaram uma relação inversa entre saturação de transferrina e risco de morte devido à doença cardiovascular.

Regnström *et al*, 1994, estudaram os níveis de ferritina sérica, níveis de ferro sérico e capacidade total de ligação do ferro em 94 homens jovens sobreviventes de infarto do miocárdio de 4 a 6 meses após o evento. Eles verificaram que não havia nenhuma diferença nos níveis de ferritina em pacientes comparados com os controles saudáveis. Os pacientes tiveram os níveis de ferro sérico menores e o índice de saturação de transferrina maior. O número e severidade das lesões das artérias coronárias mostraram não haver nenhuma associação com o *status* de ferro.

#### **2.4.4 Estudos em modelos animais**

Interesse no ferro como um fator potencial de risco para doença cardiovascular tem sido estimulado por experimento em animais que mostraram que o excesso de ferro aumenta danos no miocárdio causados pela anoxia e reperfusão e que o uso de quelantes de ferro resultou numa diminuição no dano do miocárdio em vários modelos animais (Babbs, 1985; Myers *et al*, 1985; Badylak *et al*, 1987; Bernier *et al*, 1986; Bolli *et al*, 1987).

Em 1994, Dabbagh *et al* verificaram que o excesso de ferro promoveu um aumento significativo nos níveis de colesterol total e HDL. Eles observaram, também, a depleção de ácido ascórbico no plasma. O estudo foi realizado em ratos tratados com dieta contendo colesterol com o objetivo de estudar o efeito do excesso de ferro sobre níveis de oxidantes no fígado e plasma.

Araújo *et al*, em 1995, com o objetivo de estudar o efeito do excesso de ferro sobre o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em coelhos, observaram que os coelhos alimentados com excesso de ferro e dieta com colesterol desenvolveram mais lesões ateroscleróticas em suas aortas que coelhos alimentados com colesterol sem excesso de ferro. Eles concluíram que esse fato pode estar ligado à oxidação da LDL promovida pelo ferro. O excesso de ferro não promoveu alterações nos níveis de colesterol.

Dabbagh *et al*, em 1997, com o objetivo de estudar o efeito do excesso de ferro sobre aterosclerose em coelhos hipercolesterolêmicos, verificaram que o excesso de

ferro associado à dieta rica em colesterol promoveu um aumento na saturação de transferrina e uma diminuição na capacidade de ligação do ferro, um aumento nos níveis de VLDL e LDL, e os níveis de HDL não sofreram alterações. Os níveis séricos de colesterol total foram maiores nos animais que receberam apenas excesso de ferro.

Pool & Jaarsveld, em 1998, com o objetivo de determinar o efeito do aumento da absorção de ferro da dieta sobre os níveis de lipoproteínas, antioxidantes e hidroperóxido de lipídio em ratos, notaram que o aumento da absorção de ferro da dieta promoveu elevação dos níveis séricos de LDL e não promoveu alterações nos níveis séricos de triglicérides, colesterol total e HDL.

Ponraj *et al*, em 1999, com o objetivo de verificar se as formações de lesões ateroscleróticas em coelhos hipercolesterolêmicos eram retardadas pela depleção de ferro, observaram que o acúmulo de ferro ocorreu no início das lesões ateroscleróticas e que a perda de sangue semanal diminuiu a concentração de ferro na parede das artérias e retardou a formação de lesões ateroscleróticas em animais hipercolesterolêmicos.

Turbino-Ribeiro *et al*, em 2003, com o objetivo de verificar o efeito do excesso de ferro sobre as diversas frações de lipídios séricos e pressão arterial em ratos alimentados com dieta controle ou contendo colesterol, notaram que o ferro alterou o perfil de lipídios séricos, porém os efeitos observados dependeram da dieta utilizada: a dieta hipercolesterolêmica alterou a homeostase do ferro; o excesso de ferro e dieta hipercolesterolêmica não promoveram alterações na pressão arterial e frequência cardíaca; a dieta hipercolesterolêmica promoveu acúmulo de gordura no fígado, efeito este que foi reduzido na presença do excesso de ferro.

## **2.5 Hamster como modelo no estudo de hipercolesterolemia e aterosclerose**

Vários modelos animais têm sido usados no estudo da hipercolesterolemia e aterosclerose. Ratos são resistentes a desenvolver aterosclerose, mesmo com dietas ricas em colesterol. Um dos fatores que contribui para isso pode ser o fato deles não possuírem a proteína de transferência do éster de colesterol (CETP), e a HDL é a principal proteína transportadora de colesterol (Moghadasian *et al*, 2002). Porcos são modelos bem aceitos devido às suas similaridades com humanos, contudo há necessidade de utilizar animais pequenos (Van Tol *et al*, 1991). Coelhos têm sido

utilizados como modelo de aterosclerose pelo rápido desenvolvimento da lesão aórtica (Daley *et al*, 1994). Apesar disso, a VLDL é a principal proteína carreadora de colesterol (Badimon *et al*, 1990). Hamsters e cobaias têm sido utilizados para o estudo dos efeitos da dieta nos níveis dos lipídios plasmáticos e os mecanismos envolvidos. Esses animais apresentam características semelhantes ao do homem (Fernandez *et al.*, 1991; Fernandez, 1995; Fernandez *et al*, 1997 e Fernandez *et al* 1999, Nicolsi & Wilson, 1997). Cobaias são animais LDL, e hamsters desenvolvem aterosclerose quando submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica (Otto *et al.*, 1995).

No estudo realizado por Bravo *et al*, 1994, foram observadas semelhanças entre o metabolismo de colesterol em hamster e homem. Por essa razão, há um crescente interesse no estudo desse animal para comparação com o metabolismo de colesterol. Foi observado, também, similaridade no metabolismo de fosfolipídeos entre essas espécies. Contudo, o hamster é um mamífero HDL, enquanto o homem é um mamífero LDL. O hamster e o homem apresentam a atividade CETP, enquanto o rato não, o que sugere que estudos com metabolismo de lipídios em hamster podem ajudar a entender o metabolismo não só de hamsters, mas também de ratos e humanos.

Os hamsters podem desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose em dietas aterogênicas. Uma dieta contendo 0,2% de colesterol e 10% de óleo de coco causou um aumento de 4 vezes no nível de colesterol no plasma e formação de camadas de gordura na aorta ascendente de hamsters machos *Golden Syrian* por período acima de dois meses. A dieta aterogênica resultou em mais de 200% de aumento de lipoproteínas VLDL e IDL, um aumento de 20% na LDL e 45% de diminuição na concentração de HDL comparando com o controle. Entretanto, uma dieta similar rica em gordura causou aumento no peso corporal sem modificar o nível lipídico sanguíneo e a aterogênese em hamsters fêmea *Syrian*. Por outro lado, os machos desenvolveram hiperlipidemia e aterogênese sem alteração significativa no ganho de peso (Moghdasian, 2002).

A indução da enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase (CYP7A1), que converte o colesterol em ácidos biliares através de colesterol dietético, ocorre em rato e camundongo, mas não no humano ou hamster o que sugere que caminhos regulatórios discrepantes podem existir entre espécies (Zhang & Mangelsdorf, 2002).

Como podemos observar, as associações entre indicadores do estoque de ferro e doenças cardíacas são inconsistentes. Embora não haja consenso entre efeitos nocivos do excesso de ferro e DCV, a maioria dos trabalhos em humanos aponta nesse sentido. Assim, é importante estabelecer modelos experimentais que possam esclarecer os mecanismos pelos quais o excesso de ferro afeta o desenvolvimento de doenças cardiovasculares; e, devido às características apresentadas pelo hamster, resolvemos estudar o efeito do tratamento com ferro-dextran neste modelo animal.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do excesso de ferro sobre fatores de risco para aterosclerose em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar o efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre as diversas frações de lipídios séricos.
2. Avaliar o efeito da dieta hipercolesterolêmica sobre a homeostase do ferro.
3. Avaliar o efeito do excesso de ferro sobre as diversas frações lipídicas
4. Avaliar a interação do excesso de ferro e dieta hipercolesterolêmica sobre diversas frações de lipídios séricos e homeostase do ferro.
5. Investigar o efeito da dieta hipercolesterolêmica e do excesso de ferro sobre o estresse oxidativo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

No ensaio biológico, foram utilizados 80 hamsters, *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 normas descritas em Canadian Council on Animal Care (1984).

### 4.2 Dietas

A dieta controle foi preparada segundo as recomendações da AOAC, 1980. A dieta hipercolesterolêmica diferiu da controle na quantidade de óleo de soja, colesterol e fibra (tabela 1); uma maior quantidade de fibra foi utilizada na dieta hipercolesterolêmica para que as dietas fossem isocalóricas. Elas foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto e foram acondicionadas em vasilhas plásticas e armazenadas a – 20C°. O excesso de ferro foi obtido com injeções de ferro dextran (descrito posteriormente). Durante o experimento, as dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*.

**Tabela 1: Composição das dietas controle e hipercolesterolêmica em gramas para cada 1000g da dieta.**

Nutrientes	Dietas	
	Controle	Hipercolesterolêmica
Caseína	120	120
Mistura de sais <sup>a</sup>	50	50
Mistura de vitaminas <sup>b</sup>	10	10
Óleo	80	170
Colesterol	—	5
Colina	0,4	0,4
Celulose	10	120
Maisena	729,6	524,6
Calorias	4118,4	4153,4

<sup>a</sup>Mistura de sais (expresso por g/Kg da mistura): NaCl – 139,3 / KI- 0,79 / MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O- 57,3 / CaCO<sub>3</sub>- 381,4 / MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 4,01 / FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 27,0 / ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O- 0,548 / CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O – 0,477 / CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O – 0,023; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 389,0. <sup>b</sup>Mistura de vitaminas (expresso por em g/kg da mistura): acetado de retinol – 2.000.000 IU / colecalciferol – 200.000 IU / 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 –0,04 / vitamina B12 –0,003 / sacarose – q.s.p. 1.000 / α- tocoferol 10.000 IU.

### 4.3 Desenho experimental

*Experimento I:* 40 hamsters, *Golden Syrian* machos, foram divididos em 4 grupos de 10 de acordo com a dieta recebida: Grupo C (recebeu dieta controle); Grupo CF (recebeu dieta controle mais injeção de ferro dextran); Grupo H (recebeu dieta hipercolesterolêmica); Grupo HF (recebeu dieta hipercolesterolêmica mais injeção de ferro dextran). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais. O experimento durou 9 semanas. Na sétima semana, os grupos C e H receberam injeções diárias de 0,1mL/dia/5dias de salina a 0,9%. Os grupos CF e HF receberam 0,1mL/dia/5dias de ferro-dextran (100mg/mL). O peso e a ingestão foram acompanhados semanalmente.

Na nona semana, os animais foram anestesiados e sacrificados. Foram determinados os seguintes parâmetros:

Biológicos: ingestão alimentar, ganho de peso, peso do fígado.

Lipídios: níveis séricos de colesterol, HDL, LDL, VLDL, triglicérides.

Função hepática: atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

*Experimento II.* Os procedimentos utilizados foram idênticos aos do experimento I, exceto que os animais foram mantidos em gaiolas coletivas.

Na nona semana, os animais foram anestesiados e sacrificados. Foram determinados os seguintes parâmetros:

Biológicos: peso dos animais, do fígado, do baço, do coração e dos rins.

