

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

**MODIFICAÇÃO DO BARORREFLEXO E DO REFLEXO
BEZOLD-JARISCH EM RATOS NÃO ANESTESIADOS E
SUBMETIDOS À SUPLEMENTAÇÃO PARENTERAL DE FERRO**

AUTOR: LEONARDO MÁXIMO CARDOSO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior

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

Ouro Preto, setembro de 2003.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio da Capes, FAPEMIG e UFOP e CNPq.

*Aforismo nº 4 - Conhecimento e coragem se
alternam na grandeza*

*Sendo imortais, immortalizam. Você é o tanto
quanto sabe, e se for sábio é capaz de tudo.
Homem sem saber, mundo às escuras.
Discernimento e força; olhos e mãos. Sem valor,
a sabedoria é estéril.*

“A Arte da Prudência – Um Oráculo Manual”;

Baltasar Gracián, 1647 “

—| *Agradecimentos*

Aos meus pais, por serem ao longo da vida, meu apoio e meu maior exemplo.

Ao meu irmão, por estar sempre perto de mim, mesmo a quilômetros de distância.

Ao meu orientador Déo, pela amizade, pelos ensinamentos, orientação e, principalmente, pela paciência e estímulo desde a iniciação científica, essenciais para a concretização desse trabalho. Agradeço por ter me aceitado como seu co-orientado na iniciação científica e orientado no mestrado e me iniciado na carreira científica.

À professora Maria Lúcia Pedrosa, pela amizade, confiança, pelo ajuda em momentos difíceis e por sua valorosa orientação no âmbito acadêmico-científico que deu início a este trabalho. Agradeço por ter me aceitado como seu orientado na iniciação científica e me iniciado na carreira científica.

Ao professor Márcio Flávio Dutra Moraes (UFMG), pela amizade e extraordinária ajuda que em muito contribuiu para minha formação, aprendizado e para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcelo Eustáquio Silva, pela paciência, amizade, ensinamentos e pelos inúmeros animais de que necessitei;

À professora Andréa Siqueira Haibara (UFMG), pela amizade importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Eduardo Colombari (EPM-UNIFESP) pelo apoio que contribui para a realização deste trabalho.

Aos laboratórios de Imunoparasitologia (prof. Luiz Carlos), de Bioquímica e Biologia Molecular (prof. Babá), de Bioquímica e Fisiologia de Microorganismos (profs. Ieso e Rogelio) e ao laboratório de Enzimologia e Biofísica (prof Milton) pelo constante apoio.

Aos colegas do laboratório pela ajuda prestada.

Aos colegas do mestrado (Maristela, Renata, Regina, Marcos Aurélio, Marcelo, Jorgino, Eduardo, ...) pela convivência agradável.

*Aos **professores do NUBEP, Cida e demais funcionários** envolvidos neste projeto.*

Vários trabalhos vêm demonstrando os efeitos da sobrecarga de ferro em disfunções do sistema cardiovascular. Um dos principais mecanismos envolvidos nestas disfunções é o aumento na geração de espécies altamente reativas conhecidas coletivamente como radicais livres. Dado à capacidade destas substâncias e do próprio ferro interferirem com processos fisiológicos de uma maneira muito abrangente, neste trabalho nós avaliamos os efeitos do tratamento com ferro dextran (uma droga capaz de induzir sobrecarga de ferro) sobre o barorreflexo e o reflexo Bezold-Jarisch de ratos conscientes. Para avaliar o papel de radicais livres, o quelante de ferro deferoxamina foi utilizado.

Ratos Fischer 344 machos, jovens, pesando aproximadamente 200 g foram randomizados e submetidos a dois protocolos de suplementação com ferro dextran. No protocolo *Direto*, 20 mg/dia de ferro elementar foi injetado i.p. diariamente por 7 dias seguido imediatamente pelas avaliações dos reflexos (Barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch). No protocolo *Indireto*, menos ferro elementar foi injetado (10 mg/dia) por período menor de tempo (5 dias) seguido por um período de 7 dias sem injeções de ferro dextran, após o qual, os experimentos foram conduzidos. Os níveis de ferro circulante e nos tecidos foram determinados por colorimetria. As respostas reflexas de frequência cardíaca (FC) foram elicitadas por injeções endovenosas (i.v.) de fenilefrina (Phe, 0,5 a 5,0 µg/Kg) ou nitroprussiato de sódio (NP 1,0 a 10,0 µg/Kg). As bradicardias e hipotensões reflexas referentes ao reflexo Bezold-Jarisch forma elicitadas por injeções i.v. de fenilbiguanida (0,625 a 5,0 µg/Kg). Barocurva foram derivadas para cada classe de pressão, submetidas a uma regressão sigmoidal e o ganho barorreflexo determinado através da primeira derivada destas sigmóides. Para avaliar o papel de radicais livres nas alterações reflexas do protocolo *Indireto*, um tratamento agudo com o quelante de ferro deferoxamina (20 mg/Kg, i.v.) foi conduzido e ambos, barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch, reavaliados.

Ambos protocolos *Direto* e *Indireto* afetaram a FC basal e a variabilidade da FC no domínio do tempo. Entretanto, a PAM basal e a variabilidade da PAM no domínio do tempo não apresentaram diferenças. O protocolo *Direto* não produziu alterações significativas nas respostas da barocurva, enquanto o protocolo *Indireto* produziu um

aumento de aproximadamente duas vezes no ganho barorreflexo máximo ($-5,0 \pm 0,4$ sham vs -8 ± 1 tratado com ferro). A bradicardia reflexa produzida pelo reflexo Bezold-Jarisch, mas não a hipotensão, foi atenuada no protocolo *Direto* nas doses de $1,25 \mu\text{g/Kg}$ e $2,5 \mu\text{g/Kg}$ em relação ao sham. No protocolo *Indireto*, a bradicardia foi atenuada na dose de $1,25 \mu\text{g/Kg}$, a bradicardia e a hipotensão na dose de $2,5 \mu\text{g/Kg}$ e a hipotensão na dose de $5,0 \mu\text{g/Kg}$ quando comparado ao sham. Os animais do protocolo *Indireto* tratados com ferro dextran apresentaram um retorno do ganho barorreflexo médio após o tratamento com DFO quando comparado com o grupo sham ($-3,7 \pm 0,3$ sham vs $-3,6 \pm 0,2$ ferro dextran + DFO). A hipotensão para o reflexo Bezold-Jarisch foi potencializada no grupo tratado com ferro dextran assemelhando-se à observada no grupo sham nas mesmas condições (após DFO).

Nossos resultados indicam um efeito indireto do ferro sobre o aumento do ganho barorreflexo e da atenuação do reflexo Bezold-Jarisch nos animais tratados com ferro dextran. Os resultados do modelo do protocolo *Indireto* mostraram barocurvas mais análogas às aquelas associadas com falência cardíaca. Além disso, o aumento da sensibilidade do Barorreflexo associado com a atenuação do reflexo Bezold-Jarisch poderiam ser parcialmente relacionados a mecanismos compensatórios para danos cardíacos ou falência cardíaca induzida pela sobrecarga de ferro. Nossos resultados sugerem ainda, por outro lado, ser a sobrecarga de ferro um interessante modelo *in vivo* para falência cardíaca que pode atender a ambos o quesitos: ser gradual e, até certo ponto, reversível.

—| **Abstract**

Recent studies have demonstrated the effect of iron-overload in cardiovascular dysfunctions. In this work we evaluated the direct and indirect effect of iron-overload treatment on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex on awaked Fischer 344 rats. We investigate the role of free-radicals on animals submitted to this paradigm.

In the *Direct* protocol, 20 mg/daily of elementary iron was injected i.p. daily for 7 days followed immediately by baroreflex and Bezold-Jarisch reflex evaluation. In the *Indirect* protocol, less elementary iron was injected (10 mg/daily) for a smaller period of time (5days) followed by a resting period of 7days, after which, experiments were conducted. Iron levels were determined by colorimetric assays. Reflex heart rate responses were elicited either by i.v. injections of phenylephrine (Phe, 0.5 to 5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) or sodium nitroprusside (NP 1.0 to 10.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Bezold-Jarisch reflex bradycardia and hypotension were elicited by i.v. injections of phenylbiguanide (0.625; 1.25; 2.5; 5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Barocurves were derived for pressure bins, fitted to sigmoidal equations and baroreflex gain was determined within pressure bins. To weigh the role of free-radicals vs iron on the *Indirect* protocol, an acute antioxidant treatment with deferoxamine (20 mg/Kg, i.v.) was conducted and both baroreflex and Bezold-Jarisch reflex re-evaluated.

Both *Direct* and *Indirect* protocols affect HR baseline and variability, however, baseline MAP and MAP variability did not reach statistical significance to indicate differences. The *Direct* protocol did not produce significant alterations in barocurve response, while the *Indirect* protocol produced a nearly two fold increase in baroreflex gain (-5.0 ± 0.4 sham vs -8 ± 1 iron overload). Bezold-Jarisch reflex bradycardia, but not hypotension, was attenuated in *Direct* protocol at the doses of 1.25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ and 2.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ in relation to the sham. In *Indirect* protocol, bradycardia was attenuated at the dose of 1.25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, bradycardia and hypotension in the dose of 2.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ and the hypotension at the dose of 5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ when compared to the sham. The *Indirect* protocol animals treated with deferoxamine (DFO - 20 mg/Kg, i.v.) presented sham levels of baroreflex gain (-3.7 ± 0.3 sham vs -3.6 ± 0.2 DFO) and hypotension for Bezold-Jarisch reflex.

Our results indicate an indirect effect of iron on the enhancement of baroreflex sensitivity and Bezold-Jarisch attenuation due to iron overload. Results from the

Indirect protocol model of iron overload show barocurves profiles most analogous to those associated with heart failure. Moreover, the increased sensitivity of the baroreflex associated with the attenuation of the Bezold-Jarisch reflex could be partially related to a compensatory mechanism for iron-induced heart impairment or failure in iron treated rats. Thus, our work suggests iron-overload as an interesting *in-vivo* model for heart failure that is both gradual and, to some extent, reversible.

—| *Índice Analítico*

1. Introdução	1
1.1. Metabolismo do ferro e origem dos radicais livres	4
1.2. Ferro, sistema cardiovascular e regulação neurovegetativa cardíaca	8
1.3. Possível ação do ferro sobre canais iônicos e enzimas	14
2. Objetivo	17
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Modelo animal: suplementação parenteral com ferro	20
3.2. Drogas e soluções	21
3.3. Confecção e implantação das cânulas arteriais e venosas.....	23
3.4. Registros de pressão arterial e frequência cardíaca	24
3.5. Protocolo experimental para estimulação do barorreflexo	26
3.6. Protocolo experimental para estimulação do reflexo Bezold-Jarisch.....	26
3.7. Protocolos experimentais para avaliação da PA, FC, barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch em animais sob efeito do quelante deferoxamina	27
3.8. Análise dos dados e estatística	28
3.9. Determinação de parâmetros bioquímicos	30
3.9.1. Determinação de ferro circulante.....	30
3.9.2. Determinação de ferro no fígado e baço	31
4. Resultados	32
4.1. Efeito do tratamento com ferro dextran sobre os níveis de ferro circulante, conteúdo de ferro no baço e fígado.	33
4.2. Efeito do tratamento com ferro dextran sobre os níveis basais de PAM, FC, variabilidade no domínio do tempo de pressão de pulso.....	35
4.3. Barorreflexo em animais tratados com ferro dextran no protocolo Direto.....	37
4.4. Reflexo Bezold-Jarisch em animais tratados com ferro dextran no protocolo Direto	41
4.5. Barorreflexo em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto.....	44

4.6. Reflexo Bezold-Jarisch em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto.....	48
4.7. Barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto e sob efeito de deferoxamina.....	51
5. Discussão	56
6. Bibliografia	68
Apêndice	79
Publicações	91

—| *Índice de figuras*

Figura 1 – Esquema da absorção de ferro proveniente da dieta em mamíferos (adaptado de Beard, J.L., 1996).	5
Figura 2 – Mecanismo de produção de radicais livres (A) e de dano celular (B) no stress oxidativo. (adaptado de A: Halliwell & Gutteridge, 1986 e B: Kehrer, 1993).	11
Figura 3 – Esquema representativo dos elementos anátomo-funcionais que compõem as vias do quimiorreflexo, barorreflexo e dos reflexos cardiopulmonares.	14
Figura 4 – (a) Representação esquemática do “swivel” construído em nosso laboratório para realização de ensaios com animais não anestesiados e com movimentação livre. O tubo metálico proveniente da agulha 22G2 apontada pela seta vertical (↓) permanece imóvel, conectada ao transdutor por intermédio de uma cânula PE-50 enquanto o corpo do “swivel” gira em torno deste tubo metálico. (b) representação esquemática do sistema utilizado para aquisição dos dados; (A) transdutor de pressão, (b) amplificador analógico, (c) conversor analógico digital.....	25
Figura 5 - Níveis de ferro circulante (painel A), no fígado (painel B) e no baço (painel C) em animais sham e tratados com ferro dextran. As barras representam o valor médio de cada parâmetro e as hastes o valor do erro padrão das médias.* diferença significativa entre animais sham e tratados com ferro dextran ($p < 0,05$, teste t de Student); ** diferença significativa entre animais dos protocolos Direto e Indireto ($p < 0,05$, teste t de Student).	34
Figura 6 – FC (painel A) e PAM (painel B) basais de animais sham e tratados com ferro dextran. As barras representam o valor médio de um intervalo de 10 a 20 minutos que precedem as estimulações do reflexo Bezold-Jarisch e do barorreflexo e as hastes o valor do erro padrão desta média. * diferença significativa entre o grupo sham e tratados com ferro dextran ($p < 0,05$, teste t de Student).	36
Figura 7 – Registros de um animal representativo do grupo sham mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.	38

- Figura 8** – Registros de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Direto mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.....39
- Figura 9** – O painel superior (A) mostra os valores de pico da FC contra em função dos valores de pico da PAM quando da estimulação do barorreflexo com L-fenilefrina e nitroprussiato de sódio (para detalhes veja o texto) em animais sham (●, n = 12) e do protocolo Direto (○, n = 12). As linhas pontilhadas (----) representam o grupo tratado com ferro dextran e as linhas contínuas representam o grupo sham (—). A regressão sigmoidal logística das curvas barorreflexas é a média de 10 regressões sigmoidais obtidas de dados de animais não anestesiados sham e do protocolo Direto. O painel inferior (B) representa o ganho barorreflexo, ou seja, a primeira derivada média das funções sigmóides a um determinado valor de PAM. O ganho barorreflexo máximo ocorre no valor de PAM₅₀.40
- Figura 10** – Registros de um animal representativo do grupo sham (Controle) e de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Direto mostrando os efeitos das injeções i.v. de fenilbiguanida sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.....42
- Figura 11** - Bradicardias (painel A) e hipotensões (painel B) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch em animais sham e animais do protocolo Direto. Cada ponto representa a variação média do parâmetro avaliado em função da dose e as hastes o erro padrão da média. * P<0,05 (teste t de Student).43
- Figura 12** – Registros de um animal representativo do grupo sham mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.....45
- Figura 13** – Registros de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Indireto mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.....46
- Figura 14** – O painel superior (A) mostra os valores de pico da FC contra em função dos valores de pico da PAM quando da estimulação do barorreflexo com L-fenilefrina e nitroprussiato de sódio (para detalhes veja o texto) em animais sham (●, n = 12) e do protocolo Indireto (○, n = 12). As linhas pontilhadas (----) representam o grupo tratado com ferro dextran e as linhas contínuas representam o

grupo sham (—). A regressão sigmoidal logística das curvas barorreflexas é a média de 10 regressões sigmoidais obtidas de dados de animais não anestesiados sham e do protocolo Indireto. O painel inferior (B) representa o ganho barorreflexo, ou seja, a primeira derivada média das funções sigmóides a um determinado valor de PAM. O ganho barorreflexo máximo ocorre no valor de PAM ₅₀	47
Figura 15 – Registros de um animal representativo do grupo sham (Controle) e de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Indireto mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.	49
Figura 16 - Bradicardias (painel A) e hipotensões (painel B) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch em animais sham e tratados com ferro dextran no protocolo Indireto. Cada ponto representa a variação média do parâmetro avaliado em função da dose e as hastes o erro padrão da média. * P<0,05 (teste t de Student).	50
Figura 17 – Registros de um animal representativo do grupo sham mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida e nitroprussiato de sódio sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo antes (Antes da DFO) e após (Depois da DFO) injeções i.v. de mesilato de deferoxamina.	52
Figura 18 – Registros de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Indireto mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida e nitroprussiato de sódio sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo antes (Antes da DFO) e após (Depois da DFO) injeções i.v. de mesilato de deferoxamina.	53
Figura 19 - Ganho barorreflexo geral em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto e sham antes e após a infusão de deferoxamina. No painel A as barras representam os valores médios deste parâmetro e as hastes o erro padrão da média. No painel B, uma cópia da barocurva dos animais tratados no protocolo Indireto é mostrada com o intervalo de variação de PAM marcado (retângulo) demonstrando que o ganho foi avaliado num segmento da sigmóide onde as diferenças entre os animais sham e do protocolo Indireto são bastante evidentes. * diferença estatística em relação ao sham; ** diferença estatística entre animais tratados com ferro dextran antes e após DFO (p<0,05 teste t de Student).....	54

Figura 20 – Bradicardias (painel A) e hipotensões (painel B) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch antes (linha contínua) e após (linha pontilhada) a infusão de deferoxamina em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto [Fe(+)] e sham [controle] Cada ponto representa a variação média do parâmetro avaliado em função da dose e as hastes o erro padrão da média. * $P < 0,05$ (teste t de Student).....55

—| *Índice de tabelas*

Tabela 1 - Condições que elevam os níveis de ferro em vários fluidos ou tecidos do corpo humano.....	3
Tabela 2 - Composição da ração comercial NUVILAB CR1®	80
Tabela 3 - Ferro circulante, ferro no fígado e ferro no baço de animais sham e tratados com ferro dextran.O conteúdo de ferro nos tecidos é expresso como μmol de ferro elementar por grama de tecido.	81
Tabela 4 – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais em animais sham e tratados com ferro dextran.Os dados correspondem à média de uma período de registro contínuo de 10 a 20 minutos, precedentes à qualquer manobra farmacológica.	82
Tabela 5 – Variabilidade no domínio do tempo da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) de animais sham e tratados com ferro dextran.Os dados correspondem ao desvio padrão da média de intervalos de 10 a 20 minutos de registro contínuo precedentes à qualquer manobra farmacológica.	83
Tabela 6 – Níveis de pressão de pulso em animais tratados com ferro dextran e sham. Cada valor corresponde à média da pressão de pulso em oito intervalos de 10 segundo ao longo do registro de cada animal.	84
Tabela 7 – Parâmetros da barocurva na animais sham e tratados (Tratado) com ferro dextran nos protocolos Direto e Indireto.	85
Tabela 8 – Valore médios de PAM e FC para as dez classes em que foram divididos os picos de PAM com seus respectivos picos de FC. Estes dados são representativos da dispersão das barocurvas para cada grupo. O Placebo corresponde aos picos de PAM e FC nas injeções placebo e em vermelho estão os valores de PAM e FC médios para o grupo considerando valores de intervalos de 10 segundos precedentes às estimulações do barorreflexo durante todo o experimento.....	85
Tabela 9 – Bradicardias (ΔFC) e hipotensões (ΔPAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida em animais sham e do protocolo Direto (P. Direto).....	86

Tabela 10 – Bradicardias (ΔFC) e hipotensões (ΔPAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida em animais sham e do protocolo Indireto (P. Indireto).	87
Tabela 11 – PAM e FC antes (AntesDFO) e após (ApósDFO) infusão i.v. de deferoxamina em animais sham e tratados com ferro dextran no protocolo Indireto. Os valores são a média da PAM e FC tomados em dois momentos num intervalo de 10 segundos durante o registro antes da infusão de DFO e em dois momentos após a infusão de DFO.....	88
Tabela 12 – Alterações cronotrópicas (ΔFC) e pressóricas (ΔPAM) evocadas por injeções i.v. de nitroprussiato de sódio e ganho barorreflexo antes e após infusão de deferoxamina em animais sham e tratado com ferro dextran no protocolo Indireto (P. Indireto).	89
Tabela 13 – Bradicardias (ΔFC) e hipotensões (ΔPAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida antes e após a infusão de deferoxamina em animais sham e tratados com ferro dextran no protocolo Indireto (P. Indireto).	90

—| *Lista de Abreviaturas*

PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PAM	Pressão Arterial Média
FC	Frequência Cardíaca
mmHg	milímetros de mercúrio
bpm	batimentos por minuto
UI	Unidades internacionais
µg	Micrograma
Kg	Quilograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
Δ mmHg	Variação de pressão arterial em milímetros de mercúrio
Δ bpm	Variação de frequência cardíaca em batimentos por minuto
$\bar{x} \pm Er Pd$	Média mais ou menos erro padrão da média
Fe	Ferro
SOD	Superóxido desmutase
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
GSH	Glutationa reduzida
NaCl	Cloreto de sódio
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Fosfato de sódio dibásico heptahidratado
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de sódio monobásico monohidratado
°C	Graus Celsius

1. Introdução

Acredita-se que durante a evolução da vida a capacidade de realizar processos bioquímicos elaborados com reações de oxi-redução e o aparecimento das vias metabólicas aeróbicas coincidem com o consumo de ferro acumulado nos mares primitivos. Desde cedo, os organismos vivos souberam aproveitar sua abundância e suas propriedades químicas para incrementar seus metabolismos e tornarem-se, dessa forma, mais competitivos. Na natureza, o ferro existe, em grande parte, na forma de compostos inorgânicos sólidos. Em solução, é encontrado nos estados de oxidação +2 e +3 sendo que em pH neutro e alcalino o potencial redox favorece o estado férrico, Fe^{3+} , e em pH ácido, favorece o estado ferroso, Fe^{2+} (Devlin, 1998). A capacidade de formar compostos de coordenação e, principalmente, a facilidade com que transita entre os estados oxidado e reduzido foram propriedades que lhe conferiram o status de elemento imprescindível para inúmeros processos metabólicos onde ele funciona como um catalisador para reações de oxi-redução, doando e recebendo elétrons (Yip & Dallman, 1996). Quando na ausência de controle, estas mesmas propriedades também conferem ao ferro toxicidade para os sistemas vivos. Isto funcionou como pressão seletiva do meio para que a evolução fosse conduzida no sentido de desenvolver e selecionar vários mecanismos de defesa contra os efeitos tóxicos deste elemento nos seres vivos. A eficiência destes mecanismos depende de uma série de fatores, mas o principal determinante seria o equilíbrio dinâmico entre o ferro presente no organismo e suas necessidades metabólicas.

Neste sentido, vários trabalhos relatam os efeitos deletérios que o acúmulo de ferro pode causar em mamíferos incluindo o homem (Link e cols., 1989; Asimakis e cols., 1997; Lieu e cols., 2001; Chiueh, 2001; Emerit e cols., 2001; Arosio & Levi, 2002). Inicialmente, a preocupação com os efeitos deste acúmulo se concentrava em pacientes com distúrbios metabólicos que favorecessem tal processo como, por exemplo, hemoglobinopatias, doenças hemolíticas e hemocromatose. Entretanto, nas últimas décadas alguns trabalhos têm relatado que o acúmulo de ferro pode ocorrer em condições outras, menos drásticas (Weinberg, 1990; Crawford, 1995). Dados experimentais e levantamentos epidemiológicos relatam uma série de fatores que podem levar a uma elevação dos níveis de ferro em humanos sendo que alguns destes fatores estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Condições que elevam os níveis de ferro em vários fluidos ou tecidos do corpo humano.

I. Absorção excessiva de ferro por via intestinal
A. Quantidade excessiva de ferro ingerido <ol style="list-style-type: none"> 1. Uso de panelas de ferro (Gordeuk e cols., 1986) 2. Consumo excessivo de alimentos vermelhos (ferro heme) (McLaren e cols., 1983; Morris, 1983; Sullivan, 1983) 3. “Fortificação” excessiva de alimentos com ferro inorgânico (Crosby, 1978; Olsson e cols., 1978) 4. Ingestão acidental de comprimidos de ferro (Murphy, 1974) B. Absorção aumentada de ferro (quantidade de ferro normal na dieta) <ol style="list-style-type: none"> 1. Consumo excessivo de álcool (Milder e cols., 1980; Chapman e cols., 1982; Irving e cols., 1988) 2. Consumo excessivo de ácido ascórbico (Lynch & Cook, 1980; Nienhuis, 1981; Morris, 1983) 3. Deficiência pancreática na produção de íons bicarbonato (Conrad & Barton, 1981) 4. Asplenia (Weinberg, 1987) 5. Excesso de produção de eritropoítina (Barber, 1988) 6. Defeito em receptores celulares na hemocromatose idiopática (Lombard e cols., 1989) 7. Defeitos eritropoiéticos resultantes de deficiência de ácido fólico, porfiria cutânea tardia, várias anemias e várias hemoglobinopatias (Hershko, 1977; Moreau e cols., 1998)
II. Ferro parenteral
A. Transfusões de sangue completo múltiplas ou frações eritrocíticas (Schafer e cols., 1981; McLaren e cols., 1983; Mossey & Sondheimer, 1985; Hershko, 1988) B. Ferro dextran intramuscular (Weinberg, 1984)
III. Ferro inalado
A. Mineração de minério de ferro (Antoine e cols., 1979) B. Soldagem de aço (Crawford, 1995) C. Formulários do crocidolite ou do amosite do corte de asbesto (Weitzman & Graceffa, 1984; Turver & Brown, 1987) D. Pintura com pó de óxido de ferro (Dreyfus, 1936) E. Tabagismo (McGowan & Henley, 1988)
IV. Elevação do ferro plasmático proveniente dos compartimentos
A. Liberação do ferro estocado durante a hepatite (Weinberg, 1984) B. Liberação do ferro de eritrócitos durante episódios clínicos de doenças hemolíticas (Weinberg, 1984) C. Supressão da captação celular de ferro do plasma pelo alcalóide de <i>Catharanthus</i> (Sethi e cols., 1984)
V. Redução da excreção normal de ferro em mulheres pré-menopausa
A. Histerectomia (Sullivan, 1981) B. Ingestão de altas doses de contraceptivos orais (Frassinelli-Gunderson e cols., 1985)
VI. Ausência de transferrina
A. Defeito congênito na síntese (Hershko, 1977; Bernstein, 1987) B. Falta de aminoácidos na dieta para síntese (Burger & Hogewind, 1974; Weinberg, 1984)

Adaptado de Weinberg, E. D., 1990.

No plano experimental, os modelos de suplementação parenteral de ferro vêm despertando grande interesse em vários pesquisadores. Um dos motivos para isto é o fato de que estes modelos são capazes de produzir uma condição de *stress* oxidativo (Lucesoli e cols., 1999), um importante evento associado ao processo de envelhecimento e morte celular tanto em condições fisiológicas quanto patológicas

(Choi e cols., 1998). De seus dois estados de oxidação, o ferro ferroso (Fe^{2+}) é a espécie mais reativa (Huang e cols., 2002). É um dos principais elementos na gênese de eventos citotóxicos num conjunto de reações que levam à formação de espécies químicas altamente reativas conhecidas coletivamente como *radicais livres* (Halliday & Powell, 1982). Dados experimentais mostram que a sobrecarga de ferro em um indivíduo é um estado capaz de aumentar a formação de radicais livres levando ao stress oxidativo (Burkitt & Mason, 1991) e que esta sobrecarga também pode amplificar os efeitos deletérios da superprodução destes radicais livres (Emerit e cols., 2001). Além disso, o stress oxidativo crônico pode modular a absorção e estoque de ferro levando a um processo auto-sustentado e crescente de eventos citotóxicos e mutagênicos (Emerit e cols., 2001).

No microambiente químico celular, existe uma gama de substâncias com a propriedade de impedir a propagação das reações químicas desencadeadas por radicais livres. Estas substâncias são coletivamente denominadas antioxidantes e além desta e outras funções, também modulam as reações de oxi-redução do metabolismo normal da célula no sentido de impedir a formação de radicais livres.

1.1. Metabolismo do ferro e origem dos radicais livres

Em mamíferos, o ferro é obtido da dieta sendo absorvido principalmente ao nível do duodeno. Uma vez captado da luz intestinal por um intrincado mecanismo ele é ligado a transferrina na forma de ferro férrico e carreado no sangue por esta proteína até os tecidos onde será utilizado e/ou armazenado (Yip & Dallman, 1996). A absorção de ferro é um evento controlado pela liberação do ferro captado pelo enterócitos para os capilares adjacentes à membrana baso-lateral sendo que a síntese de apoferritina por estas células constitui um dos principais mecanismos deste controle (Devlin, 1998). A figura 1 resume esquematicamente a absorção de ferro em mamíferos.

Uma vez nos tecidos alvo, a transferrina é reconhecida por receptores de membrana específicos e, ligando-se a eles, é endocitada. O endossomo é fundido a lisossomos onde o pH ácido faz com que o ferro seja liberado da transferrina. Livre do ferro, esta transferrina passa a se chamar apotransferrina e é, então, exocitada para a

corrente sanguínea. O ferro liberado é complexado por pequenas moléculas formando o *pool lábil* de ferro e, se não for utilizado na síntese de proteínas funcionais, é estocado em ferritina e hemossiderina, proteínas especializadas no armazenamento de ferro.

