UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Sobrecarga de ferro em ratos sadios

Cassiana Ganem Achtschin

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Célia Colli

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Achtschin, Cassiana Ganem.

A179s Sobrecarga de ferro em ratos sadios / Cassiana Ganem
Achtschin. -- São Paulo, 2010.

63p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Colli, Célia.

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Ferro :
Ciências dos alimentos I. T. II. Colli, Célia, orientador.

641.1 CDD

Cassiana Ganem Achtschin

Sobrecarga de ferro em ratos sadios

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Célia Colli
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá
1º examinador

Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero
2º examinador

São Paulo, 04 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a realização do meu mestrado.

Aos meus familiares pelo incentivo, em especial a minha mãe.

À Alexandre Gonçalves Lages pela paciência, incentivo e cumplicidade.

À Profa. Dra. Célia Colli por me receber em seu Laboratório, pelo aprendizado e orientação.

Aos meus colegas de laboratório: Alexandre Rodrigues Lobo, Cristiane Hermes Sales, Edna Helena S. Machado, Eduardo Gaievski, Fernanda Brunacci, Jessica Silva, Luciana Setaro, Laila Sangaletti, Maria Isabel Giannichi, Vivianne de Sousa Rocha.

Agradeço à Tatiana Garofalo (Tati) pelo auxílio em grande parte do experimento: preparo e análise das rações, rotina no biotério e sacrifício dos animais.

Às professoras colaboradoras: Primavera Borelli e Lílían Rose Marques de Sá.

Às alunas de pós-graduação do bloco 17: Amanda Rabello e Karina Nakajima.

A equipe do biotério, principalmente: Silvânia M. P. Neves, Flávia P. Ong, Renata Spalutto e Fátima.

À Renata Kanashiro pelo auxílio: no preparo das rações, na rotina com os animais no biotério durante todo o experimento e no sacrifício dos animais.

Aos secretários do Departamento: Cleonice Estrela Cabral (Cléo), Edilson Feitosa Santos e Mônica D. Perussi e aos secretários do Curso de Pós Graduação Jorge de Lima e Elaine M. Ychico.

À funcionária Maria de Lourdes Pedrosa (Lú) pela ajuda na lavagem de material, pelo carinho e atenção de sempre.

Às bibliotecárias: Rosângela Bellizia e Marta Cristina Omelzuk de Oliveira pela boa vontade em ajudar-me a buscar os artigos científicos; Leila Bonádio, por corrigir e auxiliar-me com as referências bibliográficas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Capes pela bolsa de mestrado concedida.

“Nunca desista de seus sonhos, afinal os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história, renovam as forças do ansioso, animam os deprimidos, transformam os inseguros em seres humanos de raro valor. Os sonhos fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades.”

Augusto Cury

RESUMO

ACHTSCHIN, C.G. **Sobrecarga de ferro em ratos saudáveis**. 2010. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de diferentes concentrações dietéticas de Fe em parâmetros sanguíneos (hemograma, perfil lipídico) e hepáticos (concentração de minerais, perfil de ácidos graxos, apoptose) de ratos saudáveis. Depósitos de Fe no baço e medula óssea também foram avaliados por análises histológicas. Ratos *Wistar* ($n = 40$), machos e com 40 dias de idade, consumiram rações controle (35 mgFe/kg) ou com sobrecarga de Fe (350, 750 e 1500 mgFe/kg). Após 90 dias de experimento, não foram observadas alterações no perfil lipídico e na atividade das transaminases séricas e no perfil de ácidos graxos no fígado. Por outro lado, o consumo das rações com sobrecarga de Fe (G750 e G1500) aumentou a concentração de hemoglobina e o VCM em relação ao controle. Além disso, observou-se maior concentração de Fe (G350, G750 e G1500 em espectrofotometria de absorção atômica e no grupo G1500 em histologia) e presença de corpúsculos apoptóticos (G750 e G1500) no fígado dos animais com sobrecarga (Fe hepático x apoptose, $r = 0,749$, $p = 0,000$). Os resultados indicaram que o fígado é um compartimento responsivo à sobrecarga de Fe pela dieta. A significativa associação com o processo de apoptose sugere que as alterações provocadas pela sobrecarga do mineral devam ser avaliadas mais detalhadamente nessas condições experimentais.

Palavras-chave: sobrecarga de Fe, lipoproteínas plasmáticas, transaminases, sangue, ácidos graxos no fígado, hemossiderina, histologia.

ABSTRACT

ACHTSCHIN, C.G. **Iron overload in healthy rats**. 2010. 63f. Dissertation (Master's Degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

The aim of the present work was to investigate the effect of different dietary Fe concentrations on blood parameters (hemogram, lipid profile) and hepatic parameters (mineral concentration, fatty-acid profile, apoptosis) in healthy rats. Fe depositions in the spleen and bone marrow were also assessed using histological analyses. Wistar young rats ($n = 40$) were fed control diets (35 mgFe/kg) or diets with Fe overload (350, 750 and 1500 mgFe/kg). After 90 days of experiment, no alterations in the lipid profile and serum transaminases, and fatty-acid profile in the liver were observed. On the other hand, the consumption of diets with Fe overload (G750 and G1500) led increased hemoglobin (Hb) concentration and Mean Corpuscular Volume (MCV) when compared to the control. In addition, a higher Fe concentration (G350, G750 e G1500 in Atomic Absorption Spectrophotometry and G1500 in histological sections) and presence of apoptotic bodies (G750 e G1500) were observed in the liver of animals with Fe overload (hepatic Fe x apoptosis, $r = 0.749$, $p = 0.000$). The results indicated that the liver is a compartment responsive to dietary Fe overload. The significant association with the apoptotic process suggests that the alterations caused by an overload of the mineral should be assessed in more detail under these experimental conditions.

Keywords: Fe overload, plasma lipoproteins, transaminases, blood, fatty acids in the liver, hemosiderin, histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Metabolismo do ferro 6
- Figura 2 – Corpúsculos apoptóticos no tecido hepático do fígado de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de ferro por 90 dias. (A) e (B), fotomicrografia representando cortes histológicos, observados em microscopia de fluorescência, do tecido hepático do grupo G35 e G750, respectivamente. Em (A), ausência de corpúsculos. Em (B), as setas indicam corpúsculos no citoplasma do hepatócito. Figuras em aumento de 400x. GFe35 indica grupo controle (35 mg Fe/kg ração); GFe350, GFe750 e GFe1500, sobrecarga de ferro (350, 750 e 1500 mg Fe/kg ração, respectivamente). Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 6$) 32
- Figura 3 – (A) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de fígado sem alterações histológicas. HE, 100x. (B) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de fígado sem alterações histológicas. *Perls*, 100x. (C) Rato, grupo 750mg. Fotomicrografia de fígado exibindo macrófagos com pigmento de hemossiderina em espaço porta. HE, 200x. (D) Rato, grupo 750 mg. Fotomicrografia de fígado mostrando células de *Kupffer* com pigmento de hemossiderina. *Perls*, 200x. (E) Rato, grupo 1500 mg. Fotomicrografia de fígado mostrando degeneração vacuolar microgoticular em zona 3. HE, 200x. (F) Rato, grupo 1500mg. Fotomicrografia de fígado exibindo pigmento de hemossiderina em macrófagos portais (M) e em células de *Kupffer* (seta). *Perls*, 200x 33
- Figura 4 – (A) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de baço sem alterações histológicas. HE, 100x. (B) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de baço exibindo poucos depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x. (C) Rato, grupo 750mg. Fotomicrografia de baço exibindo macrófagos com pigmento de hemossiderina. HE, 100x. (D) Rato, grupo 750 mg. Fotomicrografia de baço mostrando severo depósito de hemossiderina. *Perls*, 100x. (E) Rato, grupo 1500 mg. Fotomicrografia de baço mostrando severo depósito de hemossiderina. HE, 100x. (F) Rato, grupo 1500mg. Fotomicrografia de baço exibindo severo depósito de hemossiderina. *Perls*, 100x 35

Figura 5 – (A) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de medula óssea sem alterações histológicas. HE, 100x. (B) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de medula óssea, ausência de depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x. (C) Rato, grupo 750mg. Fotomicrografia de medula óssea sem alterações histológicas. HE, 100x. (D) Rato, grupo 750 mg. Fotomicrografia de medula óssea sem depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x . (E) Rato, grupo 1500 mg. Fotomicrografia de medula óssea sem alterações histológicas. HE, 100x. (F) Rato, grupo 1500mg. Fotomicrografia de medula óssea, sem depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulação das rações experimentais ¹	18
Tabela 2 – Composição centesimal e de Fe das rações experimentais ¹	25
Tabela 3 – Consumo total de ração e de Fe, ganho de peso de ratos alimentados com rações controle e sobrecarga de Fe, por 90 dias	26
Tabela 4 – Perfil lipídico e atividade de transaminases no sangue de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de Fe, por 90 dias ¹	27
Tabela 5 – Parâmetros hematológicos de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de ferro, por 90 dias ¹	27
Tabela 6 – Peso e concentração hepática de Fe de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de Fe, por 90 dias ¹	28
Tabela 7 – Correlações entre consumo e parâmetros de Fe (n = 31).....	28
Tabela 8 – Perfil de ácidos graxos (%) no fígado de ratos alimentados com rações controle e sobrecarga de Fe, por 90 dias ¹	29
Tabela 9 – Correlação entre o consumo de Fe e a concentração de Fe no fígado com o número de corpúsculos apoptóticos (n = 24)	31
Tabela 10 – Correlação entre o consumo de Fe, Fe hepático e resultados da classificação de <i>Perls</i> para hemossiderina (n = 24)	37
Tabela 11 – Análise histológica semi-quantitativa das concentrações de Fe no fígado de ratos alimentados com ração controle e sobrecarga de Fe.....	59
Tabela 12 – Análise histológica semi-quantitativa da concentração de Fe no baço de ratos alimentados com ração controle e sobrecarga de Fe.....	61
Tabela 13 – Análise histológica semi-quantitativa da concentração de Fe na medula óssea de ratos alimentados com ração controle e sobrecarga de Fe	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALT – aspartate aminotransferase ou aspartato aminotransferase
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AST – alanine aminotransferase ou alanina aminotransferase
- ALD – *alcoholic liver disease* (doença alcoólica do fígado)
- AIN – *American Institute of Nutrition* (Instituto Americano de Nutrição)
- AGS – ácidos graxos saturados
- AGMI – ácidos graxos monoinsaturados
- AGPI – ácidos graxos poliinsaturados
- AOAC – *Association of Official Analytical Chemists* (Associação Oficial de Química Analítica)
- C – congestão
- CA – corpúsculo apoptótico
- Dcyt-b – *duodenal cytochrome b* (citocromo b duodenal)
- DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DRI – *dietary reference intakes* (referência de ingestão dietética)
- DMT – *divalent metal transporter* (transportador de metal divalente)
- DVZ1 – degeneração vacuolar zona 1
- DVD – degeneração vacuolar difusa
- DVSZ – degeneração vacuolar difusa sem zoneamento
- ERO – espécie reativa de oxigênio
- EAA – espectrofotometria de absorção atômica
- ETPE – escore total *Perls* fígado
- FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
- GE – *erythrocyte/granulocytic* (células eritrocíticas/células granulocíticas em medula)
- GOT – *glutamic oxaloacetic transaminase* (transaminase glutâmico oxalacética)
- GPT – *glutamic pyruvic transaminase* (transaminase glutâmico pirúvica)
- HCP – *haem carrier protein* (proteína transportadora do ferro heme)
- HH – *hereditary hemochromatosis* (hemocromatose hereditária)
- HCC – *hepatocellular carcinoma* (carcinoma hepatocelular)
- HDL – *high-density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)
- HCM – hemoglobina corpuscular média
- HEM – hematopoiese extramedular
- IL – interleucina

NTBI – *iron not bound to transferrin* (ferro não ligado a transferrina)

N^ocorp – número de corpúsculos

NZ1 – necrose zona 1

OMS – Organização Mundial da Saúde

PVC – cloreto de polivinila

PIP – processo inflamatório portal

PIZ1 – processo inflamatório zona 1

PILSZ – processo inflamatório lobular sem zoneamento

PMP – *Perls* macrófago portal

PK – *Perls kupffer*

PH – *Perls* hepatócito

RTf – receptor de tranferrina

qsp – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucleico

SRE – sistema retículo endotelial

SPSS – *statistical package for social sciences* (pacote estatístico para ciências sociais)

TCZ1 – tumefação celular zona 1

TIBC – *total iron-binding capacity* (capacidade total de ligação do ferro)

TNF – *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

TRIG – triacilglicerol

UL – *upper intake level* (nível de ingestão máxima tolerável)

V – volume

VCM – volume corpuscular médio

VLDL – *very low density lipoprotein* (lipoproteína de muito baixa densidade)

LISTA DE SÍMBOLOS

16:0 – ácido palmítico
18:0 – ácido esteárico
16:1, cis-9 – ácido palmitoléico
18:1, cis-9 – ácido oléico
18:1, cis-11 – ácido vacênico
24:1, cis-15 – ácido nervônico
18:2, cis-9,12 – ácido linoléico
18:3, cis-6,9,12 – ácido γ -linolênico
20:2, cis-11,14 – ácido eicosadienóico
20:3, cis-11,14,17 – ácido eicosatrinóico ($\omega 3$)
20:3, cis-8,11,14 – ácido eicosatrienóico ($\omega 6$)
20:4, cis-5,8,11,14 – ácido araquidônico
22:5 – ácido docosapentaenóico
22:6, cis-4,7,10,13,16,19 – ácido docosaheptaenóico
 BF_3 – trifluoreto de boro
 $^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius
Ca – cálcio
Cu – cobre
d – dia
dL – decilitro
Fe – ferro
 Fe^{2+} – ferro ferroso
 Fe^{3+} – ferro férrico
 FeSO_4 – sulfato ferroso
 FeCl_3 – cloreto férrico
fL – fentolitro
g – grama
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
 HOCl – ácido hipocloroso
 NaCl – cloreto de sódio
 HNO_3 – ácido nítrico
L – litro

