

Faculdade de Medicina da Universidade Do Porto

Estudo do efeito da supressão genética da via de  
sinalização do Nrf2 num modelo animal de  
sobrecarga de ferro espontânea (*Hfe knock-out*)

Carolina Pontes Geraz Caldas

Dissertação de Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

Dissertação submetida para a obtenção do grau de Mestre em Medicina e Oncologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Tiago Duarte, Investigador Auxiliar, e sob a co-orientação científica do Doutor Pedro Rodrigues, Professor Associado, ambos pertencentes ao grupo *Iron and Innate Immunity*, do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto.

Setembro de 2013



## Agradecimentos

Este trabalho foi orientado pelo Doutor Tiago Duarte e co-orientado pelo Prof. Doutor Pedro Rodrigues (*Iron and Innate Immunity* do Instituto de Biologia Molecular e Celular), aos quais agradeço a oportunidade e o apoio para a realização deste trabalho. Contou ainda com a importante colaboração de outros elementos e amigos do grupo nomeadamente Ana Santos, Tânia Silva, João Neves, Sandro Gomes e Sílvia Costa.

Para o desenvolvimento prático e para a compreensão teórica do papel das diversas enzimas, com papel fundamental na protecção antioxidante, foi indispensável o apoio e a orientação científica informal cedida pela Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria João Martins e a participação do aluno de doutoramento Emanuel Passos, ambos do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina do Porto.

O meu percurso contou com a compreensão e dedicação do Prof. Doutor Henrique de Almeida, ao qual agradeço a simpatia e a habilidade para facilitar o meu percurso em todas as ocasiões em que precisei.

Porque uma tese não exige só audácia científica mas também destreza psicológica, agradeço todo o apoio concedido nesse sentido pelos meus pais, Amândio e Sara, pela minha irmã Rita, pelo Telmo e pelo Bruno.

Ao longo destes 2 anos, a partilha de indesejáveis longas sessões de aulas e de desejados mas curtos momentos de folia, com companheiros e amigos de curso, permitiu finalizar este percurso com uma maior facilidade, que embora individual, nunca foi solitário.

Porque este final também é o terminar de uma etapa profissional, o meu agradecimento vai também para todos aqueles que partilharam comigo os corredores do IBMC, nomeadamente aos que fizeram e aos que ainda fazem parte dos grupos III, BCRI e MP.

Este trabalho foi financiado pelo Santander e pela Reitoria da Universidade do Porto (PP-IJUP2011-122), e pela FEDER através do Programa Operacional de Factores de Competitividade – COMPETE e Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo projecto FCOMP-01-0124-Feder-011062 (PTDC/SAU-FCF/101177/2008).





# Índice

<b>Lista de símbolos e abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>3</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Introdução</b> .....	<b>11</b>
1. Metabolismo do Ferro .....	12
1.1. Absorção intestinal e distribuição do Ferro .....	12
1.2. Regulação da homeostasia do ferro .....	14
1.3. Regulação da Hpcidina .....	15
2. Patologias associadas à sobrecarga de ferro .....	18
2.1. Hemocromatose hereditária .....	18
2.2. Outras patologias hereditárias .....	21
2.3. Distúrbios secundários .....	21
3. Sobrecarga de ferro no fígado .....	22
4. Stresse Oxidativo .....	25
4.1. Espécies Reativas de Oxigênio .....	25
4.2. Reações de Fenton e de Haber-Weiss .....	26
4.3. Consequências do Stress Oxidativo .....	27
4.4. Sistema de defesa antioxidante .....	27
5. A via de sinalização do Nrf2.....	29
<b>II. Objetivos</b> .....	<b>33</b>
<b>III. Material e Métodos</b> .....	<b>35</b>
1. Material .....	36
2. Manutenção dos animais .....	36
3. Métodos .....	37
3.1. Parâmetros hematológicos .....	37
3.2. Quantificação dos marcadores no soro .....	37
3.3. Quantificação de ferro não-hémico no fígado .....	38
3.4. Análise histológica do fígado .....	39
3.5. Imunohistoquímica contra a Ferroportina .....	40