Lipídios: colesterol, HDL, LDL VLDL, triglicérides.

Ferro no soro e tecido: concentração de ferro, capacidade latente de ligação de ferro (CLLF), capacidade total de ligação de ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (%IST), transferrina e ferro no baço.

Metabólitos séricos: proteínas totais, albumina e ácido úrico.

Estresse oxidativo: níveis séricos e no fígado de malondialdeído, 4-hidroxiacetaldeído e *status* sérico de antioxidante total.

#### **4.4 Parâmetros biológicos**

##### **4.4.1 Peso corporal, ingestão alimentar**

As duas primeiras semanas foram de adaptação às dietas e o ganho de peso foi determinado, semanalmente, a partir da terceira semana. A ingestão alimentar foi determinada durante a sétima semana quando, também, diariamente, foi determinada a diferença entre a dieta oferecida e a sobras no pote e na bandeja.

#### 4.4.2 Peso do fígado, do baço, do coração, dos rins

Os animais foram anestesiados, o abdômen foi aberto e o sangue recolhido em tubos de plástico de 1,5mL, os órgãos foram extraídos e pesados. O baço foi acondicionado em papel alumínio e congelado a -20°C para posterior dosagem de ferro.

#### 4.5 Lipídios no soro

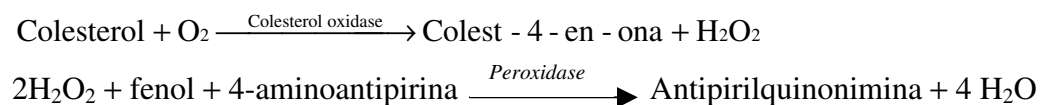
##### 4.5.1 Obtenção do soro

Após 12 horas de jejum, na 9ª semana, os animais foram anestesiados com éter etílico, por via inalatória e, através do plexo axilar, as amostras de sangue foram colhidas. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro.

##### 4.5.2 Dosagem de colesterol total

###### Princípio da técnica:

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e o 4-aminoantipirina são oxidados formando o antipirilquinonimina de cor vermelha que tem absorvidade máxima a 500nm.

###### Execução da técnica

Foram utilizados 10µL do soro e 1000µL do reagente de cor\* e incubados a 37°C durante 10 minutos. Um padrão foi feito da mesma forma utilizando uma solução de

colesterol 200mg/dL. Para zerar o aparelho, foi utilizado o reagente de cor. Logo após, foram determinadas as absorvâncias do teste e do padrão a 500nm.

Para obter a concentração de colesterol nas amostras, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância da amostra teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 200$$

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,026 = Unidades SI (mmol/L)

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 60-2/100, MS: 10009010002, Lagoa Santa, MG, Brasil.

\* O reagente de cor contém tampão 50mmol/L, pH 7,0; fenol 24,0mmol/L; colato de sódio 0,5mmol/L; azida sódica 1,5mmol/L; colesterol esterase  $\geq 250\text{U/L}$ ; colesterol oxidase  $\geq 150\text{U/L}$  e peroxidase  $\geq 1.000\text{U/L}$

### 4.5.3 Dosagem do colesterol HDL

#### Princípio da técnica

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas\* e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

#### Precipitação das VLDL e LDL

25 $\mu\text{L}$  de soro foram misturados a 0,25mL do precipitante e agitados vigorosamente durante 30 segundos. Em seguida, foram centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos para obter um sobrenadante límpido que foi pipetado.

\*Agente precipitante contém ácido fosfotúngstico 1,5mmol/L e cloreto de magnésio 54mmol/L

**Execução da técnica.**

1000 $\mu$ L do reagente de cor foram misturados a 10 $\mu$ L da amostra do sobrenadante obtido na precipitação de VLDL e LDL, levados ao banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Um padrão foi feito da mesma forma utilizando uma solução de colesterol 40mg/dL. Para “zerar” o aparelho, foi utilizado o reagente de cor. Em seguida, foram determinadas as absorvâncias do teste e do padrão em 500nm.

Para obter a concentração de HDL nas amostras, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{HDL - C (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,026 = Unidades SI (mmol/L)

Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 13, MS: 10009010026, Lagoa Santa, MG, Brasil.

O reagente de cor utilizado foi o mesmo do colesterol enzimático.

**4.5.4 Dosagem do colesterol VLDL e do colesterol LDL**

As concentrações do colesterol VLDL e LDL foram calculadas através da Equação de Friedewald (Friedewald *et al* 1972):

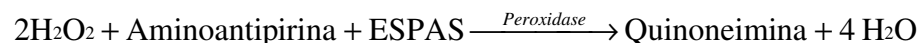
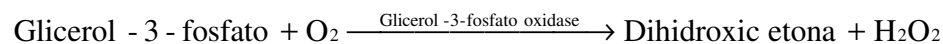
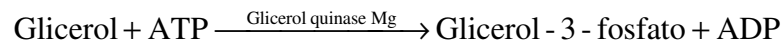
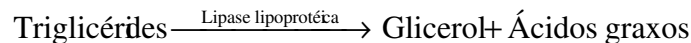
$$\text{VLDL} = \frac{\text{triglicérides}}{5}$$

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

#### 4.5.5 Dosagem de triglicérides

##### Princípio da técnica

Os triglicérides são determinados de acordo com as seguintes reações:



ESPAS: N-etil N-sufopropil n- anizidine

O glicerol liberado na hidrólise dos triglicérides, reação catalisada pela lipase lipoprotéica, é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento que ocorre entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS é catalisada pela peroxidase produzindo a quinoneimina que tem máximo de absorbância em 540nm.

##### Execução da técnica

1000µL do reagente de cor\* foram misturados a 10µL da amostra do soro e levados ao banho-maria à 37°C durante 10 minutos. Na amostra Padrão, foram misturados 1000µL do reagente de cor a 10µL do Padrão de Glicerol com concentração de 200mg/dL. Para “zerar” o aparelho, foi utilizado o reagente de cor. Em seguida, foram determinadas as absorbâncias do teste e do Padrão em 540 nm.

\* O Reagente de cor foi preparado da seguinte forma: parte do conteúdo do frasco de tampão foi transferida para o frasco contendo enzimas. As enzimas dissolvidas foram retornadas para o frasco de tampão e homogeneizadas por inversão.

Composição da solução contendo enzimas: 4-aminoantipirina 35µmol, ATP 14µmol, glicerolquinase ≥ 40U, glicerolfosfato oxidase ≥ 125U, lipase lipoprotéica ≥ 5000U e peroxidase ≥ 18U.



Composição da solução contendo tampão: PIPES (ácido 1,4 piperazina-dietonosulfônico) 50mmol/L pH 6,5, acetato de magnésio 5mmol/L, ESPAS 1,0mmol/L e azida sódica 1,54mmol/L

Para obter a concentração de triglicérides nas amostras, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,0113 = Unidades SI (mmol/L)

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 59-4/50, MS: 10009010021, Lagoa Santa, MG, Brasil.

## 4.6 Ferro no soro e no baço

### 4.6.1 Níveis de ferro no baço

#### Preparo da amostra

Os baços foram descongelados e amostras com cerca de 100mg foram colocadas em tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 0,5mL de ácido nítrico concentrado. Logo após, estes foram aquecidos a 100°C até total digestão do tecido e evaporação do ácido. O resíduo foi dissolvido com 0,2mL de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, o material foi transferido para um balão volumétrico com capacidade de 10mL e o volume foi completado com água deionizada.

#### Dosagem de ferro nas amostras

A solução obtida nesse procedimento foi utilizada para dosagem de ferro no baço, através do método colorimétrico, de acordo com a AOAC (1980): a 0,4mL da solução obtida foram adicionados 0,2mL de solução hidroxilamina a 10%; 4,2mL do tampão acetato 2mol/L pH 3,5 e 0,2mL de orto-fenantrolina a 0,1%. A leitura em espectrofotômetro foi feita a 510nm, contra um branco contendo 0,4mL de água deionizada, 0,2mL de solução hidroxilamina a 10%; 4,2mL do tampão acetato 2mol/L

pH 3,5 e 0,2mL de orto-fenantrolina a 0,1%. A curva padrão foi preparada a partir de uma solução padrão de Fe 500µg/dL. (Anexo I)

#### 4.6.2 Dosagem de ferro sérico

##### Princípio da técnica

Os íons férricos são dissociados da transferrina por ação de um tampão de pH ácido e reduzido a íons ferroso por ação da hidroxilamina.

Após a adição da Ferrozine forma-se um complexo magenta brilhante que tem máxima absorvância em 560nm.

##### Execução da Técnica

Todo o material usado no procedimento foi tratado com solução de ácido nítrico 10% durante uma noite, lavado com água corrente e enxaguado com água deionizada, para evitar a obtenção de resultados incorretos devido à contaminação com traços de ferro.

Esta dosagem foi feita segundo o método de Cardoso *et al*, 2003, com modificações:

200µL da amostra do soro foram misturados com 2,5mg de bromelina (Sigma Co.), 3mg de L-cisteína (Merck) e 500µL de tampão acetato 1M, pH 5 e incubados a 25°C por 60 minutos. A seguir, foram adicionados 500µL do tampão do Kit de ferro sérico Labtest, Cat 38, ANVS: 10009010014, Lagoa Santa, MG, Brasil (pH4,5 contendo hidroxilamina). Um branco e um padrão foram feitos da mesma forma, exceto que água ou uma solução de concentração 500µg/dL de ferro foram usadas em substituição ao soro, respectivamente. Após homogeneização, foram determinadas as absorvâncias do teste em 560nm, acertando o zero com o branco. Foram obtidas as absorvâncias  $A_1$ . Em seguida, foram adicionados 25µL de ferrozine, em cada tubo, que foram homogeneizados e incubados em banho-maria à 37°C por 10 minutos. Foram obtidas as absorvâncias do teste e do padrão em 560nm, acertando o zero com o branco. As absorvâncias do teste foram  $A_2$  e as absorvâncias do padrão foram  $A_p$ .

O ferro sérico foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Ferro sérico} = \frac{A_2 - A_1}{A_p} \times C_p$$

$A_p$  = absorvância do padrão

$A_1$  = Absorvância do teste antes da adição de ferrozine.

$A_2$  = Absorvância do teste após adição de ferrozine.

$C_p$  = Concentração do padrão.

Conversão: Unidades Convencionais ( $\mu\text{g/dL}$ )  $\times 0,179$  = Unidades SI ( $\mu\text{mol/L}$ )

#### 4.6.3 Dosagem da capacidade de ligação do ferro

Um padrão de ferro com concentração conhecida ( $500\mu\text{g/dL}$ ) é incubado com soro em um tampão de pH 8,5. Ocorre, então, a saturação dos sítios disponíveis para ferro na proteína transportadora (transferrina). Após adição de ferrozine, o excesso de ferro não ligado forma um complexo magenta brilhante permitindo a determinação da capacidade de ligação de ferro.

##### Execução da Técnica

Todo o material usado no procedimento foi tratado com solução de ácido nítrico 10% durante uma noite, lavado com água corrente e enxaguado com água deionizada, para evitar a obtenção de resultados incorretos devido à contaminação com traços de ferro.