Mg – magnésio

mg – miligrama

mL – mililitros

mm² – milímetro quadrado

N₂ – nitrogênio

nm – nanometro

O₂ – oxigênio

O₂^{•-} – superóxido

¹O₂² – oxigênio singlete

•OH – radical hidroxila

P – fósforo

U – unidade

μmol – micromol

μg – micrograma

μL – microlitro

λ – lambda

ω – ômega

Zn – zinco

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvii
1 Introdução	1
2 Revisão da literatura	5
2.1 Absorção de ferro	5
2.2 Regulação da absorção de ferro	7
2.3 Saída do ferro do enterócito	8
2.4 Transporte do ferro para os tecidos	8
2.5 Sobrecarga de ferro.....	10
2.6 Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo	12
3 Objetivos.....	15
3.1 Geral	15
3.2 Específicos.....	15
4 Material e métodos.....	17
4.1 Animais.....	17
4.2 Rações.....	17
4.3 Desmineralização do material	19
4.4 Protocolo experimental.....	19
4.5 Composição centesimal das rações experimentais	19
4.6 Minerais	20
4.7 Análises do sangue	20
4.8 Parâmetros hepáticos	21
4.9 Perfil de incorporação de ácidos graxos no fígado.....	22
4.10 Análises histológicas	22
4.10.1 Hemossiderina	22
4.10.2 Apoptose	23
4.11 Análise estatística	23
5 Resultados.....	25

5.1	Composição centesimal e mineral das dietas experimentais:	25
5.2	Consumo alimentar e ganho de peso.....	26
5.3	Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	26
5.4	Parâmetros hepáticos.....	28
5.5	Perfil de ácidos graxos	28
5.6	Análises histológicas.....	30
5.6.1	Fígado.....	30
5.6.2	Baço.....	34
5.6.3	Medula óssea.....	34
6	Discussão.....	39
7	Conclusão	43
	Referências bibliográficas.....	45
	ANEXO.....	55

1 Introdução

O ferro (Fe) é um elemento traço essencial que, em mamíferos, se apresenta em dois estados de valência: Fe^{2+} e Fe^{3+} . Por ser um elemento abundante na natureza envolvido em reações de óxido-redução, o organismo humano, ao longo de sua evolução desenvolveu um controle muito rígido de sua absorção. Assim, cerca de 10 % do total de Fe ingerido diariamente com a dieta é absorvido e distribuído nos diversos *pools* do organismo (FAIRBANKS, 2003).

O organismo humano não excreta o Fe de modo significativo. A regulação da absorção deste mineral no duodeno é fundamental para o controle da sua homeostase corporal. Cerca de 1 a 2 mg de Fe são absorvidos diariamente na dieta para contrabalançar as perdas por descamação das células da mucosa intestinal, menstruação e outras perdas sanguíneas, como hemorragias, p.ex. (SIAH *et al.*, 2006).

Apesar de o Fe ser um mineral abundante na crosta terrestre, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de pessoas anêmicas mundialmente é em torno de dois bilhões e na maioria dos casos a anemia é causada por deficiência de Fe; no Brasil, estudos populacionais mostraram índices superiores a 30 % com prevalência de anemia em crianças e mulheres em idade reprodutiva. Programas de fortificação de alimentos têm sido apontados como a melhor maneira de aumentar a ingestão de Fe em meio a anemia por deficiência de Fe (ASSUNÇÃO e SANTOS, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2002 estabeleceu no Brasil a resolução nº 344 que obriga a fortificação de farinha de trigo e milho com 4,2 mg de Fe e 150 mcg de ácido fólico para cada 100 g de farinha.

De acordo com Zancul (2004), dentre os produtos mais fortificados com Fe estão os produtos lácteos e cereais por serem bem aceitos e bastante utilizados pelas crianças; outros produtos também enriquecidos com Fe são: sal, açúcar, condimentos e café.

Ao longo dos últimos trinta anos, as mudanças nos hábitos alimentares e as estratégias no combate a anemia como a fortificação e suplementação de Fe têm se tornado uma preocupação, por esses programas atingirem todos os grupos populacionais. Nesse contexto, os efeitos fisiológicos do aumento da ingestão de Fe por indivíduos sem deficiência desse mineral que consomem alimentos fortificados ou que estejam fazendo uso de suplementos orais de Fe devem ser considerados. Diante disso, as próprias DRI (ingestão dietética de referência) definiram o nível de ingestão máxima tolerável (UL).

Embora seja sabido que a absorção de Fe é sujeita a regulação muito estreita, resultante, de uma evolução dos mamíferos em um ambiente muito rico em Fe, alguns estudos epidemiológicos realizados inicialmente na década de noventa demonstraram uma associação entre aterosclerose e infarto do miocárdio em oposição a outros. O *Framingham heart study*, estudo de coorte iniciado em 1948-1950, com 5209 pessoas de 30 - 62 anos, ao avaliar a relação entre sobrecarga de Fe e ferritina demonstrou a relação entre fatores dietéticos e risco de altos estoques de Fe em idosos e contradisse a evidência de que o Fe dietético não pode resultar em sobrecarga (FLEMING *et al.*, 2002).

Pesquisas recentes sugerem que a sobrecarga de Fe possa ser um problema maior que a deficiência de Fe nos países ocidentais, devido à fortificação de cereais, o uso de suplementos de Fe em cápsulas e a elevada ingestão de carne vermelha (KABAT e ROHAN, 2007).

A sobrecarga (ou excesso) de Fe pode ser primária, como na hemocromatose hereditária, ou secundária, que pode ser tanto hereditária quanto adquirida. Secundariamente, o excesso de Fe pode ser causado por uma eritropoiese não efetiva (p. ex na talassemia), por repetidas transfusões de sangue (indicadas em casos de anemia aplástica) ou por ingestão de níveis tóxicos de Fe (HERSHKO, 2007). A toxicidade aguda do Fe pode apresentar-se com diarreia sanguinolenta e vômitos, seguindo-se de acidose, insuficiência hepática e choque. Quando ocorre o excesso de Fe, a capacidade de ligação da transferrina é suplantada e aparece na circulação o chamado Fe não ligado à transferrina (NTBI), com alta capacidade oxidante (CABANTCHIK *et al.*, 2005; BRAGA e HOKAZONO, 2006; HERSHKO, 2007).

A hemocromatose hereditária, uma doença autossômica recessiva, derivada da mutação do gen HFE (C282Y) e que acomete de 1/200 a 1/400 indivíduos de ascendência norte-européia, é um modelo de sobrecarga de Fe por inoperância no armazenamento no SRE (sistema reticulo endotelial), acúmulo de cerca de 2mg Fe/d, e aumento de ferritina sérica e saturação de transferrina. Como consequências, podem ocorrer: cirrose, câncer primário de fígado, cardiopatia, comprometimento endócrino, artrite e hiperpigmentação (ENG *et al.*, 2005; PIETRANGELO, 2007).

O Fe se liga livremente a elétrons externos e catalisa a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O dano no DNA (ácido desoxirribonucléico) causado pelas ERO é um fator crítico do processo de carcinogênese. É interessante destacar, por exemplo, que a carcinogênese provocada pelo excesso de Fe tem sido demonstrada em modelos animais e humanos em alguns estudos. A associação do Fe com o câncer de mama tem recebido

pequena atenção epidemiológica, apesar de ser plausível biologicamente (KABAT e ROHAN, 2007).

Entre os metais de transição, o Fe é o mais associado com doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson (LYKKESFELD, MORGAN e CHRISTEN, 2007) e com a doença alcoólica do fígado (ALD) (KOHGO, IKUTA e OHTAKE, 2007).

Tanto o Fe quanto o álcool individualmente causam estresse oxidativo e peroxidação lipídica. O álcool é um indutor de sobrecarga de Fe, que leva à produção de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias bem como à doença hepática (HARRISON e DEE, 2007).

Em trabalho anterior, Cocato (2008) observou que a sobrecarga moderada de Fe (550 mgFe/kg por três meses) na ração de ratos, levou a diminuição das concentrações séricas de colesterol total, aumento da atividade da glutathione peroxidase hepática e do número de corpúsculos apoptóticos, e discreto aumento de hemossiderina ao redor das células de *Kupffer* no fígado; não se observaram alterações hematológicas, nem nas frações de colesterol sérico, transaminases, Fe sérico, saturação de transferrina e capacidade total de ligação de Fe. A avaliação dessas respostas frente a outros níveis de Fe na dieta é importante para caracterizar o momento em que começam a ocorrer.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a retenção de Fe em diferentes compartimentos envolvidos com a homeostase de Fe, em resposta ao consumo de crescentes níveis desse mineral na ração. Propôs-se ainda relacionar esses parâmetros com eventuais alterações no fígado, órgão escolhido por refletir os estoques de Fe no organismo.

2 Revisão da literatura

O Fe é um mineral vital no metabolismo de todos os seres vivos; componente essencial das enzimas do ciclo de Krebs, das moléculas que ligam e transportam o oxigênio (hemoglobina e mioglobina), dos citocromos da cadeia respiratória (participa das reações de oxidação e redução como carreador de elétrons, mantendo-se entre as formas Fe^{2+} e Fe^{3+}); constitui várias proteínas envolvidas na síntese de DNA (COZZOLINO e HENRIQUES, 2005; BRAGA e BARBOSA, 2006; SHARP e SRAI, 2007).

Em humanos, a faixa de concentração varia de 45 a 55 mgFe/kg (3,5 a 4 g) em homens e encontra-se em torno de 35 mgFe/kg (2,2 g) em mulheres; essas concentrações no entanto, variam de acordo com a idade, peso, concentração e estoque de hemoglobina (BRAGA e BARBOSA, 2006). A homeostase do Fe é fortemente regulada considerando que sua deficiência gera anemia e em excesso, o Fe livre pode gerar processo oxidativo e causar danos a proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos das células (ROUAULT, 2006).

Adultos saudáveis perdem diariamente entre 0,5 a 2 mg de Fe através da perda sanguínea e da constante esfoliação das células epiteliais do trato digestivo e urinário, pele e cabelo. No entanto, a mesma quantidade de Fe perdida precisa ser repostada pela dieta diariamente, para recuperar suas perdas e manter sua homeostase (SHARP e SRAI, 2007).

2.1 Absorção de ferro

Na dieta, o Fe está presente como Fe heme, encontrado nas carnes e vísceras, altamente biodisponível; e como Fe não-heme, Fe^{2+} ou Fe^{3+} , presente em cereais, vegetais, leguminosas e frutas, e representa 90-95 % do Fe da dieta e tem a biodisponibilidade dependente dos fatores inibidores e facilitadores.

A absorção de Fe ocorre na superfície apical do enterócito e, embora os mecanismos envolvidos não estejam completamente elucidados, a identificação de receptores de Fe heme e de transportadores de membrana possibilitou aprofundar o conhecimento sobre essa regulação (SIAH *et al.*, 2006; SCHUMANN, ETTLE e SZEGNER, 2007).

O Fe não-heme entra no trato gastrointestinal como Fe^{3+} insolúvel; em contato com o ácido gástrico, ácido ascórbico e aminoácidos como cisteína e histidina que o reduzem a Fe^{2+} , forma pela qual é absorvido principalmente no duodeno e jejuno superior pela membrana apical do enterócito (MACKENZIE e GARRICK, 2005; SHARP e SRAI, 2007). Assim, o íon

Fe^{3+} , que alcança a membrana apical é reduzido pela redutase férrica Dcytb (citocromo b duodenal) a Fe^{2+} e transportado como tal através do epitélio duodenal pela proteína DMT1 (transportadora de metal divalente 1). A saída do Fe^{2+} do enterócito para a circulação é feita pela membrana basolateral mediada pelo transportador de membrana basolateral ferroportina (PANTOPOULOS, 2004), que está envolvida na saída de Fe das células. O Fe não liberado para a circulação sanguínea é armazenado como ferritina no enterócito. (FRAZER e ANDERSON, 2003) (Figura 1).

FONTE: Andrews (1999)

Figura 1 - Metabolismo do ferro

A absorção do Fe heme da dieta é feita pela proteína transportadora do heme-1 (HCP1) presente na membrana apical das células do duodeno por endocitose, por onde atravessa o complexo Fe porfirina intacto. No interior da célula, o Fe é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase. Após o Fe ser liberado, fará parte do mesmo pool de Fe não heme, armazenado na forma de ferritina ou liberado do enterócito para o sangue. A HCP1 também é expressa em outros locais como fígado e rins; sua regulação é feita de acordo com o nível de Fe intracelular. Por esse mecanismo regulador o heme da dieta é aproveitado antes de ser eliminado pelo peristaltismo intestinal, evitando a captação desnecessária de Fe e o seu provável acúmulo. A hipóxia também induz a síntese da HCP1, facilitando a captação de heme quando há maior necessidade do organismo. O Fe heme nos seres humanos é melhor e

mais rapidamente absorvido que o Fe não-heme e, mesmo sendo a menor fração de Fe ingerida, sua absorção é pouco influenciada pelos componentes da dieta independentemente do pH intestinal (FINCH, 1994; MORGAN e OATES, 2002; GROTO, 2008). Dentro do citossol, a heme oxigenase libera o Fe do anel porfirínico, fornecendo Fe^{3+} que é possivelmente reduzido pela paraferitina (redutase férrica) e transportado por esta até a membrana basolateral. A biliverdina é então convertida em bilirrubina e transportada ligada a albumina no plasma para o fígado para ser excretada e o monóxido de carbono, produto da reação é transportado para os pulmões sendo eliminado no ar exalado (FAIRBANKS, 2003).