3.6. Determinação da actividade das enzimas antioxidantes .....	41
3.7. Extração de ARN e síntese de ADNc de fígado .....	43
3.8. Determinação da expressão genética .....	44
4. Análise estatística .....	45
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>47</b>
1. Alteração do peso corporal .....	48
2. Quantidade de ferro no soro e saturação da transferrina .....	49
3. Quantidade de ferro total não-hémico no fígado .....	50
4. Concentração de marcadores séricos de dano hepático .....	51
5. Alterações histológicas, distribuição do ferro no fígado e fibrose .....	52
6. Expressão de genes associados ao metabolismo do ferro, alvos da via do Nrf2 e pró-fibróticos no fígado .....	57
7. Marcação imunohistoquímica da ferroportina .....	60
8. Actividade enzimática associada ao estado redox .....	60
<b>V. Discussão .....</b>	<b>63</b>
1. Impacto do gene Nrf2 na acumulação de ferro .....	64
2. Papel protetor conferido pelo Nrf2 contra o dano hepático .....	67
3. Activação de genes e enzimas antioxidantes nos animais Hfe <sup>-/-</sup> .....	70
<b>VI. Conclusão .....</b>	<b>75</b>
<b>VII. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>79</b>

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementar
ALT	Alanina Transaminase
AREs	Elementos de Resposta Antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato Aminotransferase
BMP-RE	Elementos de Resposta da BMP
BMPs	Proteínas Morfogénicas do Osso
C/EBP $\alpha$	Proteína alpha Potenciadora de Ligação CCAAT
COL1A1	Colagénio tipo 1
DcytB <sup>9</sup>	Ferrireductase citocromo <i>b</i> Duodenal
DMT1	Transportador de Metal Divalente 1
ECM	Matriz Extracelular
EPO	Eritropoetina
EPOR	Recetor da Eritropoetina
Fe	Ferro
Fe <sup>2+</sup>	Ferro ferroso divalente
Fe <sup>3+</sup>	Ferro férrico trivalente
FPN	Ferroportina
GPx	Peroxidase da Glutaciona
GR	Reductase da Glutaciona
GS	Glutaciona-Sintetase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	S-Transferase da Glutaciona
GSX	Glutaciona total
Hamp	Gene da Hepcidina
HCP-1	Transportador Hémico Putativo
HCV	Hepatite C crónica
HE	Hematoxilina-Eosina
HFE	Proteína membrana da Hemocromatose humana
HH	Hemocromatose Hereditária
HJV	Hemojuvelina
HO <sup>-</sup>	Anião hidroxilo
HO <sup>·</sup>	Radical hidroxilo

HO-1	Hemoxigenase 1
IL-6	Interleucina 6
IREs	Elementos Responsivos ao ferro
IRP1/IRP2	Proteínas Reguladoras do Ferro 1 e 2
JAK	Janus Quinase
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NAFLD	Esteatose Hepática Não Alcoólica
NQO1	NADPH Quinona Oxireductase 1
Nrf2	Fator Nuclear Eritróide 2 - fator relacionado 2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
PCT	Porfíria Cutânea Tardia
RES	Sistema Reticuloendotelial
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Dismutase do Superóxido
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição
Tf	Transferrina
Tf-Fe <sub>2</sub>	Holotransferrina
TfR1/TfR2	Recetores da Transferrina 1 e 2
TGF-β1	Fator de Crescimento de Transformação beta 1
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro
TMPRSS6	Serina Protease Transmembranar 6
α-SMA	Alfa Actina de Músculo Liso
γ-GCS	γ-Glutamil-Cisteína-Sintetase



## Lista de Figuras

**Figura 1** - Absorção, redução e exportação do ferro pelos enterócitos. Após a redução pelo DcytB, o ferro inorgânico entra na célula pelo DMT1. O ferro hémico utiliza o HCP-1 para entrar na célula onde o  $\text{Fe}^{2+}$  é libertado do grupo heme através de uma reação catalisada pela HO-1. O ferro pode ser utilizado principalmente pela mitocôndria em diferentes vias metabólicas, armazenado na ferritina ou libertado da célula via FPN. O ferro exportado é oxidado pela hephaestina e transportado pela Tf [10].