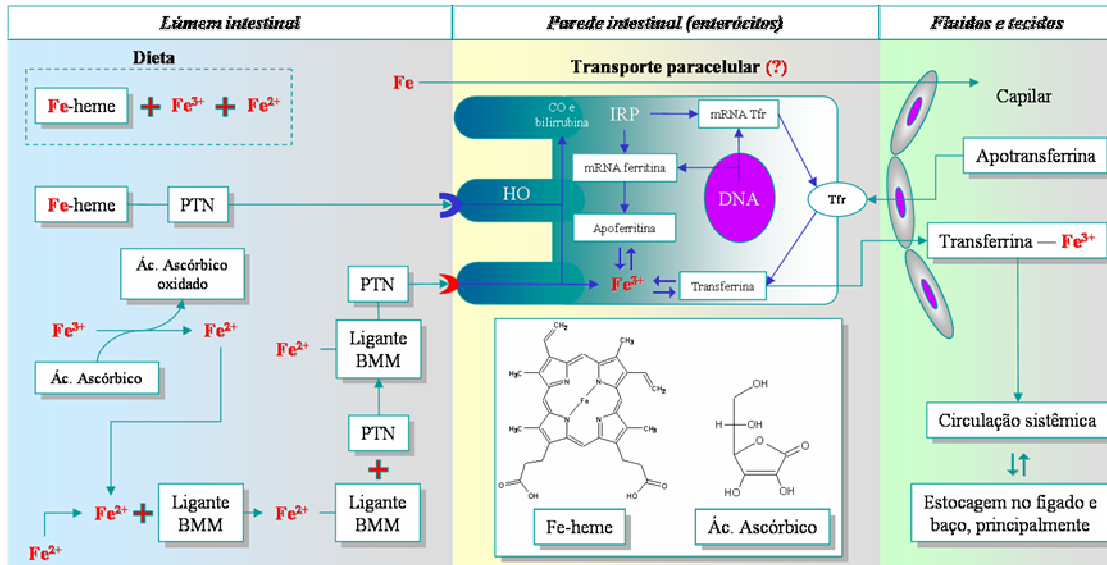


Figura 1 – Esquema da absorção de ferro proveniente da dieta em mamíferos (adaptado de Beard, J.L., 1996).

O ferro heme é diretamente ligado a transportadores na parede dos enterócitos para ser absorvido. Uma vez dentro do enterócito, o heme é degradado pela enzima Hemoxygenase (HO) que libera o ferro, monóxido de carbono e bilirrubina. O ferro (III) tem que passar por uma etapa onde é reduzido a ferro (II) para que este seja complexado por quelantes de baixa massa mola (Ligante BMM); estes complexos por sua vez são ligados a proteínas (PTN) que, por reconhecimento em transportadores específicos na superfície do enterócito, são endocitadas. Uma vez nos enterócitos, um intrincado mecanismo de controle envolvendo proteínas responsivas ao ferro (IRP), síntese de apoferritina e de receptores para transferrina (Tfr) regulam a liberação de ferro para corrente sanguínea ligada, desta vez a transferrina. Esta glicoproteína sintetizada no fígado o carrega até os tecidos alvos onde ele será armazenado em hemossiderina ou ferritina ou então incorporado em biomoléculas. O transporte paracelular constitui um mecanismo pelo qual o ferro é absorvido de forma descontrolada e sua real ocorrência in vivo ainda é controversa.

Nos sistemas vivos, o ferro funcional está na forma de proteínas ditas *hemínicas* (que contêm um grupamento heme em seus sítios funcionais) ou de proteínas ditas *não*

hemínicas. As proteínas hemínicas incluem as que transportam e armazenam oxigênio (hemoglobina, mioglobina) e certas enzimas como catalase, peroxidases, triptofano pirrolase, prostaglandina sintase, guanilato ciclase, NO sintase e os citocromos microsossomais e mitocondriais. Proteínas não hemínicas incluem transferrina, ferritina, várias enzimas redox que contêm ferro no sítio ativo e proteínas ferro enxofre (Devlin, 1998).

Conforme já mostrado na tabela 1, mesmo com estes mecanismos de controle da absorção de ferro, os mamíferos, incluindo humanos, podem se deparar com uma situação onde os níveis de ferro absorvidos da dieta ultrapassam suas necessidades podendo isto levar a um quadro patológico. Vários trabalhos vêm tentando descrever com maior precisão os mecanismos pelos quais este acúmulo de ferro pode ocorrer. Até o momento, apenas alguns elementos deste processo já foram identificados e parecem envolver a regulação ao nível molecular da síntese de proteínas e sinalizadores que controlam a liberação de ferro dos enterócitos para os capilares basais na mucosa do intestino (Powell & Halliday, 1981; Brittenham, 1994; McKie e cols., 2000). Independente da forma como o ferro pode se acumular no organismo, um ponto chave na gênese dos efeitos tóxicos deste acúmulo é o seu envolvimento na produção aumentada de radicais livres.

Os radicais livres podem ter sua formação catalisada por ferro (II), mas não pelo ferro (III), e por vezes têm função fisiológica definida como na eliminação de microorganismos patogênicos por macrófagos e/ou sinalização celular. Entretanto, quando a produção de radicais livres foge ao controle das células, estabelece-se um processo degenerativo molecular em cadeia que pode culminar em danos bioquímicos graves e morte celular. Durante o metabolismo normal da célula, moléculas altamente reativas conhecidas como superóxido (O_2^-) podem ser produzidas por algumas reações enzimáticas, na cadeia de transporte de elétrons e/ou do ferro com oxigênio. Este superóxido é prontamente eliminado através de uma reação mediada pela enzima superóxido desmutase (SOD) que catalisa a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma molécula menos reativa, a partir do superóxido.

Porém, quando em contato com traços de ferro (II) livre ou complexado com pequenas moléculas (p.e. $ADP-Fe^{2+}$), o peróxido de hidrogênio pode ser quebrado

formando outra espécie altamente reativa conhecida como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), um dos radicais livres mais danosos para a célula. Além da oxidação enzimática do superóxido pela SOD, determinadas reações enzimáticas também podem formar peróxido de hidrogênio como a catalisada pela enzima xantina oxidase, algumas desaminases dentre outras. Por ser um substrato para formação de espécies letais para as células, os organismos desenvolveram, no curso da evolução, mecanismos moleculares capazes de controlar estas reações mantendo-as em níveis muito baixos sob determinadas condições. A enzima catalase é uma das ferramentas utilizadas pela célula para controlar estas reações catalisando a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (O_2). Entretanto, quando esta atividade não é suficientemente grande para consumir todo o peróxido de hidrogênio gerado pelo metabolismo ou quando há maior disponibilidade de catalisadores inorgânicos como o Fe^{2+} pode haver um aumento na produção de radicais livres caracterizando um estado de *stress oxidativo*, numa reação classicamente conhecida como reação de Fenton.

Outro meio pela qual os radicais podem ser gerados é quando o ferro é armazenado em moléculas de ferritina. Trabalhos já demonstraram que a oxidação do ferro (II) para ferro (III) e sua ligação à ferritina para formar o “core” pode aumentar geração de radicais livres. Felizmente, esta produção de radicais livres fica confinada ao interior da molécula de ferritina protegendo a célula do stress oxidativo (Grady e cols., 1989). A conversão de ferritina para hemossiderina também parece ser um mecanismo interessante pelo qual as células se protegem dos efeitos tóxicos do ferro (O'Connell e cols., 1986). Entretanto, determinadas condições de acidose como processos inflamatórios e hipóxia (isquemia/reperfusão) podem favorecer a liberação de ferro da hemossiderina com geração de radicais livres promovendo dano tecidual em condições de suplementação de ferro. (Ozaki e cols., 1988).

O aumento na produção de radicais livres também pode estar associado a processos patológicos como na isquemia e reperfusão. Por exemplo, a frequência de disparos de células excitáveis como neurônios amielínicos conhecidos como fibras C é aumentada quando num evento de isquemia/reperfusão sendo que este fenômeno é atribuído a um aumento na produção de radicais livres (Ozaki e cols., 1988; Stahl e cols., 1993). Os autores observaram que a administração de deferoxamina atenuou este

efeito sugerindo fortemente o envolvimento de ferro. Trabalhos realizados em coração isolado demonstram que a liberação de ferro dos estoques é aumentada na isquemia e reperfusão e que o aumento do pool de ferro complexado por moléculas de baixa massa molar tem importante participação nas disfunções cardíacas observadas (Voogd e cols., 1992).

Num aspecto mais abrangente, os radicais livres propriamente ditos parecem não serem os únicos a exercerem efeitos tóxicos. Os produtos finais das cascatas de reações desencadeadas por eles também contribuem para disfunções celulares sendo que dentre estas substâncias destacam-se os aldeídos citotóxicos. A literatura relata disfunções cardíacas em animais suplementados com ferro provocados por aldeídos citotóxicos (Bartfay WJ e cols., 1999). A figura 2 sumaria um conjunto de reações envolvidas na formação de alguns radicais livres (A) e a seqüência de eventos relacionados à injúria celular (B).

1.2. Ferro, sistema cardiovascular e regulação neurovegetativa cardíaca

O sistema cardiovascular tem uma ação direta e crucial na tarefa de suprir cada célula de um organismo superior. Por ser um sistema que trabalha sob pressão e por ser esta pressão um fator determinante no adequado cumprimento desta função, no curso da evolução, a complexidade desta tarefa exigiu o desenvolvimento de dispositivos eficientes no monitoramento e manutenção da pressão arterial em níveis que atendam, simultaneamente, as necessidades de todos os tecidos. Para isto, o sistema cardiovascular dispõe de mecanismo refinados de ajuste da pressão arterial, atuando momento a momento (controle neural) e a longo prazo (controle humoral). Neste âmbito, há três pontos chave no controle da pressão arterial: 1) a ação sobre a bomba propriamente (débito cardíaco), 2) a ação sobre a resistência periférica total e 3) a ação sobre o volume circulante efetuado, principalmente, pelo sistema renal. A regulação homeostática da circulação pelo sistema neural envolve a ativação de receptores periféricos (barorreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonares, dentre outros), cujas aferências se projetam para o sistema nervoso central via nervos vago e glossofaríngeo. O processamento destas informações aferentes no sistema nervoso

central produz uma conseqüente modulação das vias simpáticas e parassimpáticas, havendo assim, o ajuste das variáveis cardiovasculares (frequência cardíaca, volume sistólico e resistência periférica), entre outros (como a regulação de volume por ajustes renais e peptídeo atrial natriurético).

Apesar de todo este controle dos níveis de pressão arterial no sentido de mantê-los dentro de uma faixa cuja relação custo/benefício seja a melhor possível, a elevação dos níveis de pressão arterial vêm se tornando um problema cada vez mais freqüente em humanos. Sabe-se que a elevação da pressão arterial e sua manutenção em níveis elevados podem ocorrer por alterações nos mecanismos de regulação do sistema cardiovascular. Freqüentemente, isto determina o aparecimento de co-morbidades além de um risco aumentado de ocorrência de acidentes vasculares cerebrais e infartos agudo e/ou crônico do miocárdio podendo levar o indivíduo à morte. O aumento na resistência vascular periférica é um achado comum na hipertensão arterial. Contudo, os mecanismos pelos quais o aumento da resistência vascular é iniciado e mantido durante a hipertensão ainda não são totalmente compreendidos.

Especial atenção vem sendo dada desde a última década aos efeitos do acúmulo do ferro sobre o sistema cardiovascular. A falência cardíaca vem sendo apontada como uma importante patologia desencadeada pela deposição de ferro no coração (Aldouri e cols., 1990; Liu & Olivieri, 1994). Alguns estudos (Oubidar e cols., 1996; Bartfay WJ e cols., 1999) têm demonstrado que o acúmulo de ferro em modelos animais pode causar danos cardíacos culminando em prejuízo no funcionamento do coração. Postula-se que os efeitos do excesso de ferro sobre o sistema cardiovascular envolvam a formação de radicais livres. Nestes modelos, um dos principais objetos de estudo é o coração, particularmente por sua alta sensibilidade mesmo a traços de ferro, fruto da baixa atividade catalase e SOD no músculo cardíaco (Batist e cols., 1985). Estes relatos nos levam a supor que o coração seria o principal órgão do sistema cardiovascular afetado por um excesso de ferro.

Porém, recentes trabalhos vêm atentando para os efeitos do estresse oxidativo sobre a resistência vascular periférica. Alguns destes trabalhos relatam ação de radicais livres aumentando a síntese de endotelina 1 (Kahler e cols., 2001), anormalidades na sinalização por cálcio em endotélio de ratos SHR (Pogan e cols., 2001), ação sinérgica

de radicais livres e angiotensina II em modelos de hipertensão renovascular (Dobrian e cols., 2001) bem como desbalanço entre mediadores químicos vasoconstritores e vasodilatadores como o NO (Rathaus & Bernheim, 2002), sendo estes fatores atribuídos a um aumento da resistência vascular periférica com conseqüente hipertensão.

Além destes, outros trabalhos vêm mostrando que alguns elementos da regulação neurovegetativa cardíaca têm sua fisiologia alterada quando expostos a precursores de radicais livres. Assumindo que o ferro é um elemento importante na produção de oxirradicais, é de se supor que um acúmulo de ferro também possa ter alguma influência sobre a dinâmica deste sistema. Trabalhos têm demonstrado que a atividade de terminações quimiossensitivas de fibras C aferentes (reflexo Bezold-Jarisch) em animais normotensos é aumentada em 498% quando aplicado peróxido de hidrogênio topicamente na superfície da câmara cardíaca sem que, contudo, células mecanossensitivas sejam diretamente afetadas (Ustinova & Schultz, 1994). Após uma dose de 20 mg/Kg (i.v.) de mesilato de deferoxamina (DFO), um quelante seletivo para ferro, este efeito sobre a atividade de fibras C produzido pelo peróxido de hidrogênio foi abolido (Schultz & Ustinova, 1996) indicando que o ferro, mesmo quando presente em um nível basal, tem importante participação no fenômeno observado.

Estes achados suscitam a questão: *o excesso de ferro pode, além de alterar elementos de controle da resistência vascular periférica a longo prazo, alterar a sensibilidade ou a eficiência de algum mecanismo envolvido na regulação neurovegetativa da pressão arterial?*

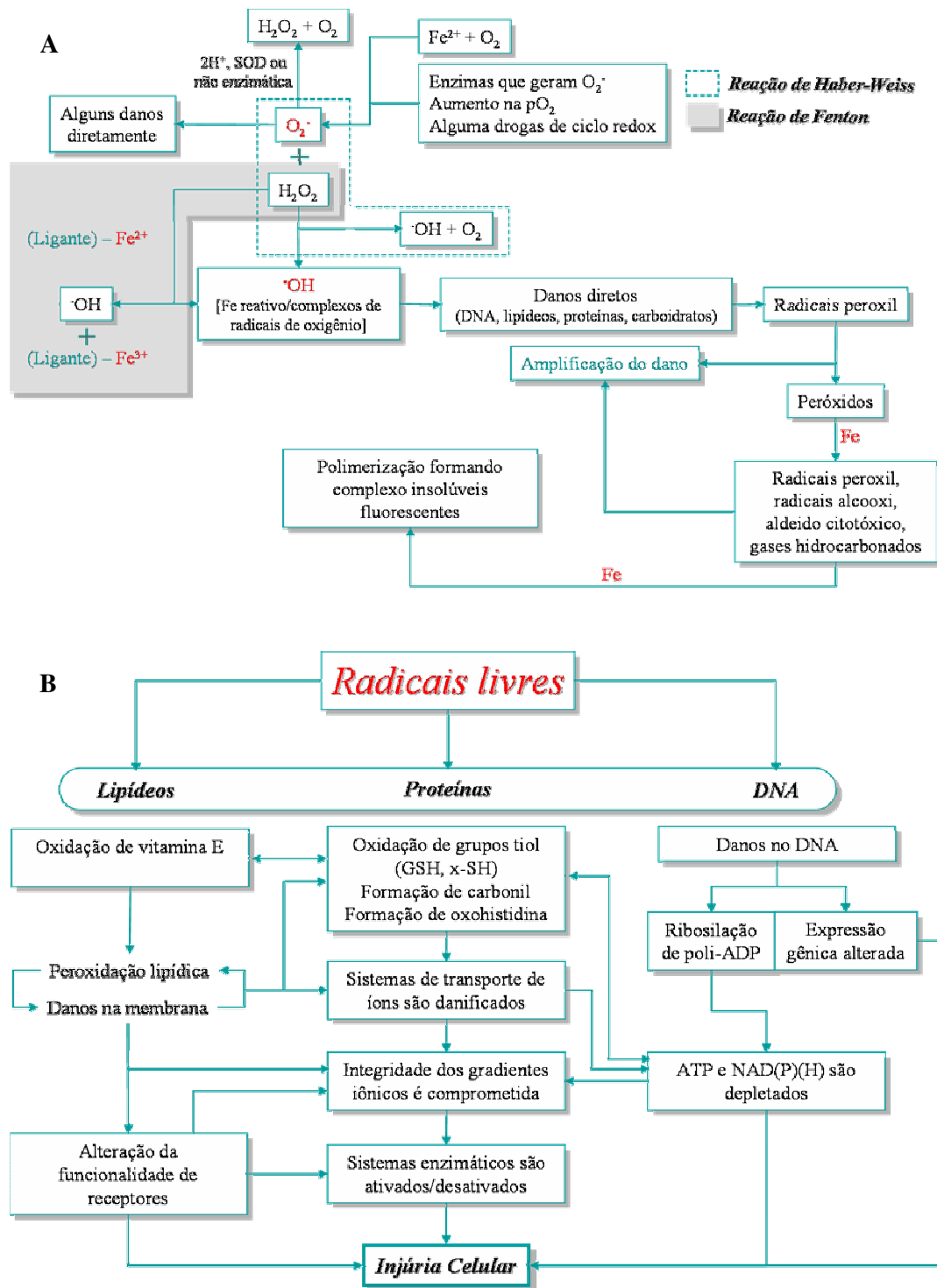


Figura 2 – Mecanismo de produção de radicais livres (A) e de dano celular (B) no stress oxidativo.

(adaptado de A: Halliwell & Gutteridge, 1986 e B: Kehrer, 1993).

As fibras C, cuja atividade foi avaliada por Ustinova e cols. frente ao peróxido de hidrogênio, fazem parte de um complexo sistema de regulação neurovegetativa da pressão arterial. Fibras C aferentes são responsáveis pela condução de impulsos provenientes de terminações nervosas localizadas, principalmente, nos pulmões e na parede do ventrículo esquerdo até uma região bulbar conhecida como Núcleo do Trato Solitário (NTS) onde fazem sua primeira sinapse (Bruce E.Maley., 1994). Quando suas terminações são estimuladas, um sinal é propagado até o NTS. No bulbo, uma série de eventos neuronais e uma complexa interação entre diferentes áreas desencadeiam uma resposta eferente tônico-inibitória para o coração que culmina em apnéia e bradicardia que leva a uma redução do débito cardíaco e, conseqüentemente, à hipotensão. Esta tríade é observada quando na estimulação de um reflexo cardiopulmonar conhecido como reflexo Bezold-Jarisch, descrito pela primeira vez por von Bezold e Hirt em 1867 e confirmado por Jarisch em 1938-1940 (Aviado & Guevara, 2001).

Sabe-se hoje que a população de terminações sensoriais cardiovasculares pode ser dividida em 2 subpopulações: as terminações mecanossensitivas, que responderiam a alterações de volume, e as terminações quimiossensitivas (Coleridge e cols., 1964), capazes de responder a uma gama de substâncias irritantes como capsaicina, fenilbiguanida, veratridina, radicais livres além de substâncias endógenas como bradicinina, prostaglandinas, serotonina e ADP. Na década de 1970, foi demonstrado que durante o fenômeno de isquemia/reperfusão as terminações cardiovasculares eram ativadas (Thoren, 1972; Thoren, 1976) e atualmente sabe-se que o aumento na frequência de disparos destas aferências deve-se, em parte, a um estímulo induzido por radicais livres (Ustinova & Schultz, 1994a), cuja produção é comumente aumentada durante a injúria por isquemia/reperfusão.

O barorreflexo é considerado um importante mecanismo de controle cardiovascular cuja função está associada a uma redução da variabilidade extrema e descontrolada da pressão arterial. Responde tanto ao aumento quanto à diminuição de pressão arterial e seus mecano-receptores localizam-se no seio carotídeo e na crosseira da artéria aorta. As relações entre a atividade barorreflexa e o excesso de ferro ainda não são bem conhecidas mas as relações entre barorreflexo, infarto crônico do miocárdio e falência cardíaca têm sido bastante exploradas (Sack e cols., 2000; Mangin e cols.,

2001; Rostagno e cols., 2000) e os resultados têm apontado ora para uma diminuição (Davies e cols., 2001) ora para um aumento (Meyrelles e cols., 1996) da sensibilidade do barorreflexo sem se observar alterações morfológicas em fibras nervosas do seio carotídeo (Wang e cols., 1996). Acredita-se que a redução da sensibilidade barorreflexa seja devida a uma dessensibilização de barorreceptores individuais e não à plasticidade neural (Wang e cols., 1996). A literatura mostra uma redução bastante significativa do ganho barorreflexo em coelhos com aterosclerose sendo sugerido que esta condição patológica é associada a uma maior produção local de radicais livres, atuando sobre os barorreceptores e diminuindo sua sensibilidade (Li e cols., 1996). Como o ferro tem participação na formação de radicais livres, cogita-se a possibilidade de que haja uma relação semelhante numa condição de excesso de ferro. Além disso, dados experimentais já demonstraram intensa deposição de ferro em áreas cerebrais que recebem inervação GABAérgica sugerindo uma possível relação entre ferro e este neurotransmissor inibitório (Thompson e cols., 2001). Por outro lado, dados fisiológicos, farmacológicos, anatômicos e bioquímicos têm sugerido que projeções do CVLM para o RVLM, as quais participam nas vias inibitórias do barorreflexo, são GABAérgicas (Sved & Gordon, 1994). Portanto, é razoável supor que alterações bioquímicas no metabolismo do GABA induzidas por ferro poderiam afetar, pelo menos em parte, o barorreflexo. A figura 3 esquematiza os reflexos acima mencionados nos pontos de vista anatômico e funcional.

Diante da complexidade dessas vias reflexas e de sua capacidade de adaptação, surgem outras questões frente às possibilidades de ação do ferro: *o fator tempo de exposição ao stress oxidativo pode determinar alteração na atividade reflexa cardíaca?*

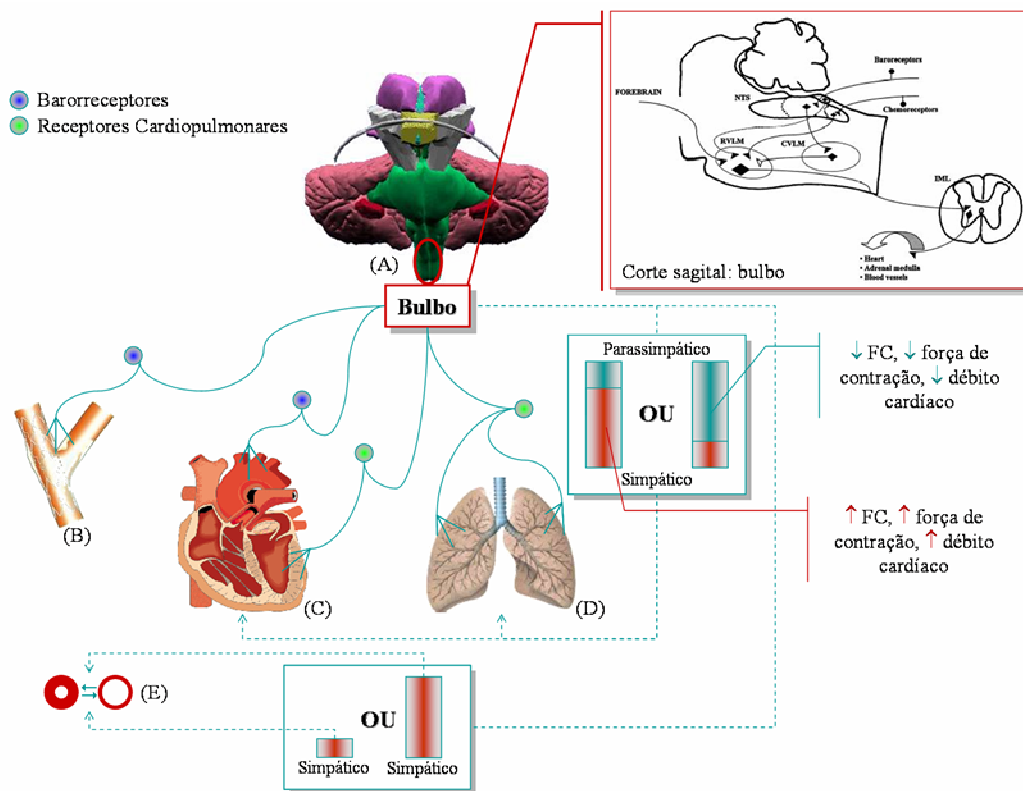


Figura 3 – Esquema representativo dos elementos anátomo-funcionais que compõem as vias do quimiorreflexo, barorreflexo e dos reflexos cardiopulmonares.

As colunas simbolizam níveis hipotéticos de atividade simpática e parassimpática tendo como objetivo demonstrar que a ativação destes reflexos visa reajustar o balanço simpático/parassimpático com o intuito de readequar os níveis pressóricos às necessidade do organismo como um todo. O “painel superior direito” representa esquematicamente a posição anatômica das áreas bulbares envolvidas no controle cardiorrespiratório vista num corte sagital. A linhas inteiras representam as vias aferentes e as linhas tracejadas as vias eferentes. (A) bulbo; (B) carótida; (C) coração; (D) pulmões e (E) corte transversal de um vaso sanguíneo.

1.3. Possível ação do ferro sobre canais iônicos e enzimas

Dentro da esfera anatomo-funcional da sinalização neuronal, os eventos moleculares assumem um papel fundamental. Determinadas moléculas que funcionam como sinalizadores são constantemente produzidas e degradadas por enzimas e/ou complexos enzimáticos. A síntese de alguns neurotransmissores também é ferro

dependente. O ferro é requerido como um co-fator para a produção de neurotransmissores como dopamina, norepinefrina e serotonina (Thompson e cols., 2001). Além disso, já foi demonstrado um intenso depósito de ferro em áreas cerebrais que recebem inervação ácido γ -aminobutírico (GABA)érgica (Hill, 1985) sugerindo uma possível relação entre ferro e este neurotransmissor inibitório. Alguns trabalhos relataram que, em determinados tipos celulares cultivados *in vitro*, enzimas como a NO sintase induzível (Chen e cols., 2001) e a hemeoxigenase (Anning e cols., 1999) podem ter sua expressão aumentada quando a célula é exposta a uma maior quantidade de ferro.

No caso de um sistema onde a sinalização é um evento constante, como na regulação neurovegetativa cardiovascular, uma mudança no padrão de atividade destas enzimas poderia modificar a dinâmica deste sistema de regulação da PA. Assumindo que uma suplementação de ferro possa efetivamente interferir no metabolismo destes neurotransmissores, sugere-se que, nesta condição, a atividade reflexa de controle da PA possa ser prejudicada quer seja por mudar o padrão de atividade das enzimas envolvidas na síntese destes mediadores quer seja por modificar os mecanismos de estocagem/liberação destes mediadores, como no caso do NO (Stoclet JC e cols., 1999; Zhou e cols., 2000). Estas hipóteses abrem um novo horizonte de possibilidades uma vez que trabalhos prévios já demonstraram que uma inibição crônica da NO sintase pelo L-NAME parece produzir um aumento do tônus simpático culminado na hipertensão observada nestes modelos animais (Colombari e cols., 2001).

Outro evento extremamente importante na regulação neurovegetativa é a atividade de canais iônicos como de cálcio, potássio e sódio. Estes canais são compostos por macromoléculas e, recentemente, a literatura vem relatando a susceptibilidade dessas macromoléculas à ação de radicais livres bem como do ferro por si só. A literatura vem dando grande ênfase aos efeitos do stress oxidativo sobre canais de cálcio tanto presentes no miocárdio quanto no sistema nervoso central. Como exemplo disto, a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático tem sua atividade inibida tanto por radicais livres quanto por íons ferrosos mesmo em concentrações submicromolar (Moreau e cols., 1998) enquanto os canais de cálcio neuronais desreguladamente abertos quando

expostos a precursores de radicais livres como o peróxido de hidrogênio (Li e cols., 1998).