2.2 Regulação da absorção de ferro

A absorção de Fe pode ser regulada pelo bloqueio da mucosa intestinal, pelos estoques de Fe e pela eritropoiese; com o bloqueio de mucosa, mesmo uma grande quantidade de Fe ingerido pode ter sua absorção reduzida em pequenas quantidades por dia, devido ao tempo de vida dos enterócitos (de três a quatro dias) e perdura até que os enterócitos completem seu ciclo. (ANDREWS, 1999; SHARP e SRAI, 2007). O tempo de vida dos enterócitos maduros coincide com o período de maturação das células das criptas duodenais até sua migração para as vilosidades, onde ocorre a absorção de Fe. As células das criptas são programadas por sinais sistêmicos para absorver determinadas quantidades de Fe quando se diferenciam em enterócitos maduros nas vilosidades duodenais (GROTO, 2008).

A absorção de Fe, por outro lado, é sensível aos estoques do mineral no organismo: quando baixo, ela aumenta e vice-versa (MORGAN e OATES, 2002). Essa regulação ocorre provavelmente em nível da programação das criptas celulares em resposta a saturação de transferrina plasmática. Estudos experimentais em animais sugeriram que os níveis do DMT1 (transportador de metal divalente 1) são alterados em resposta a mudança no estoque de Fe corporal (ANDREWS, 1999).

O terceiro mecanismo envolve a eritropoiese e modula a absorção de Fe de acordo com essa necessidade; é provável que envolva um sinal carregado pelo plasma, da medula óssea para o duodeno (ANDREWS, 1999).

Outro regulador da absorção de Fe identificado é hepcidina sintetizada no fígado e primeiramente identificada em humanos na urina e no plasma (GANZ e NEMETH, 2006). A hepcidina é um hormônio que regula o metabolismo do Fe bloqueando sua transferência para o plasma. A regulação da absorção de Fe pelo sistema hepcidina – ferroportina na membrana

basolateral dos enterócitos no duodeno é controlada por retroalimentação. Normalmente os níveis séricos de Fe ajudam a controlar a produção de hepcidina hepática. Assim, diante do excesso de Fe a quantidade de hepcidina é aumentada e quando há depleção de Fe, a quantidade é diminuída (GANZ, 2006; HERSHKO, 2007). A hepcidina liga-se à ferroportina induzindo sua internalização e degradação na célula. A remoção da ferroportina da superfície celular impede a saída de Fe e conseqüentemente aumenta a concentração de Fe no citosol que é armazenado como ferritina. A interação da ferroportina com a hepcidina pode esclarecer a regulação da homeostase de Fe em nível sistêmico. São reguladores de hepcidina os estoques de Fe, hipóxia, anemia e inflamação (DOMENICO, WARD e KAPLAN, 2008).

2.3 Saída do ferro do enterócito

O Fe é exportado da célula pela ferroportina que é seletiva para o Fe^{2+} ; a hefaestina, oxidase semelhante à ceruloplasmina sérica é quem faz a conversão do Fe^{2+} para o Fe^{3+} (GROTTO, 2008). A hefaestina e a ceruloplasmina são enzimas dependentes de cobre (Cu) (DOMENICO, WARD e KAPLAN, 2008), sendo que a hefaestina está presente no enterócito e a ceruloplasmina encontra-se no fígado e outros tecidos, mas não na mucosa intestinal (RESNICK, 2006).

2.4 Transporte do ferro para os tecidos

O Fe exportado pela ferroportina se liga à transferrina, glicoproteína sintetizada no fígado, retina, ovários, glândulas salivares e mamárias e sistema nervoso central (PONKA, BEAMONT e RICHARDSON, 1998 e PANTOPOULOS, 2004) que o transporta aos tecidos; a transferrina tem afinidade pelo Fe^{+3} e o pH neutro do plasma possibilita essa ligação (BRAGA e BARBOSA, 2006).

O complexo Fe transferrina liga-se a superfície celular pelo receptor de transferrina (RTf) da célula, que é então endocitado. Devido ao meio ácido do endossoma (pH 5,5), o Fe^{3+} é liberado da transferrina, reduzido pela ferroxidase STEAP3 e transportado do endossoma pela DMT1 até o citosol. Nesse sitio, incorpora-se ao *pool* de Fe lábil sendo utilizado para síntese de proteínas que contêm Fe ou se em excesso, é acumulado como moléculas de ferritina. O complexo apotransferrina e RTf retorna para a superfície celular; o pH neutro do plasma dissocia a transferrina do RTf tornando-a livre para ligar-se ao Fe e reiniciar o ciclo de captação deste mineral das células (PANTOPOULOS, 2004; DOMENICO, WARG e

KAPLAN, 2008). Segundo Grotto (2008), em condições normais a transferrina (Tf) plasmática tem a capacidade de transportar até 12 mg de Fe, mas essa capacidade é raramente utilizada e, em geral, cerca de 3 mg de Fe circulam ligados à Tf, ou seja, 30 % da Tf está saturada com o Fe.

A maior fonte de Fe não vem da absorção intestinal e sim da sua reciclagem que é feita pelo SRE presente principalmente no baço, fígado (células de Kupffer) e na medula óssea (MUCKENTHALER, GALY e HENTZE, 2008). Por dia, a medula óssea utiliza em torno de 24 mg de Fe para produzir mais de 200 bilhões de novos eritrócitos. Em torno de 80 % do Fe circulante é fagocitado pelo SRE que é composto por monócitos, macrófagos e seus precursores celulares. Indivíduos saudáveis possuem de 100 a 300 mg de Fe armazenados como ferritina, no fígado e medula óssea (COLLINS, RESNICK e KUTSON, 2008).

Após a eritrofagocitose pelos macrófagos, enzimas presentes nos fagossomos degradam a hemoglobina liberando o heme que atravessa a membrana do fagossoma por difusão ou por um transportador específico e chega até a heme-oxigenase do retículo endoplasmático. O heme é degradado pela heme-oxigenase liberando Fe^{2+} e produzindo biliverdina e monóxido de carbono. O Fe^{2+} poderá ser armazenado como ferritina se não for utilizado ou liberado da célula pela ferroportina; ele é então oxidado pela ceruloplasmina à Fe^{3+} para que se ligue à transferrina que o redistribuirá aos tecidos corporais. Nem a capacidade total de ligação do Fe nem a transferrina são essenciais para a saída de Fe do retículo endoplasmático; porém, a medula óssea é um fator importante para a regulação fisiológica da saída de Fe dos SRE. A expressão da ferritina nos macrófagos implica na reciclagem do Fe pelo SRE e a hepcidina controla a saída de Fe nos macrófagos (MUCKENTHALER, GALY e HENTZE, 2008).

O Fe, absorvido pelo intestino, pode ser armazenado como ferritina ou transportado no plasma pela transferrina plasmática. Precursores eritróides obtêm o Fe para síntese da hemoglobina através da transferrina plasmática ou da reciclagem de eritrócitos senescentes por macrófagos da medula óssea, fígado e baço. O Fe não utilizado para síntese da hemoglobina é armazenado nos macrófagos como ferritina ou hemossiderina. Se necessário, o Fe será liberado dos macrófagos como no aumento da eritropoiese (ANDREWS, 1999).

2.5 Sobrecarga de ferro

Em pacientes sintomáticos com hemocromatose hereditária (HH), (que geralmente ocorre entre os 40 e 60 anos de idade) os estoques de Fe podem chegar a 30 g. Nesses casos, ocorre deposição excessiva de Fe nas células parenquimatosas, em especial no fígado, pâncreas e coração, que acaba por estimular a peroxidação lipídica e produção de radicais livres, lesando-as e promovendo fibrose progressiva. A HH é, portanto, um modelo de excesso de Fe (SOUZA, CARVALHO e CHEBLI, 2001). Transfusões de sangue frequentes que levam a sobrecarga de Fe produzem aumento gradual de saturação de transferrina que resultam no aparecimento de Fe livre no plasma, que é transferido e acumulado principalmente no parênquima de células do fígado, coração, pâncreas e glândulas endócrinas. No fígado, o Fe livre acumula-se nas células de *Kupffer* e nos hepatócitos, causando aumento da mitocôndria e ruptura das membranas dos hepatócitos, podendo levar à morte celular (SHANDER, CAPELLINI e GOODNOUGHT, 2009).

Quando o Fe plasmático excede a capacidade total de ligação da transferrina, o Fe livre concentra-se nas células do parênquima do fígado. Persistindo a sobrecarga de Fe, o Fe livre pode acumular-se em todos os tecidos e órgãos. Quando a sobrecarga de Fe resulta do aumento do catabolismo de eritrócitos (pacientes que recebem contínuas transfusões de sangue), o Fe é acumulado no retículo endotelial dos macrófagos primeiramente e, depois, nas células do parênquima (ANDREWS, 2000).

As referências de ingestão dietética (IDR) ou DRI (Dietary Reference Intakes) definem o nível superior de ingestão tolerável (UL), como o nível máximo diário de determinado nutriente (por alimento, água ou suplementos) que pode ser ingerido sem causar efeitos adversos. Para o Fe, o UL está entre 40-45 mg/d ou seja, aproximadamente de 3 a 5 vezes a RDA de Fe para mulheres e homens adultos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Segundo Braga e Kokazono (2006), fazem parte do diagnóstico laboratorial da sobrecarga de Fe os testes fenotípicos: saturação de transferrina (aumentada), ferritina sérica aumentada e atividade de alanina transferase hepática (ALT) (aumentada).

A intoxicação aguda de Fe é diagnosticada pelo Fe sérico e capacidade total de ligação do Fe (TIBC, *total iron-binding capacity*); porém, esses parâmetros não determinam a sobrecarga de Fe tecidual e também podem ser confundidos pela presença de Fe não absorvido, tornando-os não apropriados como parâmetros únicos na avaliação de Fe (THOMPSON e RAEBEL, 1994).

Segundo Assa-Ben (2009), vários indicadores de níveis tóxicos agudos de Fe foram testados ao longo dos anos. Até o momento, não existe um teste único que seja exato e eficiente de maneira isolada. O indicador mais usado é o Fe sérico; porém, com a ressalva de que os níveis de Fe sérico não refletem necessariamente o meio intracelular. Em estudos recentes, a expressão da hepcidina em toxicidade aguda de Fe em ratos, foi significativamente aumentada e em humanos, a concentração de hepcidina foi claramente aumentada após uma única dose de Fe, o que torna esse, um indicador para o excesso de Fe.

O excesso de Fe absorvido causa dano celular pelas reações de Fenton e Haber-Weiss que geram radicais hidroxila e estes promovem a peroxidação lipídica das organelas das membranas, lisossomos e mitocôndria hepatocelular, evoluindo para necrose e apoptose. (OLYNYC *et al.*, 2008).

O dano hepático seja ele agudo ou crônico, aumenta a concentração sérica das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) as quais são enzimas que catalisam a conversão dos aminoácidos alanina e aspartato em piruvato e oxaloacetato respectivamente; requerem a piridoxal-5-fosfato (vitamina B₆) como catalisadora dessa reação. Ambas estão presentes no fígado e em vários outros tecidos do organismo, não sendo específicas de um único órgão, por exemplo: a AST encontra-se no coração, músculo esquelético, rins, cérebro e eritrócitos e a ALT apresenta-se em baixas concentrações no músculo esquelético e rins; é encontrada em maior concentração no fígado, e considerada um marcador específico de dano hepático. A vida média de AST total na circulação é de 17 ± 5 horas, enquanto que da ALT é de 47 ± 10 horas. As aminotranferases variam de acordo com a idade e sexo, tendo valores limites de referência para ambos (FILIPPIN *et al.*, 2004; GIANNINI, TESTA e SAVARINO, 2005).

A lesão hepatocelular e não necessariamente morte celular é o fator determinante para que ALT e AST sejam liberadas na circulação. Valores normais para ALT e AST são respectivamente: 0-45 U/L e 0-35 U/L. O valor limite de ALT para homens é de 40 U/L, e para mulheres 30 U/L (LIMDI e HYDE, 2003; PRATI *et al.*, 2004). Os valores vistos para ratos são de AST- 39-92 U/L e ALT- 17-50 U/L (PRITCHETT e CORNING, 2004).

Fibrose portal, cirrose e carcinoma hepatocelular são seqüelas tardias da sobrecarga de Fe na hemocromatose hereditária (HH). Apesar de o mecanismo não ser totalmente conhecido, a correlação entre carcinoma hepatocelular (HCC) e cirrose em HH leva a crer que o excesso de Fe hepático causa uma doença crônica inflamatória hepática, que pode ser responsável pelo desenvolvimento do HCC (ASARE *et al.*, 2009).

Em situações normais, a concentração de Fe no fígado é menor do que 20 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco e esse mineral não é visualizado no corte histológico. Na sobrecarga, o Fe pode se distribuir no parênquima, mesênquima ou uma distribuição mista: no parênquima é observada quando há absorção intestinal de Fe aumentada; ao entrar no fígado pela veia porta, o Fe é distribuído no lóbulo da área periportal para a centrolobular; já os depósitos de Fe no mesênquima podem ser encontrados em último estágio quando a quantidade de Fe no hepatócito já é responsável por sideronecrose; a sobrecarga de Fe mesenquimal corresponde ao Fe depositado nas células de *Kupffer* e ou em macrófagos portais; as células carregadas de Fe encontram-se isoladas ou agrupadas sem nenhuma sistematização lobular. A sobrecarga de Fe mista, corresponde a distribuição do Fe no fígado (homogênea ou não), ou se a carga de Fe lobular ou em caso de cirrose nodular, são equivalentes em Fe ou não (SUBRAMANIAM, DEUDNIER e TURLIN, 2007).

Na histopatologia da hemocromatose hereditária (HH) ocorre maior deposição de hemossiderina nos hepatócitos e epitélio biliar que no retículo endotelial celular. Por ser insolúvel, a hemossiderina está presente em grânulos, contendo Fe. Alternativamente o Fe pode estar depositado sob forma de ferritina que é solúvel, difusa e caracterizada por uma coloração azul clara, não granular no hepatócito ou no macrófago citoplasmático e não é característica da HH. (BATTS, 2007).