**Figura 2** - Homeostasia do ferro. O ferro é absorvido pelos enterócitos através do DMT1 e encaminhado para o plasma através da FPN, onde circula ligado à transferrina em direção à medula óssea e ao fígado. O ferro não-hémico é armazenado no fígado na forma de ferritina e o ferro hémico é utilizado na produção de hemoglobina. A absorção do ferro é regulada pela hepcidina através da sua ligação à ferroportina [11].

**Figura 3** – Vias de regulação da hepcidina. Em situações de excesso de ferro e inflamação, a expressão da hepcidina é ativada; em condições de hipóxia, deficiência em ferro ou elevada atividade eritróide, a expressão da hepcidina é reduzida, através de vias de sinalização específicas [6].

**Figura 4** - A hepcidina é regulada pelas vias de sinalização das proteínas HFE, HJV e Trf2. **a** Quando a quantidade de ferro está diminuída no organismo, os níveis da hepcidina são baixos, permitindo a entrada de ferro, através da ferroportina dos enterócitos, para a corrente sanguínea e a recirculação do ferro a partir dos macrófagos para o plasma. **b** Quando a quantidade de ferro está aumentada, os níveis de hepcidina aumentam promovendo a degradação da ferroportina, diminuindo a quantidade de ferro absorvida pelos enterócitos e a sua libertação pelos macrófagos [9].

**Figura 5** – Modelo patogénico da Hemocromatose Hereditária. **a.** As proteínas HFE (modelo representado na Figura), TfR2 e HJV são moduladores complementares da síntese da hepcidina, que regula negativamente a taxa de libertação de ferro para a corrente sanguínea pelos enterócitos e pelos macrófagos. **b.** A perda de uma das proteínas resulta no aumento do fluxo de ferro para a corrente sanguínea, apesar de alguma atividade residual da hepcidina ser sustentada pelos outros reguladores [21].

**Figura 6** - Ilustração esquemática dos lóbulos hepáticos e dos seus componentes celulares (adaptado de [26]).

**Figura 7** - Redução da molécula de oxigénio a água, com o conjunto de reações intermédias não enzimáticas que justificam a formação de espécies reativas de oxigénio na cadeia de transporte de eletrões (adaptado de [31]).

**Figura 8** - Sequência de eventos de eliminação do  $O_2^{\cdot-}$ . Inicialmente, os doadores de eletrões convertem o  $O_2$  em  $O_2^{\cdot-}$ . Através da reação de Haber-Weiss, o  $Fe^{3+}$  converte-o em  $O_2$ . A SOD elimina-o através da formação de  $H_2O_2$ , que é eliminado através da reação de Fenton, da catalase e da GPx. A GSH é sintetizada através da  $\gamma$ -GCS e da GS, e participa na reação catalisada pela GPx, através da sua oxidação a GSSG. A GR catalisa a redução da GSSG a GSH, através da oxidação do NADPH. A conjugação de muitos xenobióticos com a GSH é catalisada pela da GST. (adaptado de [35] e [36]).

**Figura 9** - A indução da resposta antioxidante depende da transcrição de genes que codificam proteínas com funções antioxidantes e citoprotetoras. Esta resposta transcricional é regulada pelo Nrf2 através da sua ligação aos AREs, que recruta os elementos transcricionais. Na ausência de stresse oxidativo, o Keap1 promove a degradação do Nrf2 [39].

**Figura 10** - Peso corporal final. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. animais B6, Nrf2<sup>-/-</sup> e Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição.