$500\mu\text{L}$  do tampão foram misturados a  $50\mu\text{L}$  da amostra de soro,  $120\mu\text{L}$  de água e  $170\mu\text{L}$  do padrão. Na amostra do Padrão, foram misturados  $670\mu\text{L}$  de água deionizada e  $170\mu\text{L}$  do Padrão de Ferro com concentração de  $500\mu\text{g/dL}$ . Após homogeneizar e incubar em banho-maria à  $37^\circ\text{C}$  por 10 minutos foram determinadas as absorvâncias do Teste em  $560\text{nm}$ , acertando o zero com o branco. A absorvância do Teste foi  $A_1$ . Logo após, foram adicionados em cada tubo  $25\mu\text{L}$  de ferrozine, homogeneizados e incubados em banho-maria à  $37^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Foram determinadas as absorvâncias do Teste

e do Padrão em 560nm, acertando o zero com o branco. As absorvâncias do Teste foram  $A_2$  e as absorvâncias do Padrão foram  $A_p$ .

A capacidade latente de ligação do ferro (CLLF) foi calculada da seguinte forma:

$$CLLF = 500 - \frac{(A_2 - A_1)}{A_p} \times 500$$

$$\boxed{\phantom{CLLF = 500 - \frac{(A_2 - A_1)}{A_p} \times 500}}$$

$A_p$  = absorvância do Padrão

$A_1$  = Absorvância do Teste (1ª leitura).

$A_2$  = Absorvância do Teste (2ª leitura).

Conversão: Unidades Convencionais ( $\mu\text{g/dL}$ ) x 0,179 = Unidades SI ( $\mu\text{mol/L}$ )

Após a determinação da capacidade latente de ligação de ferro (CLLF), foi calculada a capacidade total de ligação de ferro (CTLF), o índice de saturação da transferrina (IST) e a transferrina.

$$\boxed{CTLF (\mu\text{g/dL}) = \text{Ferro sérico} + CLLF}$$

$$\boxed{IST(\%) = \frac{\text{ferro sérico}}{CTLF} \times 100}$$

$$\boxed{\text{Transferrina (mg/dL)} = CTLF \times 0,7}$$

Esta dosagem foi feita utilizando o método de Goodwin modificado kit Labtest, cat 41, ANVS: 10009010013 Lagoa Santa, MG.

## 4.7 Metabólitos séricos

### 4.7.1 Dosagem de albumina

#### Princípio da técnica

A albumina possui a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes.

O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando se liga à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente à 630nm, sendo proporcional à concentração de albumina na amostra.

#### Execução da técnica

1000µL do reagente de cor\* foram misturados a 10µL da amostra do soro. Na amostra do padrão, foram misturados 1000µL do reagente de cor a 10µL do Padrão de proteínas com concentração de 3,8mg/dL. Para zerar o aparelho, foi utilizado o reagente de cor. Após homogeneizar e aguardar 2 minutos, foram determinadas as absorvâncias do teste e do Padrão em espectrofotômetro à 630nm.

\* Reagente de cor: contém tampão 60mmol/L, pH 3,8; verde de bromocresol 300µmol/L e brj 35 ≥ 6,0mmol/L

Para obter a concentração de albumina, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Albumina (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 3,8$$

Conversão: Unidades Convencionais (g/dL) x 144,9 = Unidades SI (µmol/L)

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 19, Lagoa Santa, MG, Brasil.

#### 4.7.2 Dosagem de proteínas totais

##### Princípio da Técnica

Os átomos de nitrogênio formam complexos (-HN-CO-) com íons cúpricos em meio alcalino (Reagente de Biureto) formando um complexo de coloração violeta, cuja absorvância medida em 545nm é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

##### Execução da técnica

1250µL do reagente de Biureto foram misturados a 25µL da amostra de soro. Na amostra do Padrão, foram misturados 1250µL do reagente de Biureto, 25µL do Padrão de Proteína com concentração de 4,0g/dL . Para zerar o aparelho, foi utilizado o branco. Após homogeneizar e aguardar 15 minutos, foram determinadas as absorvâncias do teste e do padrão em espectrofotômetro à 545nm.

Para obter a concentração de proteínas, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 4$$

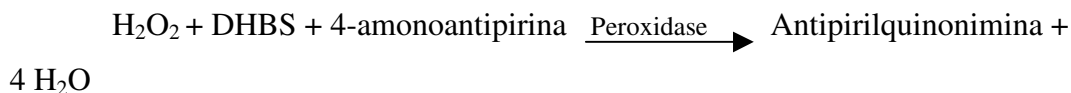
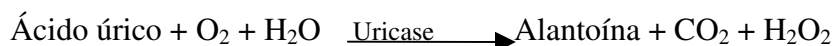
Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 10 = Unidades SI (g/L)

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 18, MS: 10009010043, Lagoa Santa, MG, Brasil.

#### 4.7.3 Dosagem de ácido úrico

##### Princípio da Técnica

O ácido úrico é determinado de acordo com as seguintes reações:



DHBS: 3,5- dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonado.

O ácido úrico é oxidado pela uricase a alantoína e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio na presença de peroxidase reage com o DHBS e a 4-aminoantipirina, formando o cromogênio antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.

### Execução da Técnica

1000µL da solução do reagente de trabalho\* foram misturados à 20µL da amostra de soro. Na amostra do Padrão, foram misturados 1000µL da solução de uricase tamponada a 20µL do \*\*Padrão. Ambos foram colocados em banho-maria à 37°C durante 10 minutos. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 520nm, acertando o zero com o branco.

Para obter a concentração, foi utilizada a seguinte fórmula:

\*Conjunto de um frasco do reagente 1 e um frasco do reagente 2.

- Reagente 1: tampão 80mmol/L pH 7,5, 4-aminoantipirina 0,82mmol/L, peroxidase  $\geq$  16.000U/L, azida sódica 0,8mmol/L e surfactante.
- Reagente 2: tampão 80mmol/L pH 7,5, DHBS 10mmol/L , uricase  $\geq$  500U/L, surfactante e azida sódica 0,8mmol/L.

\*\* Padrão: 6,0mg/dL

$$\text{Ácido úrico (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 6$$

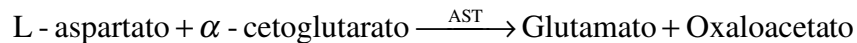
Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 59,5 = Unidades SI (µmol/L)

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 73, MS: 10009010071, Lagoa Santa, MG, Brasil.

#### 4.7.4 Dosagem de aspartato aminotransferase (AST)

##### Princípio da Técnica

A aspartato aminotransferase (AST ) promove a transferência de grupamentos alfa amino dos aminoácidos para  $\alpha$  cetoácidos.



O oxaloacetato formado reage com 2,4-difenilhidrazina formando hidrazona, que tem cor intensa em meio alcalino.

##### Execução da Técnica

125 $\mu$ L de substrato para AST foram adicionados em um tubo de ensaio, colocados em banho-maria à 37°C por 2 minutos. Foram adicionados ao mesmo tubo 25 $\mu$ L da amostra que, após homogeneização, todo o material foi incubado em banho-maria à 37°C por 60 minutos exatamente. A reação foi interrompida pela adição de 125 $\mu$ L do reagente de cor\*. Após 20 minutos, foram misturados 1250 $\mu$ L de NaOH 0,4mol/L e depois de 5 minutos foram determinadas as absorvâncias em 505nm.

Para obter a atividade enzimática da amostra, foi traçada uma curva de calibração (anexo II) correlacionando as leituras obtidas com os valores em URF/mL fornecidas pelo fabricante do kit.

\*Reagente de cor contém: 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0mmol/L e ácido clorídrico 1,0mol/L.

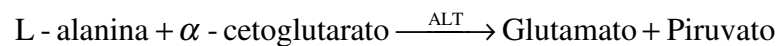
O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 52, ANVS: 10009010031, Lagoa Santa, MG, Brasil.



#### 4.7.5 Dosagem de alanina aminotransferase (ALT)

##### Princípio da técnica

A alanina aminotransferase promove a transferência de grupamentos amina de alfa aminoácidos para alfacetoácidos.



O piruvato formado reage com 2,4 difenilhidrazona que tem intensa cor em meio alcalino.

##### Execução da Técnica

125µL de substrato para ALT foram adicionados em um tubo de ensaio, colocado em banho-maria à 37°C por 2 minutos. Foram adicionados ao mesmo tubo 25µL da amostra e, após homogeneização, todo o material foi incubado em banho-maria à 37°C por 30 minutos exatamente. A reação foi interrompida pela adição de 125µL do reagente de cor. Após 20 minutos, foram misturados 1250µL de NaOH 0,4mol/L e depois de 5 minutos foram determinadas as absorbâncias em 505nm.

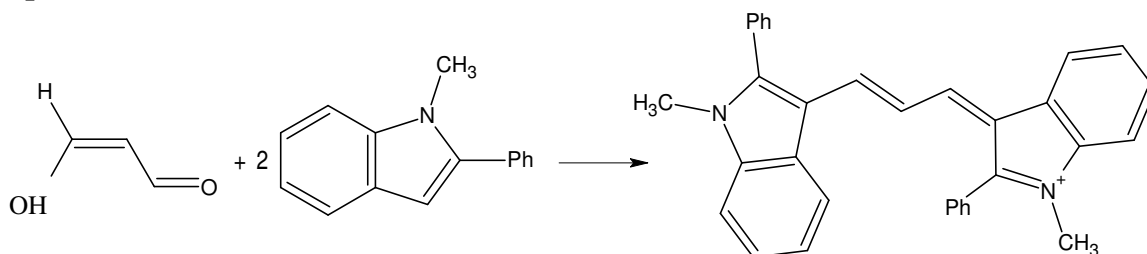
Para obter a atividade enzimática da amostra, foi traçada uma curva de calibração (anexo III), correlacionando as leituras obtidas com os valores em URF/mL fornecidas pelo fabricante do kit.

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Labtest, Cat 53, ANVS: 10009010027, Lagoa Santa, MG, Brasil.

#### 4.8 Estresse oxidativo: níveis séricos e no fígado de malondialdeído, 4-hidroxiálquenal e *status* sérico de antioxidante total.

##### 4.8.1 Dosagem de malondialdeído (MDA) no soro

###### Princípio da Técnica



Malondialdeído reage com N-metil-2-fenilindol e forma um composto colorido que é lido em 586nm.

###### Execução da Técnica

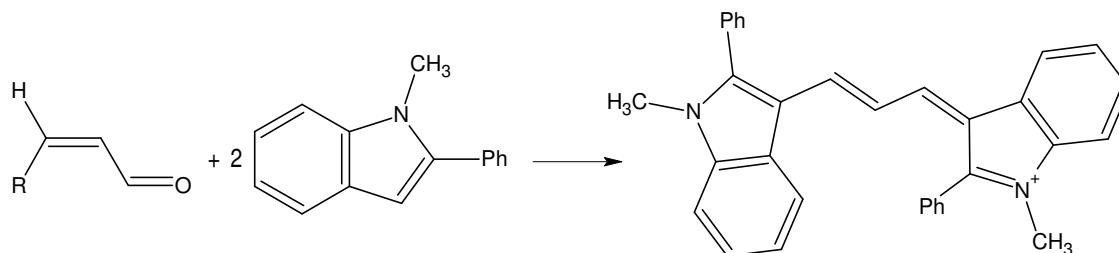
650 $\mu$ L da solução R1\* foram misturados à 100 $\mu$ L da amostra de soro, no homogeneizador, por 5 segundos. Foram adicionados 150 $\mu$ L de HCl 12mol/L, em seguida, incubados, à 45°C por 60 minutos. Após resfriar no gelo, foram determinadas as absorvâncias em 586nm.