Sabidamente, o cálcio desempenha papel fundamental tanto no ciclo cardíaco quanto na neurotransmissão. No miocárdio, o cálcio tem dois papéis pivô: dirige a ativação dos microfilamentos e regula as correntes iônicas que são responsáveis pelo ritmo elétrico normal e bloqueia o fenômeno de reentrada prevenindo arritmias (Bers, 2002). Em neurônios, a despolarização pré-sináptica desencadeia a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes pré-sinápticos os quais permitem a entrada de cálcio no botão sináptico e a liberação do conteúdo das vesículas pequenas (Nicol e cols., 1997). Além dos canais de cálcio, também foi demonstrado que canais de potássio acoplados a receptores colinérgicos sofrem influência de radicais livres. Estas espécies produzem ativação da proteína G associada a estes canais aumentando sua atividade e modificando a contratilidade e a excitabilidade cardíaca (Jeglitsch e cols., 1999).

Diante das evidências moleculares de que o stress oxidativo, manifestado principalmente na forma de radicais livres, desempenha um papel importante na gênese de processos patológicos, um elemento comum destaca-se como sendo o pivô dessa cascata de eventos: *o ferro*. Este metal parece ser o elemento chave na formação de uma série de substâncias com propriedades de modificar de forma extremamente abrangente o equilíbrio dinâmico de vários processos fisiológicos. Por sua importância, o sistema cardiovascular talvez seja um dos alvos mais importantes do stress oxidativo. Nos últimos anos vêm crescendo as evidências experimentais *in vivo* de que o ferro desempenhe papel importante em cardiopatias. Entretanto, poucas ainda são as evidências *in vivo* dos efeitos sobre mecanismos reflexos de controle da PA e quais são as implicações de uma maior exposição a quantidades excessivas de ferro sobre o equilíbrio dinâmico desses mecanismos de controle da PA.

Daí a importância de se conhecer o comportamento de alguns mecanismos centrais e periféricos de regulação cardiovascular frente a um acúmulo de ferro.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Neste trabalho nos propusemos a estudar o barorreflexo e o reflexo Bezold-Jarisch em ratos submetidos a dois protocolos de suplementação de ferro com o intuito de se avaliar os efeitos imediatos (diretos) e tardios (indiretos) do ferro nestes dois protocolos.

2.2. Objetivos específicos

1 – Avaliar os níveis basais de PAM, FC, variabilidade no domínio do tempo e pressão de pulso em ratos submetidos a dois protocolos de suplementação parenteral de ferro;

2 – Avaliar a função barorreflexa em ratos submetidos a dois protocolos de suplementação parenteral com ferro;

3 – Avaliar a atividade do reflexo Bezold-Jarisch nestes ratos submetidos a dois protocolos de suplementação parenteral com ferro;

4 – Avaliar o status relativo ao ferro nestes ratos tomando-se como referência o ferro circulante (ferro sérico), ferro no fígado e ferro no baço;

5 – Avaliar os níveis de PAM, FC e a atividade do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch após uma terapia aguda com um quelante para ferro.

3. Materiais e Métodos

3.1. Modelo animal: suplementação parenteral com ferro

No presente trabalho foram utilizados ratos Fischer 344 machos, jovens, com massa corpórea de 216 ± 2 g (independentemente do grupo) procriados e mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, UFOP-MG segundo o Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Olfert e cols., 1993). Os procedimentos complementares tais como higienização dos materiais que entraram em contato com os animais e preparo das camas (remoção de pó e esterilização) foram definidos por protocolos validados e em uso em nosso laboratório.

No acasalamento, duas fêmeas virgens, com aproximadamente quatro meses de idade, e um macho foram colocados em gaiolas plásticas de 47 x 33 x 15 cm. Após dez dias de acasalamento, os machos foram retirados, as fêmeas colocadas em gaiolas individuais e durante o período de gestação os animais receberam ração comercial Nuvilab CR1[®] (composição na tabela 2) e água filtrada *ad libidum*. No nascimento, as ninhadas foram manipuladas aleatoriamente de maneira a manter oito filhotes por fêmea. As fêmeas continuaram recebendo ração comercial e água *ad libidum* e os ratos foram amamentados durante 28 dias. Após um período de aproximadamente dois meses, os animais foram randomizados e divididos nos grupos tratados com ferro e seu respectivo sham. Ao final do tratamento apresentavam massas corpóreas semelhantes:

- ✓ **Controle (sham)**: tratados com salina, i.p.
- ✓ **Protocolo Direto**: suplementados com ferro por 7 dias, i.p., sendo administrada uma dose de 20 mg de ferro/dia totalizando, ao final do tratamento, 140 mg de ferro. Neste tratamento, os ensaios foram realizados 48 horas após a última dose.
- ✓ **Protocolo Indireto**: suplementados com ferro por 5 dias, i.p., sendo administrada uma dose de 10 mg de ferro/dia totalizando, ao final do tratamento, 50 mg de ferro. Após a última dose, aguardou-se um período de 7 dias até a realização dos ensaios.

A suplementação com ferro foi induzida com o fármaco ferro dextran (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) que consiste em hidróxido férrico complexado por dextran. Cada mL deste fármaco contém 100 mg de ferro elementar e 107 mg de

dextran, produzido assepticamente e contendo 0,5% de fenol com conservante. Estudos farmacocinéticos em ratos demonstram que após 6 horas de diálise peritoneal mais de 70% do ferro dextran é absorvido da cavidade peritoneal sem alterações histológicas indicativas de lesão (Suzuki e cols., 1995).

Após o desmame e durante o tratamento estes animais foram alimentados com ração comercial e fornecida água purificada *ad libidum*. Concluídos os ensaios, os animais foram sacrificados por anestesia com éter etílico (CAQ Casa da Química, Diadema, SP, Brasil) até completa parada cárdio-respiratória.

3.2. Drogas e soluções

Veículo: PBS (Salina tamponada com fosfato) pH 7,2: esta solução foi preparada dissolvendo-se 8,18 g de NaCl P.A., 1,98 g de Na₂HPO₄.7H₂O P.A. e 0,36 g de NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Synth, LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP) em q.s.p. 1000,0 mL de água ultrapurificada (Milli-Q®). Antes de aferir o volume, o pH foi ajustado para 7,2 com solução de HCl ou HaOH conforme o necessário. Uma vez acondicionada no frasco de Mariotte, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C e 1,0 kg/cm² durante 15 minutos conforme protocolo em vigor em nosso laboratório e mantida à temperatura ambiente por período não superior a 30 dias. As frações desta solução destinadas a injeções nos animais foram ultrafiltradas em ultrafiltro Millex® 0,22 µm.

Anestésico: Tribromoetanol 2,5%: esta solução foi preparada na concentração de 25 g/L utilizando-se 2,2,2-tribromoetanol 99% (Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI, USA) e veículo PBS pH 7,2. A vidraria utilizada no preparo desta solução foi completamente envolvida em papel alumínio para evitar degradação da substância por ação da luz. O sólido foi dissolvido em 80% do volume final sob aquecimento não superior a 40°C. Uma vez aferido o volume final, a solução foi ultrafiltrada em ultrafiltro Millex® 0,22 µm sob fluxo laminar (conforme protocolos em vigor em nosso laboratório), acondicionada em frasco âmbar e mantida à temperatura ambiente por período não superior a 60 dias.

Agonista 5-HT₃: Fenilbiguanida: a fim de um melhor ajuste do volume de droga a ser injetado, foram preparadas soluções de fenilbiguanida em duas concentrações: 0,050 g/L e 0,025 g/L. Utilizou-se fenilbiguanida 98% (Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI, USA) com as devidas correções de massa inerentes à pureza e veículo PBS pH 7,2. Uma vez aferidos os volumes finais, estas soluções foram alíquotadas em frações de 1,5 mL em tubos de polietileno Eppendorf e estocadas a -20°C até o momento do uso por período não maior que 45 dias.

Agente hipertensor agonista adrenérgico: L-Fenilefrina (sal cloridrato): a fim de um melhor ajuste do volume de droga a ser injetado, foram preparadas soluções de L-fenilefrina em três concentrações: 0,050 g/L; 0,025 g/L e 0,010 g/L. Utilizou-se cloridrato de L-fenilefrina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) com as devidas correções de massa inerentes à contribuição do contra-íon e veículo PBS pH 7,2. Uma vez aferidos os volumes finais, estas soluções foram alíquotadas em frações de 1,5 tubos de polietileno Eppendorf e armazenadas a -20°C até o momento do uso por período não maior que 45 dias.

Agente hipotensor doador de óxido nítrico: nitroprussiato de sódio (nitroferrocianeto de sódio): a fim de um melhor ajuste do volume de droga a ser injetado, foram preparadas soluções de nitroprussiato de sódio em três concentrações: 0,050 g/L; 0,025 g/L e 0,010 g/L nitroprussiato de sódio dihidratado (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) com as devidas correções de massa inerentes à hidratação e veículo PBS pH 7,2. Uma vez aferidos os volumes finais, estas soluções foram alíquotadas em frações de 1,5 em tubos de polietileno Eppendorf e armazenadas a -20°C até o momento do uso por período não maior que 45 dias.

Quelante seletivo para ferro: deferoxamina (DFO): esta solução foi preparada na concentração 20 g/L utilizando-se mesilato de deferoxamina (Novartis AG, Suíça), comercialmente vendida como Desferal[®], e como veículo água ultrapurificada (Milli-Q[®]). O liofilizado de deferoxamina foi alíquotado em frações de 10 mg e, imediatamente antes do uso, solubilizado em 500 µL de água ultrapurificada (Milli-Q[®]).

Suspensão de antibiótico: benzilpenicilina G procaína + benzilpenicilina G potássica: esta suspensão foi preparada adicionando-se ao liofilizado de benzilpenicilina G procaína + benzilpenicilina G potássica, vendido comercialmente como Despacilina

400.000UI (Bristol-Myers Squibb Brasil, São Paulo, SP), 2 mL de água bidestilada para injetáveis. A potência preparação foi estimada em 200.000 UI/mL sendo 150.000 UI de benzilpenicilina procaína e 50.000 UI de benzilpenicilina potássica. Após o preparo, a suspensão permaneceu estocada sob refrigeração (4°C) por um período 5 dias durante o qual foi utilizada.

3.3. Confeção e implantação das cânulas arteriais e venosas

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 (Becton Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD) soldados a tubos de polietileno PE-10 (Becton Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD) sendo as dimensões ajustadas de acordo com a massa corpórea do animal. Antes do implante, o interior das cânulas foi lavado e preenchido com veículo PBS pH 7,2 (esterilizado e despirogenizado) contendo heparina sódica (Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil) diluída 1:40. A extremidade PE-50 de cada cânula foi obstruída com pino de metal niquelado e esterilizado. Sob anestesia com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.), os animais foram submetidos a uma incisão na face ventral da pata traseira direita onde a artéria e veia femorais foram dissecadas e expostas. Ambas foram cateterizadas com PE-10 e as porções PE-50 foram transpassadas por sob a pele do dorso onde as extremidades destas cânulas foram exteriorizadas e fixadas próximo ao pescoço. 50.000 U/Kg (50 µL por animal) de antibiótico (Despacilina 400.000 U) foram administradas por via intramuscular profunda na pata traseira esquerda do animal e a incisão na pata traseira direita foi, em seguida, suturada. Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas na sala de experimentos sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados até o momento dos experimentos. Durante este período receberam ração comercial e água purificada *ad libidum*.

3.4. Registros de pressão arterial e frequência cardíaca

Antes do início do registro, foi administrada na cânula implantada na artéria salina heparinizada (20:1) com o intuito de impedir a formação de coágulos durante o experimento. A cânula arterial foi, então, conectada a um *swivel* hidráulico e este a um transdutor de pressão MLT0699 (ADInstruments, Austrália) ligado a um amplificador de sinais blindado ETH 400 (CB Sciences, Inc.).

O “swivel” hidráulico foi construído em nosso próprio laboratório utilizando uma seringa de 1,0 mL, 3 agulhas 21G1 (25×8) e 1 agulha 22G2 (0.7×50). A seringa foi cortada com aproximadamente 2 cm a partir da parte onde se encaixa o canhão formando o corpo do “swivel”. Uma camada de 1 mm da borracha do êmbulo foi cortada formando um anel e perfurada no centro. Duas agulhas 21G1 foram desmontadas e os canhões cortados transversalmente de modo que seus diâmetros permitissem encaixe justo dentro da seringa. O “swivel” foi montado de forma que a agulha 22G2 ficasse no centro transpassando o anel de borracha e vedando a passagem de líquido para o corpo do “swivel”. A **figura 4(a)** mostra, esquematicamente, o “swivel” montado em nosso laboratório.

O amplificador era conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália) e o conversor ao computador por intermédio de uma placa SCISI onde o software *Chart for Windows*[®] criava os registros a partir dos dados enviados pelo conversor analógico digital numa frequência amostral de 200 Hz. Foi feita a aquisição dos dados referentes à pressão arterial pulsátil (PAP) a partir dos quais foram derivados, “on line”, os canais de FC e PAM (**figura 4(b)**). Estes dados foram estocados em arquivos individualizados para cada animal e analisados posteriormente quanto aos parâmetros pré-estabelecidos.

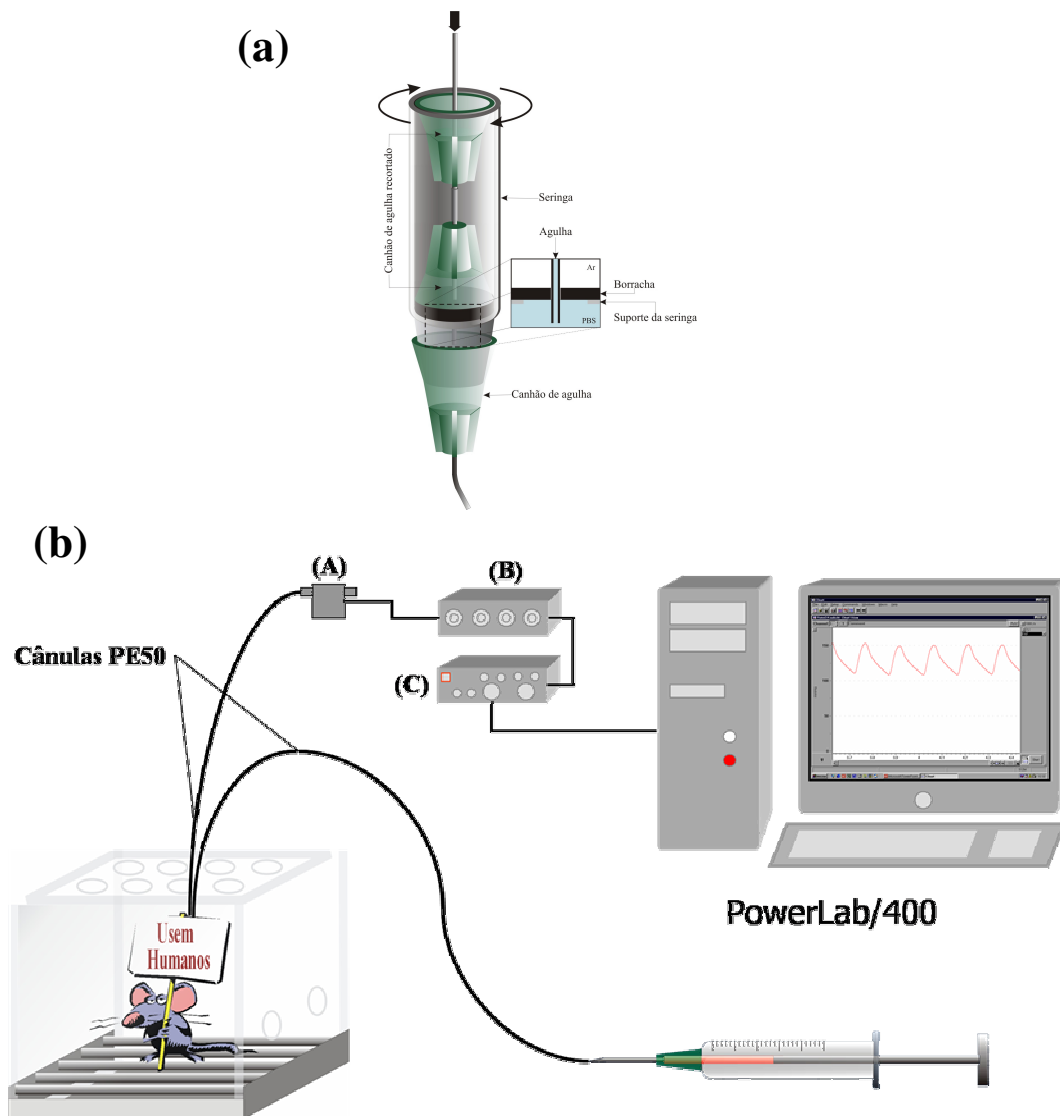
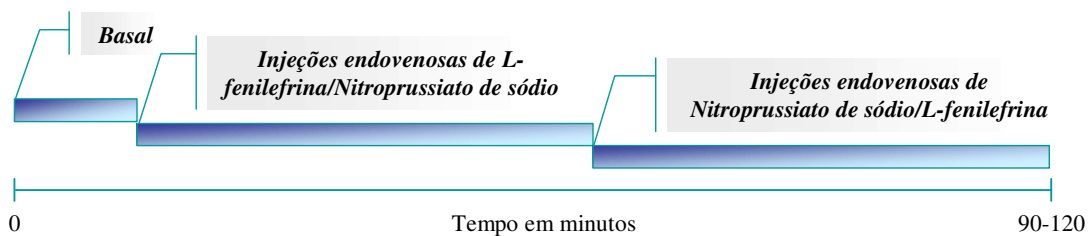


Figura 4 – (a) Representação esquemática do “swivel” construído em nosso laboratório para realização de ensaios com animais não anestesiados e com movimentação livre. O tubo metálico proveniente da agulha 22G2 apontada pela seta vertical (↓) permanece imóvel, conectada ao transdutor por intermédio de uma cânula PE-50 enquanto o corpo do “swivel” gira em torno deste tubo metálico. (b) representação esquemática do sistema utilizado para aquisição dos dados; (A) transdutor de pressão, (b) amplificador analógico, (c) conversor analógico digital.

3.5. Protocolo experimental para estimulação do barorreflexo

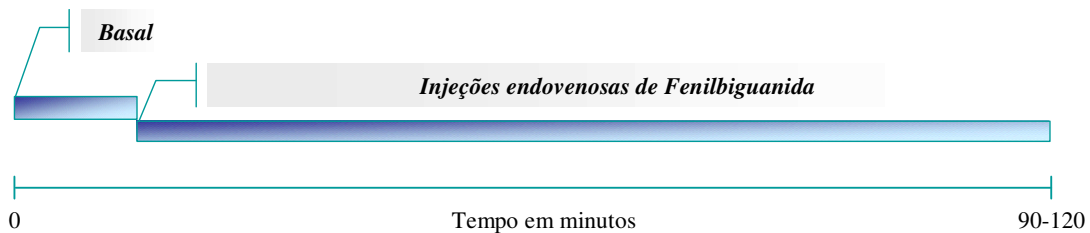
Uma vez instrumentados, foi dado aos animais um período de estabilização de 30 a 60 minutos. Com os parâmetros cardiovasculares estáveis, iniciou-se o registro definitivo sendo que os primeiros 10 a 20 minutos foram tomados como parâmetros basais de PA e FC. Para estimulação do barorreflexo foram utilizadas injeções endovenosas em *bolus* de L-fenilefrina nas doses de 0,5; 2,0; 3,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e nitroprussiato de sódio nas doses de 1,0; 4,0; 7,0 e 10,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ mais duas doses placebo de veículo PBS pH 7,2. Iniciaram-se os ensaios alternadamente com uma droga a fim de se evitar um *vieze* nos resultados. As doses foram administradas aleatoriamente, com um *flush* de 0,1 mL, concedendo-se um intervalo de, no mínimo, 5 minutos entre uma dose e outra para que os níveis de PA e FC retornassem a valores próximos aos basais. O esquema abaixo sumaria este protocolo, representando as barras horizontais o registro ao longo do tempo:



3.6. Protocolo experimental para estimulação do reflexo Bezold-Jarisch

Uma vez instrumentados, foi dado aos animais um período de estabilização de 30 a 60 minutos. Com os parâmetros cardiovasculares estáveis, iniciou-se o registro definitivo sendo que os primeiros 10 a 20 minutos foram tomados como parâmetros basais de PA e FC. Para estimulação do reflexo Bezold-Jarisch foram utilizadas injeções endovenosas em *bolus* de fenilbiguanida nas doses 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ mais uma dose placebo de veículo PBS pH 7,2. Estas doses foram administradas aleatoriamente com um *flush* de 0,1 mL, em duplicata, concedendo-se um intervalo de, no mínimo, 5 minutos entre uma dose e outra para que os níveis de PA e FC

retornassem a valores próximos aos basais. O esquema abaixo sumaria este protocolo, representando as barras horizontais o registro ao longo do tempo:

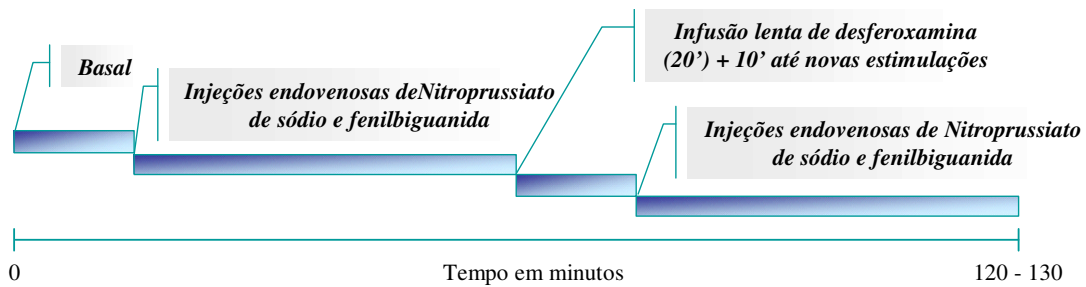


3.7. Protocolos experimentais para avaliação da PA, FC, barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch em animais sob efeito do quelante deferoxamina

A deferoxamina é uma molécula capaz de suprimir a formação de radicais livres por quelar o ferro presente no “pool” lábil de maneira seletiva, indisponibilizando-o para participar em reações de oxi-redução com o peróxido de hidrogênio e superóxido nas quais os oxirradicais são formados. Pode deslocar ferro de estoques como ferritina e hemossiderina, mas não de hemoproteínas ou outras que contenham ferro. Quela, predominantemente, íons trivalentes de ferro e alumínio com constantes de formação de $1,0 \times 10^{31} \text{ mol}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{25} \text{ mol}^{-1}$. A afinidade da deferoxamina para íons divalentes (tais como o Fe^{2+}) é substancialmente menor, na ordem de $1,0 \times 10^{14} \text{ mol}^{-1}$ ou menor. O complexo ferro-deferoxamina é formado na base molar de 1:1, ou seja, 1 g de deferoxamina pode, teoricamente, ligar-se a 85 mg de Fe^{3+} . O complexo é eliminado principalmente na urina e nas fezes (Curtis D.Klaassen, 2002).

Com esse protocolo, avaliou-se o efeito imediato da supressão retirada do ferro livre disponível para formação de oxirradicais e/ou seus efeitos diretos sobre os níveis de PAM e FC bem como sobre a atividade do reflexo Bezold-Jarisch e barorreflexo. Foram conduzidos ensaios pareados onde foi feita uma estimulação prévia de ambos os reflexos por injeções endovenosas em *bolus* de nitroprussiato de sódio nas doses de 1,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 4,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e fenilbiguanida nas doses de 1,25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 2,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Seguiu-se a estas injeções uma infusão endovenosa lenta, com duração mínima de 20 minutos, de uma solução de deferoxamina totalizando uma dose de 20 mg/Kg. 10 minutos após esta

infusão estimularam-se novamente ambos os reflexos por injeções endovenosas em *bolus* de nitroprussiato de sódio nas doses de 1,0 µg/Kg e 4,0 µg/Kg e fenilbiguanida nas doses de 1,25 µg/Kg e 2,5 µg/Kg. O esquema abaixo sumaria estes protocolo:



3.8. Análise dos dados e estatística

A análise dos dados foi feita no software *Chart for Windows*[®] e a análise estatística no software *Minitab™ Statistical Software, Release 13.31* (Minitab Inc.). Devido a algumas limitações do software *Chart for Windows*[®] na reprodução fiel dos eventos ocorridos em momentos críticos dos ensaios referente ao cálculo de FC e PAM, posteriormente, ao analisar-se os dados, os cálculos de FC e PAM foram refeitos “off line” pico-a-pico sistólico sendo que em doze animais de cada grupo um quarto canal foi derivado para o cálculo da pressão de pulso. Os resultados foram apresentados como *média ± erro padrão* ($\bar{x} \pm Er Pd$).

Os valores basais de PAM e FC foram obtidos por cálculo da média do registro contínuo num intervalo de 10 a 20 minutos precedentes ao início das estimulações dos reflexos cardiovasculares avaliados. Intervalos de 10 segundos em 12 animais de cada grupo foram tomados em 8 pontos distintos ao longo do registro para determinação dos níveis de pressão de pulso. Para comparação entre médias dos grupos tratados com ferro e seus respectivos sham utilizou-se teste *t de Student* considerando-se como diferentes significativamente apenas aqueles pares de médias cujo valor de P (probabilidade de se cometer erro tipo II) fosse inferior a 0,05.

A análise do reflexo Bezold-Jarisch consistiu em medir-se a variação de PAM e FC decorrentes da administração de fenilbiguanida tomando-se a diferença entre o

maior ponto imediatamente posterior à injeção da droga e o menor ponto referente ao efeito máximo da droga desconsiderando-se efeitos posteriores. Estes dados foram transformados em uma curva dose-resposta e a comparação entre os grupos foi feita dose a dose avaliando-se as respostas médias referentes a cada grupo utilizando-se o teste *t de Student* e considerando-se como diferentes significativamente apenas aqueles pares de médias cujo valor de P (probabilidade de se cometer erro tipo II) fosse inferior a 0,05.

A análise do barorreflexo consistiu em avaliarem-se as variações de PAM e FC decorrentes da administração de L-fenilefrina e nitroprussiato de sódio tomando-se o menor ou maior valor de PAM e FC atingido após a injeção das drogas. Nesta análise em especial foi aplicado tanto ao canal de PAM quanto ao de FC um *smoothing* com janela de 201 pontos. Foram analisados os valores de pico para PAM e FC e, independentemente do animal, os valores de PAM foram postos em ordem crescente com seus respectivos valores de FC. Classes de 10 valores de pico de PAM foram separadas e a média destes 10 valores de PAM foi plotada contra a média dos respectivos 10 valores de FC representando os pontos para construção da barocurva para cada grupo e do grau de dispersão dos dados. Intervalos de 10 segundo precedentes a cada estimulação do barorreflexo foram tomados pra determinação de PAM e FC para cada animal ao longo do experimento. De cada classe, foram tomados seqüencialmente 1 dos dez pares (PAM e FC) para construção de barocurvas individuais. A partir destas barocurvas individuais obteve-se a sigmóide média para cada grupo, os valores de platô superior e inferior e o valor de PAM₅₀. As sigmóides foram obtidas segundo a equação I, descrita abaixo:

$$FC = FC_{\max} + \frac{FC_{\min} - FC_{\max}}{1 + e^{-\left(\frac{PAM - PAM_{50}}{b}\right)}} \quad (\text{Equação I})$$

onde FC_{\max} é a frequência cardíaca no platô superior, FC_{\min} é a frequência cardíaca no platô inferior, PAM é a pressão arterial média, PAM_{50} é a pressão arterial média no ponto médio do intervalo de frequência entre os platôs superior e inferior e b é o coeficiente de curvatura. O ganho barorreflexo máximo para cada grupo foi inferido a partir dos valores de pico da primeira derivada das respectivas sigmóides individuais.

Nos ensaios com deferoxamina, o barorreflexo foi avaliado apenas quanto ao ganho calculado a partir dos valores de variações máximas de PAM e FC segundo a equação II, descrita abaixo:

$$Ganho = \frac{\Delta_{máximo} FC}{\Delta_{máximo} PAM} \text{ (Equação II)}$$

onde $\Delta_{máximo} FC$ é a variação máxima de frequência cardíaca e $\Delta_{máximo} PAM$ é a variação máxima de pressão arterial média decorrentes das injeções de nitroprussiato de sódio ou L-fenilefrina. Estes valores de ganho foram comparados entre os grupos independentemente da dose, onde todos os dados foram reunidos gerando um valor médio de *ganho*. Intervalos de 10 segundo precedentes a cada estimulação do barorreflexo foram tomados pra determinação de PAM e FC para cada animal ao longo do experimento. Avaliaram-se as respostas médias referentes a cada grupo antes e após a DFO utilizando-se o teste *t de Student* e consideraram-se como diferentes significativamente apenas aqueles pares de médias cujo valor de P (probabilidade de se cometer erro tipo II) fosse inferior a 0,05.

3.9. Determinação de parâmetros bioquímicos

3.9.1. Determinação de ferro circulante

Concluídos os ensaios, uma amostra de 3 mL de sangue foi coletada de cada animal, centrifugada a 14.000 rpm por 8 minutos e o plasma separado. Uma nova centrifugação foi realizada para retirar células remanescentes e o plasma resultante foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios colorimétricos.

Nestes ensaios, uma amostra de 200 µL foi pré-tratada com bromelina em pH 4,5 e temperatura ambiente por 20 minutos para hidrólise de proteínas plasmáticas. Após este pré-tratamento, as amostras foram submetidas ao protocolo para determinação colorimétrica de ferro conforme descrito previamente na literatura (Turbino-Ribeiro e cols., 2003).