**Figura 11** - Quantificação do ferro no soro (A) e saturação da transferrina (B). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>d</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe; <sup>e</sup>  $p < 0.05$  vs. animais Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição.

**Figura 12** - Quantificação do ferro total não hémico no fígado. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição.

**Figura 13** - Concentração dos marcadores séricos ALT (A) e AST (B). <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe.

**Figura 14** - Cortes histológicos do fígado, representativos de cada grupo experimental dos animais com 6, 12 e 18 meses, corados com HE, para avaliação da arquitetura do tecido e eventual lesão hepática. (Ampliação original 100x)

**Figura 15** - Avaliação do grau de siderose hepática baseado no método descrito por Nash et al [31], nos cortes histológicos corados com Perls. (grau 0 - ausência de ferro; grau 1 a 3 - sucessiva acumulação de ferro no parênquima, desde a zona periportal (grau 1), até à zona média do parênquima (grau 2), atingindo os hepatócitos centrolobulares (grau 3).

**Figura 16** - Acumulações nucleares de ferro em hepatócitos de um animal *Hfe*<sup>-/-</sup> com 12 meses.

**Figura 17** - Cortes histológicos do fígado, representativos de cada grupo experimental dos animais com 6, 12 e 18 meses, corados com Perls, para caracterização do padrão de distribuição do ferro. (Ampliação original 100x)

**Figura 18** - Cortes histológicos do fígado, representativos de cada grupo experimental dos animais com 6, 12 e 18 meses, corados com *Sirius Red* para observação das fibras de colagénio (a vermelho) e eventual formação de fibrose hepática. (Ampliação original 100x)

**Figura 19** - Cortes histológicos com coloração histológica de Perls (em cima) e de *Sirius Red* (em baixo), representativos dos grupos *Nrf2/Hfe*<sup>-/-</sup> dos animais com 12 e 18 meses, onde é possível observar a deposição de fibras de colagénio em redor dos “nódulos sideróticos”. (Ampliação original 400x)

**Figura 20** - Quantificação da expressão de ARNm de genes relacionados com o metabolismo do ferro, *Hamp* (A) e *Fpn1* (B) no fígado dos animais com 12 e 18 meses. <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais *Nrf2*<sup>-/-</sup> da mesma condição. (*Hamp* - gene da hepcidina; *Fpn1* – gene da ferroportina)

**Figura 21** - Quantificação da expressão de ARNm dos genes diretamente regulados pelo fator de transcrição Nrf2 (Gsta1) no fígado dos animais com 12 e 18 meses. <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>d</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade.

**Figura 22** - Quantificação da expressão de ARNm dos genes pró-fibróticos  $\alpha$ Sma (A), Col1a1 (B) e Tgf $\beta$ 1 (C) no fígado dos animais com 12 meses e 18 meses. <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição.

**Figura 23** - Imunohistoquímica indireta contra a FPN nos animais com 12 meses (ampliação 100x e 400x).

**Figura 24** - Determinação da atividade da catalase (A), SOD (B), GR (C), GST (D), e GPx (E) e da quantidade de GSH (F), GSX (G) e GSSG (H). <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe; <sup>d</sup> p<0.05 vs. animais B6 da mesma condição; <sup>e</sup> p<0.05 vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>f</sup> p<0.05 vs. animais Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1** - Distúrbios associadas à sobrecarga de ferro no organismo (adaptado de [15], [16]).

**Tabela 2** - Espécies reativas de oxigênio, radicais e não-radicaais, potencialmente sintetizados nos organismos que utilizam o oxigênio como comburente [31].