\*R1: 6ml de solução de íons férricos (Fe<sup>3+</sup>) dissolvidos em etanol mais 18ml de N-metil-2 fenilindol dissolvido em acetonitrila.

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Calbiochem, Cat 615700, lot B57862, Darmstadt, Alemanha

#### 4.8.2 Dosagem de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxiacetaldeído (HAE) no soro

##### Princípio da Técnica



R= OH; R= hidroxiacetal

Malondialdeído reage com N-metil-2-fenilindol e forma um composto que é lido em 586nm.

##### Execução da Técnica

650µL da solução R1\* foram misturados, no agitador, por 5 segundos, à 200µL da amostra de soro. Foram adicionados 150µL de R2\*\*, em seguida, incubados, à 45°C por 60 minutos. Após resfriar no gelo, foram determinadas as absorvâncias em 586nm.

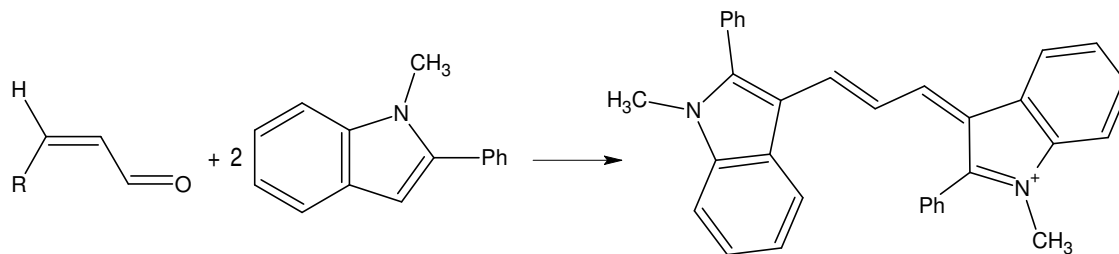
\*R1: 6ml de solução de íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dissolvidos em etanol mais 18ml de N-metil-2 fenil-indol dissolvido em acetonitrila.

\*\*R2: ácido metano sulfônico

Obs.: padrão usado-. 1,1,3,3-tetrametoxi-propano.

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Calbiochem, Cat 615700, lot B57862, Darmstadt, Alemanha

### 4.8.3 Dosagem de malondialdeído (MDA) no fígado



#### Preparação do tecido

Amostras do tecido foram perfundidas com NaCl (150mmol/L)/ EDTA (100mmol/L). Em seguida, os tecidos foram lavados em 20mmol/L de PBS. Logo após, eles secos em papel absorvente e pesados. Depois, os tecidos foram homogeneizados e diluídos em 20mmol de PBS. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.000 g, durante 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi utilizado como amostra do tecido.

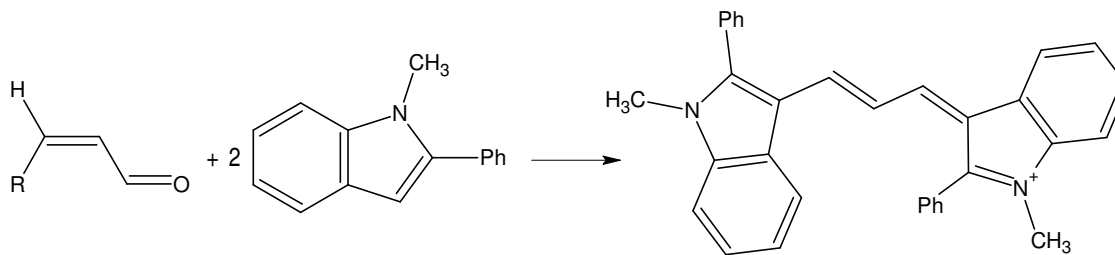
#### Execução da Técnica

650µL da solução R1\* foram misturados a 100µL da amostra de soro, no homogeneizador por 5 segundos. Foram adicionados 150µL de HCl 12mol/L, em seguida, incubados por 45°C por 60 minutos. Após resfriar no gelo, as absorbâncias foram determinadas em 586nm.

\* R1: 6ml de solução de íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dissolvidos em etanol mais 18ml de N-metil-2 fenil-indol dissolvido em acetonitrila.

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Calbiochem, Cat 615700, lot B57862, Darmstadt, Alemanha.

### 4.8.4 Dosagem de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxiacetaldeído (HAE) no fígado



#### Preparação do tecido

Amostras do tecido perfundidos com NaCl (150mmol/L)/EDTA (100mmol/L). Em seguida, os tecidos foram lavados em 20mmol/L de PBS. Logo após, eles foram secos em papel absorvente e pesados. Depois, foram homogeneizados e diluídos em 20mmol de PBS. Em seguida, o homogenato foi centrifugado à 3.000 x g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como amostra do tecido.

#### **Execução da Técnica**

650µL da solução R1\* foram misturados, no Vortex, por 5 segundos, à 200µL da amostra do tecido. Foram adicionados 150µL de R2\*\*, em seguida, incubados à 45°C por 60 minutos. Após resfriar no gelo, as absorbâncias foram determinadas em 586nm. R1\*: 6ml de solução de íons férricos ( $Fe^{3+}$ ) dissolvidos em etanol mais 18ml de N-metil-2-fenil-indol dissolvido em acetonitrila.

\* R2: ácido metano sulfônico

Obs.: padrão usado-. 1,1,3,3-tetrametoxi-propano.

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Calbiochem, Cat 615700, lot B57862, Darmstadt, Alemanha

#### **4.8.5 Status sérico de antioxidante total.**

##### **Princípio da técnica**

Antioxidantes presentes na amostra inibem a oxidação do ABTS [2,2'-azo-bis-(sulfonato de 3 etil benzotiazolina)] a  $ABTS^{*+}$  pela metimioglobina (uma peroxidase). A quantidade de  $ABTS^{*+}$  produzida pode ser monitorada pela leitura à 600nm. Sob as condições da reação usada, os antioxidantes na amostra causam supressão da absorbância a um grau que é proporcional à sua concentração.

##### **Execução da Técnica**

Os reagentes foram preparados da seguinte forma:

- ✓ Reagente de cor: 10mL de tampão foram adicionados a um frasco contendo 19mL de reagente de cor (metmioglobina e ABTS).
- ✓ Substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estabilizado): 10mL do reagente de cor foram adicionados a 7,5mL de tampão PBS.
- ✓ Padrão (1,5mM ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). 1mL de água destilada foi adicionado a 1mL do padrão.

O substrato e o reagente ficaram à 37°C por 5 minutos antes do uso. O espectrofotômetro foi zerado contra o ar e foi feita a leitura à 600nm, à 37°C. Na primeira cubeta, referente à leitura do branco, foram adicionados 20µL de água destilada e 1mL do reagente de cor. Na segunda cubeta, referente à leitura do padrão, foram adicionados 20µL do padrão e 1mL do reagente de cor. Na terceira cubeta, referente à leitura do teste, foram adicionados 20µL da amostra e 1mL do reagente de cor. Em seguida, foram feitas as leituras do branco, do padrão e do teste à 600nm (absorbância inicial). Logo após, foram adicionados às cubetas 200µL do substrato diluído. Após três minutos, foram feitas as segundas leituras à 600nm (absorbância final)

Para obter a concentração de antioxidante total nas amostras, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Antioxidantes} = \frac{1,65 \times (\Delta A_{\text{branco}} - \Delta A_{\text{amostra}})}{\Delta A_{\text{branco}} - \Delta A_{\text{padrão}}}$$

O Kit comercial utilizado para dosagem foi: Calbiochem, Cat 437634, lot B56160, Darmstadt, Alemanha

#### 4.9 Análise Estatística

Os resultados são expressos com média ± desvio padrão. As análises estatísticas dos dados foram feitas usando o MINITAB 13 Software (State College, PA). Os dados foram testados pela ANOVA, análise bivariada. Quando as alterações foram

significativas, o teste de Turkey foi feito para determinar as diferenças específicas entre as médias. A diferença de  $p < 0,05$  foi considerada significativa.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados do primeiro experimento

#### 5.1.1 Parâmetros biológicos: peso do fígado, ingestão alimentar, ganho de peso.

A tabela 2 apresenta peso do fígado, peso corporal final, ganho de peso e ingestão alimentar em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro.

Observando o peso do fígado, verificamos que o tratamento com ferro-dextran teve efeito, pois os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) obtiveram valores maiores que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) tiveram valores maiores que os grupos C+CF ( $p < 0,05$ ). Não houve interação entre tratamento com ferro-dextran e tipo de dieta ( $p > 0,05$ ).

Ao verificarmos o peso corporal final, o ganho de peso e a ingestão alimentar, notamos que o tratamento com ferro-dextran não teve efeito, pois não houve diferença estatística entre os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) e os grupos que não receberam tratamento (C+H) ( $p > 0,05$ ). Porém, verificamos que a dieta teve efeito: os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) apresentaram valores menores que os grupos (C+CF) ( $p < 0,05$ ). Não houve interação entre tratamentos com ferro-dextran e com o tipo de dieta.



**Tabela 2: Peso do fígado, peso corporal final, ganho de peso e ingestão alimentar em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.**

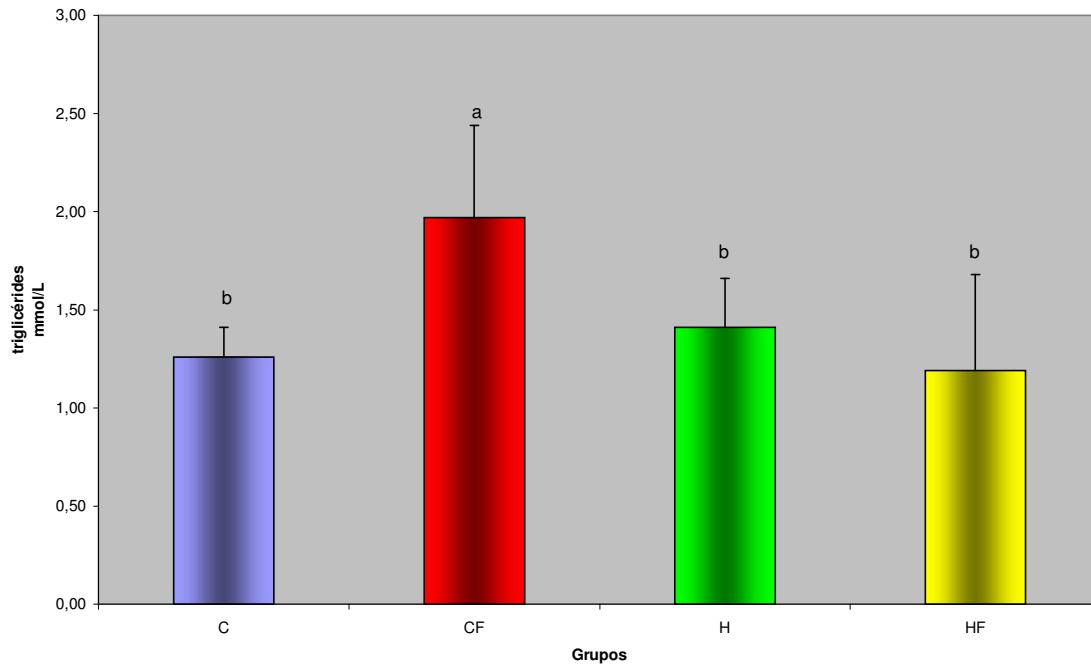
Grupo experimental	Parâmetros biológicos			
	Peso do fígado (g)	Peso corporal final (g)	Ganho de peso (g)	Ingestão Alimentar (g/dia)
C	2,99±0,35	112,00±16,53	11,53±20,42	6,23±0,76
CF	3,52±0,28	118,58±8,09	13,28±12,04	5,83±0,58
H	5,68±1,17	106,36±10,72	-2,26±13,79	4,55±0,58
HF	6,49±0,80	99,66±9,74	0±16,68	5,09±1,04
Resultado da ANOVA				
Efeito do ferro				
C+H	4,33±1,61	109,38±13,91	4,64±18,38	5,39±1,09
CF+HF	5,01±1,63	109,12±13,04	6,64±15,71	5,46±0,90
Efeito da dieta				
C+CF	3,26±0,41	115,49±13,06	12,41±16,34	6,03±0,69
H+HF	6,08±1,06	103,01±10,54	-1,13±14,94	4,82±0,87
Valor de P (ANOVA)				
Ferro-dextran	< 0,05	NS	NS	NS
Dieta	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Interação	NS	NS	NS	NS