3.9.2. Determinação de ferro no fígado e baço

Depois de sacrificados, os animais foram perfundidos com aproximadamente 200 mL de salina 0,9%. Fígado e baço foram removidos e secos em papel de filtro por 5 minutos. Estes órgãos foram pesados e uma amostra foi retirada para determinação do teor de ferro. Estas amostras foram digeridas em ácido nítrico P.A. a 120°C até a secura. O resíduo foi então solubilizado em 10,0 mL de solução HCl 50% v/v e a solução resultante submetida à colorimetria pelo método da ortofenantrolina (Association of Official Analytical Chemists, 1980). Posteriormente, os valores de concentração ferro foram convertidos em teor de ferro no fígado e baço, sendo expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

4. Resultados

4.1. Efeito do tratamento com ferro dextran sobre os níveis de ferro circulante, conteúdo de ferro no baço e fígado.

A fim de quantificar os efeitos do tratamento com ferro dextran sobre os níveis de ferro circulante e nos estoques no dois protocolos adotados, foram feitas determinações bioquímicas destes parâmetros. Os níveis de ferro circulante mostraram-se aumentados nos dois grupos tratados com ferro dextran.

Nos animais do protocolo *Direto* observou-se o maior nível de ferro circulante (*tabela 3 e figura 5*). Cabe ressaltar, entretanto, que no caso dos animais do protocolo *Direto*, juntamente com o ferro ligado à transferrina, foi também determinado o ferro circulante ligado ao dextran o que contribuiu para este grande aumento. Neste protocolo, observou-se também um aumento significativo dos níveis de ferro no fígado mas não no baço.

Aumentos significativos do conteúdo de ferro tanto no baço quanto no fígado foram detectados nos animais do protocolo *Indireto*. Estes resultados são mostrados na *tabela 3* e resumidos na *figura 5*.

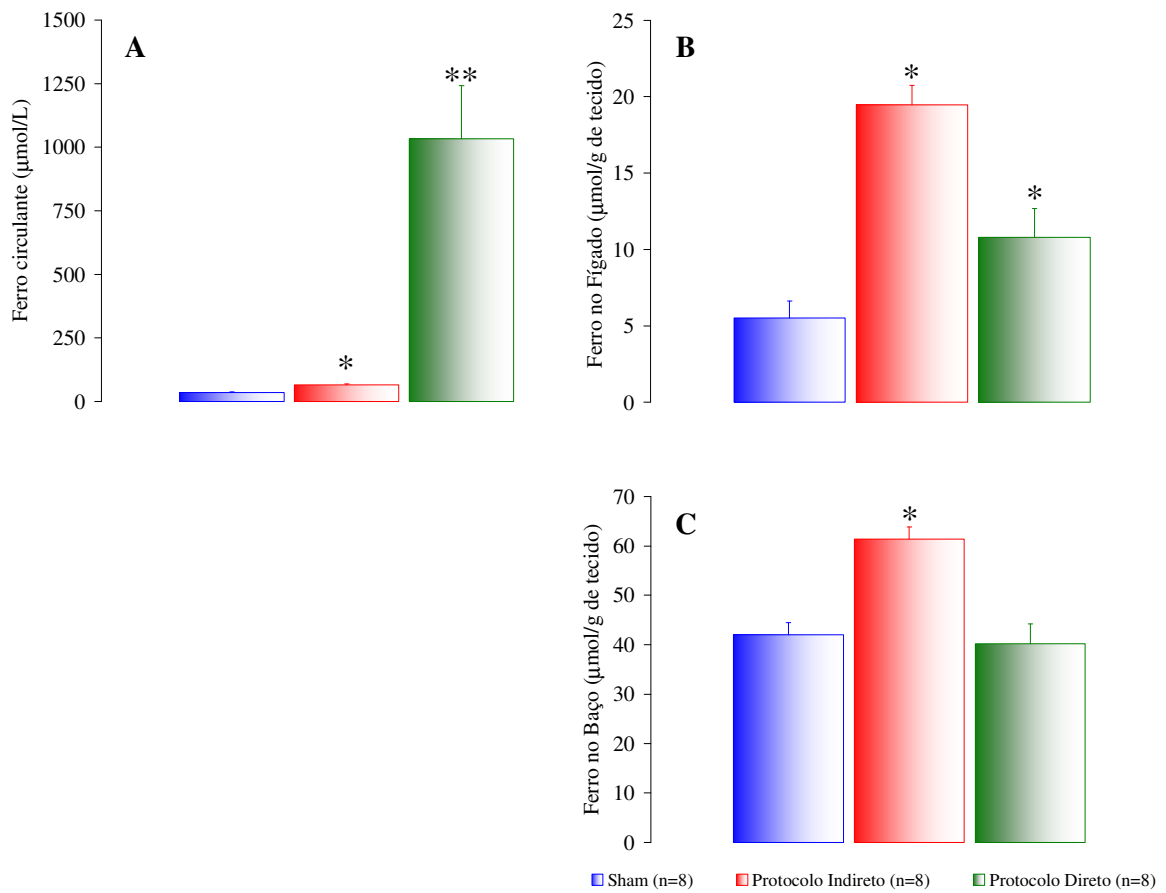


Figura 5 - Níveis de ferro circulante (painel A), no fígado (painel B) e no baço (painel C) em animais sham e tratados com ferro dextran. As barras representam o valor médio de cada parâmetro e as hastes o valor do erro padrão das médias. * diferença significativa entre animais sham e tratados com ferro dextran ($p < 0,05$, teste t de Student); ** diferença significativa entre animais dos protocolos Direto e Indireto ($p < 0,05$, teste t de Student).

4.2. Efeito do tratamento com ferro dextran sobre os níveis basais de PAM, FC, variabilidade no domínio do tempo de pressão de pulso

O tratamento com ferro dextran promoveu uma pequena, porém significativa, redução da FC basal (*tabela 4; figura 6 - A*) tanto nos animais do protocolo *Direto* quanto nos animais do protocolo *Indireto* em relação aos seus respectivos grupos sham. Além de observarmos esta redução de FC, constatamos uma redução da variabilidade no domínio do tempo deste parâmetro entre os animais tratados com ferro dextran e seus respectivos sham (*tabela 5*). Entre os grupos tratados com ferro dextran não foram observadas diferenças entre os níveis basais de FC.

Apesar da redução de FC, não foram observadas diferenças entre os níveis basais de PAM (*tabela 4; figura 6 - B*) entre os grupos tratados com ferro dextran e seus respectivos grupos sham ocorrendo o mesmo para a variabilidade no domínio de tempo para este parâmetro (*tabela 5*). Entretanto, os níveis de pressão de pulso nos animais tratados com ferro dextran no protocolo *Indireto* mostraram ligeiramente diminuídos em relação ao grupo sham (38 ± 1 mmHg vs. 40 ± 1 mmHg, $p < 0,05$) como mostrado na *tabela 6*. Apesar de seguir a mesma tendência, não foram observadas diferenças significativas neste parâmetro para animais tratados com ferro dextran no protocolo *Direto* e sham (37 ± 1 mmHg vs 39 ± 1 mmHg; *tabela 6*).

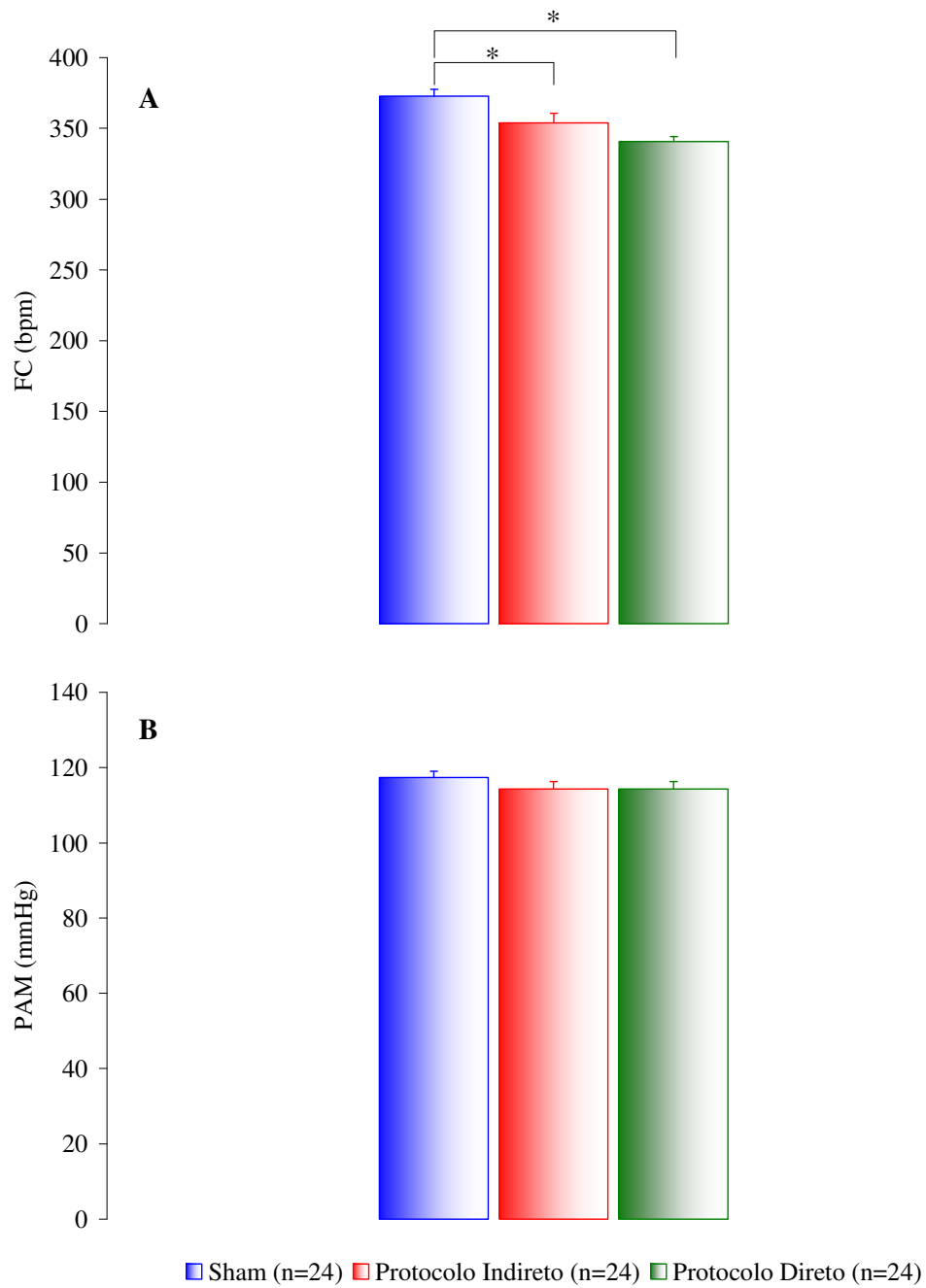


Figura 6 – FC (painel A) e PAM (painel B) basais de animais sham e tratados com ferro dextran. As barras representam o valor médio de um intervalo de 10 a 20 minutos que precedem as estimulações do reflexo Bezold-Jarisch e do barorreflexo e as hastes o valor do erro padrão desta média. * diferença significativa entre o grupo sham e tratados com ferro dextran ($p < 0,05$, teste t de Student).

4.3. Barorreflexo em animais tratados com ferro dextran no protocolo Direto

A estimulação do barorreflexo consistiu num conjunto de manobras com o tônus vascular que visaram elevar ou diminuir o retorno venoso, o débito cardíaco e conseqüentemente a pressão arterial, ativando, com isso, os barorreceptores aórticos e carotídeos. Em resposta a estas alterações pressóricas, o sistema nervoso neurovegetativo produziu modificações cronotrópicas cardíacas para restabelecer a pressão arterial em níveis próximos aos do período precedente à manobra. Neste sentido, as injeções endovenosas de nitroprussiato de sódio e L-fenilefrina produziram as devidas respostas hipotensoras e hipertensoras acompanhadas por suas respectivas respostas taquicárdica e bradicárdica tanto nos animais do protocolo *Direto* quanto em seu respectivo sham. Aspectos qualitativos destas manobras são exemplificados nas **figuras 7 e 8**. O conjunto destes resultados é sumariado na **figura 9** sendo que apesar de uma forte tendência de redução do valor do platô superior, a barocurva dos animais tratados com ferro dextran no protocolo *Direto* não apresentaram diferenças quanto ao ganho máximo, platô inferior e PAM₅₀ em relação aos animais sham (**tabela 7**). Na **tabela 8** são mostrados valores médios de PAM e FC para as dez classes em que foram divididos os picos de PAM com seus respectivos picos de FC. Estes dados são representativos da dispersão das barocurvas para cada grupo.

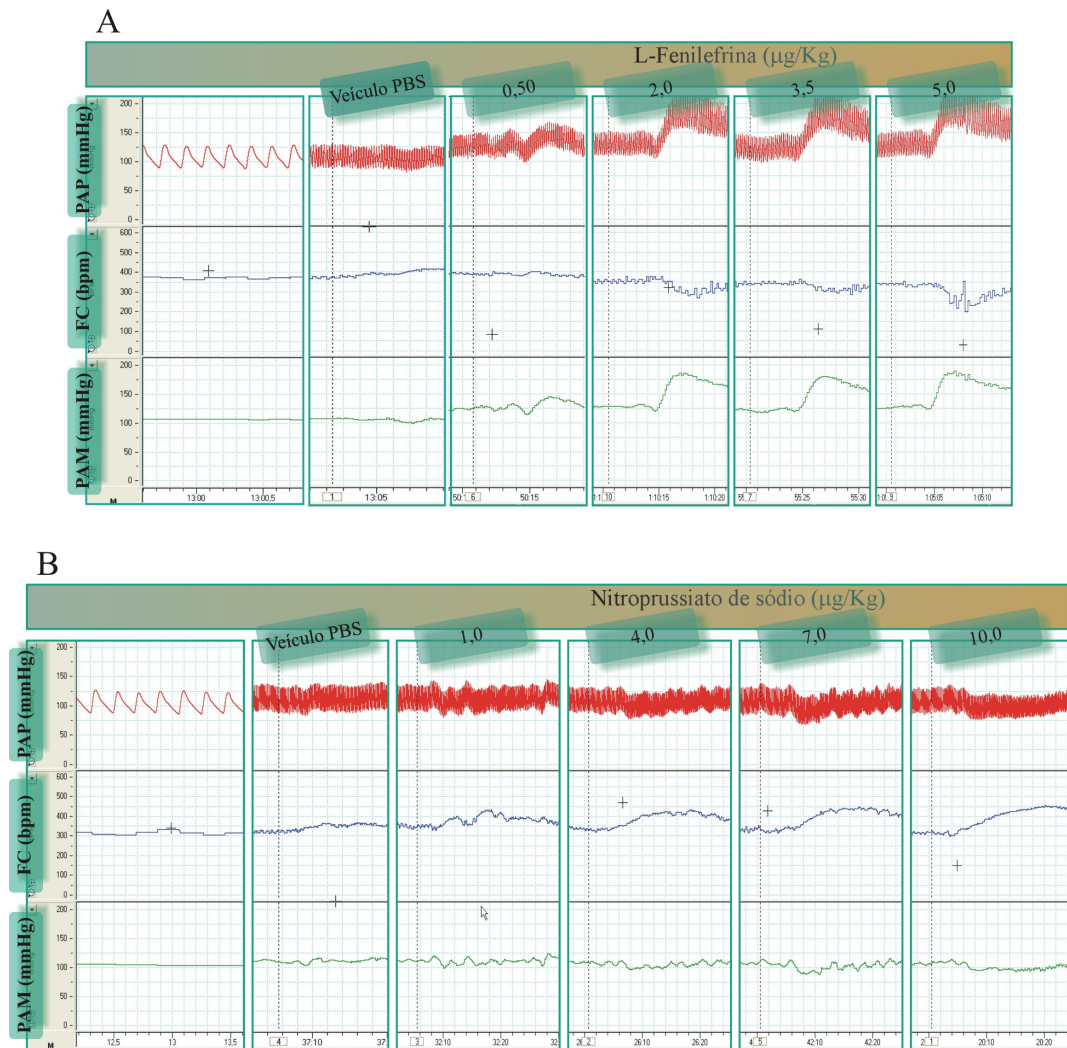


Figura 7 – Registros de um animal representativo do grupo sham mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.

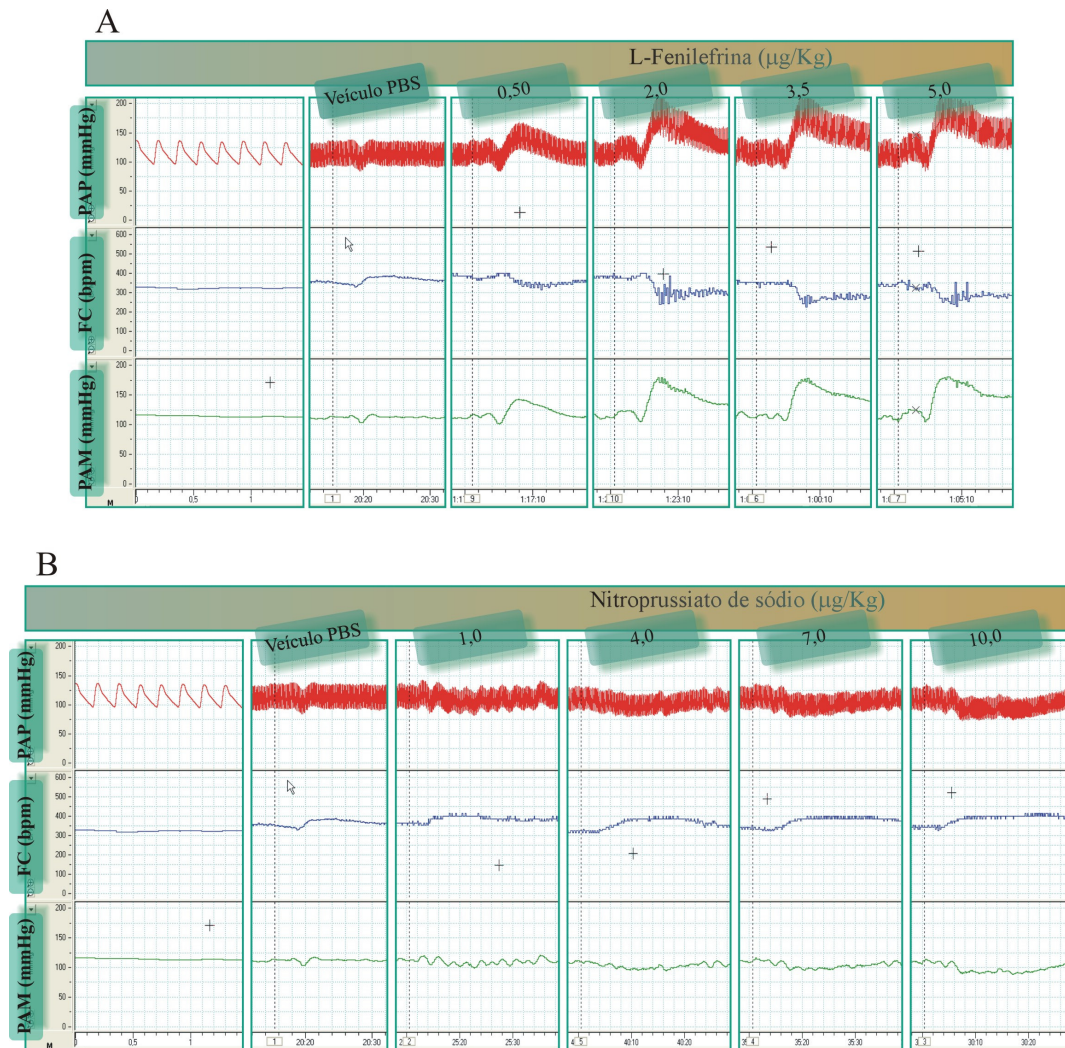


Figura 8 – Registros de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Direto mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.

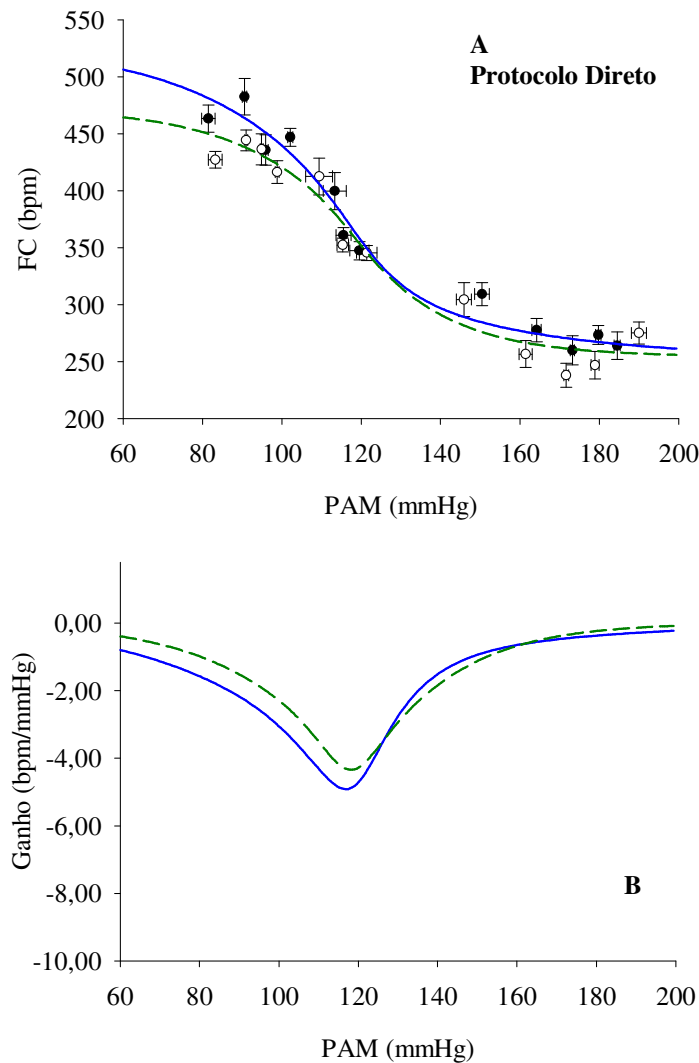


Figura 9 – O painel superior (A) mostra os valores de pico da FC contra em função dos valores de pico da PAM quando da estimulação do barorreflexo com L-fenilefrina e nitroprussiato de sódio (para detalhes veja o texto) em animais sham (●, n = 12) e do protocolo Direto (○, n = 12). As linhas pontilhadas (-----) representam o grupo tratado com ferro dextran e as linhas contínuas representam o grupo sham (—). A regressão sigmoidal logística das curvas barorreflexas é a média de 10 regressões sigmoidais obtidas de dados de animais não anestesiados sham e do protocolo Direto. O painel inferior (B) representa o ganho barorreflexo, ou seja, a primeira derivada média das funções sigmóides a um determinado valor de PAM. O ganho barorreflexo máximo ocorre no valor de PAM_{50} .

4.4. Reflexo Bezold-Jarisch em animais tratados com ferro dextran no protocolo Direto

Tendo em vista que a fenilbiguanida é uma droga com capacidade de ativar seletivamente fibras C aferentes quimiossensíveis (Thoren, 1979), observamos que as injeções endovenosas desta droga produziram bradicardias e hipotensões dose-dependente tanto no grupo tratado com ferro dextran no protocolo *Direto* quanto em seu respectivo sham, conforme exemplificado na **figura 10**. A análise destas respostas, fruto de uma estimulação da população quimiossensitiva destas terminações aferentes, mostrou uma atenuação das bradicardias reflexas nos animais do protocolo *Direto* nas doses 1,25 µg/Kg e 2,5 µg/Kg sem alterações nas hipotensões. Estes resultados são mostrados na **tabela 9** e sumariados na **figura 11**.

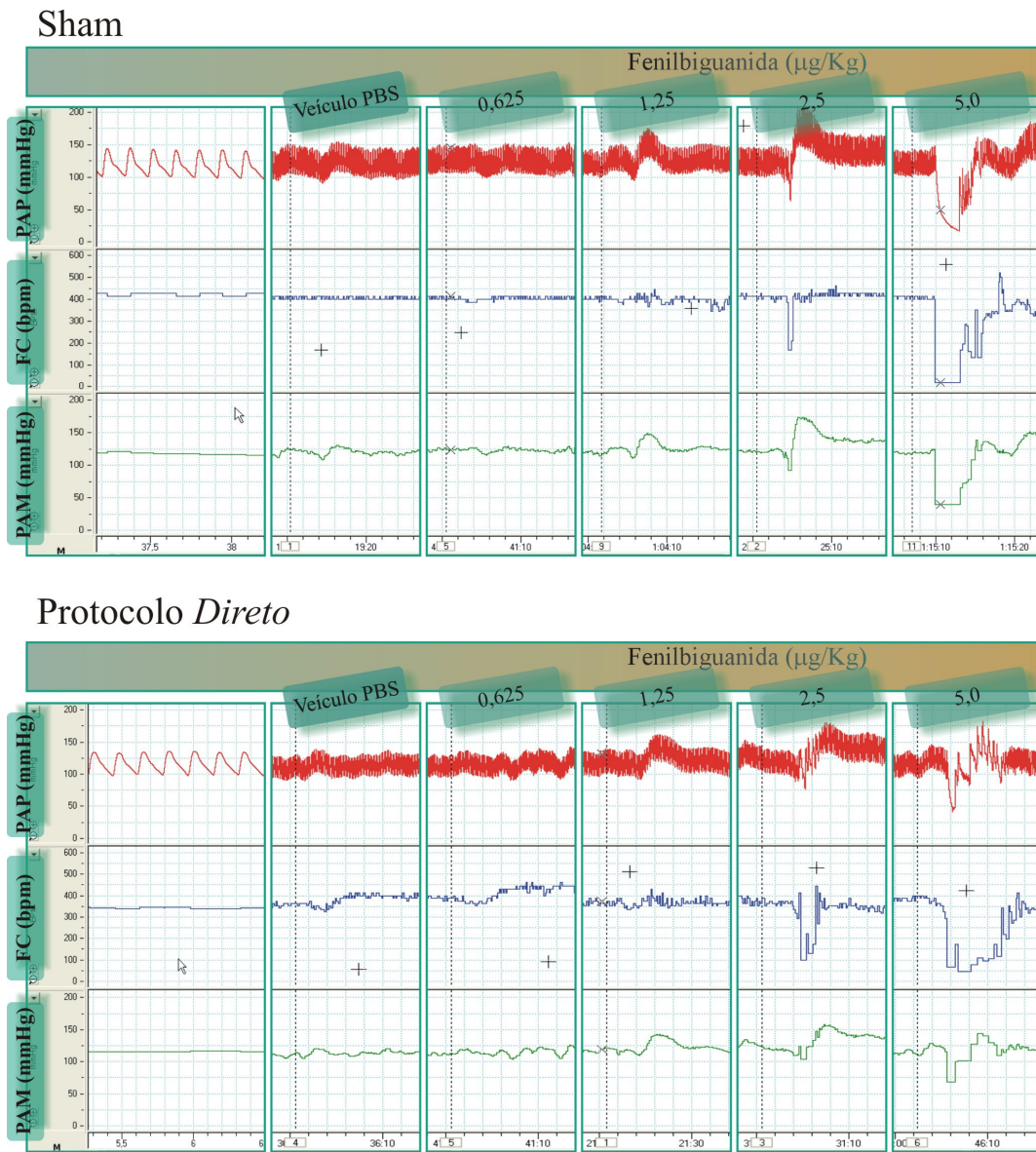


Figura 10 – Registros de um animal representativo do grupo sham (Controle) e de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Direto mostrando os efeitos das injeções i.v. de fenilbiguanida sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.