Segundo Dada, Mckie and Simpson (2006), documentaram aumento da absorção de Fe durante a hemólise tanto em humanos com anemia hemolítica quanto em experimento animal; e que o aumento da absorção de Fe foi associado com a ampliação do pool de reticulócitos devido ao aumento da eritropoiese. Ginzburg *et al.* (2009), induziram a sobrecarga de Fe em camundongos com β -talassemia e demonstraram aumento extramedular de eritropoiese, que resultou no aumento de produção da hemoglobina, de reticulócitos e redução da expressão de hepcidina.

2.6 Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes. Radicais livres ou ERO são componentes moleculares que contêm um ou mais elétrons desemparelhados que os tornam instáveis e reativos. As ERO abrangem não somente radicais de oxigênio (O_2) como o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), o radical hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como o peróxido

de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)² (FERREIRA e KATSUBARA, 1997). Essa condição pode variar bastante entre os organismos, tipos celulares e até mesmo entre as células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada. Os principais alvos de ERO incluem DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores, como o local onde a espécie reativa é gerada, a capacidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula (BERRA e MENK, 2006).

O Fe, por ser um metal de transição, possui elétrons desemparelhados, o que lhe confere a capacidade de receber e doar elétrons, atuando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células. Em condições de estresse, um excesso de superóxido (O_2^-) provoca a saída do Fe da ferritina e de enzimas que contêm o grupamento 4Fe-4S; livre como Fe^{2+} pode participar da reação de Fenton (reação 1) produzindo o radical hidroxila. O superóxido participa da reação de Haber-Weiss (reação 2), que combina com a reação de Fenton na produção de radical hidroxila, e reduz o Fe^{3+} formando Fe^{2+} e oxigênio (VALKO *et al.*, 2006; FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

O Fe livre catalisa a conversão do superóxido e peróxido de hidrogênio em radical hidroxila, que promove o estresse oxidativo resultando em apoptose e morte celular (SELIM e RATAN, 2004).

A capacidade do Fe levar a peroxidação lipídica através da reação de Fenton pode alterar os ácidos graxos poliinsaturados das membranas fosfolipídicas, afetando o sistema vital da organela e da célula. Em ratos que receberam sobrecarga de Fe através de injeção intraperitoneal de FeCl_3 (duas doses de 15 mg/kg peso corporal, uma das doses associada com salicilato de sódio), alterações hepatocelulares foram mais observadas, devido ao fato do grande armazenamento de Fe no fígado, conseqüentemente aumento dos níveis dos índices peroxidativos e consecutivamente a alteração na concentração lipídica e composição das

lipoproteínas no fígado e assim, também nas lipoproteínas plasmáticas (BRUNET *et al.*, 1997).

O excesso de Fe, por criar um ambiente pró-oxidante contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e aumento progressivo da aterosclerose em animais experimentais. Em modelo experimental de camundongos com trombose, uma moderada sobrecarga de Fe acelerou a formação de trombos, prejudicou a atividade dos vasos (constritora e dilatadora), aumentou a produção de ERO e marcadores sistêmicos de estresse oxidativo. Demais investigações laboratoriais mostraram a dependência do Fe na formação de ERO em culturas de células endoteliais, aumento da aterosclerose em camundongos deficientes em apolipoproteína E e aumento do colesterol em coelhos com ingestão elevada de Fe (FRANCHINI, TARGHER e MONTANA, 2008). Nesse contexto, Fibach e Rachmilewitz (2008), relataram que na talassemia, as plaquetas encontram-se em estresse oxidativo com conseqüente tromboembolia.

Em humanos sadios com faixa etária média entre 22 a 54 anos, suplementados diariamente, por 14 dias, com cápsulas de 100 mgFeSO₄/d por via oral foi observado um aumento na produção de ERO (pró carcinogênico para câncer colo-retal) no material fecal (LUND *et al.*, 1999).

3 Objetivos

3.1 Geral

Avaliar, em ratos, o efeito de diferentes níveis de ingestão de Fe, em parâmetros hepáticos e hematológicos.

3.2 Específicos

Avaliar o efeito da sobrecarga dietética de Fe:

- Na ocorrência de lesão hepática avaliada pela atividade das transaminases: AST e ALT.
- No perfil dos lipídeos séricos
- Na concentração hepática de Fe
- Em parâmetros histológicos do fígado (concentração de Fe e formação de corpúsculos apoptóticos), baço (concentração de Fe) e medula óssea (concentração de Fe)
- No perfil de incorporação de ácidos graxos no fígado.

4 Material e métodos

4.1 Animais

O protocolo experimental (CEEA nº 167) foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ANEXO 1).

Quarenta ratos machos da linhagem *Wistar Hannover*, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, recém desmamados (21 dias), pesando cerca de 50 g foram alocados individualmente em gaiolas semi-metabólicas de aço inox, em ambiente com temperatura e umidade controladas (22 ± 2 °C, 55 ± 10 % respectivamente), com ciclos de claro/escuro de 12 horas (7-19 h, período claro). Tubos de PVC introduzidos nas gaiolas foram utilizados como brinquedos para os animais, no intuito de diminuir seu nível de estresse (Iselin-Allmann, 2000).

4.2 Rações

A formulação da ração em pó seguiu a recomendação preconizada pelo *American Institute of Nutrition* (AIN) para animais em crescimento (REEVES *et al.*, 1993). Foram preparadas com quatro diferentes concentrações de Fe (35, 350, 750 e 1500 mg/kg de ração), na forma de sulfato ferroso (FeSO_4) microencapsulado (lote 77SF3008) (Fermavi Eletroquímica LTDA, São Paulo, Brasil; COCATO *et al.*, 2007) (Tabela 1).

Alíquotas de ração foram separadas e armazenadas a 4 °C, até sua utilização. Em decorrência da alta concentração de Fe nas rações, foram preparadas em 3 lotes para evitar a oxidação das mesmas .

Tabela 1 - Formulação das rações experimentais¹

Ingredientes (%)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	G 35 mgFe/kg	G 350 mgFe/kg	G 750 mgFe/kg	G 1500 mgFe/kg
Caseína ²	21,92	21,92	21,92	21,92
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja	7,00	7,00	7,00	7,00
L – cistina	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Mistura vitamínica ³	1,00	1,00	1,00	1,00
Mistura salina sem ferro ⁴	3,50	3,50	3,50	3,50
Sacarose	9,96	9,65	9,25	8,50
FeSO ₄ ⁵	0,035	0,350	0,750	1,50
Amido de milho	51,03	51,03	51,03	51,03

¹ Conforme recomendações do *American Institute of Nutrition* (REEVES *et.al.*, 1993) com modificações.

² 77 % de proteína. O teor de proteína da caseína foi determinado pelo método do *Microkjeldahl*, utilizando-se o fator de conversão 6,25 (AOAC, 1995)

³ Mistura vitamínica AIN-93-VX (REEVES *et al.*, 1993) para 10 g/kg de ração; adquirida por Rhoster-Indústria e Comércio LTDA: lote-2346/08, fabricada em março/2008, validade de 10 meses. Composição: ácido nicotínico – 3,0 g/kg, pantotenato de cálcio – 1,6 g/kg, cloridrato de piridoxina – 0,700 g/kg, cloridrato de tiamina – 0,600 g/kg, riboflavina – 0,600 g/kg, ácido fólico – 0,200 g/kg, biotina D – 0,020 g/kg, vitamina B – 12-2,5 g/kg, vitamina E – 15,0 g/kg, vitamina A – 0,800 g/kg, vitamina D₃ – 0,250 g/kg, vitamina K – 0,075 g/kg, sacarose qsp 1 kg.

⁴ A mistura salina (para 35 g/kg ração) foi formulada sem a adição do citrato férrico. Neste caso, incorporou-se o sulfato ferroso microencapsulado à sacarose da ração. Minerais essenciais: carbonato de cálcio, anidro, 40,04 % Ca – 5000 mg/kg, fosfato de potássio, monobásico – 22,76 % P; 28,73 % K – 1561,00 mg/kg, citrato de potássio, tri-potássio, monohidratado, 36,16 % K – 3600,00 mg/kg, sulfato de potássio, 44,87 % K; 18,39 % S – 300,00 mg/kg, cloreto de sódio, 39,34 % Na; 60,66 % Cl – 1019,00 mg/kg, óxido de magnésio, 60,32 % Mg – 507,00 mg/kg, carbonato de zinco, 52,14 % Zn – 30,00 mg/kg, carbonato de manganês, 47,79 % Mn – 10,00 mg/kg, carbonato de cobre, 57,47 % Cu – 6,00 mg/kg, iodato de potássio, 59,3 % I – 0,2 mg/kg, paramolibdato de amônio, 4 hidratado, 54,34 % Mo – 0,15 mg/kg, selenato de sódio, anidro, 41,79 % Se – 0,15 mg/kg, sacarose qsp 1 kg.

⁵ O FeSO₄ foi incorporado à sacarose, com a finalidade de aumentar a homogeneidade do Fe nas rações .

4.3 Desmineralização do material

Todo o material utilizado no preparo das rações e nas análises foi desmineralizado em banho de ácido nítrico HNO_3 (30 %) por 12 horas, enxaguado com água desionizada e seco.

4.4 Protocolo experimental

Os animais recém desmamados foram submetidos a um período de adaptação de 20 dias, às condições ambientais da sala de experimentação, em que consumiram apenas a ração controle AIN 93G – 35 mgFe/kg; com o objetivo de iniciar o experimento com ratos na puberdade, por apresentarem um consumo de ração mais homogêneo, ao redor de 20 g, em função do tempo do experimento, no intuito de obtermos um consumo de ração mais regular e preciso, uma vez que os animais recém desmamados consomem quantidades irregulares de ração. Após esse período, os animais com idade de 40 dias e peso médio de $160 \pm 5,5\text{g}$, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (grupo G35, 35 mgFe/kg; G350, 350 mgFe/kg; 750, 750 mgFe/kg e G1500, 1500 mgFe/kg) formados por dez animais por grupo. Os ratos tiveram livre acesso às rações e a água desmineralizada, por 90 dias.

O consumo de ração foi avaliado a cada três dias e o peso corporal, uma vez por semana. Após 90 dias, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com uma mistura (1:1:0,4:1,6; v/v/v/v) contendo quetamina (10 mg/kg de peso corporal; Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA), xilazina (25 mg/kg de peso corporal; Virbaxil 2%, Virbac, São Paulo, Brasil), acepromazina (2 mg/mL; Acepran 0,2%, Univet S/A Indústria Veterinária, São Paulo, Brasil) e H_2O desmineralizada. Não houve período de jejum antecedente ao procedimento da anestesia.

4.5 Composição centesimal das rações experimentais

As determinações foram realizadas em triplicata segundo as técnicas da AOAC, 1995.

- **Umidade** (AOAC, 1995): utilizou-se o método gravimétrico, pela determinação da perda de peso da amostra submetida a aquecimento em estufa 105°C até se obter peso constante do produto dessecado.

- **Lípides** (AOAC, 1995): realizada por solvente químico (éter) em aparelho extrator Soxhlet de forma intermitente.
- **Cinzas** (AOAC, 1995): as cinzas ou resíduo mineral fixo, foram determinadas, por gravimetria, após incineração das amostras em mufla a 550 °C, até obter-se o peso constante.
- **Proteína** (AOAC, 1995): a concentração de proteína foi determinada segundo o método de Micro-Kjeldahl para nitrogênio total, utilizando-se o fator 6,25 para a conversão de nitrogênio em proteína. A digestão foi realizada em bloco digestor (Sarge Aparelhos Científicos Ltda-Piracicaba-SP) a 350 °C até o completo clareamento das amostras.

4.6 Minerais

A concentração de minerais (ferro, cobre, cálcio, magnésio e zinco) nas amostras de rações foi determinada pelo método de espectrofotometria de absorção atômica (EAA), empregando-se lâmpadas de catodo oco nos comprimentos de onda (λ) de 248,3, 324,8, 422,7, 202,6 e 213,9 nm, respectivamente, e fendas de 0,2, 0,7, 0,7, 0,7 e 0,7 nm, respectivamente, após digestão das amostras por via úmida (HNO_3 : H_2O_2 , 5:1, v/v). As curvas padrão foram preparadas a partir de soluções padrão (Tritisol, Merck, Darmstadt, Alemanha), segundo as normas da AOAC (1995).

A concentração de fósforo foi determinada pelo método colorimétrico, baseado fundamentalmente na transformação de fósforo em ácido fosfomolibdico pela adição de molibdato de amônio (FISKE, 1925). Este ácido, por sua vez, é reduzido pelo ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, formando um complexo de coloração azul (azul de molibdênio), cuja intensidade da cor é medida espectrofotometricamente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Biospectro SP-220, a 660 nm, utilizando-se como padrão o fosfato dibásico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.7 Análises do sangue

- a) O sangue foi coletado por punção cardíaca, após anestesia intraperitoneal e acondicionado em microtúbulo com anticoagulante EDTA (10%), na proporção 1:25

de sangue e em tubo coletor sem anticoagulante para as respectivas análises do hemograma e bioquímica no soro.

- b) O hemograma foi determinado no equipamento ABC VET (HORIZAABX). Os reticulócitos foram determinados pela coloração supra-vital com novo azul de metileno (BRECHER, 1949); esse corante cora restos de ácidos nucléicos presentes nos reticulócitos (restos de RNA), e permite distinguir as hemácias mais jovens, ou seja, reticulócitos, e indica a cinética de produção de hemácias (quanto mais reticulócitos, mais a medula óssea está sintetizando hemácias). Nesta técnica, foi misturado 50 µL de sangue com 50 µL de corante e incubado por 10 min a 37 °C. Após esse processo foi feita extensão sanguínea e nesta foi feita a contagem manual dos reticulócitos; contados 10 campos com 200 hemácias e dentre essas hemácias foram contadas quantos são os reticulócitos e depois feita a proporção.