*Os resultados são expressos como média ± desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05. NS = Não significativo, p > 0,05.*

### 5.1.2 Lipídios: níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL.

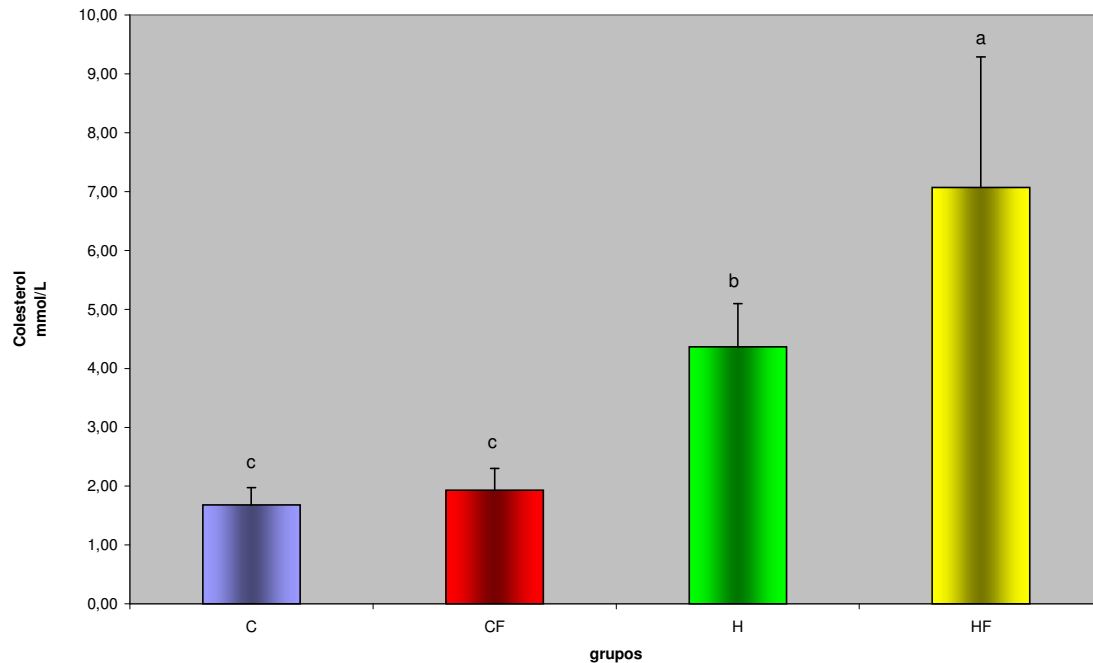
O gráfico 1 mostra os níveis séricos de triglicérides em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Observamos que o tratamento com ferro-dextran levou ao aumento dos níveis de triglicérides. Os grupos CF+ HF obtiveram níveis de triglicérides maiores que os grupos C+H ( $p<0,05$ ). Já os animais que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) obtiveram níveis menores que os grupos controles (C+CF) ( $p<0,05$ ). Houve interação entre o tipo de dieta e o tratamento com ferro-dextran ( $p<0,05$ ): o grupo CF ( $1,97\pm 0,47$ ) foi o que apresentou maior concentração de triglicérides em relação aos outros grupos os quais não obtiveram valores estatisticamente diferentes [C ( $1,26\pm 0,15$ ); H ( $1,41\pm 0,25$ ); HF ( $1,19\pm 0,49$ )].

O gráfico 2 apresenta os níveis séricos de colesterol em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Os grupos CF + HF, que receberam o tratamento com ferro, obtiveram valores maiores que os grupos C + H ( $p<0,05$ ). Os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) obtiveram valores maiores que os controles (C+CF) ( $p<0,05$ ). Quando analisamos a associação entre a administração de ferro-dextran e o tipo de dieta, observamos uma interação significativa ( $p<0,05$ ): o grupo HF ( $7,07\pm 2,22$ ) apresentou maior concentração de colesterol sérico do que o grupo H ( $4,37\pm 0,73$ ) seguido dos grupos C ( $1,68\pm 0,29$ ) e CF ( $1,93\pm 0,37$ ) que não apresentaram diferenças significativas entre si.



**Gráfico 1:** Níveis séricos de triglicérides em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$ ; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultados da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	1,34 $\pm$ 0,21
CF+HF	1,58 $\pm$ 0,35
Efeito da dieta	
C+CF	1,62 $\pm$ 0,50
H+HF	1,30 $\pm$ 0,40
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	< 0,01
Dieta	< 0,01
Interação	< 0,01



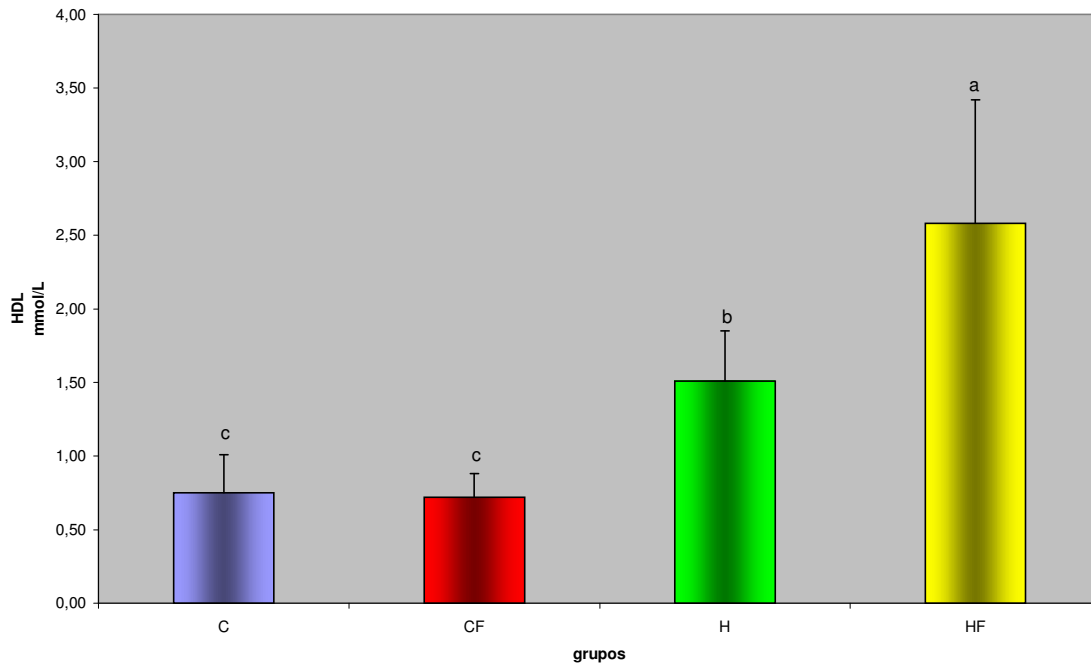
**Gráfico 2:** Níveis séricos de colesterol em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$ ; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	3,02 $\pm$ 1,48
CF+HF	4,50 $\pm$ 3,06
Efeito da dieta	
C+CF	1,80 $\pm$ 0,35
H+HF	5,72 $\pm$ 2,12
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	< 0,01
Dieta	< 0,01
Interação	< 0,01

O gráfico 3 mostra os níveis séricos de HDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) obtiveram níveis séricos de HDL maiores que os grupos que não receberam este tratamento (C+H) ( $p < 0,05$ ). Os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) apresentaram níveis séricos de HDL mais elevados que os grupos que receberam dieta controle (C+CF) ( $p < 0,05$ ). Houve interação entre os tratamentos com ferro-dextran e tipo de dieta: o grupo HF ( $2,58 \pm 0,84$ ) foi o que apresentou a maior concentração seguido do grupo H ( $1,51 \pm 0,34$ ). As concentrações dos grupos C ( $0,75 \pm 0,26$ ) e CF ( $0,72 \pm 0,16$ ) foram menores e não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

O gráfico 4 apresenta os níveis séricos de LDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) obtiveram níveis de LDL maiores que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Os grupos H+HF tiveram níveis de LDL maiores que os grupos C+CF ( $p < 0,05$ ). Houve interação entre o tratamento com ferro-dextran e tipo de dieta: o grupo HF ( $4,05 \pm 1,81$ ) foi o que apresentou o nível de LDL mais elevado seguido do grupo H ( $2,20 \pm 0,62$ ). Os grupos C ( $0,34 \pm 0,21$ ) e CF ( $0,30 \pm 0,33$ ) apresentaram os menores níveis e não apresentaram diferença significativa.

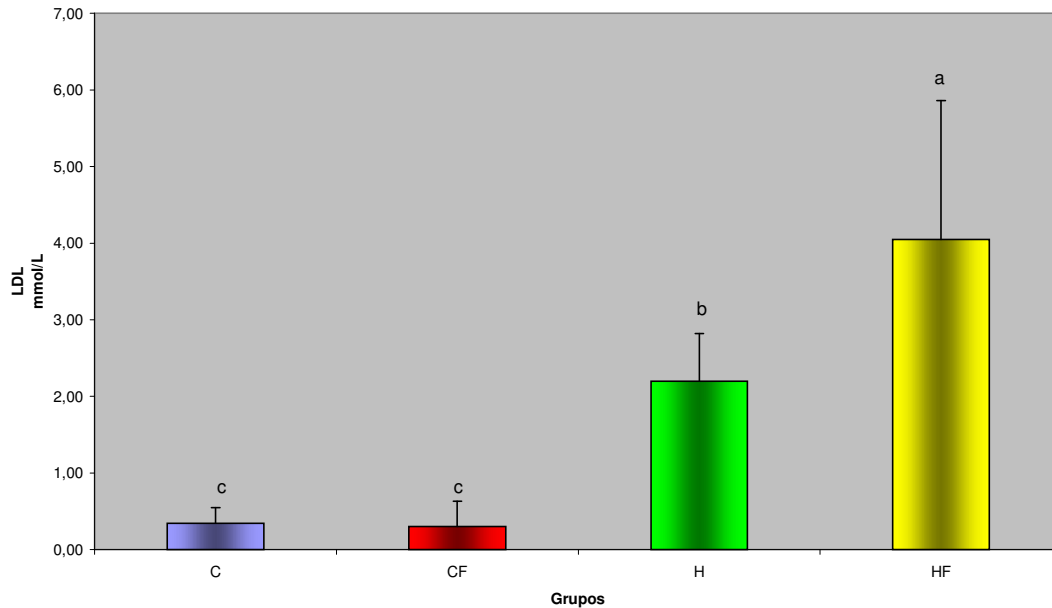
O gráfico 5 apresenta concentrações séricas de VLDL em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Os grupos CF+HF tiveram maiores concentrações de VLDL que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Porém, a dieta hipercolesterolêmica levou à diminuição dos níveis séricos de VLDL ( $p < 0,05$ ). Observamos uma interação entre a administração de ferro e o tipo de dieta: o grupo CF ( $0,91 \pm 0,22$ ) foi o que apresentou maior concentração de VLDL em relação aos demais grupos que não obtiveram concentrações diferentes [C ( $0,58 \pm 0,07$ ); H ( $0,65 \pm 0,11$ ); HF ( $0,55 \pm 0,23$ )].