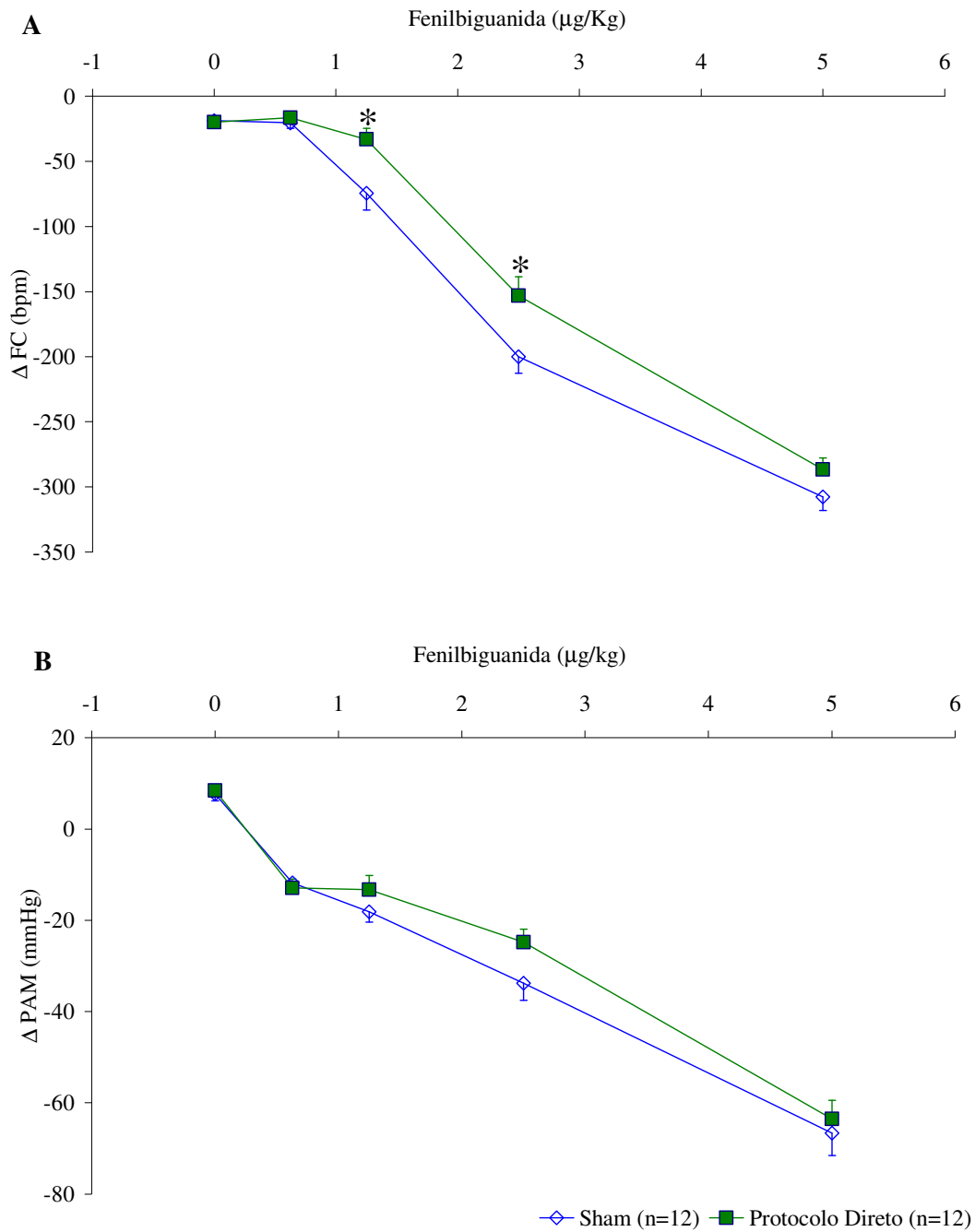


Figura 11 - Bradicardias (painel A) e hipotensões (painel B) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch em animais sham e animais do protocolo Direto. Cada ponto representa a variação média do parâmetro avaliado em função da dose e as hastes o erro padrão da média. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

4.5. Barorreflexo em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto

A avaliação do barorreflexo consistiu num conjunto de manobras com o tônus vascular que visaram elevar ou diminuir o retorno venoso, e conseqüentemente a pressão arterial, ativando, com isso, os barorreceptores aórticos e carotídeos. Em resposta a estas alterações pressóricas, o sistema nervoso neurovegetativo produziu modificações cronotrópicas cardíacas para restabelecer a pressão arterial em níveis próximos aos do período precedente à manobra. Neste sentido, as injeções endovenosas de nitroprussiato de sódio e L-fenilefrina produziram as devidas respostas hipotensoras e hipertensoras e suas respectivas respostas taquicárdica e bradicárdica tanto no grupo sham quanto no grupo tratado com ferro dextran no protocolo *Indireto* (**figuras 12 e 13**). O conjunto destes resultados é sumariado na **figura 14**. A regressão sigmoideal logística das curvas barorreflexas é a média de 10 regressões sigmoideais obtidas de dados de animais não anestesiados sham e do protocolo *Direto*. A barocurva dos animais tratados com ferro dextran no protocolo *Direto* não apresentaram diferenças quanto aos platôs inferior e superior em relação aos animais sham (**figura 14, A e tabela 7**). Contudo, o ganho barorreflexo, ou seja, a inclinação da sigmóide, representada pela primeira derivada média das funções sigmóides a um determinado valor de PAM (**figura 14, B**) mostrou um valor máximo aumentado (1,58 vezes) nos animais do protocolo *Direto* em relação aos animais sham. Este aumento no ganho foi acompanhado por um deslocamento da barocurva para esquerda com conseqüente redução do valor de PAM₅₀ (111 ± 1 mmHg vs. 117 ± 1 mmHg) e um estreitamento da curva da primeira derivada nos animais do protocolo *Direto* em relação aos animais sham. Na **tabela 8** são mostrados valores médios de PAM e FC para as dez classes em que foram divididos os picos de PAM com seus respectivos picos de FC. Estes dados são representativos da dispersão das barocurvas para cada grupo.

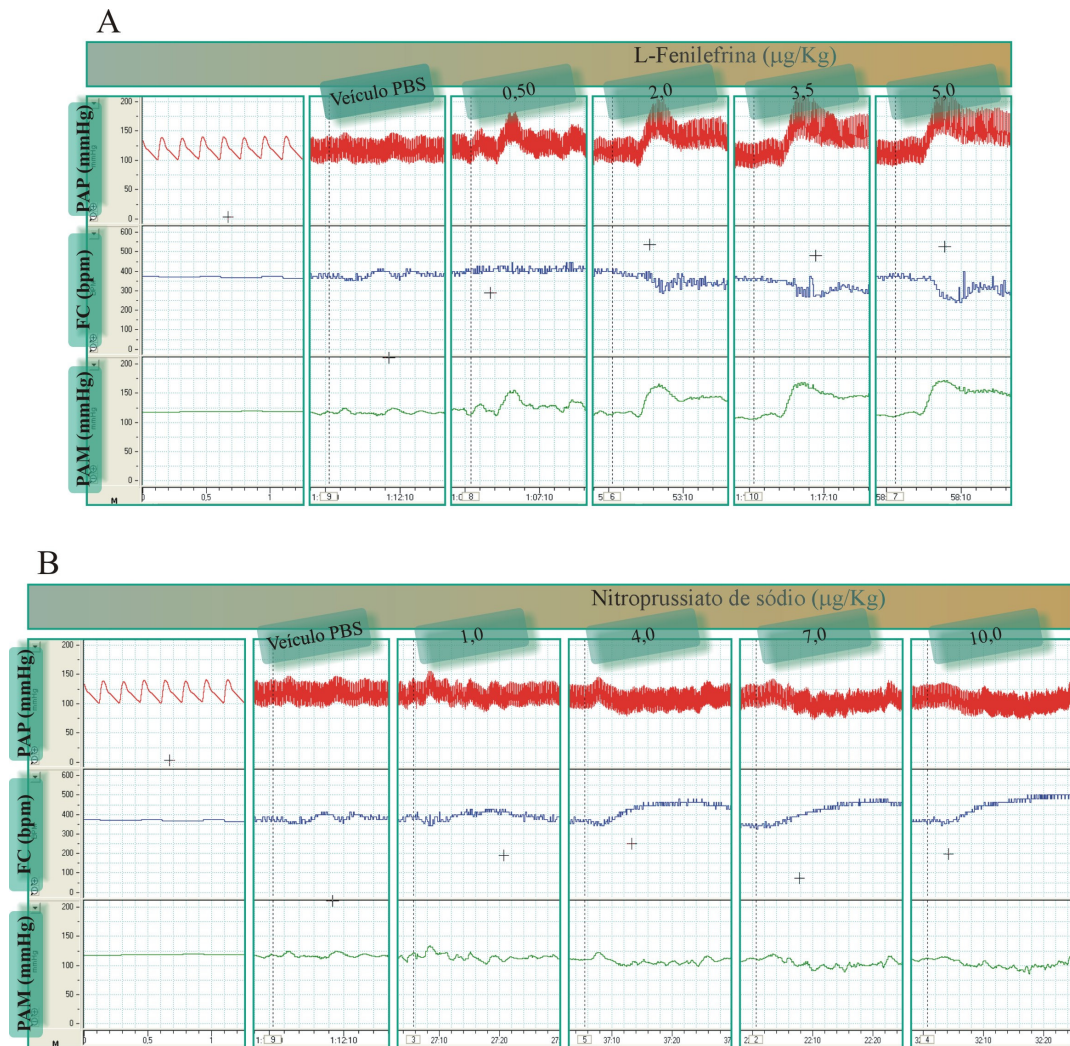


Figura 12 – Registros de um animal representativo do grupo sham mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.

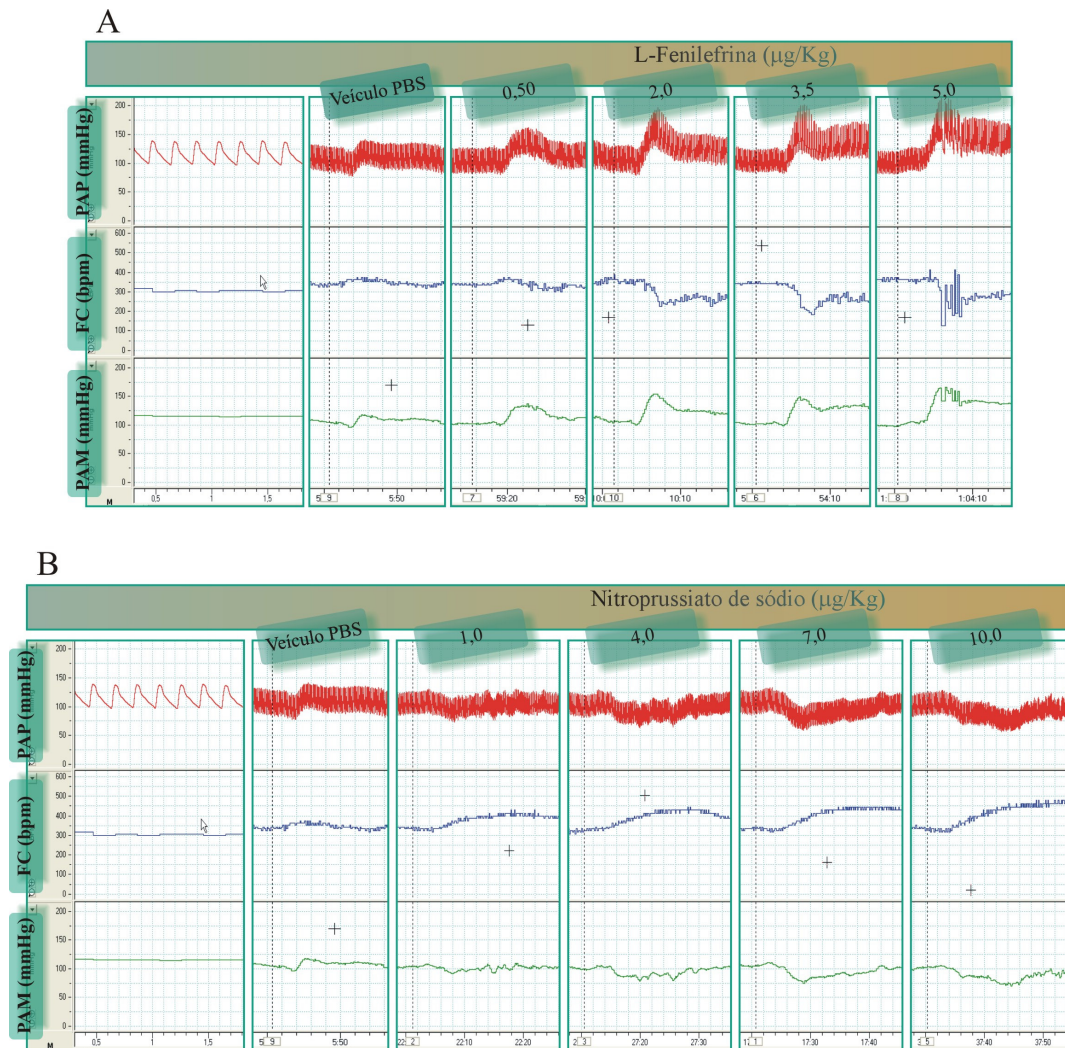


Figura 13 – Registros de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Indireto mostrando os efeitos das injeções i.v. de L-fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.

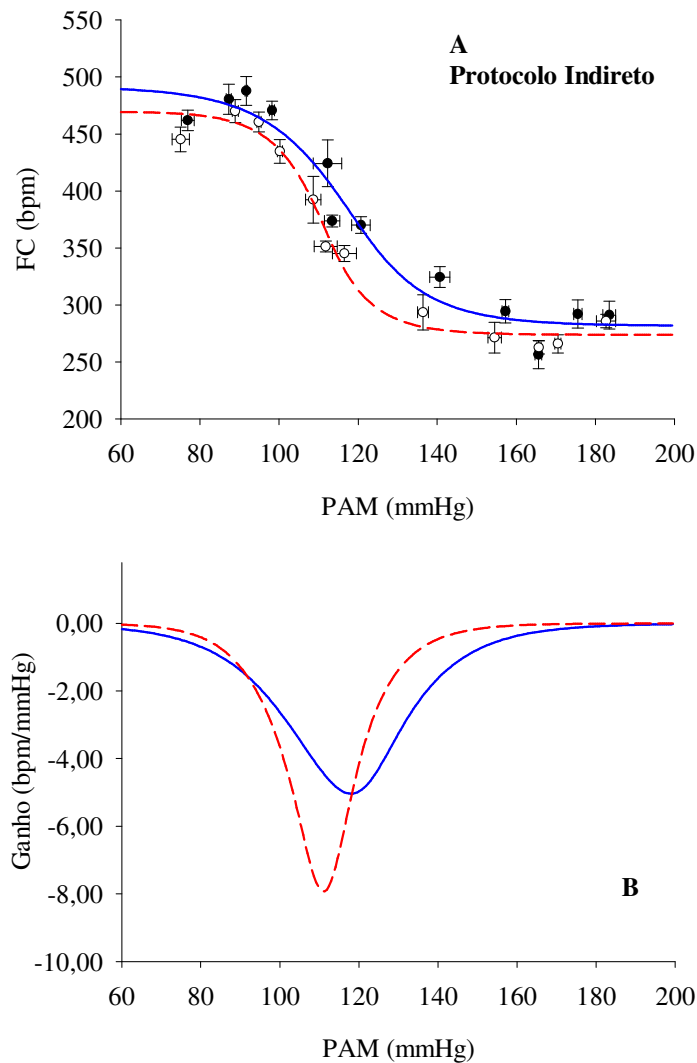
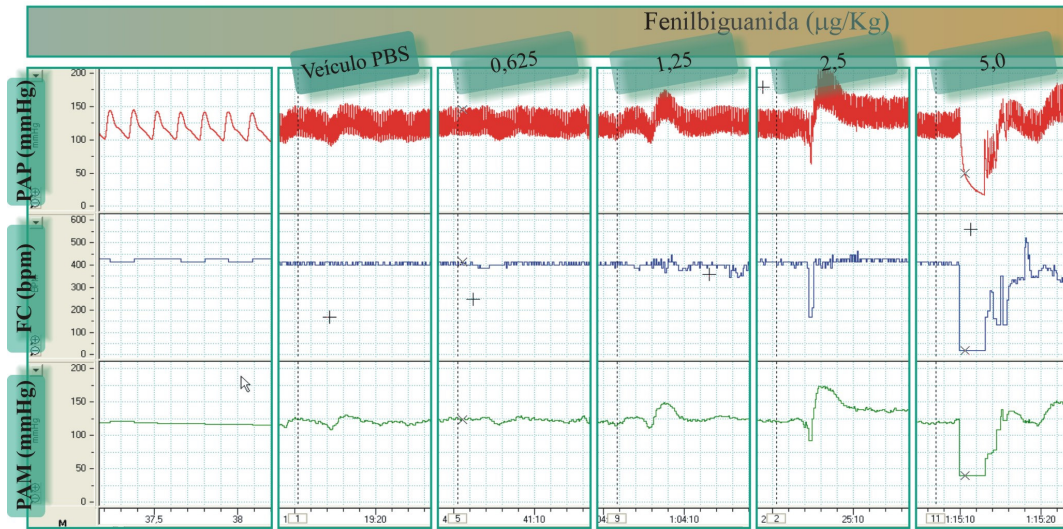


Figura 14 – O painel superior (A) mostra os valores de pico da FC contra em função dos valores de pico da PAM quando da estimulação do barorreflexo com L-fenilefrina e nitroprussiato de sódio (para detalhes veja o texto) em animais sham (●, n = 12) e do protocolo Indireto (○, n = 12). As linhas pontilhadas (-----) representam o grupo tratado com ferro dextran e as linhas contínuas representam o grupo sham (—). A regressão sigmoidal logística das curvas barorreflexas é a média de 10 regressões sigmoidais obtidas de dados de animais não anestesiados sham e do protocolo Indireto. O painel inferior (B) representa o ganho barorreflexo, ou seja, a primeira derivada média das funções sigmóides a um determinado valor de PAM. O ganho barorreflexo máximo ocorre no valor de PAM_{50} .

4.6. Reflexo Bezold-Jarisch em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto

Tendo em vista que a fenilbiguanida é uma droga com capacidade de ativar seletivamente fibras C aferentes quimiossensíveis (Thoren, 1979), observamos que as injeções endovenosas desta droga produziram bradicardias e hipotensões dose-dependente tanto nos animais do protocolo *Indireto* quanto em seu respectivo sham (**figura 15**). A análise destas respostas, fruto de uma estimulação da população quimiossensitiva destas terminações aferentes, mostrou uma atenuação das bradicardias reflexas nos animais do protocolo *Indireto* nas doses 1,25 µg/Kg e 2,5 µg/Kg. Diferentemente dos animais tratados com ferro dextran no protocolo *Direto*, nesse grupo também foram observadas atenuações nas hipotensões reflexas nas doses de 2,5 µg/Kg e 5,0 µg/Kg. Estes resultados são mostrados na **tabela 10** e sumariados na **figura 16**.

Sham



Protocolo Indireto

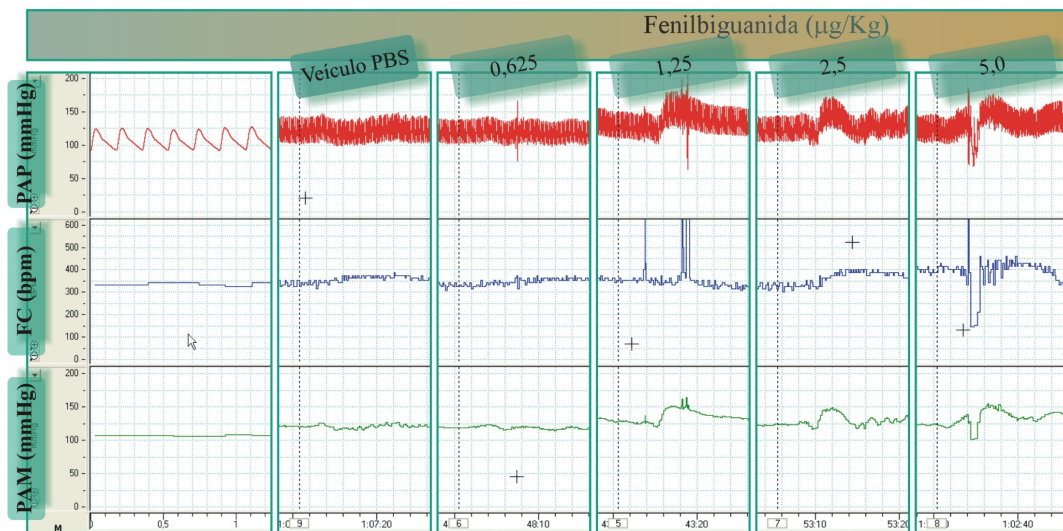


Figura 15 – Registros de um animal representativo do grupo sham (Controle) e de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Indireto mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo.

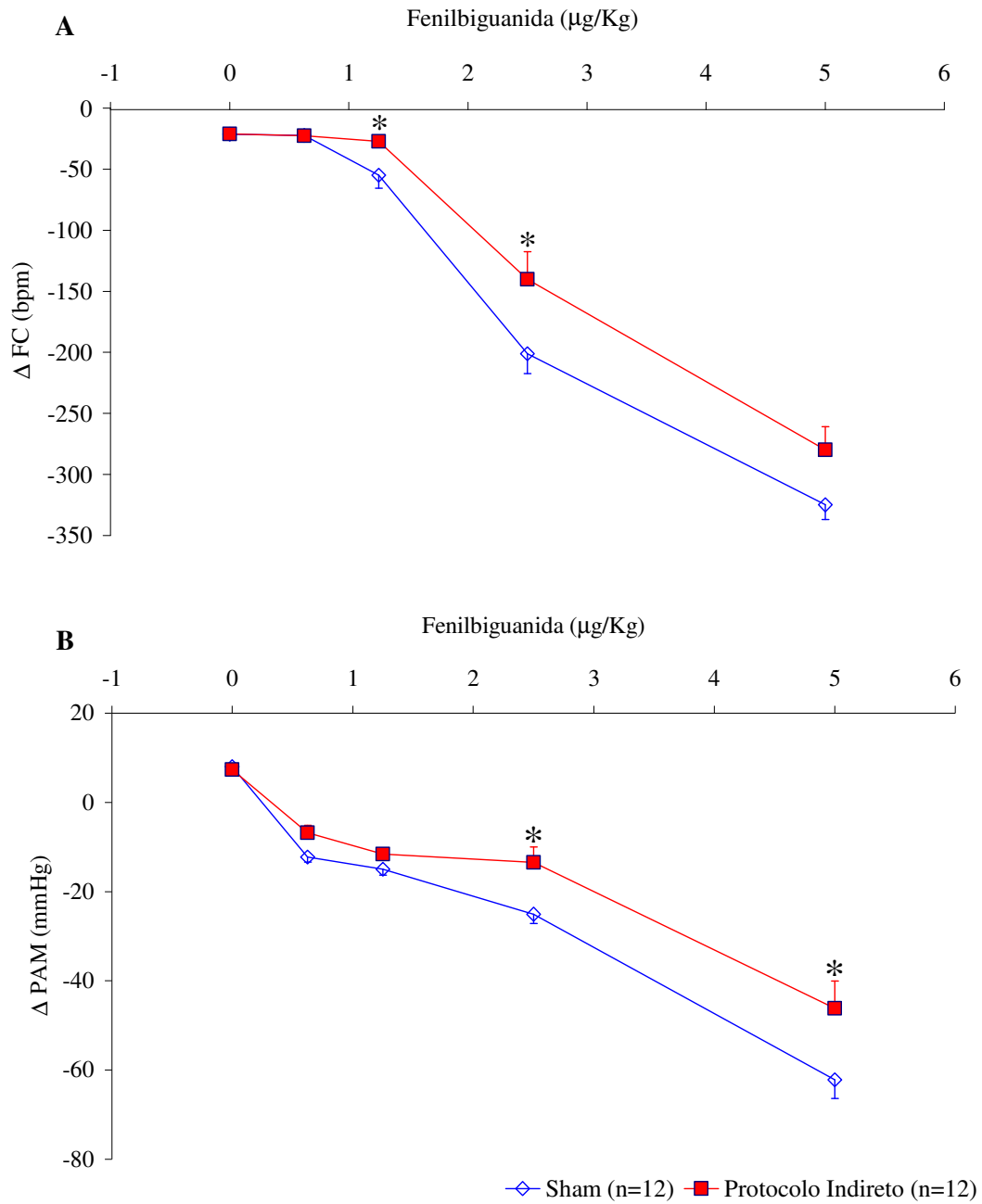


Figura 16 - Bradicardias (painel A) e hipotensões (painel B) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch em animais sham e tratados com ferro dextran no protocolo Indireto. Cada ponto representa a variação média do parâmetro avaliado em função da dose e as hastes o erro padrão da média. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

4.7. Barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto e sob efeito de deferoxamina

Conforme descrito previamente na literatura, a infusão lenta de deferoxamina e a dose utilizada (20 mg/Kg) permitiram mudanças consistentes na atividade neuronal sem modificações dos índices cardíacos (Thompson e cols., 1998; Ustinova & Schultz, 1994a). Os efeitos observados foram fruto de uma ação quelante da DFO sobre íons férricos (Fe^{3+}) principalmente, presumivelmente livres, sem se levar em conta alterações funcionais de longa duração como, por exemplo, inativação permanente de proteínas como a Ca^{2+} -ATPases – meia vida de 12 a 17 dias em músculo esquelético de ratos Fischer 344 (Ferrington e cols., 1998).

As injeções de nitroprussiato de sódio e fenilbiguanida produziram as devidas respostas dose-dependente tanto no grupo tratado com ferro dextran no protocolo *Indireto* quanto no grupo sham antes e após a infusão de deferoxamina (**figuras 17 e 18**). Apesar de uma forte tendência de aumento da PAM nos animais tratado com ferro dextran no protocolo *Indireto* após a infusão de DFO (Antes DFO: 119 ± 1 mmHg; após DFO: 124 ± 2 mmHg), não foram observadas alterações significativas da PAM e FC após a administração de deferoxamina em nenhum dos grupos (**tabela 11**).

O ganho medo para o barorreflexo não se mostrou alterado após a infusão de deferoxamina nos animais do grupo sham. Entretanto, nos animais do protocolo *Indireto* houve uma redução significativa deste parâmetro após a infusão, não diferindo, por conseguinte, do apresentado pelo grupo sham. Estes resultados são apresentados na **tabela 12** e sumariados na **figura 19**.

Com relação ao reflexo Bezold-Jarisch, as bradicardias reflexas tanto no grupo sham quanto nos animais do protocolo *Indireto* não se mostraram alteradas após a infusão de deferoxamina. Entretanto, a hipotensão reflexa foi exacerbada nos animais tratados com ferro dextran no protocolo *Indireto* após a infusão de deferoxamina para a dose de $2,5 \mu\text{g/Kg}$ de fenilbiguanida, diferindo do grupo sham antes mas não após a infusão. Estes resultados são apresentados na **tabela 13** e sumariados na **figura 20**.

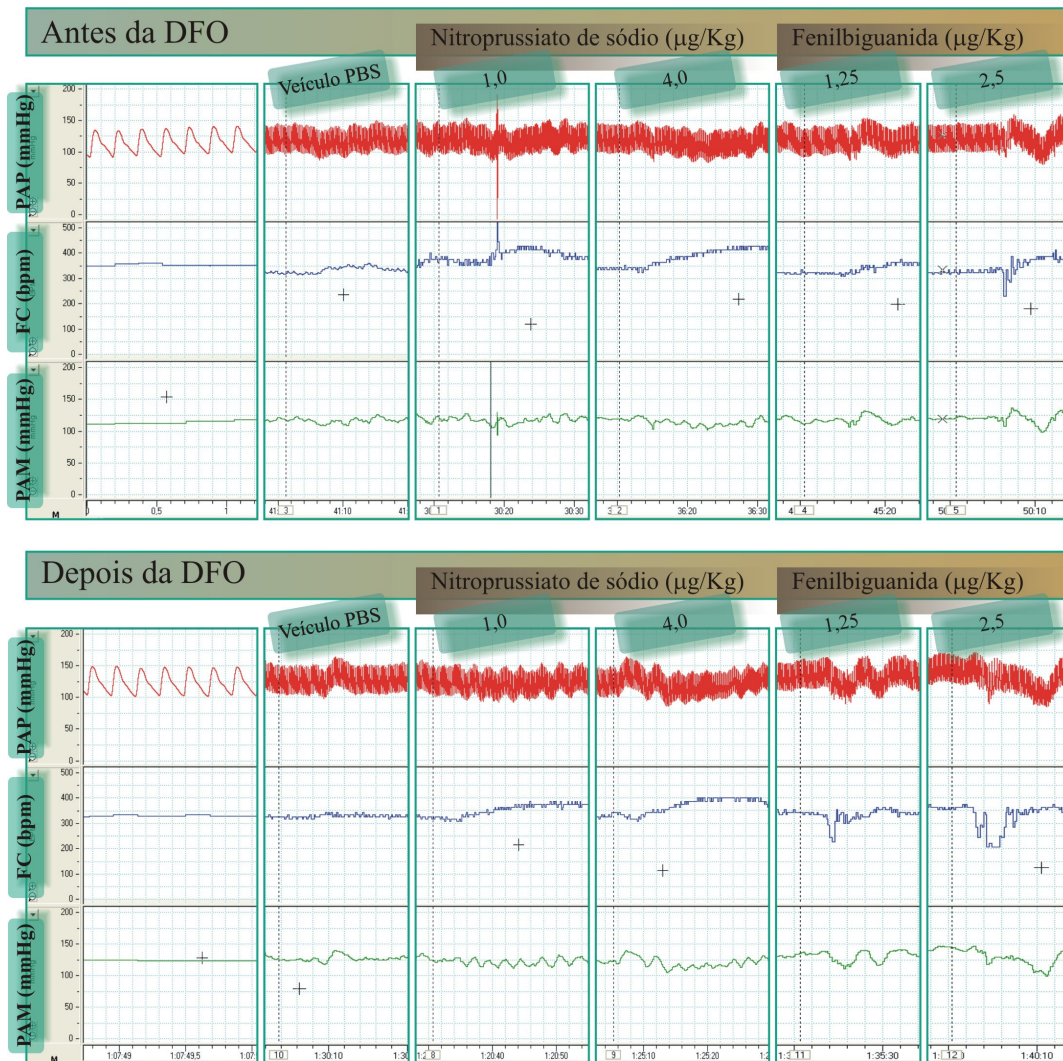


Figura 17 – Registros de um animal representativo do grupo sham mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida e nitroprussiato de sódio sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo antes (Antes da DFO) e após (Depois da DFO) injeções i.v. de mesilato de deferoxamina.