Extensões sanguíneas foram feitas imediatamente após a coleta, para contagem diferencial dos leucócitos e análises morfológicas (ROSENFELD, 1947). Para detecção das possíveis lesões causadas pela sobrecarga de Fe, foi avaliada a atividade das transaminases séricas: aspartato aminotransferase (AST) (AST/GOT Liquiform Ref.109) e alanina aminotransferase (ALT) (ALT/GPT Liquiform Ref.108). Triacilglicerol (Trig Liquiform Ref.87) colesterol total (Colesterol Liquiform Ref.76) e HDL-colesterol (Colesterol HDL Ref.13). Todas essas análises foram realizadas por kits comerciais (Labtest[®] Diagnóstica S/A, Lagoa Santa – Minas Gerais, Brasil).

4.8 Parâmetros hepáticos

Os fígados foram perfundidos pela veia subepática com solução de NaCL (9 g/L), nos animais anestesiados, para retirada do sangue do órgão. Foram pesados e armazenados a -20 °C até o momento das análises. Para a determinação da concentração de Fe, os fígados foram descongelados a temperatura ambiente e alíquotas de cerca de 1 g retiradas do lóbulo médio, foram digeridas segundo metodologia descrita pela AOAC (1995). A concentração dos minerais foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (*Perkin Elmer, AAnalyst 100, USA*) nas mesmas condições descritas para as análises de minerais nas rações.

4.9 Perfil de incorporação de ácidos graxos no fígado

Os fígados foram descongelados à temperatura ambiente e macerados até a obtenção de um homogenato. Cerca de 1g de cada órgão foi pesado e submetido à hidrólise ácida dos lipídeos, usando o ácido pirogálico para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos graxos durante a análise. Os lipídios foram extraídos com éter etílico e então metilados para ésteres metílicos de ácidos graxos, usando trifluoreto de boro (BF₃) em metanol (7 %). Após remoção do solvente sob fluxo de nitrogênio (N₂), os ésteres metílicos de ácidos graxos foram resuspendidos em clorofórmio e injetados em cromatógrafo a gás CG17A (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector de ionização de chama ligado a um processador-integrador C-30021 (CG Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil), nas seguintes condições de análise:

- Coluna cromatográfica de sílica fundida (SP-2560) – 100 m x 0,25 mm de diâmetro, com 20 µm de espessura (Supelco Park, Bellefonte, Palo Alto, CA, EUA)
- Gás de arraste: hélio (1 mL/min)
- Programação de temperatura da coluna: isotérmico a 140 °C por 5 min, e então aquecimento a 4 °C/min até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 min
- Temperatura do vaporizador: 250 °C
- Temperatura do detector: 270 °C

O percentual de ácidos graxos individuais foi calculado de acordo com os picos das áreas em relação à área total (ácidos graxos totais foram fixados em 100 %) (GUIMARÃES *et al.*, 1995).

4.10 Análises histológicas

4.10.1 Hemossiderina

Para avaliação da sobrecarga de Fe os fragmentos de fígado foram fixados em formol (10 %), incluídos em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de 5 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (MACMANUS, MOWRY, 1964) e pelo método de *Perls*, que utiliza como corante o reagente de *Perls* e o vermelho neutro a 1% de solução

aquosa; como resultados: a cor azul que é o ferro férrico, o vermelho que é o núcleo e o vermelho claro outras estruturas (BEHMER *et al.*, 1976).

O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz, com aumentos de 40, 100 e 400 x. A intensidade do depósito de hemossiderina no fígado, baço e medula óssea foi analisada semiquantitativamente na escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro da normalidade com ausência de pigmento de hemossiderina; 1 = alterações mínimas caracterizadas por presença de 1 até 10 células com hemossiderina por campo de 400x; 2 = alterações grau moderado no qual se observam de 11 a 50 células com pigmentos; 3 = grau máximo de alteração no qual há mais de 50 células com pigmentos por campo de 400 x. Nas análises histológicas quanto às alterações circulatórias, degenerativas, necróticas e inflamatórias nos fragmentos dos órgãos examinados, foi levada em consideração a intensidade e a localização das alterações.

4.10.2 Apoptose

A apoptose foi avaliada pelo método de microscopia de fluorescência de acordo com Ong *et al.* (2006), em metodologia descrita por Stinchcombe *et al.* (1995). Foi utilizado microscópio de epifluorescência (Nikon - Eclipse E-800, Japão) em aumento de 400 x, para quantificar o número de corpúsculos apoptóticos (CA) nas áreas de lesão ou de tecido sem alteração. Foram contados todos os corpúsculos e mensurada a área de corte. A área de corte foi mensurada pela lupa (Olympus SZX7, Japão) com foco de 0,8 mm e auxílio do sistema de análise de imagens Image Pro-Plus versão 6.3. Essas análises foram realizadas no Departamento de Patologia da FMVZ/USP, no laboratório de Oncologia Experimental Comparada.

4.11 Análise estatística

A análise dos dados foi feita com pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows versão 18 (SPSS 18) e Minitab versão 16 (Minitab 16). Todos os testes foram realizados assumindo um nível de significância $\alpha = 5\%$. Inicialmente foi utilizada a estatística descritiva para avaliar a média e o desvio-padrão das variáveis de interesse. A correlação de Pearson (MORETTIN e BUSSAB, 2001) foi calculada para medir o grau de associação entre algumas variáveis. As comparações das médias das variáveis, entre os quatro grupos (controle, G2, G3 e G4), foram realizadas através da ANOVA

(MONTGOMERY, 2001). Para as diferenças significativas, o *Post-Hoc* de *Tukey* foi aplicado para identificar onde ocorreram essas diferenças.

Às análises histológicas, por serem semiquantitativas, foram avaliadas por teste não-paramétrico, utilizado em distribuições assimétricas (SIEGEL, 1988). O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar variáveis ordinais com mais de duas amostras entre os grupos e em seguida o teste de *Fisher* (CAMPOS, 2010) para identificar onde ocorreram essas diferenças. A medida da correlação utilizada foi a correlação de *Spearman* (SILVER, 2000).

5 Resultados

5.1 Composição centesimal e mineral das dietas experimentais:

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da composição centesimal e em Fe das rações experimentais.

Tabela 2 - Composição centesimal e de Fe das rações experimentais^{1*}

Componentes	G Fe 35	G Fe 350	G Fe 750	G Fe 1500	p
Umidade (%)	10 ± 1,1	11 ± 1,3	10 ± 1,1	10 ± 0,5	0,760
Proteína (%)	19 ± 0,4	17 ± 0,8	18 ± 0,4	18 ± 0,6	0,070
Lípídeo (%)	7 ± 0,1	7 ± 0,6	7 ± 0,5	7 ± 0,2	0,980
Carboidrato ² (%)	62 ± 1,0	63 ± 2,1	63 ± 1,1	64 ± 1,7	0,540
Cinzas totais (%)	3 ± 0,2	3 ± 0,3	3 ± 0,1	3 ± 0,1	0,930
Fe (mg/kg)	52 ± 3,9 ^a	389 ± 31,0 ^b	762 ± 55,5 ^c	1620 ± 101,7 ^d	0,000

GFe 35: grupo controle (35 mgFe/kg ração); GFe 350, GFe 750 e GFe 1500 (350, 750 e 1500 mgFe/kg ração, respectivamente). *Estatística: Anova e Post-Hoc de *Tukey*.

¹ Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média ± desvio-padrão (n = 3)

² A fração carboidrato foi determinada pela diferença do total de macronutrientes

Valor calórico das rações: 387, 383, 387, 391 kcal/100g respectivamente para GFe 35, GFe 350, GFe 750 e GFe 1500.

5.2 Consumo alimentar e ganho de peso

Na Tabela 3 são apresentados o consumo total de ração e de Fe e o ganho de peso dos animais, durante 90 dias de experimento.

Tabela 3 - Consumo total de ração e de Fe, ganho de peso de ratos alimentados com rações controle e sobrecarga de Fe, por 90 dias^{1*}

Parâmetros	GFe 35	GFe 350	GFe 750	GFe 1500	p
	n = 9	n = 10	n = 10	n = 8	
Consumo total de ração (g)	1489 ± 94,2	1451 ± 118,2	1560 ± 104,5	1475 ± 112,1	0,153
Consumo de Fe (mg)	78 ± 5,2 ^a	482 ± 44,6 ^b	1015 ± 68,5 ^c	2097 ± 171,9 ^d	0,000
Peso inicial (g)	163 ± 3,8	162 ± 5,7	162 ± 5,8	163 ± 4,9	0,856
Peso final (g)	336 ± 33,8	312 ± 7	348 ± 22,5	320 ± 32,8	0,116
Ganho de peso (g)	173 ± 33,5	150 ± 45,1	186 ± 22,6	156 ± 29,0	0,098

GFe35: grupo controle (35 mg Fe/kg ração); GFe350, GFe750 e GFe1500 (350, 750 e 1500 mg Fe/kg ração, respectivamente). *Estatística: Anova e Post-Hoc de *Tukey*.

¹Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média ± desvio-padrão.

5.3 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Na Tabela 4 são apresentados os resultados referentes ao perfil lipídico (colesterol total e frações – HDL, VLDL e triacilglicerol) e atividade das transaminases (ALT e AST) no sangue. Na Tabela 5 encontram-se aqueles referentes aos parâmetros hematológicos determinados em sangue e coletado ao fim de 90 dias de experimento.

Tabela 4 – Perfil lipídico e atividade de transaminases no sangue de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de Fe, por 90 dias^{1*}

Parâmetros	GFe 35 n = 8	GFe 350 n = 8	GFe 750 n = 9	GFe 1500 n = 6	p
Triacilglicerol (mg/dL)	51 ± 35,3	60 ± 26,6	69 ± 33,6	48 ± 22,4	0,521
Colesterol (mg/dL)	58 ± 17,8	63 ± 22,7	59 ± 8,4	53 ± 9,6	0,688
HDL ² (mg/dL)	43 ± 12,0	58 ± 32,0	42 ± 12,9	37 ± 8,7	0,199
VLDL ³ (mg/dL)	10 ± 7,1	12 ± 5,3	14 ± 6,7	10 ± 4,3	0,509
ALT ⁴ (UI/L)	32 ± 20,3	29 ± 17,9	21 ± 5,6	19 ± 11,9	0,321
AST ⁵ (UI/L)	113 ± 41	101 ± 36,2	89 ± 18,9	71 ± 32,5	0,133

GFe35: grupo controle (35 mg Fe/kg ração); GFe350, GFe750 e GFe1500 (350, 750 e 1500 mg Fe/kg ração, respectivamente). *Estatística: Anova e Post-Hoc de Tukey.

¹Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média ± desvio-padrão

²HDL indica lipoproteína de alta densidade; VLDL³, lipoproteína de muito baixa densidade; ALT⁴ aspartato aminotransferase; AST⁵, alanina aminotransferase

Tabela 5 – Parâmetros hematológicos de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de ferro, por 90 dias^{1*}

Parâmetros	GFe 35 n = 8	GFe 350 n = 8	GFe 750 n = 9	GFe 1500 n = 6	p
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7 ± 0,8	7 ± 0,6	7 ± 0,6	7 ± 0,4	0,099
Hemoglobina (g/dL)	13 ± 1,3 ^a	14 ± 1,4 ^{a,b}	15 ± 0,9 ^b	14 ± 0,5 ^{a,b}	0,016
Hematócrito (%)	35 ± 4,0 ^a	39 ± 2,9 ^{a,b}	40 ± 2,6 ^b	39 ± 2,4 ^{a,b}	0,011
VCM ² (fl)	53 ± 0,8 ^a	53 ± 1,5 ^{a,b}	55 ± 1,6 ^{b,c}	56 ± 0,8 ^c	0,000
HCM ³ (pg)	19 ± 1,0	19 ± 0,8	20 ± 1,2	20 ± 0,8	0,221
Reticulócitos (%)	3 ± 0,8	4 ± 1,5	3 ± 0,4	3 ± 0,6	0,137
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	3 ± 1,3	3 ± 1,4	4 ± 1,1	3 ± 0,6	0,162
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	467 ± 150	532 ± 56,4	576 ± 72,4	524 ± 86,9	0,216

GFe35: grupo controle (35 mg Fe/kg ração); GFe350, GFe750 e GFe1500 (350, 750 e 1500 mg Fe/kg ração, respectivamente). *Estatística: Anova e Post-Hoc de Tukey.

¹Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média ± desvio-padrão

²VCM indica volume corpuscular médio; HCM³, hemoglobina corpuscular média.

5.4 Parâmetros hepáticos

Na Tabela 6 são apresentados o peso (absoluto e relativo) do fígado e as concentrações hepáticas de Fe, e na Tabela 7 as correlações entre o consumo e parâmetros de Fe.

Tabela 6 – Peso e concentração hepática de Fe de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de Fe, por 90 dias^{1*}

Parâmetros	GFe 35 n = 9	GFe 350 n = 10	GFe 750 n = 10	GFe 1500 n = 8	p
Peso do fígado(g)	9 ± 1,3	9 ± 2,9	11 ± 2,9	10 ± 1,7	0,192
Peso fígado/peso corporal (%)	3 ± 0,3	3 ± 0,7	3 ± 0,70	3 ± 0,44	0,184
Fe (µmol/g fígado)	3 ± 1,3 ^a	8 ± 2,5 ^b	8 ± 2,1 ^{b,c}	12 ± 3,5 ^c	0,000

GFe35 indica grupo controle (35 mg Fe/kg ração); GFe350, GFe750 e GFe1500, sobrecarga de ferro (350, 750 e 1500 mg Fe/kg ração, respectivamente). *Estatística: Anova e Post-Hoc de *Tukey*.

¹Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média ± desvio-padrão

Tabela 7 - Correlações entre consumo e parâmetros de Fe (n = 31)*

Parâmetros	Consumo de Fe (mg/90d)		Fe no Fígado (µmol/g)	
	r	p	r	p
Fe no fígado (µmol)	0,740	0,000	-	-
VCM (fL)	0,750	0,000	0,560	0,000

*Estatística: Correlação de *Pearson*.