**Gráfico 3:** Níveis séricos de HDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$ ; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	1,13 $\pm$ 0,49
CF+HF	1,60 $\pm$ 1,08
Efeito da dieta	
C+CF	0,74 $\pm$ 0,21
H+HF	2,00 $\pm$ 0,80
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	< 0,01
Dieta	< 0,01
Interação	< 0,01

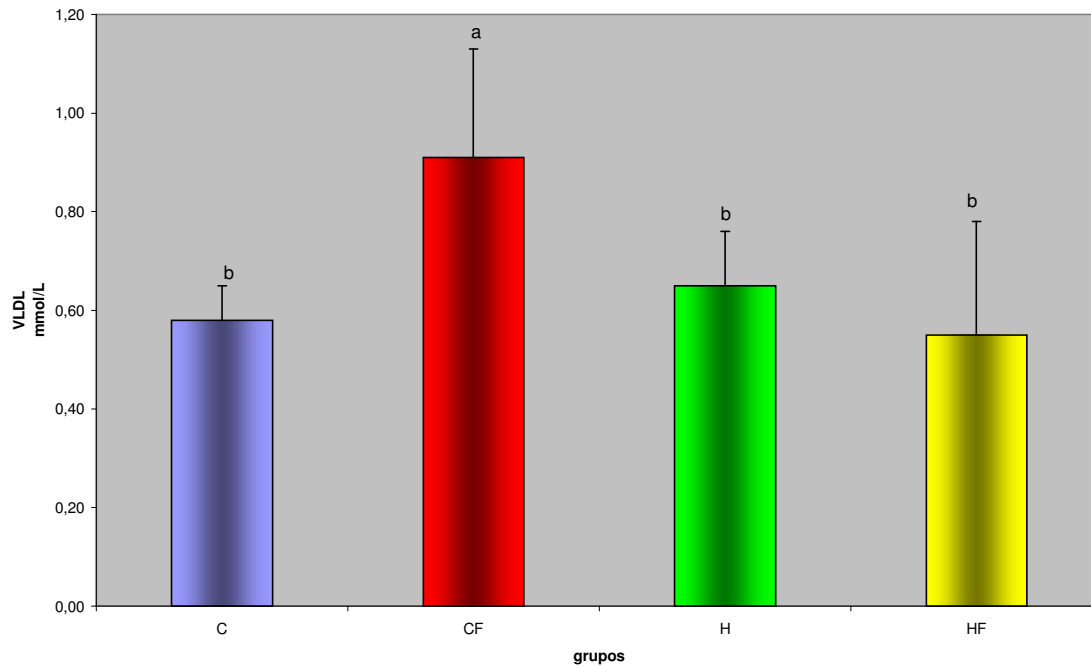




**Gráfico 4:** Níveis séricos de LDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	1,27 $\pm$ 1,06
CF+HF	2,17 $\pm$ 2,30
Efeito da dieta	
C+CF	0,32 $\pm$ 0,27
H+HF	3,13 $\pm$ 1,62
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	< 0,01
Dieta	< 0,01
Interação	< 0,01





**Gráfico 5:** Níveis séricos de VLDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$ ; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	0,62 $\pm$ 0,10
CF+HF	0,73 $\pm$ 0,28
Efeito da dieta	
C+CF	0,74 $\pm$ 0,23
H+HF	0,60 $\pm$ 0,18
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	< 0,01
Dieta	< 0,01
Interação	< 0,01

### **5.1.3 Atividade das enzimas no soro: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT)**

A tabela 3 mostra a atividade de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) em hamsters alimentados com dieta controle e hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro.

Ao analisarmos a atividade de AST, observamos que o tratamento com ferro-dextran aumentou sua atividade. A atividade enzimática dos grupos CF+HF foi maior que a dos grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Não há diferença estatística quanto ao tipo de dieta utilizada ( $p > 0,05$ ). Não houve interação entre o tipo de dieta e tratamento com ferro-dextran. ( $p > 0,05$ ).

Quanto à atividade de ALT, verificamos que o tratamento com ferro-dextran não teve efeito, pois os valores obtidos dos grupos C+H e dos grupos CF+HF não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Já os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) tiveram valores maiores que os grupos C+CF ( $p < 0,05$ ). Não houve interação entre o tipo de dieta e tratamento com ferro-dextran ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3: Atividade da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.**

Grupo experimental	Parâmetros séricos	
	AST (U/L)	ALT(U/L)
C	15,83±1,12	18,08±6,80
CF	23,63±16,02	36,50±22,86
H	19,88±5,23	64,72±23,58
HF	25,94±13,89	60,32±22,36
Resultado da ANOVA		
Efeito do ferro		
C+H	17,48±4,43	41,40±29,82
CF+HF	24,79±14,64	48,41±26,22
Efeito da dieta		
C+CF	19,36±11,89	27,29±19,71
H+HF	22,91±10,68	62,52±23,68
Valor de P (ANOVA)		
Ferro-dextran	<0,05	NS
Dieta	NS	< 0,01
Interação	NS	NS

*Os resultados são expressos como média ± desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .*

## 5.2 Resultados do segundo experimento

### 5.2.1 Parâmetros biológicos: peso corporal final, do fígado, do coração e dos rins.

A tabela 4 apresenta peso corporal final, do fígado e do coração em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro.

Ao observarmos o peso corporal final, verificamos que o tratamento com ferro-dextran não influenciou o peso corporal final, pois os valores dos grupos C+H e dos grupos CF+HF não apresentaram diferença significativa ( $p>0,05$ ). Os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) tiveram valores menores que os grupos C+CF ( $p<0,05$ ). Não houve interação entre o tipo de dieta e tratamento com ferro-dextran ( $p>0,05$ ).

Os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) e os que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) obtiveram valores maiores de peso do fígado que os grupos que não receberam tratamento com ferro (C+H) e os grupos alimentados com dieta controle (C+CF), respectivamente ( $p<0,05$ ). Não houve interação entre tratamento com ferro-dextran e tipo de dieta ( $p>0,05$ ).

Verificamos que o peso do coração não foi influenciado pelos tratamentos. Não houve interação entre o tipo de dieta e tratamento com ferro-dextran ( $p>0,05$ ).

A tabela 5 mostra peso dos rins e dos rins direito (d) e esquerdo (e) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Nesta tabela, notamos que o tratamento com ferro-dextran e o tipo de dieta não influenciaram o peso dos rins. Não houve interação entre o tipo de dieta e tratamento com ferro-dextran ( $p>0,05$ ).

**Tabela 4: Peso corporal final, do fígado e do coração em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.**

Grupo experimental	Parâmetros biológicos		
	Peso corporal (g)	Fígado (g)	Coração (g)
C	99,88±13,65	2,80±0,35	0,38±0,03
CF	101,91±12,96	3,34±0,30	0,37±0,03
H	88,42±8,88	4,98±0,44	0,38±0,07
HF	84,93±7,73	5,45±0,39	0,38±0,05
Resultado da ANOVA			
Efeito do ferro			
C+H	94,45±12,49	3,89±1,18	0,38±0,05
CF+HF	93,42±13,32	4,45±1,08	0,37±0,04
Efeito da dieta			
C+CF	100,90±13,00	3,12±0,45	0,37±0,03
H+HF	86,78±7,64	5,21±0,46	0,38±0,06
Valor de P (ANOVA)			
Ferro-dextran	NS	<0,01	NS
Dieta	< 0,01	< 0,01	NS
Interação	NS	NS	NS

*Os resultados são expressos como média ± desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05. NS = Não significativo, p > 0,05.*

**Tabela 5: Peso dos rins e dos rins direito (d) e esquerdo(e) em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.**

Grupo Experimental	Parâmetros biológicos		
	Peso dos rins (g)	Rim (d) (g)	Rim (e) (g)
C	0,67±0,06	0,34±0,03	0,33±0,03
CF	0,70±0,06	0,36±0,03	0,34±0,03
H	0,72±0,09	0,37±0,04	0,36±0,05
HF	0,71±0,06	0,32±0,13	0,39±0,10
Resultado da ANOVA			
Efeito do ferro			
C+H	0,70±0,09	0,35±0,04	0,34±0,04
CF+HF	0,70±0,06	0,34±0,09	0,36±0,07
Efeito da dieta			
C+CF	0,69±0,06	0,35±0,03	0,34±0,03
H+HF	0,72±0,07	0,34±0,09	0,37±0,08
Valor de P (ANOVA)			
Ferro-dextran	NS	NS	NS
Dieta	NS	NS	NS
Interação	NS	NS	NS

*Os resultados são expressos como média ± desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05. NS = Não significativo, p > 0,05.*

### 5.2.2 Lipídios: níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL.

A tabela 6 apresenta os níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL-C, LDL-C, VLDL-C em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro.

Observando os níveis séricos de triglicérides e VLDL, verificamos que o tratamento com o ferro-dextran não teve efeito, pois não houve diferença estatística entre os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) e os grupos que não receberam tratamento (C+H) ( $p>0,05$ ). Contudo, notamos que a dieta teve efeito: os grupos H+HF obtiveram níveis menores de triglicérides e VLDL que os grupos C+CF ( $p<0,05$ ). Houve interação entre os dois tratamentos: o grupo CF foi o que apresentou a maior concentração de triglicérides e VLDL seguido dos grupos C e H os quais não apresentaram diferenças estatísticas. Já o grupo HF foi o que apresentou menor concentração de triglicérides e VLDL e não apresentou diferença estatística em relação ao grupo H ( $p<0,05$ ).

Em relação ao colesterol, HDL e LDL, notamos que os grupos CF+HF tiveram valores maiores que os grupos C+H ( $p<0,05$ ). Os grupos H+HF obtiveram valores maiores que os grupos C+CF ( $p<0,05$ ). Houve interação entre tratamento com ferro-dextran e com o tipo de dieta: o grupo HF foi o que apresentou a maior concentração destes parâmetros seguido do grupo H. Os grupos C e CF apresentaram menores concentrações e não apresentaram diferença significativa ( $p<0,05$ ).