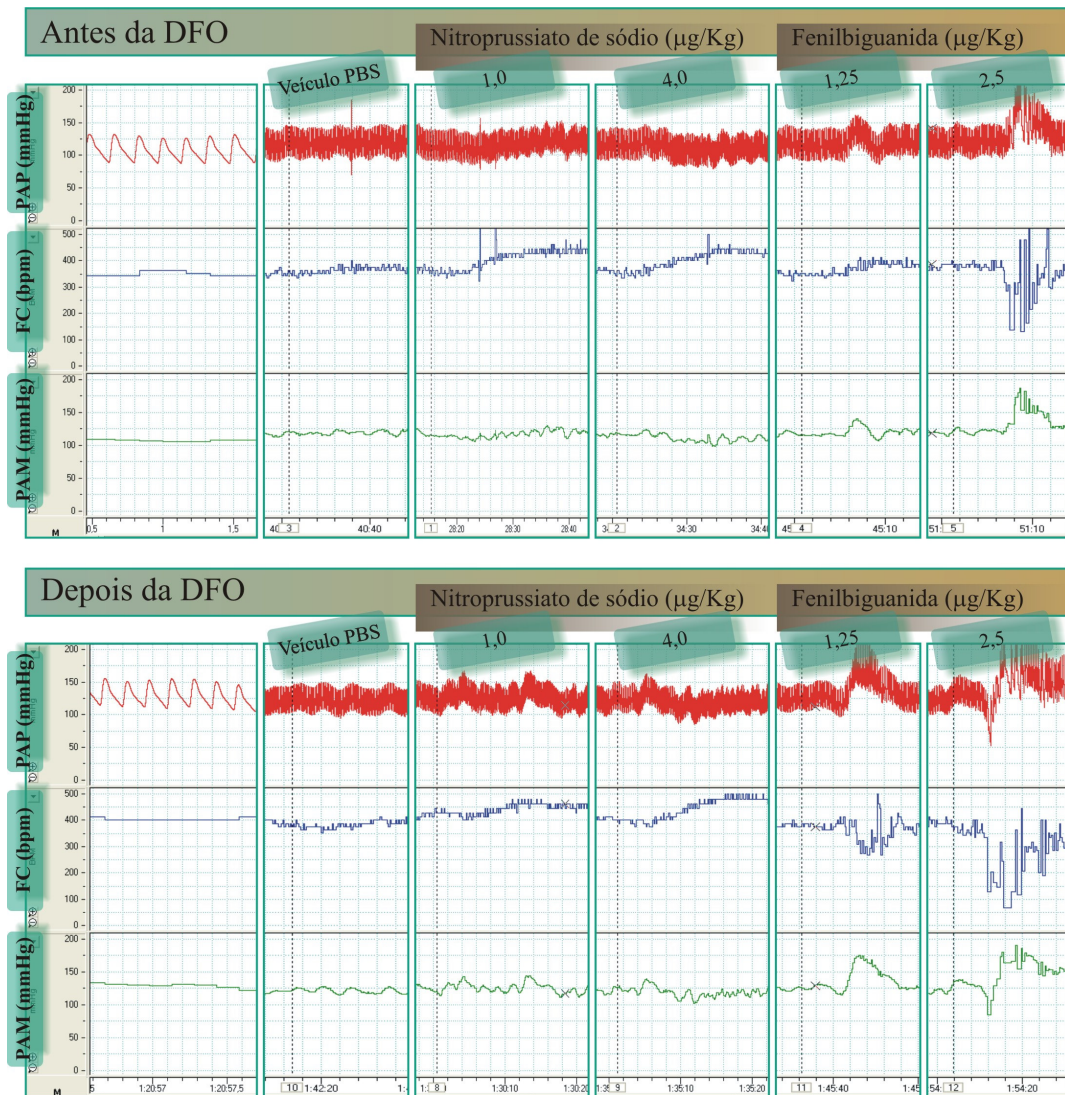


Figura 18 – Registros de um animal representativo do grupo tratado com ferro dextran no protocolo Indireto mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida e nitroprussiato de sódio sobre a PAP, PAM e FC em função do tempo antes (Antes da DFO) e após (Depois da DFO) injeções i.v. de mesilato de deferoxamina.

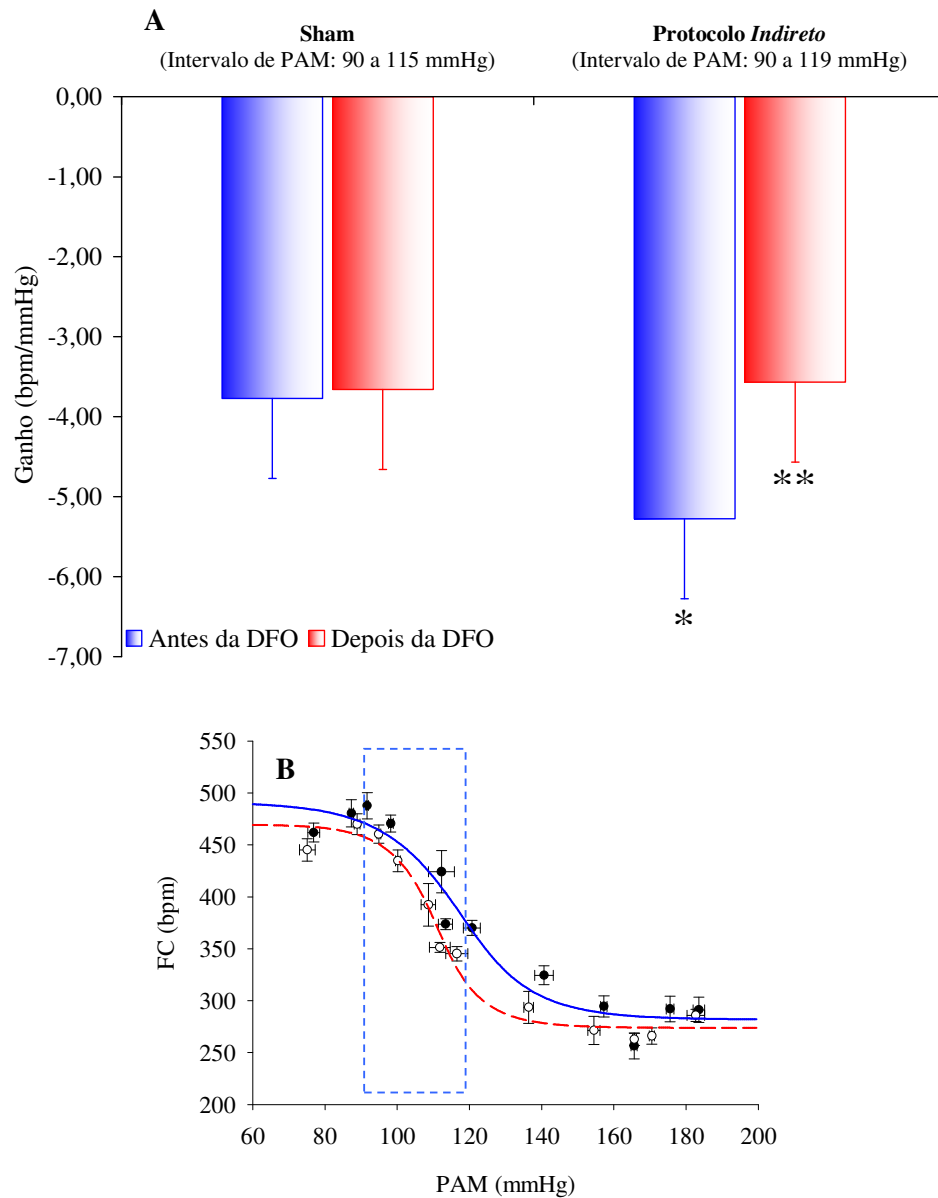


Figura 19 - Ganho barorreflexo geral em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto e sham antes e após a infusão de deferoxamina. No painel A as barras representam os valores médios deste parâmetro e as hastes o erro padrão da média. No painel B, uma cópia da barocurva dos animais tratados no protocolo Indireto é mostrada com o intervalo de variação de PAM marcado (retângulo) demonstrando que o ganho foi avaliado num segmento da sigmóide onde as diferenças entre os animais sham e do protocolo Indireto são bastante evidentes. * diferença estatística em relação ao sham; ** diferença estatística entre animais tratados com ferro dextran antes e após DFO ($p < 0,05$ teste t de Student).

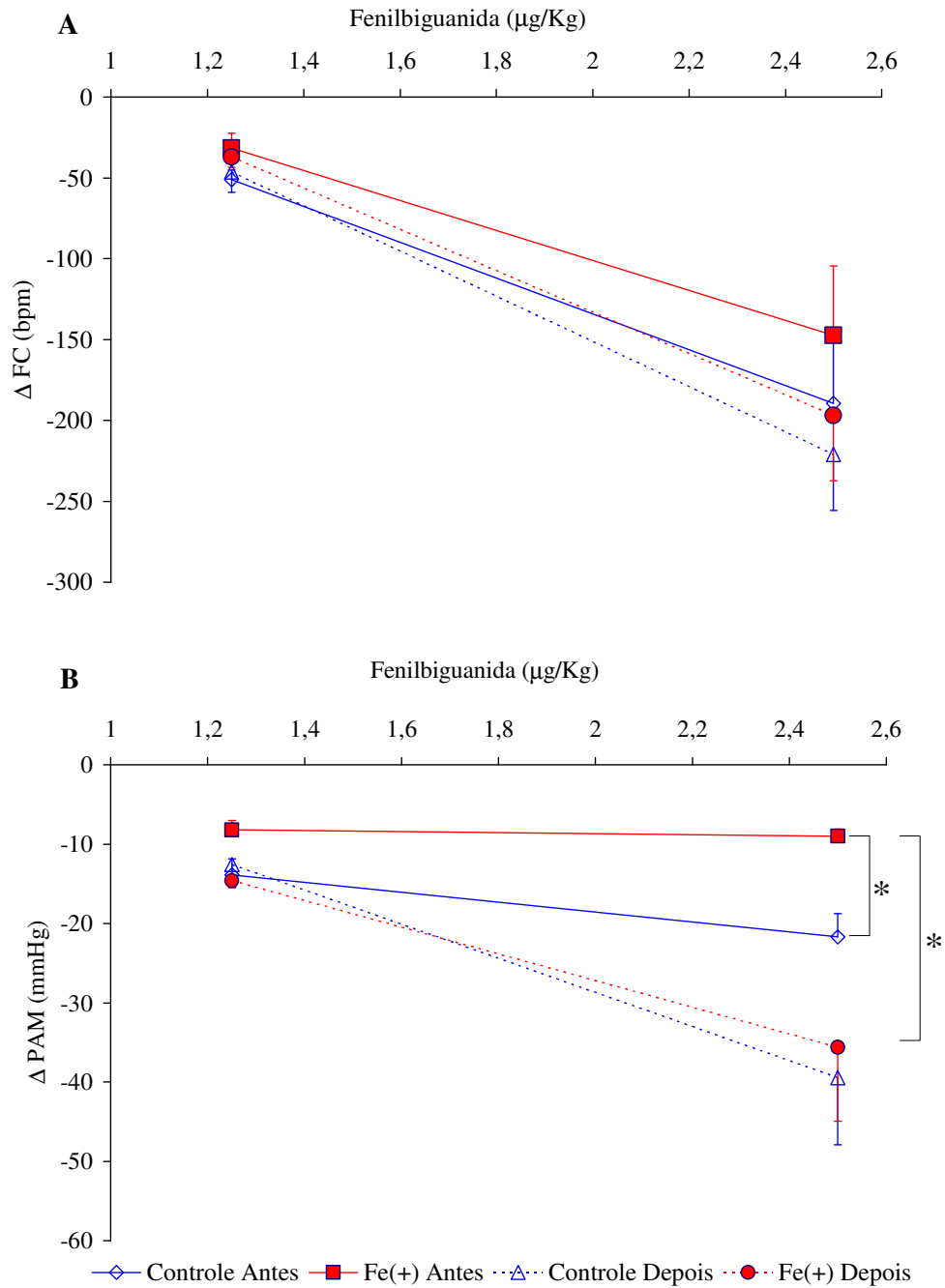


Figura 20 – Bradicardias (painel A) e hipotensões (painel B) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch antes (linha contínua) e após (linha pontilhada) a infusão de deferoxamina em animais tratados com ferro dextran no protocolo Indireto [Fe(+)] e sham [controle] Cada ponto representa a variação média do parâmetro avaliado em função da dose e as hastes o erro padrão da média. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

5. Discussão

Nossos resultados demonstraram que a suplementação parenteral com ferro dextran produziu alterações na atividade do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch além de uma leve bradicardia de repouso sem, contudo, alterações da pressão arterial média. Observamos ainda uma redução da variabilidade da FC de repouso nos animais tratados com ferro dextran e uma pequena redução da pressão de pulso nos animais tratados com ferro dextran segundo o protocolo *Indireto*. Além disso, a infusão i.v. de mesilato de deferoxamina foi capaz de reverter os efeitos do tratamento com ferro dextran no protocolo *Indireto* sobre o barorreflexo e o reflexo Bezold-Jarisch sem alterações significativas na PAM e FC.

As questões nutricionais relativas ao ferro vêm se tornado objeto de estudos de várias linhas de pesquisa não somente em países desenvolvidos como também em países em desenvolvimento nas últimas décadas. Estes estudos vêm revelando dados epidemiológicos e experimentais de grande importância para o contexto da saúde pública. Diversos trabalhos demonstram que o acúmulo de ferro em humanos é um fato e que não apenas causas patológicas, mas também alguns hábitos alimentares e o próprio processo de envelhecimento estão envolvidos neste processo com repercussões fisiopatológicas relevantes na prevalência e incidência de algumas doenças crônico-degenerativas (McLaren e cols., 1983; Brittenham, 1994; Choi & Yu, 1994; Crawford, 1995; Beard, 2002). A suplementação com antioxidantes como a vitamina C tem sido apontada como uma prática capaz de reverter e/ou proteger contra danos provocados pelo stress oxidativo (Chen e cols., 2000; Berger e cols., 1997). Contudo, seu real valor e eficácia na terapia de distúrbios provocados pelo acúmulo de ferro ainda são discutíveis (Crawford, 1995; Lachili e cols., 2001). À parte destas dissensões, o efeito dos antioxidantes, sob determinadas condições, impinge aos radicais livres um efeito fugaz, ou seja, um curto período de existência em células cujo metabolismo esteja ajustado para um perfeito equilíbrio entre produção e degradação de radicais livres. Ora, se os radicais livres, elementos centrais na via de efeitos citotóxicos exercidos pelo ferro, têm uma existência fugaz, espera-se que eles contribuam muito pouco para danos celulares graves em condições normais. De fato, muitas das proteínas, lipídeos de membrana e seqüências de DNA afetados, em última análise, pelos efeitos deletérios dos radicais livres (e, indiretamente, do ferro) conseguem se regenerar e/ou são

substituídos no processo de “turnover” celular de modo que a depender da intensidade e do tempo de exposição a uma produção aumentada de radicais livres as células conseguem se recompor e manter suas funções normais durante seu ciclo de vida. Contudo, a perda da homeostasia no metabolismo do ferro tem sido associado a uma maior produção de radicais livres contribuindo para o desenvolvimento de uma série de patologias incluindo doenças cardiovasculares (Emerit e cols., 2001).

Sob a justificativa de evitar os inúmeros, e infelizmente comuns, casos de anemia todos os anos em todo o mundo, uma gama relativamente ampla de alimentos industrializados vem sendo suplementados com quantidades apreciáveis de ferro de forma indiscriminada. A anemia tem várias causas e muitos autores acreditam que a anemia por deficiência de ferro perfaça um percentual pequeno de todos os casos registrados. Muitos clínicos acreditam que a anemia é essencialmente um indicativo de deficiência de ferro baseados em parâmetros como ferro sérico e capacidade de ligação de ferro cuja credibilidade para este fim diagnóstico tem sido questionada. A exemplo disto, citam-se os casos de anemia com redução significativa de ferro sérico decorrente de uma infecção maciça por parasitas incluindo bactérias. Nestes casos, o próprio organismo lança mão de recursos moleculares como a lactoferrina para indisponibilizar o ferro para estes agentes infecciosos (Weinberg, 1984; Weinberg, 1990). Há mais de um século atrás era comum tratar quadros de anemia com arsênio que atuava estimulando a formação de mais células vermelhas. O fato de o arsênio, outras substâncias tóxicas ou até mesmo o ferro estimularem a produção de células vermelhas não indica uma deficiência daquela substância (por exemplo, o ferro), mas simplesmente que o organismo reage de forma diferente a agentes tóxicos estimulando a produção de células vermelhas. Cabe ressaltar que a injúria celular estimula a produção e liberação de fatores de crescimento, necessários à regeneração, os quais também atuam sobre a proliferação de células vermelhas. Além disso, já foi demonstrado que a exposição à radiação produz efeitos semelhantes sobre a produção de células vermelhas. Sob outro aspecto, é fortemente sugerido que a suplementação de ferro em casos de anemia também contribui com outras complicações tais como o stress oxidativo, principalmente no intestino, como já demonstrado experimentalmente (Srigiridhar & Nair, 1998). Em conjunto, estes resultados chamam atenção para a necessidade de se

considerar com cautela os parâmetros indicativos de anemia e em que momento deve-se intervir com uma terapia de “reposição” com ferro a fim de se evitar um acúmulo deste micronutriente no organismo.

Apesar do crescente número de publicações que defendem a idéia de que a sobrecarga de ferro tem implicações importantes em distúrbios funcionais no sistema cardiovascular (Bartfay e cols., 1999; Crawford, 1995; Li e cols., 1996; Weinberg, 1990), alguns autores defendem a hipótese de que não há correlação entre o status de ferro de um indivíduo e o risco aumentado de doenças cardiovasculares como a aterosclerose decorrente do aumento da oxidação de LDL por radicais livres provenientes da reação de Fenton (Corti e cols., 1997). Este autor ainda reforça que uma falha real de seus dados é a falta de concordância em como obter dados precisos e representativos dos níveis de ferro em humanos. Contudo, é um consenso entre todos os autores, favoráveis ou não à hipótese do ferro, que as técnicas empregadas e os parâmetros analisados não são suficientes para conclusões definitivas a favor ou contra esta hipótese (Beard, 2002). Talvez, a natureza do “risco cardiovascular” avaliado tenha fundamental importância nesta associação. A exemplo disto, é sabido que a deposição de ferro no coração conduz a um processo de cardiomiopatia que evolui para um quadro de falência cardíaca com severa disfunção diastólica, mas com função sistólica preservada em estágios iniciais da desordem onde ainda há baixas concentrações de ferro no tecido (Liu & Olivieri, 1994; Bartfay WJ e cols., 1999). Com o aumento progressivo da deposição de ferro a falência cardíaca evolui rapidamente sendo a falência cardíaca induzida por ferro apontada por alguns autores como uma das principais causas de morte na segunda e terceira décadas de vida em todo o mundo em pacientes com talassemia (Aldouri e cols., 1990; Liu & Olivieri, 1994; Bartfay WJ e cols., 1999).

A discussão criada em torno de qual processo, sobrecarga ou deficiência de ferro, é mais expressivo do ponto de vista de saúde pública deixa de levar em conta um elemento comum em ambos os estados: o excesso de ferro nos estoques parece ser acompanhado por uma maior quantidade de ferro livre na célula e, com isso, levar a uma maior geração de radicais livres (Burkitt & Mason, 1991); por outro lado, a deficiência de ferro leva, em um estado inicial, a uma maior mobilização de ferro dos

estoques o que poderia aumentar a geração de radicais livres e, num estado mais avançado, quando os estoques já tiverem sido depletados, a deficiência de ferro pode comprometer a formação e funcionamento de enzimas como a catalase envolvidas na eliminação de precursores de e/ou radicais livres diretamente.

A opção por um estudo com sobrecarga de ferro leva em conta alguns aspectos como a natureza de nosso objeto de estudo. O fato de trabalharmos com reflexos cardíacos em animais intactos e não anestesiados implica em um funcionamento pleno de todos os mecanismos de regulação da pressão arterial. Levamos ainda em consideração o fato de que a linha que separa uma real deficiência de ferro e a anemia é bastante tênue. Portanto, se os animais chegassem a um estado de anemia, a diminuição da oxigenação tecidual poderia modificar a regulação neurovegetativa cardiovascular e, com isso, levar a um comprometimento da interpretação dos dados. Neste sentido, a suplementação de ferro fornece resultados mais precisos, pois, a priori, apenas a variável ferro está em voga neste.

Nos dois protocolos de suplementação de ferro utilizados neste estudo, além das diferenças inerentes à dose de ferro, dois momentos distintos foram definidos: um imediatamente após o tratamento com ferro dextran, onde supomos predominarem os efeitos imediatos do ferro sobre os mecanismos de regulação neurovegetativa cardiovascular, e outro 7 dias após o término do tratamento com ferro dextran, onde supomos predominarem os efeitos indiretos e tardios do ferro sobre a regulação neurovegetativa cardiovascular. Estes dois momentos foram marcados por diferenças relevantes nos conteúdos de ferro nos fluidos (principalmente plasma) e nos estoques. No protocolo *Direto*, a quantidade de ferro circulante é extremamente elevada enquanto foi observado um aumento significativo de ferro estocado apenas no fígado. Isto indica que, neste momento, o ferro ainda começa a ser estocado, com um tráfico intenso de ferro dos fluidos para os estoques, uma grande disponibilidade de ferro livre e uma grande possibilidade de observar um estado de stress oxidativo intenso por maior geração de radicais livres pela reação de Fenton. No protocolo *Indireto*, apesar de apresentarem maior conteúdo de ferro sérico que o sham, este ainda é menor que o do grupo tratado por 7 dias. Entretanto, os conteúdos de ferro tanto no fígado quanto no baço são maiores que os do sham e que os dos animais do protocolo *Direto*. Esta análise

sugere que o ferro injetado nestes dois esquemas de tratamento estaria distribuído de forma diferenciada nestes dois momentos e que, portanto, os mecanismos reflexos de controle da PA poderiam ser afetados de formas diferentes. Esta distribuição diferenciada deve-se a características farmacocinéticas do ferro dextran que libera o ferro lentamente enquanto o dextran é degradado pelos macrófagos (Holbein, 1980). Do ponto de vista patológico, a deposição de ferro no coração inicia-se no epicárdio e apenas depois ocorre na parede transmural, no miocárdio propriamente (Liu & Olivieri, 1994; Liu e cols., 1996; Bartfay WJ e cols., 1999). Considerando a importância da deposição de ferro para o desenvolvimento de um quadro de falência cardíaca sugerimos que no protocolo *Direto* o grau de falência cardíaca induzida por ferro ainda seja bastante reduzido no momento de análise dos reflexos ao passo que o grau de falência cardíaca nos animais do protocolo *Indireto* possa ser maior e mais severo. À favor desta hipótese tem-se o fato de termos observado uma redução na pressão de pulso do animais tratados com ferro dextran no protocolo *Indireto* (mas não no protocolo *Direto*), fato que estaria de acordo com um possível quadro de insuficiência cardíaca nestes animais.

A análise dos parâmetros cardiovasculares basais revelou uma redução da FC não acompanhada pela PAM. Esta redução da FC foi também acompanhada por uma redução da variabilidade da FC, considerado um importante indicador de risco de morte súbita. Trabalhos utilizando o modelo coração isolado já demonstraram uma redução da FC em animais tratados com ferro dextran (Bartfay WJ e cols., 1999) estando de acordo com o que observamos. Diante disto, sugerimos que um que efeito direto do ferro no coração possa estar sendo, pelo menos em parte, responsável por esta redução de FC. Galgamos esta hipótese em estudos com canais de cálcio onde tem sido demonstrado que tanto a geração de radicais livres (Grover & Samson, 1988; Winegar e cols., 1991; Burlando e cols., 2001) quanto o ferro por si só (Moreau e cols., 1998) modificam a atividade destes canais estimulando a abertura de portões e inibindo transportadores ativos de cálcio alterando as correntes intracelulares deste íon. Considerando a importância das correntes de cálcio para o período refratário durante o ciclo cardíaco, a inativação destes canais poderia contribuir para um aumento deste período refratário culminando na leve bradicardia observada tanto *in vivo* quanto *ex vivo*.

Estes dados, contudo, não descartam a hipótese de um envolvimento do sistema nervoso neurovegetativo nestas alterações, mesmo porque os níveis pressóricos não se mostraram menores que os do grupo sham. Além disso, a hipótese dos canais de cálcio poderia explicar facilmente a bradicardia no modelo coração isolado, mas *in vivo* esta bradicardia poderia estar levando a uma leve e permanente hipotensão capaz de induzir um aumento da atividade simpática via barorreflexo. O fato de observarmos esta bradicardia *in vivo* sugere que este provável aumento de tônus simpático não ocorreu ou pelo menos não está sendo por si só suficiente para reverter o quadro de bradicardia. Em última análise, acreditamos que alterações na regulação autonômica poderiam contribuir para a manutenção da pressão arterial em seus níveis normais por outras vias, principalmente a resistência vascular periférica e não somente por ação sobre o cronotropismo pois com um possível quadro de falência cardíaca o coração como bomba perderia sua eficiência. No protocolo *Direto*, considerado aqui como um estágio inicial do processo de falência cardíaca, onde alterações do barorreflexo ainda não puderam ser detectadas, podemos observar que o platô superior, ou seja, a taquicardia máxima produzida pelo barorreflexo, tendeu a ser menor em relação ao sham. Isto representaria um prejuízo da capacidade do coração em responder a estímulos simpatoexcitatórios de uma alça de feedback ainda não completamente adaptada que, posteriormente, já “mais adaptada”, conseguiria trazer o platô superior da barocurva dos animais do protocolo *Indireto* para mais próximo do controle conforme pode ser observado nas **figuras 9 e 14**. Contudo, as conseqüências e a continuidade destas mudanças poderiam, de alguma forma, contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento de disfunções cardiovasculares severas. Por termos realizado experimentos de curto prazo, o curso crônico das alterações nos mecanismos reflexos e suas contribuições para possíveis elevações da PA ainda permanecem em aberto.

A análise dos reflexos cardiovasculares demonstrou que o tratamento com ferro dextran no protocolo *Direto* parece não ter exercido efeitos tão pronunciados sobre o barorreflexo (**figura 9**). Esperávamos que com este protocolo de tratamento observássemos alterações mais profundas da resposta barorreflexa pelos motivos já mencionados. Contrariamente, o tratamento com ferro dextran no protocolo *Indireto* modificou o ganho barorreflexa de forma intensa deslocando a curva para valores de

PAM mais baixos e estreitando a faixa de pressão na qual o barorreflexo é eficiente conforme pode ser visto na *figura 14B*. Este aumento de sensibilidade talvez possa explicar a redução na variabilidade da FC uma vez que o sistema estaria mais responsivo a variações pequenas de PA com uma redução reduzindo as oscilações nas FC. Estes dados estão de acordo com observações feitas em outros modelos de falência cardíaca como no infarto crônico do miocárdio onde o ganho barorreflexo mostrou-se aumentado com redução de FC e PAM basais (Meyrelles e cols., 1996). Se considerarmos que a bradicardia de repouso observada nos animais tratados com ferro poderia, indiretamente, estimular vias simpatoexcitatórias do barorreflexo, o ganho do componente taquicárdico poderia, pelo menos em parte, ser explicado por este mecanismo. Entretanto, considerando a natureza adaptativa dos barorreceptores, é pouco provável que após 7 dias de término de estímulo (tratamento com ferro dextran) o componente taquicárdico do barorreflexo ainda permaneça hiper-ativo. Não desconsideramos a possibilidade de uma adaptação da alça de feedback para trabalhar em 50 % de sua capacidade combinada com alterações da modulação neurovegetativa sobre o tônus vascular e a própria falência cardíaca induzida pelo ferro. Sugerimos portanto, que a resultante de todos os efeitos que ferro e radicais livres, combinados ou não, produzem sobre o sistema cardiovascular coloque em primeiro plano a falência cardíaca como problema principal a ser resolvido e que portanto levaria a um aumento do ganho barorreflexo para tentar compensar a perda de sincronismo entre componentes periféricos e o coração como bomba na regulação da PA.