5.5 Perfil de ácidos graxos

Na Tabela 8 são apresentados os resultados do perfil de incorporação de ácidos graxos, após extração e esterificação dos lipídeos em homogenatos do fígado.

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos (%) no fígado de ratos alimentados com rações controle e sobrecarga de Fe, por 90 dias^{1*}

Ácidos graxos (%)	GFe 35 n = 9	GFe 350 n = 10	GFe 750 n = 10	GFe 1500 n = 8	p
16:0	1,08 ± 0,46	1,09 ± 0,5	0,82 ± 0,22	0,99 ± 0,52	0,503
18:0	0,94 ± 0,46	1,01 ± 0,45	0,77 ± 0,18	0,88 ± 0,46	0,599
16:1	0,06 ± 0,02	0,1 ± 0,08	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,05	0,164
18:1, cis-9	0,51 ± 0,22	0,46 ± 0,22	0,35 ± 0,1	0,44 ± 0,22	0,331
18:1, cis-11	0,21 ± 0,08	0,18 ± 0,09	0,16 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,547
24:1	0,24 ± 0,12	0,28 ± 0,15	0,23 ± 0,1	0,26 ± 0,14	0,854
18:2 (ω-6)	1,12 ± 0,67	1,1 ± 0,48	0,88 ± 0,25	0,89 ± 0,37	0,569
20:3 (ω-6)	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,307
20:4 (ω-6)	1,37 ± 0,56	1,39 ± 0,63	1,13 ± 0,33	1,25 ± 0,6	0,692
18:3 (ω-3)	0,1 ± 0,13	0,09 ± 0,12	0,04 ± 0,05	0,06 ± 0,08	0,562
20:3 (ω-3)	1,13 ± 0,57	1,37 ± 0,62	1,12 ± 0,33	1,25 ± 0,59	0,690
22:5 (ω-3)	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,331
22:6 (ω-3)	0,29 ± 0,12	0,28 ± 0,15	0,22 ± 0,07	0,27 ± 0,14	0,538
AGPI ω-6	2,52 ± 0,98	2,52 ± 1,11	2,04 ± 0,58	2,20 ± 0,99	0,596
AGPI ω-3	1,56 ± 0,70	1,78 ± 0,90	1,40 ± 0,45	1,61 ± 0,83	0,712
ω-6/ω-3	1,65 ± 0,20	1,44 ± 0,12	1,47 ± 0,11	1,40 ± 0,12	0,143
Ácidos graxos total	7,64 ± 2,91	7,94 ± 3,61	6,23 ± 1,8	7,09 ± 3,45	0,612
Saturados	2,02 ± 0,91	2,09 ± 0,92	1,59 ± 0,4	1,88 ± 0,98	0,540
Monoinsaturados	1,02 ± 0,35	1,03 ± 0,49	0,79 ± 0,27	0,95 ± 0,47	0,542
Poliinsaturados	4,08 ± 1,67	4,3 ± 2	3,44 ± 1,02	3,8 ± 1,82	0,688

GFe35 indica grupo controle (35 mg Fe/kg ração); GFe350, GFe750 e GFe1500, sobrecarga de ferro (350, 750 e 1500 mg Fe/kg ração, respectivamente). *Estatística: Anova e Post-Hoc de *Tukey*.

¹Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média ± desvio-padrão

5.6 Análises histológicas

5.6.1 Fígado

5.6.1.1 Hemossiderina e Morfologia

- a) Ausência de pigmentos de hemossiderina no GFe 35. Degeneração vacuolar microgoticular hepatocelular discreta em zona 1 (2/6), zona 2 (3/6) e sem zoneamento (2/6); discreto infiltrado de linfócitos, macrófagos e plasmócitos nos espaços-porta (4/6). O quadro corresponde à discreta hepatopatia vacuolar e hepatite portal condizentes com resposta sistêmica inespecífica.
- b) Frequência dos pigmentos de hemossiderina de 1/6 (*Perls* positivo) em hepatócitos, células de *kupffer* e macrófagos portais nos grupos GFe 350 e GFe 750. Degeneração vacuolar microgoticular hepatocelular discreta sem zoneamento (2/6) com quadro correspondente à discreta hepatopatia vacuolar condizente com resposta sistêmica inespecífica para o grupo GFe 350; e para o grupo GFe 750, a análise histológica dos fragmentos revelou degeneração vacuolar microgoticular hepatocelular discreta em zona 3 (3/6) e sem zoneamento (1/6), discreto infiltrado de linfócitos, macrófagos e plasmócitos nos espaços-porta (1/4), com quadro de discreta hepatopatia vacuolar e hepatite portal condizentes com resposta sistêmica inespecífica.
- c) No grupo GFe 1500 a frequência de pigmentos de hemossiderina é de 5/6 em células de *kupffer* e 4/6 em hepatócitos e macrófagos portais. Degeneração vacuolar microgoticular discreta em zona 2 (1/6) e zona 3 (3/6) e sem zoneamento (2/6); discreto infiltrado de linfócitos, macrófagos e plasmócitos nos espaço-porta (2/6) e discreto infiltrado de linfócitos lobular (1/6), quadro de discreta hepatopatia vacuolar e hepatite portal condizentes com resposta sistêmica inespecífica (Anexo 2).

5.6.1.2 Corpúsculos apoptóticos

Na figura 2, são apresentados os resultados da avaliação dos corpúsculos apoptóticos no fígado e do índice apoptótico nesse tecido.

Tabela 9 – Correlação entre o consumo de Fe e a concentração de Fe no fígado com o número de corpúsculos apoptóticos (n = 24)*

Parâmetros	Consumo de Fe (mg/90d)		Fe no fígado (μmol/g)	
	r	p	r	p
Apoptose (n° corp/mm ²)	0,806	0,00	0,749	0,00

*Estatística: correlação de *Pearson*.

Figura 2 – Corpúsculos apoptóticos no tecido hepático do fígado de ratos alimentados com rações controle e com sobrecarga de ferro por 90 dias. (A) e (B), fotomicrografia representando cortes histológicos, observados em microscopia de fluorescência, do tecido hepático do grupo G35 e G750, respectivamente. Em (A), ausência de corpúsculos. Em (B), as setas indicam corpúsculos no citoplasma do hepatócito. Figuras em aumento de 400x. GFe35 indica grupo controle (35 mg Fe/kg ração); GFe350, GFe750 e GFe1500, sobrecarga de ferro (350, 750 e 1500 mg Fe/kg ração, respectivamente). Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores diferentes ($p \leq 0,05$). Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 6$)

Figura 3 – (A) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de fígado sem alterações histológicas. HE, 100x. (B) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de fígado sem alterações histológicas. *Perls*, 100x. (C) Rato, grupo 750mg. Fotomicrografia de fígado exibindo macrófagos com pigmento de hemossiderina em espaço porta. HE, 200x. (D) Rato, grupo 750 mg. Fotomicrografia de fígado mostrando células de *Kupffer* com pigmento de hemossiderina. *Perls*, 200x . (E) Rato, grupo 1500 mg. Fotomicrografia de fígado mostrando degeneração vacuolar microgoticular em zona 3. HE, 200x. (F) Rato, grupo 1500mg. Fotomicrografia de fígado exibindo pigmento de hemossiderina em macrófagos portais (M) e em células de *Kupffer* (seta). *Perls*, 200x

5.6.2 Baço

- a) Presença de macrófagos com pigmentos de hemossiderina na polpa vermelha e discreta congestão. Observaram-se focos de hematopoiese extramedular; quadro histológico correspondeu a discreta hemossiderose esplênica para o G35 mgFe/kg.
- b) Presença de macrófagos com pigmentos de hemossiderina na polpa vermelha e em raros folículos linfóides da polpa branca na frequência de 3/6 e hematopoiese extramedular; quadro histológico correspondeu a hemossiderose esplênica discreta a moderada para o G350 mgFe/kg.
- c) Presença de macrófagos com pigmentos de hemossiderina na polpa vermelha e nos folículos linfóides da polpa branca na frequência de 6/6, focos de hematopoiese extramedular, congestão discreta (G750) e discreta a moderada (G1500); quadro histológico correspondeu a severa hemossiderose esplênica para os grupos G 750 e G1500 mgFe/kg. (Anexo 3).

5.6.3 Medula óssea

- a) Ausência de pigmentos de hemossiderina para o G35 mgFe/kg.
- b) Discreto depósito de pigmentos de hemossiderina de granulação fina (1/6) para o G750 e (2/6) para os grupos G350 e G1500 mgFe/kg.

Para todos os grupos, a análise histológica revelou medula 90% celular exibindo as três linhagens, a relação granulocítica:eritrocítica (3:1) e a maturação celular preservada; quadro correspondeu a medula óssea dentro do padrão histológico normal (Anexo 4).

Figura 4 - (A) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de baço sem alterações histológicas. HE, 100x. (B) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de baço exibindo poucos depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x. (C) Rato, grupo 750mg. Fotomicrografia de baço exibindo macrófagos com pigmento de hemossiderina. HE, 100x. (D) Rato, grupo 750 mg. Fotomicrografia de baço mostrando severo depósito de hemossiderina. *Perls*, 100x. (E) Rato, grupo 1500 mg. Fotomicrografia de baço mostrando severo depósito de hemossiderina. HE, 100x. (F) Rato, grupo 1500mg. Fotomicrografia de baço exibindo severo depósito de hemossiderina. *Perls*, 100x

Figura 5 – (A) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de medula óssea sem alterações histológicas. HE, 100x. (B) Rato, grupo controle. Fotomicrografia de medula óssea, ausência de depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x. (C) Rato, grupo 750mg. Fotomicrografia de medula óssea sem alterações histológicas. HE, 100x. (D) Rato, grupo 750 mg. Fotomicrografia de medula óssea sem depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x . (E) Rato, grupo 1500 mg. Fotomicrografia de medula óssea sem alterações histológicas. HE, 100x . (F) Rato, grupo 1500mg. Fotomicrografia de medula óssea, sem depósitos de hemossiderina. *Perls*, 100x

Tabela 10 - Correlação entre o consumo de Fe, Fe hepático e resultados da classificação de *Perls* para hemossiderina (n = 24)*

Órgão	Células	Consumo de Fe (mg/90d)		Fe hepático ($\mu\text{mol/g}$)		Apoptose (nº corp/mm ²)	
		r	p	r	p	r	p
	Kupffer	0,638	0,001	0,691	0,000	0,506	0,012
Fígado	Macrófago portal	0,615	0,001	0,603	0,002	0,287	0,174
	Hepatócito	0,467	0,021	0,529	0,008	0,451	0,027
Baço	Macrófagos	0,793	0,000	-	-	-	-

*Estatística: correlação de *Spearman*.

6 Discussão

No presente estudo, em que se buscou avaliar o modelo de sobrecarga de Fe na dieta, observou-se que níveis dietéticos entre 10 e 40 vezes a recomendação de Fe não afetaram o consumo de ração e o peso corporal dos animais avaliados (Tabela 3). Por outro lado, nos resultados observou-se aumento do VCM (Tabela 5), que, segundo Barton, Bertoli e Rothenberg (2000), é comum em indivíduos com sobrecarga acentuada de Fe. Esses resultados assinalaram que a partir de cerca de 20 vezes a recomendação, já ocorreria alterações do tamanho do eritrócito, como já descrevia Finch (1982).

Embora o peso relativo do fígado não tenha sido afetado, a sobrecarga de Fe na ração também resultou em aumento significativo da concentração de Fe no órgão, quando os grupos foram comparados com o grupo controle (Tabelas 6 e 7). O Fe hepático corresponde a 60 % do total de Fe do organismo e desse, 95 % é armazenado nos hepatócitos como ferritina e 5 % como hemossiderina nas células de *Kupffer*. Os 40 % de Fe restantes são encontrados nos tecidos musculares e nos macrófagos do sistema reticuloendotelial (BEARD *et al.*, 1996). Em estudo anterior do nosso laboratório, demonstrou-se aumento significativo da concentração de Fe no fígado (cerca de 12,2 % em relação ao grupo controle) após 90 dias de consumo de rações com moderada sobrecarga de Fe (550 mg/kg) (COCATO, 2008). Outros estudos demonstraram aumento da concentração hepática de Fe proporcional à concentração na ração em intervalo variando de 3 mg a 1500 mg de Fe/kg de ração (WARD *et al.*, 1991; DABBAGH *et al.*, 1994; BRUNET *et al.*, 1999; WHITTAKER e CHANDERBHAN, 2001; COCKELL *et al.*, 2005).

As análises histológicas para se avaliar a distribuição do depósito de Fe indicaram, para os animais do grupo GFe 1500, *Perls* positivo em células de *Kupffer* (discreto a moderado depósito de hemossiderina), hepatócitos e macrófagos portais (discreto depósito de hemossiderina) e fígado total (acentuado depósito de hemossiderina) (Figura 3, Tabela 11, Anexo 2). No baço, as análises indicaram intensos depósitos de hemossiderina em macrófagos (polpa vermelha) e folículos linfóides (polpa branca) nos grupos GFe 750 e 1500 (Figura 4, Tabela 12, Anexo 3).

Esses resultados, já esperados, reforçam o papel do fígado e do baço no armazenamento do Fe em situações normais e principalmente quando há incremento da disponibilidade do mineral no organismo, como foi o caso do presente estudo. Por outro lado, é importante considerar que, possivelmente, o controle exercido pela “barreira da mucosa” na

absorção intestinal de Fe em situações de sobrecarga do mineral pode ter sido alterado em função da oxidação lipídica nas células intestinais (KE *et al.*, 2001).

O Fe intracelular em excesso é potencialmente tóxico, por ser catalisador de reações de oxidação que favorecem a produção de ERO (GALARIS e PANTOPOULOS, 2008). Espécies reativas de oxigênio podem levar, por exemplo, à peroxidação lipídica nas células hepáticas. Vários estudos demonstraram peroxidação lipídica como resultado da sobrecarga de Fe, avaliada por diferentes protocolos (DABBAGH *et al.*, 1994; BRUNET *et al.*, 1999; WHITTAKER, CHANDERBHAN, 2001; LAFAY *et al.*, 2005). No entanto, nas condições experimentais do presente estudo, não foram observadas alterações nas transaminases e no perfil lipídico sérico bem como no perfil de ácidos graxos no fígado, sugerindo uma eventual proteção antioxidante nesse compartimento (Tabelas 4 e 8).