**Tabela 6: Níveis séricos de triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.**

Grupo experimental	Parâmetros séricos				
	Triglicérides (mmol/L)	Colesterol (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	VLDL (mmol/L)
C	1,67±0,55 <sup>b</sup>	2,07±0,25 <sup>c</sup>	0,74±0,09 <sup>c</sup>	0,56±0,31 <sup>c</sup>	0,77±0,25 <sup>b</sup>
CF	2,18±0,26 <sup>a</sup>	2,17±0,46 <sup>c</sup>	0,66±0,18 <sup>c</sup>	0,50±0,623 <sup>c</sup>	1,00±0,12 <sup>a</sup>
H	1,27±0,43 <sup>b,c</sup>	4,87±1,59 <sup>b</sup>	1,58±0,46 <sup>b</sup>	2,70±1,09 <sup>b</sup>	0,58±0,19 <sup>b,c</sup>
HF	0,89±0,25 <sup>c</sup>	6,97±1,88 <sup>a</sup>	2,67±0,88 <sup>a</sup>	3,88±1,01 <sup>a</sup>	0,41±0,11 <sup>c</sup>
Resultado da ANOVA					
Efeito do ferro					
C+H	1,48±0,48	3,47±1,54	1,16±0,44	1,63±1,27	0,68±0,22
CF+HF	1,54±0,69	4,57±2,53	1,67±1,09	2,19±1,81	0,71±0,32
Efeito da dieta					
C+CF	1,93±0,26	2,12±0,36	0,70±0,15	0,53±0,48	0,89±0,23
H+HF	1,08±0,19	5,92±1,29	2,13±0,65	3,29±0,90	0,50±0,13
Valor de P (ANOVA)					
Ferro-dextran	NS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	NS
Dieta	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Interação	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

*Os resultados são expressos como média ± desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05. NS = Não significativo, p > 0,05.*

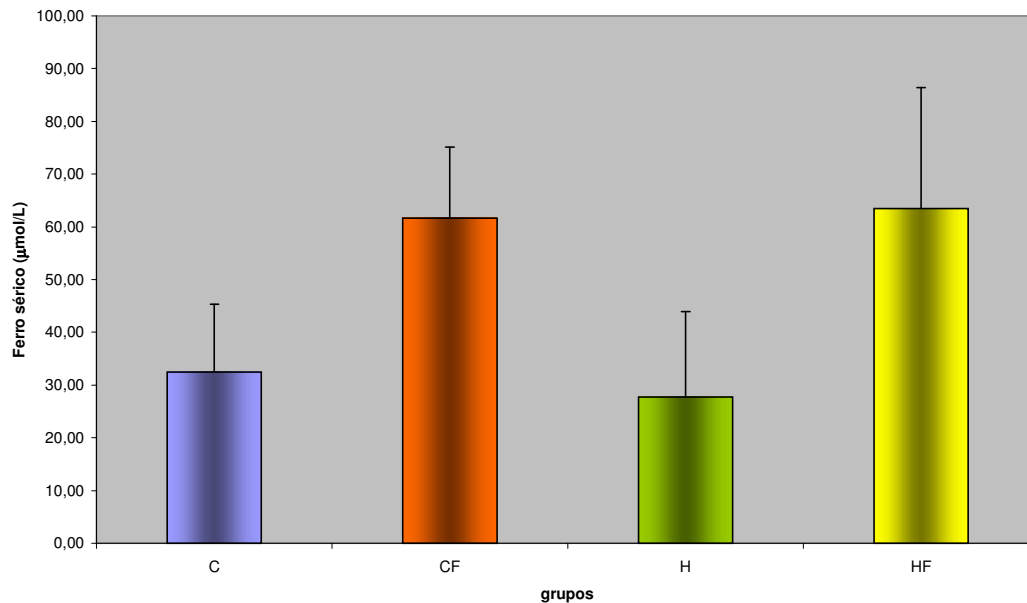


### **5.2.3 Concentração de ferro, capacidade latente de ligação de ferro (CLLF), capacidade total de ligação de ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (%IST), transferrina, ferro no baço.**

O gráfico 6 apresenta níveis séricos de ferro em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Observamos que o tratamento com o ferro-dextran afeta os níveis de ferro sérico, pois os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) obtiveram maiores concentrações de ferro sérico que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Já a dieta não teve efeito, pois os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos C+CF ( $p > 0,05$ ). Não houve interação entre tratamento com ferro-dextran e dieta hipercolesterolêmica ( $p > 0,05$ ).

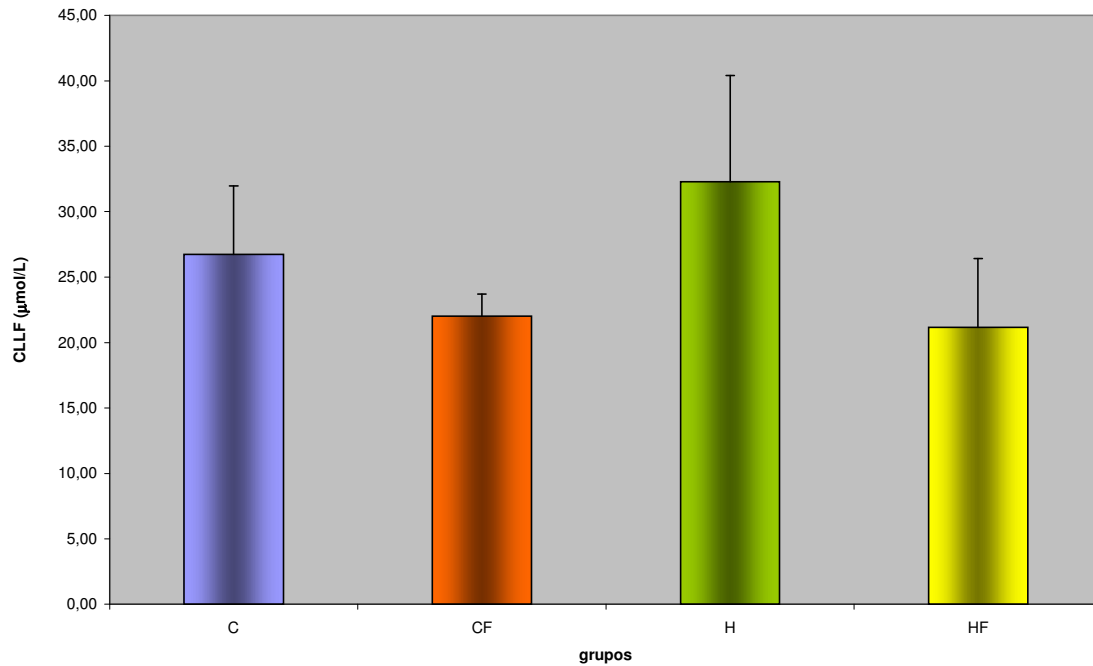
O gráfico 7 mostra a capacidade latente de ligação do ferro sérico (CLLF) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Os grupos CF+HF, que receberam tratamento com ferro-dextran, obtiveram valores menores que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). O tipo de dieta não teve efeito na CLLF, pois os grupos H+HF não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos C+CF ( $p > 0,05$ ). Não houve interação entre tratamento com ferro-dextran e o tipo de dieta ( $p > 0,05$ ).

O gráfico 8 apresenta a capacidade total de ligação do ferro (CTLF) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Notamos que os grupos CF+HF, que receberam tratamento com ferro-dextran, apresentaram valores maiores que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Porém, a dieta hipercolesterolêmica não afetou a CTLF. Os grupos H+HF não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos C+CF ( $p > 0,05$ ). Não houve interação entre dieta hipercolesterolêmica e tratamento com ferro-dextran ( $p > 0,05$ ).



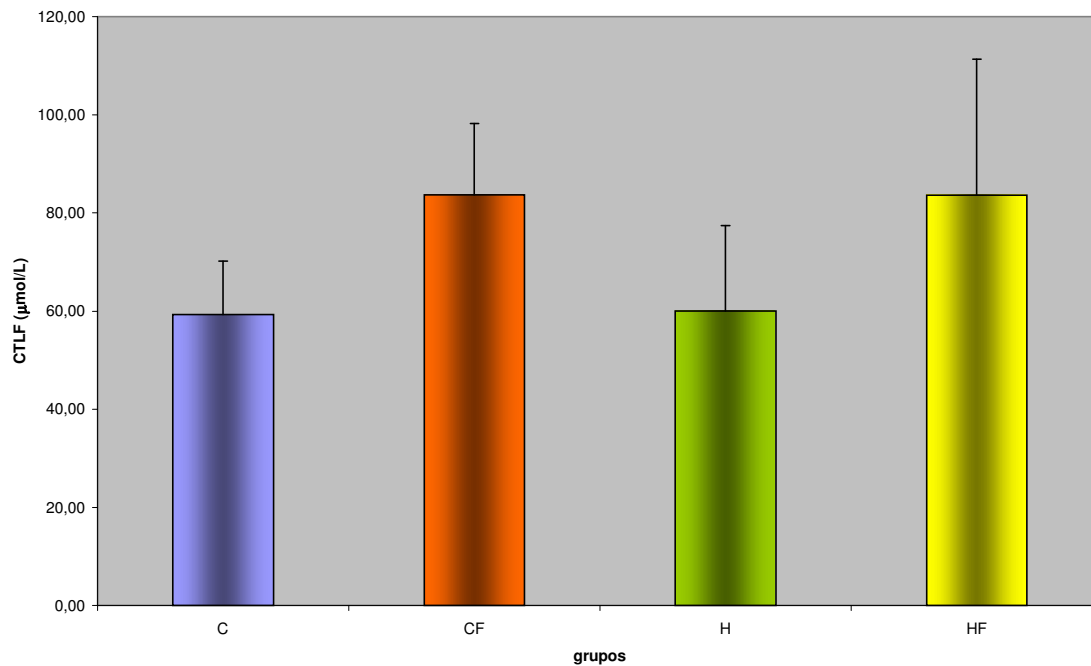
**Gráfico 6:** Níveis séricos de Ferro em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$ ; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	30,24 $\pm$ 14,31
CF+HF	62,39 $\pm$ 17,38
Efeito da dieta	
C+CF	47,08 $\pm$ 19,71
H+HF	45,59 $\pm$ 24,75
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	<0,01
Dieta	NS
Interação	NS



**Gráfico 7:** Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF) em hamsters alimentados com dieta controle (c) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	29,52 $\pm$ 6,98
CF+HF	21,59 $\pm$ 3,42
Efeito da dieta	
C+CF	24,39 $\pm$ 4,49
H+HF	26,72 $\pm$ 8,39
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	<0,01
Dieta	NS
Interação	NS