No que tange ao reflexo Bezold-Jarisch, diferenças foram observadas nas bradicardias reflexas, mas não nas hipotensões de animais tratados com ferro dextran no protocolo *Direto*. Já nos animais tratados com ferro dextran no protocolo *Indireto*, observamos uma modificação mais profunda da atividade deste reflexo com atenuação tanto das bradicardias quanto das hipotensões reflexas. Trabalhos anteriores (Chianca, Jr. & Machado, 1996) já demonstraram estar a hipotensão intimamente relacionada à bradicardia. O que nos chama a atenção é o fato desta hipotensão não acompanhar as diferenças nas bradicardias reflexas quando das injeções de fenilbiguanida sugerindo uma dissociação parcial destes dois componentes. O fato de o barorreflexo, e talvez até o quimiorreflexo, estar alterado, apresentando um ganho aumentado, pode ter

contribuído para esta possível dissociação pois a hipotensão desencadeada pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch pode ter estimulado o barorreflexo que por estar mais responsivo, a refreou. O componente simpatoinibitório do barorreflexo utiliza, em áreas bulbares, vias neuronais semelhantes às do reflexo Bezold-Jarisch (Verberne & Guyenet, 1992). Além disso, uma interação funcional entre estes dois reflexos é sugerida, sendo o efeito Bezold-Jarisch afetado pela entrada prevalente dos barorreceptores arteriais e uma atenuação do barorreflexo observada durante a ativação do reflexo Bezold-Jarisch (Chen, 1979). Esta relação dinâmica entre estes dois reflexos pode estar preservada nos animais tratados com ferro dextran sendo que o aumento da sensibilidade barorreflexa possa estar relacionado centralmente com a redução da resposividade do reflexo Bezold-Jarisch.

A atenuação do reflexo Bezold-Jarisch parece, em um primeiro momento, um dado inusitado pois em trabalhos anteriores foi demonstrado que a atividade de terminações quimiossensitivas de fibras C aferentes (aferências do reflexo Bezold-Jarisch) em animais normotensos era aumentada em 498% quando era aplicado peróxido de hidrogênio topicamente na superfície da câmara cardíaca (Ustinova & Schultz, 1994a). Diante da possibilidade de a suplementação com ferro induzir um aumento na geração de radicais livres, sugerimos que apesar do aumento expressivo da atividade de um componente desta via reflexa a resposta total mostrou-se atenuada. Esta atenuação poderia ser fruto de uma redução do tráfico cardiovagal eferente resultando em uma atenuação do efeito Bezold-Jarisch. Se considerarmos os trabalhos de Schultz e Ustinova, esta parece ser uma idéia consistente, pois a causa da atenuação do reflexo Bezold-Jarisch seria repassada para vias eferentes ou mesmo para o processamento central. Sob o ponto de vista de ajustes compensatórios da atividade nervosa sobre o sistema cardiovascular, é aceitável crer que num quadro de falência cardíaca (induzida pelo ferro no caso) ao mesmo tempo em que o barorreflexo aumenta sua sensibilidade, reflexos cardioinibitórios como o reflexo Bezold-Jarisch seriam inibidos com o intuito de reduzir a atividade inibitória sobre um coração com débito cardíaco prejudicado. Ao mesmo tempo em que justificaria uma atenuação na bradicardia reflexa (mais não das hipotensões) de animais do protocolo *Direto* inicialmente, isto também justifica uma atenuação das hipotensões decorrente das bradicardias reflexas nos animais do

protocolo *Indireto*, num momento mais tardio, com um grau de falência cardíaca possivelmente maior (ver *figura 16*)

Embora os resultados de dosagem de ferro circulante e ferro nos tecidos tenham demonstrado que o tratamento com ferro dextran fora eficiente em induzir uma sobrecarga de ferro fez-se necessário uma averiguação da participação funcional do ferro nas alterações fisiológicas observadas. Portanto, experimentos conduzidos com animais suplementados com ferro no protocolo *Indireto* e sob efeito de deferoxamina foram conduzidos com o intuito de se fazer uma triagem de possíveis mecanismos envolvidos nestas modificações. Os resultados obtidos nos forneceram dados contundentes de uma participação do ferro a curto prazo nas alterações reflexas observadas tanto no barorreflexo quanto no reflexo Bezold-Jarisch. Trinta minutos após o início da infusão de deferoxamina já era possível observar um retorno do ganho barorreflexo para valores semelhantes ao controle assim como da hipotensão reflexa decorrente da ativação do reflexo Bezold-Jarisch. Considerando que o principal efeito do tratamento com deferoxamina é a supressão imediata da formação de radicais livres (Ustinova & Schultz, 1994a), supões que, pelo menos em parte, estas alterações se devam a uma maior geração de radicais livres nos animais tratados com ferro com possíveis alterações no equilíbrio dinâmico e estabilidade de membranas excitáveis (Emerit e cols., 2001), principalmente no diz respeito ao cálcio. Contudo, o tratamento com deferoxamina teria pouco ou nenhum efeito imediato sobre proteínas funcionais afetada permanentemente por radicais livres de forma que somente após seu “turnover” normal poder-se-ia observar uma mudança no padrão funcional do sistema cardiovascular em animais suplementados com ferro e após tratamento com deferoxamina. Com isto, sugerimos que o fato de a DFO quelar o ferro possa estar, pelo menos em parte, revertendo os efeitos do tratamento com ferro dextran sobre o barorreflexo o que faz deste um interessante modelo para estudos de falência cardíaca com a possibilidade de revertê-la sob determinadas condições

Muito embora outros trabalhos já demonstraram um efeito direto do ferro sobre algumas proteínas chave no funcionamento do coração como as Ca^{++} -ATPase que são inativadas mesmo por traços de ferro (Moreau e cols., 1998) os efeitos indiretos, como a geração de radicais livres, ainda assumem papel central em vários estudos.

Independentemente dos mecanismos moleculares envolvidos, vários elementos, da esfera molecular à sistêmica, são afetados funcionalmente ou quantitativamente chegando alguns a perecerem frente ao acúmulo de ferro. Cita-se como exemplo canais de potássio acoplados a receptores colinérgicos (Jeglitsch e cols., 1999) além de outras envolvidas no controle cardiovascular como a óxido nítrico sintase (Chen e cols., 2001). Além disso, trabalhos recentes vêm demonstrando uma ação incisiva de radicais livres sobre componentes dos reflexos cardiopulmonares em condições patológicas como na isquemia e reperfusão (Ustinova & Schultz, 1994b) e do barorreflexo em condições patológicas como a aterosclerose (Li e cols., 1996). Particularmente em relação a este último, seus achados destoam dos obtidos por nós sob a ótica do stress oxidativo. O autor aborda o envolvimento do stress oxidativo como possível mecanismo para a redução significativa do ganho barorreflexo que observou. Nossos resultados mostram um aumento do ganho barorreflexo quando no tratamento com ferro dextran sendo que atribuímos a este fenômeno um aumento na geração de radicais livres decorrente da suplementação com ferro conforme descrito por outros autores (Burkitt & Mason, 1991; Lesnefsky, 1994; Bartfay & Bartfay, 2000; Emerit e cols., 2001).

Grande parte dos resultados experimentais relativos ao sistema cardiovascular, em especial o coração, é obtido de ensaios *in vitro* sendo os parâmetros avaliados em um intervalo de tempo pequeno, seguido de uma manobra que altere o equilíbrio na geração/degradação de radicais livres como, por exemplo, a aplicação de peróxido de hidrogênio. No contexto celular, sabe-se que o encontro de moléculas de peróxido de hidrogênio ou superóxido com íons ferrosos propiciado por um desequilíbrio entre estes dois elementos é um evento que permite a formação de radicais livres. Todavia, na esfera temporal a seqüência de eventos, sua duração e sua continuidade ou intermitência podem determinar a extensão e repercussões no sistema cardiovascular de forma que os mecanismos de “turnover” celular e as eventuais adaptações dos diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos que são acionados numa condição de acúmulo de ferro não sejam suficientes para conter os danos provocados pelo stress oxidativo.

Em conjunto, estes achados apontam para uma ação efetiva do ferro, direta ou indiretamente, sobre o sistema cardiovascular de forma que mudanças nos padrões de regulação a curto prazo da PA foram alterados sem uma modificação dos níveis basais

de PAM. É bastante provável que estas alterações nos reflexos cardiovasculares tenham tido um papel fundamental na manutenção da pressão em seus níveis normais muito embora os resultados estejam aquém de nossos anseios de esclarecer os reais motivos que levaram a estas alterações. Contudo sugerimos ser a sobrecarga de ferro uma possível causa para um quadro de insuficiência cardíaca que, por conseguinte seria uma causa para as alterações reflexas observadas relegando outros efeitos do stress oxidativo e/ou do ferro diretamente sobre os reflexos a segundo plano.

Outra questão acerca deste modelo é o nível de suplementação de ferro e o quanto ele deve ser para que co-morbidades não tenham efeito mais incisivo que os cardiovasculares deixando-os em segundo plano. Achados experimentais demonstram uma relação dose-dependente entre suplementação com ferro e geração de radicais livres (Lucesoli e cols., 1999). Vários outros trabalhos utilizam doses relativamente altas quando comparadas às doses que utilizamos nestes estudos. Em nosso trabalho observamos modificações mais profundas na regulação neurovegetativa cardiovascular quando de uma diminuição da dose de ferro dextran subsequente a um período de 7 dias após o tratamento para a realização dos ensaios. Estes resultados indicam que mesmo diante de um nível de suplementação menor, o fator tempo de exposição parece ter uma grande importância neste processo subjugando, inclusive, o fator dose nestes ensaios, provavelmente pelas características farmacocinéticas do ferro dextran. Portanto, ainda não são claros que níveis de ferro nos estoques ou de ferro circulante são limítrofes para o aparecimento de mudanças nos padrões do sistema cardiovascular e tão pouco se estes efeitos são distintos frente a diferentes doses.

Em suma, acreditamos que embora ainda estejamos longe de uma compreensão mais profunda de como os mecanismos reflexos de controle da PA se comportam frente a um acúmulo de ferro, demos um passo no sentido de obter maiores esclarecimentos acerca destes processos.

6. Bibliografia

- ALDOURI M.A., WONKE B., HOFFBRAND A.V., FLYNN D.M., WARD S.E., AGNEW J.E. & HILSON A.J. (1990) High incidence of cardiomyopathy in beta-thalassaemia patients receiving regular transfusion and iron chelation: reversal by intensified chelation. *Acta Haematol.* **84**, 113-117.
- ANNING P.B., CHEN Y., LAMB N.J., MUMBY S., QUINLAN G.J., EVANS T.W. & GUTTERIDGE J.M. (1999) Iron overload upregulates haem oxygenase 1 in the lung more rapidly than in other tissues. *FEBS Lett.* **447**, 111-114.
- ANTOINE D., BRAUN P., CERVONI P., SCHWARTZ P. & LAMY P. (1979) Le cancer bronchique des mineurs de fer de Lorraine peut-il etre considere comme une maladie professionnelle? *Revue Française aladie Respiratoire* **7**, 63-65.
- AROSIO P. & LEVI S. (2002) Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage(1,2). *Free Radical Biology & Medicine* **33**, 457
- ASIMAKIS G.K., INNERS K.F. & ETHRIDGE R.T. (1997) Role of low molecular weight iron in functional preconditioning of the isolated rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* **29**, 1087-1096.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1980) *Official methods of analysis*. Whashington, DC: AOAC. pp. 0-492.
- AVIADO D.M. & GUEVARA A.D. (2001) The Bezold-Jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonary reflexes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **940**, 48-58.
- BARBER W.H. (1988) Fetal Hemoglobin and Erythropoietin. *New England journal of Medicine* **318**, 449
- BARTFAY WJ, DAWOOD F, WEN WH, LEHOTAY DC, HOU D, BARTFAY E, LUO X, BACKX PH & LIUPP (1999) Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovascular Research* **43**, 892-900.
- BARTFAY W.J. & BARTFAY E. (2000) Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. *Biological Research for Nursing* **2**, 49-59.
- BARTFAY W.J., DAWOOD F., WEN W.H., LEHOTAY D.C., HOU D., BARTFAY E., LUO X., BACKX P.H. & LIU P.P. (1999) Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovascular Research* **43**, 892-900.
- BATIST G., NORTON J., KATKI A.G., WAGMAN L., FERRANS V.J., MAHER M. & MYERS C.E. (1985) Cardiac and red blood cell glutathione peroxidase:

- results of a prospective randomized trial in patients on total parenteral nutrition. *Cancer Res.* **45**, 5900-5903.
- BEARD J. (2002) Dietary iron intakes and elevated iron stores in the elderly: is it time to abandon the set-point hypothesis of regulation of iron absorption? *Am.J.Clin.Nutr.* **76**, 1189-1190.
- BERGER T.M., POLIDORI M.C., DABBAGH A., EVANS P.J., HALLIWELL B., MORROW J.D., ROBERTS L.J. & FREI B. (1997) Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J.Biol.Chem.* **272**, 15656-15660.
- BERNSTEIN S.E. (1987) Hereditary hypotransferrinemia with hemosiderosis, a murine disorder resembling human atransferrinemia. *J.Lab Clin.Med.* **110**, 690-705.
- BERS D.M. (2002) Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ.Res.* **90**, 14-17.
- BRITTENHAM G.M. (1994) New advances in iron metabolism, iron deficiency, and iron overload. *Curr.Opin.Hematol.* **1**, 101-106.
- BRUCE E.MALEY. (1994) Immunocytochemical Localization of Neurochemical Synaptic Circuits of the Nucleus Tractus Solitarii at the Light Microscopic and Ultrastructural Levels. In *Nucleus of the Solitarii Tract.* Ed C.P.Boca Raton. Robin A.Barraco. pp. 63-73.
- BURGER F.J. & HOGWIND Z.A. (1974) Changes in trace elements in kwashiorkor. *S.Afr.Med.J.* **48**, 502-504.
- BURKITT M.J. & MASON R.P. (1991) Direct evidence for in vivo hydroxyl-radical generation in experimental iron overload: an ESR spin-trapping investigation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 8440-8444.
- BURLANDO B., PANFOLI I., VIARENGO A. & MARCHI B. (2001) Free radical-dependent Ca²⁺ signaling: role of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Antioxidants & Redox Signalling* **3**, 525-530.
- CHAPMAN R.W., MORGAN M.Y., LAULICHT M., HOFFBRAND A.V. & SHERLOCK S. (1982) Hepatic iron stores and markers of iron overload in alcoholics and patients with idiopathic hemochromatosis. *Dig.Dis.Sci.* **27**, 909-916.
- CHEN H.I. (1979) Interaction between the baroreceptor and Bezold-Jarisch reflexes. *Am.J.Physiol* **237**, H655-H661
- CHEN K., SUH J., CARR A.C., MORROW J.D., ZEIND J. & FREI B. (2000) Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *American Journal of Physiology.Endocrinology and Metabolism* **279**, E1406-E1412

- CHEN L., WANG Y., KAIRAITIS L.K., WANG Y., ZHANG B.H. & HARRIS D.C. (2001) Molecular mechanisms by which iron induces nitric oxide synthesis in cultured proximal tubule cells. *Exp.Nephrol.* **9**, 198-204.
- CHIANCA D.A., Jr. & MACHADO B.H. (1996) Microinjection of NMDA antagonist into the NTS of conscious rats blocks the Bezold-Jarisch reflex. *Brain Res.* **718**, 185-188.
- CHIUEH C.C. (2001) Iron overload, oxidative stress, and axonal dystrophy in brain disorders. *Pediatric Neurology* **25**, 138-147.
- CHOI J.H., KIM D.W. & YU B. (1998) Modulation of age-related alterations of iron, ferritin, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *J.Nutr.Health Aging* **2**, 133-137.
- CHOI J.H. & YU B.P. (1994) Modulation of Age-Related Alterations of Iron, Ferritin, and Lipid-Peroxidation in Rat Serum. *Age* **17**, 93-97.
- COLERIDGE H.M., COLERIDGE J.C.G. & KIDD C. (1964) Cardiac receptors in the dog with particular reference to two types of afferent ending in the ventricular wall. *Journal of Physiology (London)* **174**, 323-339.
- COLOMBARI E., SATO M.A., CRAVO S.L., BERGAMASCHI C.T., CAMPOS R.R., Jr. & LOPES O.U. (2001) Role of the medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* **38**, 549-554.
- CONRAD M.E. & BARTON J.C. (1981) Factors affecting iron balance. *Am.J.Hematol.* **10**, 199-225.
- CORTI M.C., GAZIANO M. & HENNEKENS C.H. (1997) Iron status and risk of cardiovascular disease. *Ann.Epidemiol.* **7**, 62-68.
- CRAWFORD R.D. (1995) Proposed role for a combination of citric acid and ascorbic acid in the production of dietary iron overload: a fundamental cause of disease. *Biochem.Mol.Med.* **54**, 1-11.
- CROSBY W.H. (1978) The safety of iron-fortified food. *JAMA* **239**, 2026-2027.
- CURTIS D.KLAASSEN (2002) Metais Pesados e Antagonistas de Metais Pesados. In *As Bases Farmacológicas da Terapêutica - Goodman e Gilman*. 10th Ed. Eds Joel G.Hrdman & Lee E.Limbird. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. pp. 1871-1872.
- DAVIES L.C., FRANCIS D.P., PONIKOWSKI P., PIEPOLI M.F. & COATS A.J. (2001) Relation of heart rate and blood pressure turbulence following premature ventricular complexes to baroreflex sensitivity in chronic congestive heart failure. *Am.J.Cardiol.* **87**, 737-742.

- DEVLIN T.M. (1998) Metabolismo do Heme e do Ferro. In *Manual de Bioquímica e Correlações Clínicas*. Ed Eds Awaed. W.M. pp. 838-855.
- DOBRIAN A.D., SCHRIVER S.D. & PREWITT R.L. (2001) Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* **38**, 361-366.
- DREYFUS J.R. (1936) Lungencarcinom bei Geschwistern nach inhalation von eisenoxydhaltigem staub der jugend. *Zeitschrift für Klinsche Medizin* **130**, 256-260.
- EMERIT J., BEAUMONT C. & TRIVIN F. (2001) Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedecine & Pharmacotherapy* **55**, 333-339.
- FERRINGTON D.A., KRAINEV A.G. & BIGELOW D.J. (1998) Altered turnover of calcium regulatory proteins of the sarcoplasmic reticulum in aged skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* **273**, 5885-5891.
- FRASSINELLI-GUNDERSON E.P., MARGEN S. & BROWN J.R. (1985) Iron stores in users of oral contraceptive agents. *Am.J.Clin.Nutr.* **41**, 703-712.
- GORDEUK V.R., BRITTENHAM G.M., MCLAREN G.D. & SPAGNUOLO P.J. (1986) Hyperferremia in immunosuppressed patients with acute nonlymphocytic leukemia and the risk of infection. *J.Lab Clin.Med.* **108**, 466-472.
- GRADY J.K., CHEN Y., CHASTEEN N.D. & HARRIS D.C. (1989) Hydroxyl radical production during oxidative deposition of iron in ferritin. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 20224-20229.
- GROVER A.K. & SAMSON S.E. (1988) Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am.J.Physiol* **255**, C297-C303
- HALLIDAY J.W. & POWELL L.W. (1982) Iron overload. *Semin.Hematol.* **19**, 42-53.
- HERSHKO C. (1977) Storage iron regulation. *Prog.Hematol.* **10**, 105-148.
- HERSHKO C. (1988) Oral iron chelating drugs: coming but not yet ready for clinical use. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* **296**, 1081-1082.
- HILL J.M. (1985) Iron concentration reduced in ventral pallidum, globus pallidus, and substantia nigra by GABA-transaminase inhibitor, gamma-vinyl GABA. *Brain Res.* **342**, 18-25.
- HOLBEIN B.E. (1980) Iron-controlled infection with Neisseria meningitidis in mice. *Infect.Immun.* **29**, 886-891.

- HUANG X., DAI J., FOURNIER J., ALI A.M., ZHANG Q. & FRENKEL K. (2002) Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radic.Biol.Med.* **32**, 84-92.
- IRVING M.G., HALLIDAY J.W. & POWELL L.W. (1988) Association between alcoholism and increased hepatic iron stores. *Alcohol Clin.Exp.Res.* **12**, 7-13.
- JEGLITSCH G., RAMOS P., ENCABO A., TRITTHART H.A., ESTERBAUER H., GROSCHNER K. & SCHREIBMAYER W. (1999) The cardiac acetylcholine-activated, inwardly rectifying K⁺-channel subunit GIRK1 gives rise to an inward current induced by free oxygen radicals. *Free Radic.Biol.Med.* **26**, 253-259.
- KAHLER J., EWERT A., WECKMULLER J., STOBBE S., MITTMANN C., KOSTER R., PAUL M., MEINERTZ T. & MUNZEL T. (2001) Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **38**, 49-57.
- LACHILI B., HININGER I., FAURE H., ARNAUD J., RICHARD M.J., FAVIER A. & ROUSSEL A.M. (2001) Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biological Trace Element Research* **83**, 103-110.
- LESNEFSKY E.J. (1994) Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. *Adv.Exp.Med.Biol.* **366**, 129-146.
- LI A., SEGUI J., HEINEMANN S.H. & HOSHI T. (1998) Oxidation regulates cloned neuronal voltage-dependent Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J.Neurosci.* **18**, 6740-6747.
- LI Z., MAO H.Z., ABBOUD F.M. & CHAPLEAU M.W. (1996) Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circulation Research* **79**, 802-811.
- LIEU P.T., HEISKALA M., PETERSON P.A. & YANG Y. (2001) The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* **22**, 1-87.
- LINK G., PINSON A., KAHANE I. & HERSHKO C. (1989) Iron loading modifies the fatty acid composition of cultured rat myocardial cells and liposomal vesicles: effect of ascorbate and alpha-tocopherol on myocardial lipid peroxidation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **114**, 243-249.
- LIU P., HENKELMAN M., JOSHI J., HARDY P., BUTANY J., IWANOCHKO M., CLAUBERG M., DHAR M., MAI D., WAIEN S. & OLIVIERI N. (1996) Quantification of cardiac and tissue iron by nuclear magnetic resonance relaxometry in a novel murine thalassemia-cardiac iron overload model. *Can.J.Cardiol.* **12**, 155-164.

- LIU P. & OLIVIERI N. (1994) Iron overload cardiomyopathies: new insights into an old disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **8**, 101-110.
- LOMBARD M., BOMFORD A., HYNES M., NAOUMOV N.V., ROBERTS S., CROWE J. & WILLIAMS R. (1989) Regulation of the hepatic transferrin receptor in hereditary hemochromatosis. *Hepatology* **9**, 1-5.
- LUCESOLI F., CALIGIURI M., ROBERTI M.F., PERAZZO J.C. & FRAGA C.G. (1999) Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 37-43.
- LYNCH S.R. & COOK J.D. (1980) Interaction of vitamin C and iron. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **355**, 32-44.
- MANGIN L., MONTI A., MEDIGUE C., MACQUIN-MAVIER I., LOPES M., GUERET P., CASTAIGNE A., SWYNGHEDAUW B. & MANSIER P. (2001) Altered baroreflex gain during voluntary breathing in chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **3**, 189-195.
- MCGOWAN S.E. & HENLEY S.A. (1988) Iron and ferritin contents and distribution in human alveolar macrophages. *J. Lab. Clin. Med.* **111**, 611-617.
- MCKIE A.T., MARCIANI P., ROLFS A., BRENNAN K., WEHR K., BARROW D., MIRET S., BOMFORD A., PETERS T.J., FARZANEH F., HEDIGER M.A., HENTZE M.W. & SIMPSON R.J. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* **5**, 299-309.
- MCLAREN G.D., MUIR W.A. & KELLERMEYER R.W. (1983) Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **19**, 205-266.
- MEYRELLES S.S., MILL J.G., CABRAL A.M. & VASQUEZ E.C. (1996) Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* **60**, 163-168.
- MILDER M.S., COOK J.D., STRAY S. & FINCH C.A. (1980) Idiopathic hemochromatosis, an interim report. *Medicine (Baltimore)* **59**, 34-49.
- MOREAU V.H., CASTILHO R.F., FERREIRA S.T. & CARVALHO-ALVES P.C. (1998) Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase at submicromolar iron concentrations: evidence for metal-catalyzed oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 554-560.
- MORRIS E.R. (1983) An overview of current information on bioavailability of dietary iron to humans. *Fed. Proc.* **42**, 1716-1720.

- MOSSEY R.T. & SONDEHEIMER J. (1985) Listeriosis in patients with long-term hemodialysis and transfusional iron overload. *Am.J.Med.* **79**, 397-400.
- MURPHY B.F. (1974) Editorial: Hazards of children's vitamin preparations containing iron. *JAMA* **229**, 324
- NICOL S., RAHMAN D. & BAINES A.J. (1997) Ca²⁺-dependent interaction with calmodulin is conserved in the synapsin family: identification of a high-affinity site. *Biochemistry* **36**, 11487-11495.
- NIENHUIS A.W. (1981) Vitamin C and iron. *N.Engl.J.Med.* **304**, 170-171.
- O'CONNELL M., HALLIWELL B., MOORHOUSE C.P., ARUOMA O.I., BAUM H. & PETERS T.J. (1986) Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. Is haemosiderin formation a biological protective mechanism? *The Biochemical Journal* **234**, 727-731.
- OLFERT E.D., CROSS B.M. & MCWILLIAM A.A. (1993) *Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use o Experimental Animals*. Ottawa, Ontario: Bradda Printing Services.
- OLSSON K.S., HEEDMAN P.A. & STAUGARD F. (1978) Preclinical hemochromatosis in a population on a high-iron-fortified diet. *JAMA* **239**, 1999-2000.
- OUBIDAR M., MARIE C., MOSSIAT C. & BRALET J. (1996) Effects of increasing intracellular reactive iron level on cardiac function and oxidative injury in the isolated rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* **28**, 1769-1776.
- OZAKI M., KAWABATA T. & AWAI M. (1988) Iron release from haemosiderin and production of iron-catalysed hydroxyl radicals in vitro. *The Biochemical Journal* **250**, 589-595.
- POGAN L., GARNEAU L., BISSONNETTE P., WU L. & SAUVE R. (2001) Abnormal Ca²⁺ signalling in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats: role of free radicals. *Journal of Hypertension* **19**, 721-730.
- POWELL L.A. & HALLIDAY J.W. (1981) Iron absorption and iron overload. *Clin.Gastroenterol.* **10**, 707-735.
- RATHAUS M. & BERNHEIM J. (2002) Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association* **17**, 216-221.
- ROSTAGNO C., GALANTI G., FELICI M., MACCHERINI M., SANI G., CACIOLLI S. & GENSINI G.F. (2000) Prognostic value of baroreflex sensitivity assessed

by phase IV of Valsalva manoeuvre in patients with mild-to-moderate heart failure. *Eur.J.Heart Fail.* **2**, 41-45.

SACK S., AURICCHIO A., BAUMANN L., KADHIRESAN V., MAARSE A., POCHET T. & KRAMER A. (2000) Baseline baroreflex sensitivity can identify heart failure patients who can benefit from ventricular resynchronization therapy. *European Journal of Heart Failure* **2**, 13

SCHAFER A.I., CHERON R.G., DLUHY R., COOPER B., GLEASON R.E., SOELDNER J.S. & BUNN H.F. (1981) Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N.Engl.J.Med.* **304**, 319-324.

SETHI V.S., SHIHABI Z. & SPURR C.L. (1984) Increase of serum iron concentrations in rhesus monkeys and humans on administration of vincristine, vinblastine, or vindesine. *Cancer Treat.Rep.* **68**, 933-936.

SRIGIRIDHAR K. & NAIR K.M. (1998) Iron-deficient intestine is more susceptible to peroxidative damage during iron supplementation in rats. *Free Radic.Biol.Med.* **25**, 660-665.

STAHL G.L., PAN H.L. & LONGHURST J.C. (1993) Activation of ischemia- and reperfusion-sensitive abdominal visceral C fiber afferents. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. *Circ.Res.* **72**, 1266-1275.

STOCLET JC, MULLER B, GYORGY K, ANDRIANTSIOTHAINA R & KLESCHYOV AL (1999) The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *European Journal of Pharmacology* **375**, 139-155.

SULLIVAN J.L. (1981) Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* **1**, 1293-1294.

SULLIVAN J.L. (1983) Vegetarianism, ischemic heart disease, and iron. *Am.J.Clin.Nutr.* **37**, 882-883.

SUZUKI K., TWARDOWSKI Z.J., NOLPH K.D., KHANNA R. & MOORE H.L. (1995) Absorption of iron dextran from the peritoneal cavity of rats. *Advances in Peritoneal Dialysis.Conference on Peritoneal Dialysis* **11**, 57-59.

SVED A.F. & GORDON F.J. (1994) Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. *News in Physiological Sciences* **9**, 243-246.

THOMPSON G.W., HORACKOVA M. & ARMOUR J.A. (1998) Sensitivity of canine intrinsic cardiac neurons to H₂O₂ and hydroxyl radical. *Am.J.Physiol* **275**, H1434-H1440

THOMPSON K.J., SHOHAM S. & CONNOR J.R. (2001) Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res.Bull.* **55**, 155-164.