Segundo Jacob (1977), no fígado de pacientes com hemocromatose, o Fe inicialmente está depositado na região periportal dos hepatócitos (zona 1); em estágios mais avançados da doença, há acúmulo de Fe nas regiões intermediária e centrolobular dos hepatócitos, bem como nas células de *Kupffer*. A progressão do acúmulo de Fe no fígado evolui para fibrose, cirrose micronodular e carcinoma hepatocelular. Whittaker *et al.* (1996) suplementaram rações de ratos com Fe carbonila nas concentrações de 35, 350, 3500 e 20000 mgFe/kg por quatro meses. Nos fígados dos animais com sobrecarga de Fe observaram-se depósitos de hemossiderina na zona 1 (periportal) dos hepatócitos e com 3500 e 20000 mgFe/kg na ração, gradiente de Fe da região portal para central. No baço, maiores quantidades de hemossiderina foram visualizadas nos macrófagos sinusoidais dos grupos com maiores concentrações de Fe. Houve atrofia desse órgão nos ratos com sobrecarga por perda das células primárias afetando a zona marginal da polpa branca, possivelmente resultado de redução do número de linfócitos.

Narama *et al.* (1999) estudando aspectos toxicológicos de ingestão de Fe suplementaram rações comerciais com diferentes concentrações de lactato de Fe variando de 1500 a 12000 mgFe/kg. Os autores observaram que nessas condições experimentais extremas, houve discreta diminuição na concentração de hemoglobina acompanhada de aumento na contagem de plaquetas e reticulócitos. O menor nível de Fe desse ensaio correspondeu ao maior nível de Fe de nosso estudo.

Meguro *et al.* (2005), através de administração intraperitoneal de Fe dextrana em ratos (20 mg de Fe a cada 2 dias, em um total de 10 mg de Fe por 3 semanas) identificaram que em todas as áreas dos lóbulos hepáticos, as células de *Kupffer* encontravam-se repletas de

Fe e edemaciadas, com siderossoma densamente presente, indicando elevado trabalho fagolisossomal; a concentração de Fe foi intensa nos hepatócitos e nos sinusóides das células endoteliais. Nos macrófagos do baço houve aumento nos siderossomas, com ausência de edema; os depósitos de Fe foram distribuídos principalmente de acordo com a massa da hemossiderina.

Valerio e Petersen (2000) suplementaram a ração AIN 93 G de camundongos geneticamente modificados com 0,2 p/p de ferroceno por quatro meses; a sobrecarga de Fe provocou *Perls* Prussian grau quatro nos hepatócitos, grandes depósitos de hemossiderina na região centrolobular dos hepatócitos e pouca concentração nas células de *Kupffer*, presença de siderossomas nas células parenquimais com valores quinze vezes maiores do que o controle; fibrose hepática claramente associada com aumento de Fe nos hepatócitos, predominantemente na região centrolobular. Apesar dos níveis de sobrecarga de Fe que utilizamos no nosso estudo não serem tão altos quanto os desses estudos apresentados, e nosso modelo de sobrecarga não ser o mesmo de pacientes com hemocromatose, percebemos um aumento de discreto a moderado de hemossiderina nas células de *Kupffer* no grupo de maior sobrecarga (Figura 3, Tabela 10).

As células de *Kupffer* representam a maior população de macrófagos do organismo e possuem estratégias anatômicas e histológicas para controlar a entrada de substâncias trazidas pelo sangue portal (VANDERKERKEN *et al.*, 1995). Quando ativadas, as células de *Kupffer* podem desencadear processos secundários que envolvem dois grupos: no primeiro grupo estão incluídas as prostaglandinas e os leucotrienos, no segundo grupo fazem parte as interleucinas-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), dentre outros. Esses processos secundários que envolvem as células de *Kupffer* podem induzir alterações no tecido hepático como reações inflamatórias, apoptose, fibrose e necrose (VANDERKERKEN *et al.*, 1995, CANBAY *et al.*, 2003, RAM e RUDELL, 2010).

Nossos resultados indicam que à medida que se aumenta o nível de Fe nas rações, ocorre aumento proporcional do número de corpúsculos apoptóticos no tecido hepático (Figura 2, Tabela 9). Alguns autores (RAUEN *et al.*, 2004; ISOM, DEVITT e MOO, 2009) sugerem que a sobrecarga de Fe em determinadas circunstâncias, (p. ex. em modelos de cultura de células) podem alterar a função mitocondrial e a fluidez de sua membrana em função do estresse oxidativo. Esse efeito pode resultar em modificações estruturais como o aumento da permeabilidade e formação de poros na membrana mitocondrial, com

conseqüente liberação de proteínas da matriz para o citoplasma e ativação de vias apoptóticas (p. ex., ativação de caspases).

Os resultados do presente estudo sugerem então que o controle da homeostase de Fe pode ser alterado em situações de sobrecarga do mineral na dieta. Essas alterações, observadas no fígado em nosso modelo experimental, são reflexo de um aumento nos depósitos de Fe, que resultam em morte celular. Os mecanismos envolvidos e as repercussões desses efeitos devem ser mais explorados para definir, p. ex., níveis superiores de ingestão do mineral (UL).

7 Conclusão

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- 1- 90 dias de consumo de rações com sobrecarga de ferro resultaram em aumento da concentração hepática e esplênica do mineral, conforme demonstrado pelas análises químicas e histológicas;
- 2- Esses efeitos, como o esperado, foram mais pronunciados nos animais que consumiram o maior nível de ferro nas rações (1500 mg Fe/kg);
- 3- O perfil de lipídeos e parâmetros de dano hepático avaliados no sangue, bem como o perfil de incorporação de ácidos graxos no fígado não foram afetados pela sobrecarga de ferro nas condições experimentais do presente estudo;
- 4- Observou-se aumento da quantidade de células em apoptose no fígado (associado com a concentração hepática de ferro), sugerindo que a sobrecarga de ferro resultou em morte celular.

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995. cap. 4, p. 8-11; cap. 31, p.1; cap. 32, p. 30-31; cap. 50, p. 15-17. (JAOAC 14, 529, 1931).

ASSUNÇÃO, M.C.; SANTOS, I.S. Efeito da fortificação de alimentos com ferro sobre anemia em crianças: um estudo de revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.2, p.269-281, 2007.

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1986-1995, 1999.

ANDREWS, N.C. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. **Annual Review of Genetics**, v. 1, p. 75-98, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico. **Resolução RDC n.344, 13 de dezembro de 2002**. Disponível em

<http://www.simabesp.org.br/arquivos/ResolucaoRDCn344de13122002.pdf>. Acessado em: 26 out. 2010.

ASARE, G.A.; MOSSANDA K.S.; KEW M.C.; PATERSON, A.C.; VENTER-K, C.P.; SIZIBA, K. Hepatocellular carcinoma caused by iron overload: a possible mechanism of direct hepatocarcinogenicity. **Toxicology**, v. 219, p. 41-52, 2009.

ASSA-BEN, E.; YOUNGSTER, I.; KOZER, E.; KISHK-ABU, I.; HAIM-BAR, A.; OZ-BAR, B.; BERKOVICHTH, M. Changes in serum hepcidin levels in acute iron intoxication in a rat model. **Toxicology Letters**, v. 189, p. 242-247, 2009.

BARTON, J.C.; BERTOLI, L.J.; ROTHENBERG, B.E. Peripheral blood erythrocyte parameters in hemochromatosis: evidence for increased erythrocyte hemoglobin content. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 135, p. 96-104, 2000.

BATTS, K.P. Iron overload syndromes and the liver. **Modern Pathology**, v. 20, p. S31-S39, 2007.

BEARD, J.L.; DAWSON, H.; PIÑERO, D.J. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutrition Reviews**, v. 54, n.10, p. 295-317, 1996.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976, 241 p.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BRAGA, J.A.P.; HOKAZONO, M. Sobrecarga de Ferro. In: BRAGA, J.A.P.; AMÂNCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. **O ferro e a saúde das populações**. São Paulo, Roca, 2006. cap.11, p.144.

BRAGA, J.A.P.; BARBOSA, T.N.N. Fisiologia e Metabolismo do ferro. In: BRAGA, J.A.P.; AMÂNCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. **O ferro e a saúde das populações**. São Paulo: Roca, 2006. cap.2, p. 10-26.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **American Journal of Pathology**, v. 19, p. 895-896, 1949.

BRUNET, S.; GUERTIN, F.; THIBAUT, L.; GAVINO, V.; DELVIN, E.; LEVY, E. Iron-salicylate complex induces peroxidation, alters hepatic lipid profile and affects plasma lipoprotein composition. **Atherosclerosis**, v. 129, p. 159-168, 1997.

BRUNET, S.; THIBAUT, L.; DELVIN, E.; YOTOV, W.; BENDAYAN, M.; LEVY, E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. **Hepatology**, v. 29, p. 1809-1817, 1999.

CABANTCHIK, I.Z.; BREUER, W.; ZANNINELLI, G.; CIANCIULLI, P. LPI-labile plasma iron in iron overload. **Best Practice & Research, Clinical Haematology**, v. 18, p. 277-287, 2005.

CAMPOS, G. Filosofia de alguns testes para estatística. In: _____. **Estatística prática para docentes e pós-graduandos**. Disponível em: http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro_cap19.html. Acesso em 28 out. 2010.

CANBAY, A.; FELDSTEIN, A.E.; HIGUCHI, H.; WERNEBURG, N.; GRAMBIHLER, A.; BRONK, S.F.; GORES, G.J. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. **Hepatology**, v. 38, n. 5, 2003.

COCATO, M.L. **Sobrecarga moderada de ferro em ratos: interação com frutanos e/ou fitato no metabolismo hepático e ósseo**. 2008. 91p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

COCATO, M.L.; RÉ, M.I.; TRINDADE-NETO, M.A.; CHIEBAO, H.P.; COLLI, C. Avaliação por métodos in vitro e in vivo da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. **Revista de Nutrição**, v. 20, p. 239-247, 2007.

COCKELL, K.A.; WOTHERSPOON, A.T.L.; BELONJE, B.; FRITZ, M.E.; MADERE, R.; HIDIROGLOU, N.; PLOUFFE, L.J.; RATNAYAKE, W.M.N.; KUBOW, S. Limited effects of combined dietary copper deficiency/iron overload on oxidative parameters in rat liver and plasma. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.16, p. 750-756, 2005.

COLLINS, J.F.; RESNICK-WESSLING, M.; KNUTSON, M.D. Hepcidin regulation of iron transport. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 2284-2288, 2008.

COZZOLINO, F.M.S; HENRIQUES, S.G. Ferro. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005. cap. 23, p.473-477.

DADA-LATUNDE, G.O.; MCKIE, A.T.; SIMPSON, R.J. Animal models with enhanced erythropoiesis and iron absorption. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1762, p. 414-423, 2006.

DABBAGH, A.J.; MANNION, T.; LYNCH, S.M.; FREI, B. The effect of iron on rat plasma and liver oxidant status *in vivo*. **Biochemical Journal**, v. 300, p. 799-803, 1994.

DOMENICO, I.D.; WARD, D.M.; KAPLAN, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. **Nature**, v. 9, p. 72-89, 2008.

ENG, S.C.; TAYLOR, S.L.; REYES, V.; RAAKA, S.; BERGER, J.; KOWDLEY, K.V. Hepatic iron overload in alcoholic end-stage liver disease is associated with iron deposition in other organs in the absence of HFE-1 hemochromatosis. **Liver International**, v. 25, p. 513-517, 2005.

FAIRBANKS, V.F. O ferro em medicina em nutrição. In: SHILS, M. E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C., eds. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. Barueri: Manole, 2003. v.1, cap.10, p.207-212

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FLEMING, D.J.; TUCKER, K.L.; JACQUES, P.F.; DALL, GE; WILSON, P.W.F.; WOOD, R.J. Dietary factors associated with the risk of iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 6, p.1375-84, 2002.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, p. 609-619, 2008.

FILIPPIN, F.; REIS, K., CEMIN, L., DUZZIONI, M.; HERMES, E.M.; SOUZA, C. L. Novo intervalo de referência para alanina aminotransferase usando o sistema automatizado de bioquímica Dade Behring Ar Dimension. **NewsLab**, v. 65, p. 148-152, 2004.

FINCH, C. Regulators of iron balance in humans. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1697-1702, 1994.

FINCH, C.A. Erythropoiesis, erythropoietin, and iron. **Blood**, v. 60, p. 1241-1246, 1982.

FISKE, C.W.; SUBBAROW, V. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p.375 – 400, 1925.

FRANCHINI M.; TARGHER G.; MONTAGNANA M.; LIPPI G. Iron and thrombosis. **Annals of Hematology**, v. 87, p. 167-173, 2008.

FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v. 30, p. 288-297, 2003.

GALARIS, D.; PANTOPOULOS, K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 45, p. n. 1, p. 1-23, 2008.

GANZ, T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. **Hematology**, v. 507, p. 29-35, 2006.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron imports IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, pt. G199-G203, 2006.

GIANNINI, EG.; TESTA R.; SAVARINO V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-79, 2005.

GINZBURG, Y.Z.; RYBICKI, A.C.; SUZUKA, S.M.; HALL, C.B.; BREUER, W.; CABANTCHIK, Z.I.; BOUHASSIRA, E.E.; FABRY, M.E.; NAGEL, R.L. Exogenous iron increases hemoglobin in β -thalassemic mice. **Experimental Hematology**, v. 37, p. 172-183, 2009.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

GUIMARÃES, A.R.P; KUGA. E.; TORRES. R.P.; COLQUHOUN, A.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Composition of fatty acids in the liver and lymphoid organs of rats fed fatty acids-rich diets. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 36, p. 451–461, 1995.