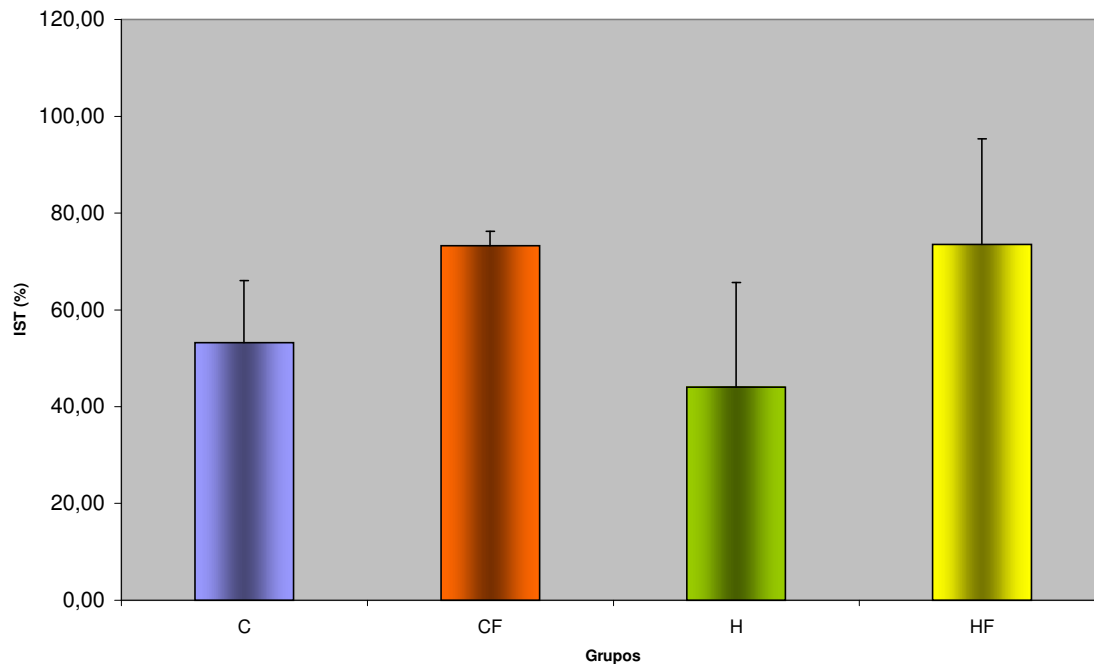


**Gráfico 8:** Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF) em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	59,64 $\pm$ 10,12
CF+HF	83,66 $\pm$ 15,83
Efeito da dieta	
C+CF	71,46 $\pm$ 17,73
H+HF	71,84 $\pm$ 17,40
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	<0,01
Dieta	NS
Interação	NS

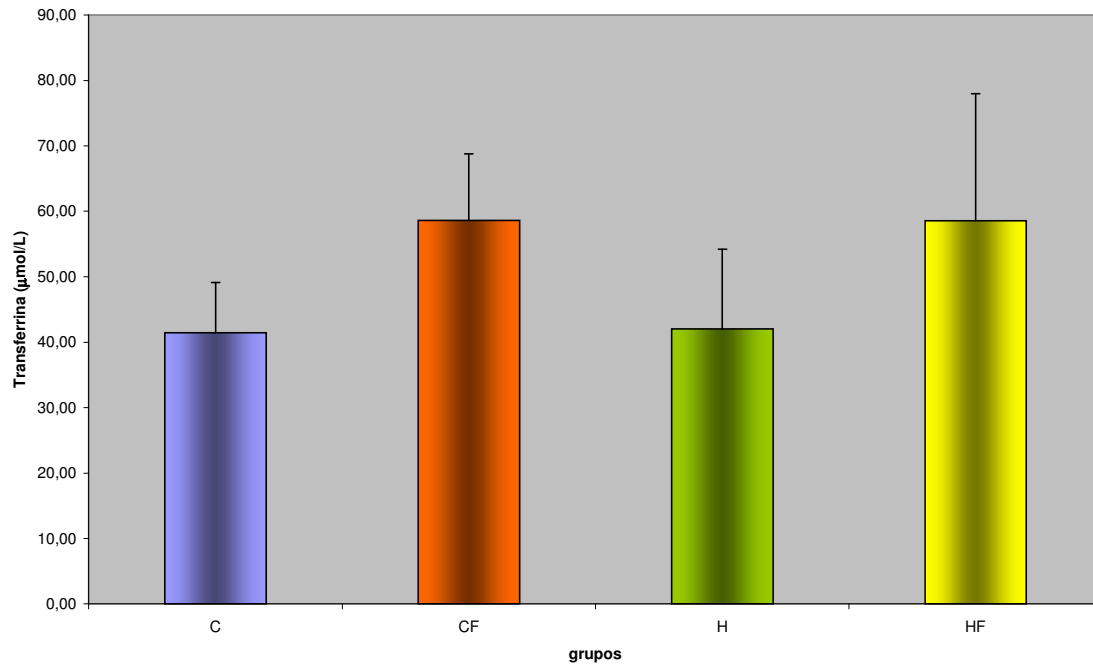
O gráfico 9 apresenta o Índice de Saturação da Transferrina (IST%) em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Os grupos CF+HF, que receberam tratamento com ferro-dextran, obtiveram valores maiores de IST% que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Já a dieta não alterou os valores do IST% ( $p > 0,05$ ). Não houve interação entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

O gráfico 10 mostra os níveis séricos de transferrina em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro. Verificamos que os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) apresentaram níveis séricos de transferrina mais elevados que os grupos C+H. O tipo de dieta não afetou os níveis séricos de transferrina ( $p > 0,05$ ). Não houve interação entre tratamento com ferro-dextran e dieta hipercolesterolêmica ( $p > 0,05$ ).



**Gráfico 9:** Índice de Saturação da Transferrina (IST%) em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com(F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	48,62 $\pm$ 15,57
CF+HF	73,40 $\pm$ 7,47
Efeito da dieta	
C+CF	63,24 $\pm$ 13,74
H+HF	58,77 $\pm$ 20,55
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	<0,01
Dieta	NS
Interação	NS



**Gráfico 10:** Níveis séricos de Transferrina em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$ ; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ . NS = Não significativo,  $p > 0,05$ .

Resultado da ANOVA	
Efeito do ferro	
C+H	41,73 $\pm$ 7,27
CF+HF	58,56 $\pm$ 11,08
Efeito da dieta	
C+CF	50,02 $\pm$ 12,41
H+HF	50,29 $\pm$ 12,18
Valor de P (ANOVA)	
Ferro-dextran	<0,01
Dieta	NS
Interação	NS

A tabela 7 apresenta o peso do baço e quantidade de ferro no baço ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$  de tecido) e quantidade total de ferro no baço em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro.

Em relação ao peso do baço, os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos que não receberam tratamento com ferro (C+H) ( $p>0,05$ ). Os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos que receberam dieta controle (C+CF) ( $p>0,05$ ). Não houve interação entre tratamento com ferro-dextran e tipo de dieta ( $p>0,05$ ).

Os grupos CF+HF, que receberam tratamento com ferro-dextran, apresentaram maior quantidade de ferro no baço que os grupos C+H ( $p<0,05$ ). A quantidade de ferro no baço dos grupos H+HF foi menor que nos grupos C+CF ( $p<0,05$ ). Houve interação entre o tipo de dieta e tratamento com ferro-dextran: o grupo CF foi o que apresentou a maior quantidade de ferro seguido do grupo HF. Os grupos C e H apresentaram os menores valores e não apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).



**Tabela 7: Peso do baço, quantidade de ferro no baço ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$  de tecido) e quantidade total de ferro no baço em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.**

Grupo experimental	Parâmetros biológicos		
	Peso do baço (g)	Ferro no baço ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )	Total de ferro no baço ( $\mu\text{g}$ )
C	0,12 $\pm$ 0,03	1,81 $\pm$ 0,55 <sup>c</sup>	2,24 $\pm$ 1,08 <sup>c</sup>
CF	0,14 $\pm$ 0,03	20,29 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	26,90 $\pm$ 5,18 <sup>a</sup>
H	0,16 $\pm$ 0,06	1,81 $\pm$ 0,75 <sup>c</sup>	3,22 $\pm$ 1,73 <sup>c</sup>
HF	0,14 $\pm$ 0,03	13,17 $\pm$ 4,49 <sup>b</sup>	15,84 $\pm$ 10,29 <sup>b</sup>
Resultado da ANOVA			
Efeito do ferro			
C+H	0,14 $\pm$ 0,05	1,81 $\pm$ 0,72	2,60 $\pm$ 1,39
CF+HF	0,14 $\pm$ 0,03	16,73 $\pm$ 4,81	23,30 $\pm$ 8,57
Efeito da dieta			
C+CF	0,13 $\pm$ 0,03	11,05 $\pm$ 9,70	15,06 $\pm$ 13,76
H+HF	0,15 $\pm$ 0,03	7,49 $\pm$ 6,45	10,77 $\pm$ 9,59
Valor de P (ANOVA)			
Ferro-dextran	NS	0,01	<0,01
Dieta	NS	0,01	<0,01
Interação	NS	0,01	<0,01

*Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05. NS = Não significativo, p > 0,05.*

#### 5.2.4 Metabólitos séricos: níveis séricos de proteínas totais, albumina e ácido úrico

A tabela 8 mostra os níveis séricos de proteínas totais, albumina e ácido úrico em hamsters alimentados com dieta controle ou hipercolesterolêmica, com ou sem excesso de ferro.

Os grupos CF+HF, que receberam tratamento com ferro-dextran, apresentaram níveis séricos de proteínas totais menores que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) apresentaram níveis séricos de proteínas totais maiores que os grupos que receberam dieta controle (C+CF) ( $p < 0,05$ ). Houve interação entre tratamento com ferro-dextran e tipo de dieta: o grupo H foi o que apresentou o maior nível de proteínas totais seguido do grupo HF. Os grupos C e CF apresentaram os menores valores e não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Os grupos que receberam tratamento com ferro-dextran (CF+HF) apresentaram níveis séricos de albumina menores que os grupos C+H ( $p < 0,05$ ). Os grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (H+HF) apresentaram níveis séricos de albumina menores que os grupos que receberam dieta controle (C+CF) ( $p < 0,05$ ). Houve interação entre tratamento com ferro-dextran e tipo de dieta: o grupo C foi o que apresentou a maior concentração de albumina em relação aos demais grupos não apresentaram diferença significativa.

Verificamos que os níveis séricos de ácido úrico não foram influenciados pelos tratamentos. Não houve interação entre o tipo de dieta e tratamento com ferro-dextran ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 8: Níveis séricos de proteínas totais, albumina e ácido úrico em hamsters alimentados com dieta controle (C) ou hipercolesterolêmica (H), com (F) ou sem excesso de ferro.**

Grupo experimental	Parâmetros séricos		
	Proteínas totais (g/L)	Albumina ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ácido úrico ( $\mu\text{mol/L}$ )
C	58,04 $\pm$ 2,09 <sup>b</sup>	446,89 $\pm$ 77,30 <sup>a</sup>	94,79 $\pm$ 37,35
CF	53,29 $\pm$ 2,93 <sup>c</sup>	372,07 $\pm$ 31,21 <sup>b</sup>	79,71 $\pm$ 41,35
H	72,71 $\pm$ 4,09 <sup>a</sup>	355,92 $\pm$ 23,61 <sup>b</sup>	111,84 $\pm$ 32,04
HF	62,04 $\pm$ 4,77 <sup>b</sup>	350,20 $\pm$ 32,84 <sup>b</sup>	87,57 $\pm$ 38,55
Efeito do ferro			
C+H	65,37 $\pm$ 8,11	401,41 $\pm$ 72,56	103,32 $\pm$ 34,20
CF+HF	57,66 $\pm$ 5,67	361,14 $\pm$ 31,38	83,64 $\pm$ 37,07
Efeito da dieta			
C+CF	55,79 $\pm$ 3,45	409,48 $\pm$ 66,71	87,25 $\pm$ 39,12
H+HF	67,68 $\pm$ 6,96	353,06 $\pm$ 25,31	99,71 $\pm$ 33,69
Valor de p (ANOVA)			
Ferro dextran	<0,01	<0,01	NS
Dieta	<0,01	<0,01	NS
Interação	<0,01	<0,01	NS

*Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 10; letras superescritas diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05. NS = Não significativo, p > 0,05.*