- THOREN P. (1972) Left ventricular receptors activated by severe asphyxia and by coronary artery occlusion. *Acta Physiol Scand.* **85**, 455-463.
- THOREN P. (1979) Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **86**, 1-94.
- THOREN P.N. (1976) Activation of left ventricular receptors with nonmedullated vagal afferent fibers during occlusion of a coronary artery in the cat. *Am.J.Cardiol.* **37**, 1046-1051.
- TURBINO-RIBEIRO S.M., SILVA M.E., CHIANCA D.A., Jr., DE PAULA H., CARDOSO L.M., COLOMBARI E. & PEDROSA M.L. (2003) Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J.Nutr.* **133**, 15-20.
- TURVER C.J. & BROWN R.C. (1987) The role of catalytic iron in asbestos induced lipid peroxidation and DNA-strand breakage in C3H10T1/2 cells. *Br.J.Cancer* **56**, 133-136.
- USTINOVA E.E. & SCHULTZ H.D. (1994a) Activation of cardiac vagal afferents by oxygen-derived free radicals in rats. *Circulation Research* **74**, 895-903.
- USTINOVA E.E. & SCHULTZ H.D. (1994b) Activation of cardiac vagal afferents in ischemia and reperfusion. Prostaglandins versus oxygen-derived free radicals. *Circulation Research* **74**, 904-911.
- VERBERNE A.J. & GUYENET P.G. (1992) Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. *Am.J.Physiol* **263**, R1195-R1202
- VOOGD A., SLUITER W., VAN EIJK H.G. & KOSTER J.F. (1992) Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *J.Clin.Invest* **90**, 2050-2055.
- WANG W., HAN H.Y. & ZUCKER I.H. (1996) Depressed baroreflex in heart failure is not due to structural change in carotid sinus nerve fibers. *Journal of the Autonomic Nervous System* **57**, 101-108.
- WEINBERG E.D. (1984) Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev.* **64**, 65-102.
- WEINBERG E.D. (1987) Pregnancy-associated immune suppression: risks and mechanisms. *Microb.Pathog.* **3**, 393-397.
- WEINBERG E.D. (1990) Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev.* **22**, 531-579.

- WEITZMAN S.A. & GRACEFFA P. (1984) Asbestos catalyzes hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide. *Arch.Biochem.Biophys.* **228**, 373-376.
- WINEGAR B.D., KELLY R. & LANSMAN J.B. (1991) Block of current through single calcium channels by Fe, Co, and Ni. Location of the transition metal binding site in the pore. *The Journal of General Physiology* **97**, 351-367.
- YIP R. & DALLMAN P.R. (1996) Iron. Present Knowledge Nutrition. In 7 th Ed. Anonymouspp. 277-291.
- ZHOU X.J., LASZIK Z., WANG X.Q., SILVA F.G. & VAZIRI N.D. (2000) Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. *Lab Invest* **80**, 1905-1914.

Apêndice

Tabela 2 - Composição da ração comercial NUVILAB CRI®

Composição básica	
Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos.	
Níveis de garantia	
Umidade (máx.)	12,50%
Proteína bruta (mín.)	22,00%
Extrato etéreo (mín.)	4,00%
Material mineral (máx.)	10,00%
Matéria fibrosa (máx.)	8,00%
Cálcio (máx.)	1,40%
Fósforo (mín.)	0,80%
Suplementação por quilo (não menos que)	
VITAMINAS	
Vitamina A	12.000 UI
Vitamina D ₃	1.800 UI
Vitamina E	30,00 mg
Vitamina K ₃	3,00 mg
Vitamina B ₁	5,00 mg
Vitamina B ₂	6,00 mg
Vitamina B ₆	7,00 mg
Vitamina B ₁₂	20,00 µg
Niacina	60,00 mg
Ácido pantotênico	20,00 mg
Ácido fólico	1,00 mg
Biotina	0,05 mg
Colina	600,00 mg
MICROELEMENTOS MINERAIS	
Ferro	50,00 mg
Zinco	60,00 mg
Cobre	10,00 mg
Iodo	2,00 mg
Manganês	60,00 mg
Selênio	0,05 mg
Cobalto	1,50 mg
AMINOÁCIDOS	
DL-Metionina	300,00 mg
Lisina	100,00 mg
ADITIVOS	
Antioxidante	100,00 mg

Tabela 3 - Ferro circulante, ferro no fígado e ferro no baço de animais sham e tratados com ferro dextran. O conteúdo de ferro nos tecidos é expresso como μmol de ferro elementar por grama de tecido.

<i>Parâmetro</i>	<i>Sham (n=8)</i>	<i>Tratados com ferro dextran</i>	
		<i>Protocolo Indireto (n=8)</i>	<i>Protocolo Direto (n=8)</i>
Ferro circulante ($\mu\text{mol/L}$)	36 ± 2	65 ± 4^a	$1032 \pm 210^{a,b}$
Ferro no fígado ($\mu\text{mol/g}$)	6 ± 1	19 ± 1^a	11 ± 1^a
Ferro no baço ($\mu\text{mol/g}$)	42 ± 2	61 ± 2^a	40 ± 4

^a diferenças significativas entre os grupos sham e tratado com ferro dextran

^b diferenças significativas entre os animais dos protocolos *Direto* e *Indireto*

Tabela 4 – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais em animais sham e tratados com ferro dextran. Os dados correspondem à média de uma período de registro contínuo de 10 a 20 minutos, precedentes à qualquer manobra farmacológica.

	<i>Protocolo Indireto (n=24)</i>				<i>Protocolo Direto (n=24)</i>			
	<i>PAM</i>		<i>FC</i>		<i>PAM</i>		<i>FC</i>	
	<i>Sham</i>	<i>Tratado</i>	<i>Sham</i>	<i>Tratado</i>	<i>Sham</i>	<i>Tratado</i>	<i>Sham</i>	<i>Tratado</i>
103	112	353	321	116	125	408	323	
117	108	359	328	135	120	376	347	
111	123	367	323	124	118	318	349	
105	109	359	330	103	127	349	356	
102	121	372	318	120	90	372	305	
116	112	380	358	110	121	383	358	
116	111	376	341	120	96	375	327	
117	108	372	331	120	129	390	348	
124	112	389	352	108	122	379	342	
120	126	399	339	132	110	385	337	
105	112	377	344	114	114	370	310	
116	115	356	347	128	114	382	336	
122	116	397	421	105	113	366	361	
131	118	378	422	111	108	333	333	
126	113	351	370	116	110	364	326	
121	116	397	392	115	119	389	354	
107	135	359	428	101	105	357	327	
129	105	385	365	123	124	337	364	
125	117	391	347	122	108	342	344	
125	126	394	367	111	118	352	337	
117	108	337	338	133	106	352	346	
125	79	410	303	120	118	399	366	
123	122	350	369	105	115	377	369	
116	115	419	394	116	108	356	377	
$\bar{x} \pm Er Pd$	117 ± 2	114 ± 2	376 ± 5	356 ± 7*	117 ± 2	114 ± 2	366 ± 5	343 ± 4*
P (Teste t)	0,22272		0,01848		0,29204		0,00014	

* diferença significativa quando comparado com o sham; p < 0,05 (teste t de Student).

Tabela 5 – Variabilidade no domínio do tempo da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) de animais sham e tratados com ferro dextran. Os dados correspondem ao desvio padrão da média de intervalos de 10 a 20 minutos de registro contínuo precedentes à qualquer manobra farmacológica.

	FC		PAM		FC		PAM	
	Sham	Prot. Direto	Sham	Prot. Direto	Sham	Prot. Indireto	Sham	Prot. Indireto
	12	12	5	3	34	13	5	5
	33	18	6	5	23	14	4	3
	22	12	5	4	25	10	4	4
	17	8	3	3	24	15	5	3
	7	5	3	3	14	13	3	4
	21	16	4	5	18	12	5	4
	26	20	6	4	25	24	4	4
	35	14	4	4	26	17	3	4
	34	12	5	4	34	9	4	3
	27	9	5	5	24	18	5	8
	26	18	5	5	13	12	3	4
	16	15	7	4	6	16	4	3
	16	15	5	3	29	9	4	4
	12	13	5	4	8	3	3	8
	18	10	4	4	13	16	4	5
	33	15	6	5	9	18	3	4
	18	12	7	4	8	13	3	4
	26	21	4	5	17	12	5	5
	13	21	4	5	16	11	4	3
	23	6	6	4	11	11	4	3
	13	13	4	3	14	12	3	5
	13	16	4	5	13	10	4	2
	24	11	4	4	24	11	4	3
	10	18	5	5	10		5	
$\bar{x} \pm Er Pd$	21±1,7	14±0,9*	5±0,2	4±0,2	18±1,7	13±0,9*	4±0,2	4±0,3
P (teste t)	0,0007		0,0179 ¹		0,0090		0,6107	

* diferença significativa quando comparado com o sham; p < 0,05 (teste t de Student).

¹ Apesar de este valor de P ser menor que 0,05, referência a partir da qual se considera diferença significativa ou não entre pares de médias, sua magnitude não foi considerada neste estudo por serem próximas as variabilidades de PAM entre estes dois grupos e, portanto, com significado fisiológico duvidoso.

Tabela 6 – Níveis de pressão de pulso em animais tratados com ferro dextran e sham. Cada valor corresponde à média da pressão de pulso em oito intervalos de 10 segundo ao longo do registro de cada animal.

	<i>Protocolo Indireto</i>		<i>Protocolo Direto</i>	
	<i>Sham (n=12)</i>	<i>Tratado (n=12)</i>	<i>Sham (n=12)</i>	<i>Tratado (n=12)</i>
	39	41	31	39
	40	40	39	36
	43	42	42	40
	42	39	43	36
	38	32	39	34
	40	37	35	34
	48	37	38	40
	43	41	38	37
	37	39	43	34
	41	38	41	34
	40	33	40	44
	38	35	38	38
$\bar{x} \pm Er Pd$	40 ± 1	38 ± 1*	39 ± 1	37 ± 1
P (teste t)	0,034255		0,185917	

* diferença significativa quando comparado com o sham; p < 0,05 (teste t de Student).

Tabela 7 – Parâmetros da barocurva na animais sham e tratados (Tratado) com ferro dextran nos protocolos Direto e Indireto.

Parâmetros	Protocolo Direto		Protocolo Indireto	
	Sham (n=12)	Tratado (n=12)	Sham (n=12)	Tratado (n=12)
Platô superior (bpm)	528 ± 27	473 ± 11	492 ± 11	469 ± 9
Platô inferior (bpm)	253 ± 10	254 ± 5	282 ± 5	274 ± 5
Intervalo de FC (bpm)	275 ± 27	218 ± 9	210 ± 13	196 ± 9
PAM ₅₀ (mmHg)	114 ± 4	117 ± 3	117 ± 1	111 ± 1*
Ganho (bpm/mmHg)	-4,91 ± 0,69	-4,34 ± 0,74	-5,03 ± 0,39	-7,93 ± 1,08*

* diferença estatística comparado como o grupo sham (p < 0,05, teste *t de Student*).

Tabela 8 – Valore médios de PAM e FC para as dez classes em que foram divididos os picos de PAM com seus respectivos picos de FC. Estes dados são representativos da dispersão das barocurvas para cada grupo. O Placebo corresponde aos picos de PAM e FC nas injeções placebo e em vermelho estão os valores de PAM e FC médios para o grupo considerando valores de intervalos de 10 segundos precedentes às estimulações do barorreflexo durante todo o experimento.

	Protocolo Direto				Protocolo Indireto			
	Sham (n=12)		Tratado (n=12)		Sham (n=12)		Tratado (n=12)	
	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC
Classe 1	82 ± 2	463 ± 12	83 ± 2	427 ± 7*	77 ± 2	462 ± 9	75 ± 2	445 ± 11
Classe 2	91 ± 1	483 ± 16	91 ± 0,4	444 ± 9	87 ± 1	480 ± 13	89 ± 1	470 ± 10
Classe 3	96 ± 1	436 ± 13	95 ± 0,4	436 ± 14	92 ± 0,3	488 ± 13	95 ± 1*	460 ± 9
Classe 4	102 ± 1	447 ± 8	99 ± 0,5*	416 ± 10*	98 ± 1	471 ± 8	100 ± 1*	435 ± 10*
Classe 5	113 ± 3	400 ± 16	109 ± 3	413 ± 16	112 ± 4	424 ± 20	109 ± 2	392 ± 21
PAM/FC	116 ± 2	361 ± 7	115 ± 1	352 ± 6	113 ± 2	374 ± 5	112 ± 3	351 ± 5*
Placebo	120 ± 2	347 ± 8	121 ± 3	345 ± 7	121 ± 2	370 ± 7	117 ± 3	345 ± 7
Classe 6	150 ± 2	309 ± 10	146 ± 2	304 ± 15	141 ± 3	324 ± 9	136 ± 1	294 ± 16
Classe 7	164 ± 1	278 ± 10	161 ± 2	257 ± 12	157 ± 1	294 ± 10	155 ± 2	271 ± 14
Classe 8	173 ± 1	260 ± 13	172 ± 1	238 ± 11	166 ± 1	256 ± 12	166 ± 1	263 ± 6
Classe 9	180 ± 1	274 ± 8	179 ± 1	247 ± 12	176 ± 1	292 ± 12	171 ± 1*	266 ± 8
Classe 10	185 ± 1	264 ± 12	190 ± 2	275 ± 10	184 ± 2	291 ± 12	183 ± 2	286 ± 6

* diferença estatística comparado como o grupo sham (p < 0,05, teste *t de Student*).

Tabela 9 – Bradicardias (ΔFC) e hipotensões (ΔPAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida em animais sham e do protocolo Direto (P. Direto).

Grupo	Veículo (PBS)		Fenilbiguanida							
	ΔFC	ΔPAM	0,625 $\mu g/Kg$		1,25 $\mu g/Kg$		2,5 $\mu g/Kg$		5,0 $\mu g/Kg$	
	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM
Sham	-40	11	-16,5	-4,5	-57,5	-7,5	-219,5	-19,5	-356	-72,5
Sham	-16	10	-23	-14	-139	-31	-178,5	-48	-267,5	-75,5
Sham	-9	20	-16,5	-1,5	-104	-25	-210,5	-45	-286	-94
Sham	-54	8	-50,5	-23,5	-88,5	-19	-165,5	-38	-289	-38,5
Sham	-11,5	9	-2,5	-12,5	-7	-13	-146	-18	-296	-57,5
Sham	-7,5	2,5	0	-9,5	-62,5	-13,5	-154,5	-29,5	-270,5	-50
Sham	-8,5	3	-5,5	-10	-87	-19	-171,5	-27	-250,5	-45,5
Sham	-12,5	1	-41	-13	-67,5	-17	-208	-19,5	-330,5	-61,5
Sham	-14,5	5,5	-15	-9	-13	-10,5	-215	-35	-328	-63,5
Sham	-22,5	11,5	-16,5	-7	-148,5	-23	-242,5	-42	-320	-74
Sham	-10,5	3	-30,5	-8,5	-33,5	-10	-184,5	-24	-339,5	-77
Sham	-19	7,5	-26	-28,5	-86,5	-29,5	-304	-59,5	-358,5	-90
$\bar{x} \pm Er Pd$	-19 \pm 4	8 \pm 2	-20 \pm 4	-12 \pm 2	-75 \pm 13	-18 \pm 2	-200 \pm 13	-34 \pm 4	-308 \pm 10	-67 \pm 5
P. Direto	-21	15	-17,5	-12	-20,5	-11,5	-183	-42,5	-280,5	-86,5
P. Direto	-21	6,5	-18	-11,5	-13,5	-12	-138,5	-22,5	-254,5	-47,5
P. Direto	-12,5	8,5	-12	-23	-9	-14	-173,5	-19,5	-304,5	-58,5
P. Direto	-19,5	8,5	-10	-20	-17,5	12,5	-120	-22,5	-329,5	-79,5
P. Direto	-8	7,5	-10,5	-6	-10	-10	-20	-16,5	-232	-43,5
P. Direto	-36,5	10,5	-20,5	-21	-95,5	-35,5	-159	-29,5	-297	-67
P. Direto	-28	6,5	-15,5	-4,5	-38,5	-12,5	-132	-10	-248,5	-46,5
P. Direto	-22,5	9	-18,5	-19,5	-36,5	-22	-171	-35,5	-298	-71,5
P. Direto	-14	11	-6,5	-5	-87	-18	-179	-31,5	-287,5	-69
P. Direto	-29,5	8	-24,5	-6,5	-40	-10,5	-211	-11,5	-311,5	-57,5
P. Direto	-7,5	4	-25,5	-12	-26	-17,5	-197	-26,5	-275,5	-57,5
P. Direto	-18	6	-19	-14	-3,5	-9	-152	-29,5	-319	-77,5
$\bar{x} \pm Er Pd$	-20 \pm 3	8 \pm 1	-17 \pm 2	-13 \pm 2	-33 \pm 9*	-13 \pm 3	-153 \pm 14*	-25 \pm 3	-287 \pm 9	-64 \pm 4

* diferença significativa quando comparado com o sham; p < 0,05 (teste t de Student).

Tabela 10 – Bradicardias (ΔFC) e hipotensões (ΔPAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida em animais sham e do protocolo Indireto (P. Indireto).

Grupo	Veículo (PBS)		Fenilbiguanida							
	ΔFC	ΔPAM	0,625 $\mu g/Kg$		1,25 $\mu g/Kg$		2,5 $\mu g/Kg$		5,0 $\mu g/Kg$	
	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM
Sham	-20	3,5	-27	-10,5	-17	-14	-134,5	-18,5	-285,5	-47,5
Sham	-14,5	7,5	-16	-18,5	-130,5	-26,5	-217,5	-40,5	-339	-61
Sham	-46	16	-24,5	-10	-118,5	-17	-231,5	-27	-304	-58
Sham	-26	12,5	-26	-14	-28,5	-13	-276,5	-37,5	-330	-60
Sham	-16	4	-10	-6	-31,5	-7	-244,5	-23	-337,5	-45
Sham	-6,5	1,5	-14,5	-11,5	-66	-11	-245	-22,5	-333	-63,5
Sham	-31	8	-16	-14	-58	-17	-167	-25,5	-318,5	-67,5
Sham	-22,5	4	-44,5	-7,5	-46,5	-16	-96,5	-17	-314	-65,5
Sham	-18,5	10	-18	-13	-56	-16	-160,5	-24	-234,5	-37
Sham	-35	19,5	-36	-18	-55	-16,5	-273,5	-24	-374	-85,5
Sham	-8	6,5	-19	-12	-23,5	-11,5	-197	-18	-327,5	-71,5
Sham	-12	3,5	-16	-12,5	-27	-14	-168	-23,5	-400,5	-84,5
$\bar{x} \pm Er Pd$	-21 \pm 3	8 \pm 2	-22 \pm 3	-12 \pm 1	-55 \pm 10	-15 \pm 1	-201 \pm 16	-25 \pm 2	-325 \pm 12	-62 \pm 4
P. Indireto	-18	14	-10,5	3,5	-20,5	-14	-151	-21	-228,5	-26,5
P. Indireto	-27,5	7	-22	-5	-21,5	-6	-14	-14,5	-258	-26
P. Indireto	-13	5	-19,5	-12	-29,5	-15,5	-200,5	-15	-296	-42
P. Indireto	-20	3,5	-23,5	2,5	-29	-8	-242,5	17,5	-311	-51,5
P. Indireto	-22	8,5	-19,5	-15	-31,5	-13,5	-261	-36	-371,5	-85
P. Indireto	-24	4	-25,5	-4,5	-24	-8,5	-237,5	-17,5	-354	-52
P. Indireto	-20	5	-25,5	-8	-46,5	-12	-130,5	-12	-175,5	-20
P. Indireto	-28	13,5	-27,5	-5,5	-17	-19	-113	-13	-354,5	-82,5
P. Indireto	-15,5	6	-19,5	-8,5	-28,5	-9,5	-66	-11,5	-172	-22
P. Indireto	-9	11	-9	-7	-16,5	-7,5	-84	-18	-254	-48
P. Indireto	-26	5,5	-36	-6,5	-23,5	-12	-78	-11	-300	-55
P. Indireto	-28,5	5	-31	-15,5	-38,5	-14	-105,5	-9,5	-281,5	-44
$\bar{x} \pm Er Pd$	-21 \pm 2	7 \pm 1	-22 \pm 2	-7 \pm 2	-27 \pm 3*	-12 \pm 1	-140 \pm 23*	-13 \pm 3*	-280 \pm 19	-46 \pm 6*

* diferença significativa quando comparado com o sham; p < 0,05 (teste t de Student).

Tabela 11 – PAM e FC antes (AntesDFO) e após (ApósDFO) infusão i.v. de deferoxamina em animais sham e tratados com ferro dextran no protocolo Indireto. Os valores são a média da PAM e FC tomados em dois momentos num intervalo de 10 segundos durante o registo antes da infusão de DFO e em dois momentos após a infusão de DFO.

	<i>Sham (n=7)</i>				<i>Protocolo Indireto (n=7)</i>			
	<i>PAM</i>		<i>FC</i>		<i>PAM</i>		<i>FC</i>	
	<i>AntesDFO</i>	<i>ApósDFO</i>	<i>AntesDFO</i>	<i>ApósDFO</i>	<i>AntesDFO</i>	<i>ApósDFO</i>	<i>AntesDFO</i>	<i>ApósDFO</i>
	129	118	383	356	124	130	294	294
	116	113	356	347	122	134	328	333
	113	117	344	391	113	119	386	338
	127	123	368	377	123	114	336	366
	111	117	348	356	120	123	353	334
	119	123	383	404	118	126	310	352
	119	125	350	325	117	124	363	399
$\bar{x} \pm Er Pd$	119 ± 3	119 ± 2	362 ± 6	365 ± 10	119 ± 1	124 ± 2	339 ± 12	345 ± 12
P (teste t)	0,926		0,784		0,141		0,717	

Tabela 12 – Alterações cronotrópicas (ΔFC) e pressóricas (ΔPAM) evocadas por injeções i.v. de nitroprussiato de sódio e ganho barorreflexo antes e após infusão de deferoxamina em animais sham e tratado com ferro dextran no protocolo Indireto (P. Indireto).

	Período	Veículo PBS			1,0 µg/Kg Nitroprussiato			4,0 µg/Kg Nitroprussiato		
		ΔFC	ΔPAM	Ganho	ΔFC	ΔPAM	Ganho	ΔFC	ΔPAM	Ganho
Sham	Antes	-11	2	-5,50	65	-16	-4,06	87	-27	-3,22
	Depois	-11	7	-1,57	57	-21	-2,71	76	-28	-2,71
Sham	Antes	-20	4	-5,00	71	-15	-4,73	102	-32	-3,19
	Depois	-19	2	-9,50	95	-23	-4,13	69	-25	-2,76
Sham	Antes	-20	4	-5,00	76	-14	-5,43	71	-26	-2,73
	Depois	-27	11	-2,45	92	-16	-5,75	80	-20	-4,00
Sham	Antes	-11	5	-2,20	92	-20	-4,60	98	-30	-3,27
	Depois	-23	12	-1,92	76	-21	-3,62	98	-25	-3,92
Sham	Antes	-27	2	-13,50	111	-21	-5,29	111	-28	-3,96
	Depois	-27	12	-2,25	95	-21	-4,52	127	-27	-4,70
Sham	Antes	-23	6	-3,83	65	-29	-2,24	87	-39	-2,23
	Depois	-39	27	-1,44	74	-30	-2,47	80	-35	-2,29
Sham	Antes	-9	6	-1,50	76	-23	-3,30	104	-23	-4,52
	Depois	-18	2	-9,00	79	-16	-4,94	92	-34	-2,71
— x ± Er Pd	Antes	-17±3	4±1	-5,22±1,49	79±6	-20±2	-4,24±0,43	94±5	-29±2	-3,30±0,29
	Depois	-23±3	10±3	-4,02±1,36	81±5	-21±2	-4,02±0,45	89±7	-28±2	-3,30±0,34
P. Indireto	Antes	-10	7	-1,43	98	-17	-5,76	109	-31	-3,52
	Depois	-10	2	-5,00	71	-23	-3,09	146	-31	-4,71
P. Indireto	Antes	-19	5	-3,80	92	-17	-5,41	64	-19	-3,37
	Depois	-12	11	-1,09	71	-14	-5,07	86	-27	-3,19
P. Indireto	Antes	-13	4	-3,25	137	-11	-12,45	119	-26	-4,58
	Depois	-16	8	-2,00	80	-25	-3,20	125	-36	-3,47
P. Indireto	Antes	-16	4	-4,00	79	-16	-4,94	67	-14	-4,79
	Depois	-15	9	-1,67	64	-24	-2,67	67	-22	-3,05
P. Indireto	Antes	-23	4	-5,75	65	-11	-5,91	100	-24	-4,17
	Depois	-10	4	-2,50	120	-43	-2,79	95	-23	-4,13
P. Indireto	Antes	-17	3	-5,67	48	-10	-4,80	60	-15	-4,00
	Depois	-35	12	-2,92	78	-24	-3,25	74	-23	-3,22
P. Indireto	Antes	-11	9	-1,22	84	-13	-6,46	104	-28	-3,71
	Depois	-22	12	-1,83	109	-27	-4,04	98	-24	-4,08
— x ± Er Pd	Antes	-16±2	5±1	-3,59±0,68	86±11	-14±1	-6,53±1,01*	89±9	-22±2	-4,08±0,24
	Depois	-17±3	8±1	-2,43±0,48	85±8	-26±3	-3,44±0,32 [‡]	99±11	-27±2	-3,71±0,26

* P < 0,05 comparado ao sham (teste t de Student) e ‡ P < 0,05 comparado ao ganho antes da infusão de deferoxamina no mesmo grupo (teste t de Student).

Tabela 13 – Bradicardias (ΔFC) e hipotensões (ΔPAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida antes e após a infusão de deferroxamina em animais sham e tratados com ferro dextran no protocolo Indireto (P. Indireto).

	Período	Veículo (PBS)		1,25 $\mu\text{g/Kg}$ Fenilbiguanida		2,5 $\mu\text{g/Kg}$ Fenilbiguanida	
		ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM
Sham	Antes	-11	2	-57	-10	-223	-25
	Depois	-11	7	-48	-12	-139	-29
Sham	Antes	-20	4	-50	-6	-285	-29
	Depois	-19	2	-76	-7	-355	-74
Sham	Antes	-20	4	-59	-16	-229	-25
	Depois	-27	11	-25	-13	-255	-29
Sham	Antes	-11	5	-67	-22	-29	-26
	Depois	-23	12	-22	-5	-94	-10
Sham	Antes	-27	2	-54	-18	-135	-11
	Depois	-27	12	-20	-9	-243	-41
Sham	Antes	-23	6	-54	-12	-314	-25
	Depois	-39	27	-27	-14	-293	-64
Sham	Antes	-9	6	-17	-13	-112	-15
	Depois	-18	2	-107	-28	-168	-29
– $\bar{x} \pm Er Pd$	Antes	-17 \pm 3	4 \pm 1	-51 \pm 6	-14 \pm 2	-190 \pm 38	-22 \pm 2
	Depois	-23 \pm 3	10 \pm 3	-46 \pm 13	-13 \pm 3	-221 \pm 35	-39 \pm 8
P. Indireto	Antes	-10	7	-30	-9	-235	-10
	Depois	-10	2	-30	-14	-125	-18
P. Indireto	Antes	-19	5	-42	-9	-118	-8
	Depois	-12	11	-23	-12	-76	-11
P. Indireto	Antes	-13	4	-21	-8	-64	-11
	Depois	-16	8	-47	-14	-268	-42
P. Indireto	Antes	-16	4	-59	-11	-58	-11
	Depois	-15	9	-29	-16	-245	-62
P. Indireto	Antes	-23	4	-6	-4	-262	-7
	Depois	-10	4	-57	-17	-271	-45
– $\bar{x} \pm Er Pd$	Antes	-16 \pm 2	5 \pm 1	-32 \pm 8	-8 \pm 1	-147 \pm 36	-9 \pm 1*
	Depois	-13 \pm 2	7 \pm 1	-37 \pm 5	-15 \pm 1	-197 \pm 34	-36 \pm 8 ^y

* P < 0,05 comparado ao sham (teste t de Student) e ^y P < 0,05 comparado ao ganho antes da infusão de deferroxamina no mesmo grupo (teste t de Student).

Publicações

Parte A – Referentes ao período do mestrado

Trabalho submetido:

Revista: Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

1. ***Baroreflex function in iron over load conscious rat.*** Cardoso, L. M.; Pedrosa, M. L.; Silva, M. E.; Colombari, E.; Moraes, M. F. D. and Chianca-Jr, D. A.

Parte B – Período referente à iniciação científica

1. *Elimination of Turbidity Interference in Serum Iron Colorimetric Assay by Enzymatic Proteolysis.* Leonardo M. Cardoso, Milton H. G. de Andrade, Deoclécio A. Chianca-Jr., Marcelo Eustáquio Silva and Maria Lúcia Pedrosa. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** Curitiba; vol. 46, nº 3, 2003: **In Press.**

2. *Iron overload in Hypercholesterolemic Rats Affects Iron Homeostasis and Serum Lipids but Not Blood Pressure.* Silvana M. L. Turbino-Ribeiro, Marcelo E. Silva, Deoclécio A. Chianca Jr., Heberth de Paula, Leonardo M. Cardoso, Eduardo Colombari. **Journal of Nutrition.** Vol. 133(1), pp. 15 – 20, 2003.

3. *Effects of Low-Protein Diet on the Baroreflex and Bezold-Jarisch Reflex in Conscious Rats.* F.C. Trópia, L.M. Cardoso, M.L. Pedrosa, M.E. Silva, A.S. Haibara, M.F.D. Moraes and D.A. Chianca Jr. **Nutrition Neuroscience.** Vol. 4, pp. 99 – 107, 2001.