HARRISON, F., DEE, D. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 37, p. 4925-4930, 2007.

HERSHKO, C. Iron loading and its clinical implications. **American Journal of Hematology**, v. 82, p. 1147-1148, 2007.

ISELIN-ALLMANN, I. Husbandry. In: KRINKE, G.J. **The Laboratory Rat**. London and San Diego, Academic Press, 2000, chap. 4, p. 45-55.

ISOM, H.C.; MCDEVITT, E.I.; MOON, M.S. Elevated hepatic iron: a confounding factor in chronic hepatitis C. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 650-662, 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE. Iron. In: _____. **Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. New York: National Academy Press, 2000. cap. 9, p. 290-393.

JACOB, A. Iron overload – Clinical and pathological aspects. **Seminars in Hematology**, v. 14, p.89-113, 1977.

KABAT, G.C.; ROHAN, T.E. Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? An unresolved hypothesis. **Cancer Causes Control**, v. 18, n. 10, p. 1047-1053, 2007.

KE, L; JS, F-T; GS, W; TI, J. Chronic exposure to high levels of dietary iron fortification increases lipid peroxidation in the mucosa of the rat large intestine. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 11, p. 2928-31, 2001

KOHGO, Y.; IKUTA, K.; OHTAKE, T. Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis / insulin resistance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 35, p. 4699-4706, 2007.

LAFAY, S.; GUEUX, E.; RAYSSIGUIER, Y.; MAZUR, A.; REMESY, C.; SCALBERT, A. Caffeic acid inhibits oxidative stress and reduces hypercholesterolemia induced by iron overload in rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 75, n. 2, p. 119-125, 2005.

LIMDI, J.K.; HYDE, G.M. Evaluation of abnormal liver function tests. **Postgraduate Medical Journal**, v. 79, n. 932, p. 307-312, 2003.

LUND, E.K.; WHARF, S.G.; TAIT-F., S.J.; JOHNSON, I.T. Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 250-255, 1999.

LYKKESFELD, J.; MORGAN, E.; CHRISTEN, S. Oxidative Stress and damage in liver, but not brain, of Fischer 344 rats subjected to dietary iron supplementation with lipid-soluble. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 21, n. 3, p. 145-154, 2007.

MACKENZIE, B.; GARRICK, M.D. Iron imports. II. Iron uptake at the apical membrane in intestine. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, p. G981-G986, 2005.

MCMANUS, J.F.A; MOWRY, R.W. Frozen Section Routines in Surgical Pathology. **Staining Methods. Histologic and Histochemical**. New York: Harper & Row, 1964. cap. 7, p. 68-69.

MEGURO, R.; ASANO, Y.; ODAGIRI, S.; LI, C.; IWATSUKI, H.; SHOUMURA, K. The presence of ferric and ferrous iron in the nonheme iron store of residence macrophages in different tissues and organs: histochemical demonstrations by the perfusion-*Perls* and Turnbull methods in the rat. **Archives of Histology Cytology**, v. 68, n. 3, p. 171-183, 2005.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 5.ed. New York: John Wiley, 2001. 684p.

MORGAN, H.E; OATES, S.P. Mechanism and regulation of intestinal iron absorption. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 29, n. 3, p. 384-399, 2002.

MORETTIN, P.A.; BUSSAB, W.O. **Estatística básica**. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 2003. 526p

MUCKENTHALER, M.U.; GALY, B.; HENTZE, M.W. Sistemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 197-213, 2008.

NARAMA, I.; OZAKI, K.; MATSUURA, T.; MARUYAMA, H. Topographic relation between iron-deposition and citotoxic changes in iron lactate-overload rats. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 12, p. 105-111, 1999.

OLYNYK, J.K; TRINDER, D.; RAMM, G.A.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R. Hereditary Hemochromatosis in the post HFE era. **Hepatology**, v. 48, p. 991-1001, 2008.

ONG, T.P.; HEIDOR, H.; CONTI, A.; DAGLY, M.L.Z.; MORENO, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferations and DNA damage, but distinct actions on apoptosis plasma cholesterol and HMG CoA reductase. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 6, p. 1194-1203, 2006.

PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 1-13, 2004.

PERKIN-ELMER. **Atomic absorption spectroscopy. Analytical methods**. Norwalk: The Perkin-Elmer Corporation, 1996. 300p.

PIETRANGELO, A. Iron chelation beyond transfusion iron overload. **American Journal of Hematology**, v. 82, p. 1142-1146, 2007.

PONKA, P.; BEAUMONT, C.; RICHARDSON, R.D. Function and regulation of transferrin and ferritin. **Seminars in Hematology**, v. 35, n. 1, p. 35-54, 1998.

PRATI, D.; MAGGION, M.; MILANI, S.; CERINO, M.; CIANCIULLI, P.; COGGI, G.; FRONI, G.L.; MAGNANO, C.; MEO, A.; GRAMIGNOLI, R.; REBULLA, P.; FIORELLI, G.; CAPPELLINI, M.D. Clinical and histological characterization of liver disease in patients with transfusion-dependent B-thalassemia: a multicenter study of 117 cases. **Haematological**, v. 89, p. 1179-1186, 2004.

PRITCHETT, K.R.; CORNING, B.F. Biology and medicine of rats. In: REUTER, J.D.; SUCKOW, M.A. **Laboratory animal medicine and management**. New York: International Veterinary Information Service, 2004.

RAMM, G.A.; RUDDALL, R.G. Iron homeostasis, hepatocellular injury, and fibrogenesis in hemochromatosis: the role of inflammation in a noninflammatory liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 30, n.3, p. 271-287, 2010.

RAUEN, U.; PETRAT, F.; SUSTMANN, R.; GROOT, H. Iron- induced mitochondrial permeability transition in culture hepatocytes. **Journal of Hepatology**, v. 40, p. 607-615, 2004.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN – 93G purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN – 76 A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RESNICK-WESSLING, M. Iron Imports III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 1, pt. 1, p. G1-G6, 2006.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 20, p. 315-28, 1947.

ROUAULT, T.A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. **Nature**, v. 2, n. 8, p. 406-414, 2006.

SCHUMANN, K.; ETTLE, T.; SZEGNER, B. On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 147-168, 2007.

SELIM, M.H.; RATAN R. R. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. **Ageing Research Reviews**, v. 3, p. 345-353, 2004.

SHARP, P.; SRAI, S.K. Molecular mechanism involved in intestinal iron absorption. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 35, p. 4716-4724, 2007.

SHANDER, A; CAPPELLINI, M.D; GOODNOUGH, L. T. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. **Vox Sanguinis**, v. 97, p. 185-197, 2009.

SIAH, C.W.; OMBIGA, J; ADAMS, L.A.; TRINDER, D.; OLYNYK, J.K. Normal Iron Metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 27, n.1, p. 5-16, 2006.

SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral science**. Boston: Mac Graw Hill, 1988. 399p.

SILVER, M. **Estatística para administração**. São Paulo: Atlas, 2000. 458p.

SOUZA, A.F.M.; CARVALHO Filho, R.J; CHEBLI, J.F. Hemocromatose hereditária. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 3, p. 194-202, 2001.

STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCK, K.W.; SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2, 3, 7, 8 – tetrachlorodibenzeno-p-dioxin mediated tumor promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 1271-1275, 1995.

SUBRAMANIAM, N.; DEUDNIER, Y.; TURLIN, B. Pathology of hepatic iron overload. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 35, p. 4755-4760, 2007.

THOMPSON, D.F.; RAEBEL, M.A. Reassessment of measuring total iron binding capacity in acute iron overdose. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 28, n.1, p. 63-66, 1994.

VALKO, M.; RHODES, J.C.; MONCOL, J.; ISAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals, and antioxidants in oxidative stress induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n.1, p. 1-40, 2006.

VALERIO, L.G.; PETERSEN, D.R. Characterization of hepatic iron overload following dietary administration of dicyclopentadienyl iron (ferrocene) to mice: cellular, biochemical, and molecular aspects. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 68, p. 1-12, 2000.

VANDERKERKEN, K.; BOUWENS, L.; ROOIJEN, N.V.; BERG, K.V.D.; BAEKELAND, M.; WISSE, E. The role of kupffer cells in the differentiation process of hepatic natural killer cells. **Hepatology**, v.22, p. 283-290, 1995.

WARD, R.J.; FLORENCE, A.L.; BALDWIN, D.; ABIAKA, C.; ROLAND, F.; RAMSEY, M.H.; DICKSON, D.P.E.; PETERS, T.J.; CRICHTON, R.R. Biochemical and biophysical investigations of the ferrocene-iron-loaded rat. **European Journal of Biochemistry**, v.202, p. 405-410, 1991.

WHITTAKER, P.; HINES, F.A.; ROBL, M.G.; DUNKEL, V.C. Histopathological evaluation of liver, pancreas, spleen, and heart from iron-overloaded Sprague-Dawley rats. **Toxicologic Pathology**, v. 24, n. 5, p. 558-563, 1996.

WHITTAKER, P.; CHANDERBHAN, R.F. Effect of increasing iron supplementation on blood lipids in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 86, p. 587-592, 2001.

ZANCUL, M.S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.37, p. 45-50, 2004.

ANEXO

Tabela 11 - Análise histológica semi-quantitativa das concentrações de Fe no fígado de ratos alimentados com ração controle e sobrecarga de Fe*

Animal	G	PH	PK	PMP	ETPF	DVZ1	DVZ2	DVZ3	DVD	DVSZ	TCZ1	TCZ2	TCZ3	C	PIP	PIZ1	PIZ2	PIZ PILS	NZ1	NZ2	NZ3
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
52	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	2	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	3	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
22	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
19	4	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	4	1	1	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	4	1	1	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	4	1	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
40	4	1	2	1	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
53	4	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Controle: G1 (controle) = 35 mgFe/kg, G2 = 350 mgFe/kg, G3 = 750 mgFe/kg e G4 = 1500 mgFe/kg.

PH = *Perls* hepatócito, PK = *Perls* kupffer, PMP = *Perls* macrófago portal, ETPF = escore total *Perls* fígado, DVZ1 = degeneração vacuolar zona 1, DVZ2 = degeneração vacuolar zona 2

DVD = degeneração vacuolar difusa, DVSZ = degeneração vacuolar sem zoneamento, TCZ1 = tumefação celular zona 1, TCZ 2 = tumefação celular zona 2, TCZ 3 = tumefação celular

Zona 3, C = congestão, PIP = processo inflamatório portal, PIPZ1 = processo inflamatório portal zona 1, PIPZ2 = processo inflamatório portal zona 2, PIPZ3 = processo inflamatório

Portal zona 3, PILSZ = processo inflamatório lobular sem zoneamento, NZ1 = necrose zona 1, NZ2 = necrose zona 2, NZ3 = necrose zona 3. Escore 0 = ausência de pigmento de hemossiderina. Escore 1 = discreta alteração presença de 1 a 10 células com hemossiderina por campo de 40 x. Escore 2 = presença em grau moderado de hemossiderina em número de 11 células a 50 células por campo de 40 x. Escore 3 = grau severo de hemossiderina presente nas células em número de 51 a todas por campo de 40 x.

*Estatística: *Kruskal-Wallis* e *Fisher*

Tabela 12 – Análise histológica semi-quantitativa da concentração de Fe no baço de ratos alimentados com ração controle e sobrecarga de Fe*

Animal	Grupo	Perls	HEM	Congestão
17	1	1	1	0
52	1	1	1	1
15	1	2	1	1
20	1	1	1	0
50	1	2	1	0
6	1	1	1	0
57	2	1	1	0
55	2	2	1	0
16	2	2	1	1
10	2	2	1	0
29	2	2	1	0
60	2	2	1	1
43	3	2	1	0
4	3	2	1	1
39	3	3	1	1
22	3	3	1	1
36	3	3	0	1
34	3	3	1	1
19	4	3	1	0
21	4	3	1	0
14	4	3	1	0
11	4	3	1	2
40	4	3	1	1
53	4	3	1	0

Controle: G1 (controle) = 35 mgFe/kg, G2 = 350 mgFe/kg, G3 = 750 mgFe/kg e G4 = 1500 mgFe/kg

HEM = hematopoiese extramedular. Escore 0 = ausência de pigmento de hemossiderina. Escore 1 = discreta alteração, presença de 1 a 10 células de hemossiderina por campo.

Escore 2 = presença em grau moderado de hemossiderina em número de 11 células a 50 células por campo de 40 x.

Escore 3 = grau severo de hemossiderina presente em 51 a todas as células por campo de 40 x.

*Estatística: *Kruskal-Wallis* e *Fisher*

Tabela 13 – Análise histológica semi-quantitativa da concentração de Fe na medula óssea de ratos alimentados com ração controle e sobrecarga de Fe*

Animal	Grupo	Perls	Celularidade	GE	Maturação
17	1	0	90	0	0
52	1	0	90	0	0
15	1	0	90	0	0
20	1	0	90	0	0
50	1	0	90	0	0
6	1	0	90	0	0
57	2	1	90	0	0
55	2	0	90	0	0
16	2	0	90	0	0
10	2	1	90	0	0
29	2	0	90	0	0
60	2	0	90	0	0
43	3	1	90	0	0
4	3	0	90	0	0
39	3	0	90	0	0
22	3	0	90	0	0
36	3	0	90	0	0
34	3	0	90	0	0
19	4	1	80	0	0
21	4	1	90	0	0
14	4	0	90	0	0
11	4	1	95	0	0
40	4	0	95	0	0
53	4	0	95	0	0

Controle: G1 (controle) = 35 mgFe/kg, G2 = 350 mgFe/kg, G3 = 750 mgFe/kg e G4 = 1500 mgFe/kg

Escore 0 = ausência de pigmento de hemossiderina. Escore 1 = discreta alteração, presença de 1 a 10 células de hemossiderina por campo de 40 x. GE = células eritrocíticas/células granulocíticas em medula.

*Estatística: *Kruskal-Wallis* e *Fisher*