**Tabela 3** - Amostragem dos 3 tempos experimentais decorridos durante 6, 12 e 18 meses.

**Tabela 4** - *Primers* utilizados para avaliação da expressão genética por qRT-PCR.

## Resumo

A Hemocromatose Hereditária associada ao Hfe é a doença genética de sobrecarga de ferro mais comum nos caucasianos. Se não for tratada, pode levar a uma acumulação de ferro por todo o organismo associada a dano tecidual em vários órgãos devido ao stresse oxidativo. A maior parte dos doentes é portadora da mutação C282Y no gene Hfe em homozigotia. Contudo, os sintomas são muito variados. A baixa penetrância desta mutação indica que a homozigotia para a mutação C282Y é necessária mas não suficiente para provocar a doença. A nossa hipótese é que a resistência ao stresse oxidativo poderá ser um modelador da progressão da doença na Hemocromatose Hereditária associada ao Hfe. O fator de transcrição Nrf2 desempenha uma importante função na adaptação ao stresse oxidativo, regulando a transcrição de genes antioxidantes e citoprotetores.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a supressão genética do Nrf2 predispõe os murganhos Hfe<sup>-/-</sup>, modelo animal da Hemocromatose Hereditária onde a deposição de ferro ocorre espontaneamente e gradualmente com a idade, levando ao desenvolvimento de dano hepático.

Murganhos fêmeas C57BL/6 (B6), Hfe<sup>-/-</sup>, Nrf2<sup>-/-</sup> e duplo *knock-out* (Hfe/Nrf2<sup>-/-</sup>) (n=4-8) foram sacrificados aos 6, 12 e 18 meses, para a recolha de amostras de sangue e fígado. No primeiro tempo experimental, os animais foram divididos em dois grupos. Um dos grupos foi alimentado com uma dieta enriquecida com ferro (0,5%) durante as últimas 12 semanas de vida.

A quantificação da concentração do ferro no soro e no fígado, da saturação da transferrina e a análise da expressão dos genes Hamp e Fpn1 sugerem que o Nrf2 não influenciou a quantidade de ferro absorvido, transportado e acumulado no fígado. A coloração de Perls revelou a presença de grandes acumulações de ferro nos macrófagos sinusoidais nos animais duplo *knock-out*. A quantificação dos marcadores séricos não revelou a existência de dano hepático extenso, e a análise dos níveis de glutatona e da atividade de enzimas antioxidantes não detetou um aumento de stresse oxidativo no fígado destes animais. Contudo, a formação das fibras de colagénio em redor dos “nódulos sideróticos” e o aumento da expressão do gene Col1a1 em animais Hfe/Nrf2<sup>-/-</sup> envelhecidos, sugerem o aparecimento de fibrose hepática. Foi possível concluir que o Nrf2 interfere na distribuição do ferro acumulado no fígado em animais Hfe<sup>-/-</sup>. A sua ausência contribui para a formação de lesões hepáticas que poderão estar relacionadas com o desenvolvimento de fibrose durante o processo de envelhecimento.

## Abstract

HFE-associated hereditary hemochromatosis (HH) is the most common genetic iron overload disorder among Caucasians. If untreated, it can lead to total body iron overload with secondary tissue damage in several organs, attributable to oxidative stress. Most HH patients are homozygous for the C282Y mutation in the Hfe gene. However, symptoms are highly variable. The low penetrance of the C282Y mutation indicates that C282Y homozygosity is a necessary but not a sufficient factor in causing the disease. We hypothesized that resistance to oxidative stress may be a modifier of disease progression in HFE-HH. Transcription factor Nrf2 plays a key role in adaptation to oxidative stress by regulating the induction of antioxidant/cytoprotective genes.

The aim of this study was to evaluate if the genetic suppression of Nrf2 predisposes the Hfe<sup>-/-</sup> mouse, an animal model of HH where iron deposition occurs spontaneously and gradually with aging, to the development of liver damage.

Female C57BL/6 (B6), Hfe<sup>-/-</sup>, Nrf2<sup>-/-</sup> and double *knock-out* (Hfe/Nrf2<sup>-/-</sup>) mice (n=4-8) were sacrificed at the age of 6, 12 and 18 months and blood and liver samples were collected. In the first experimental time-point, the animals were divided into two groups. One of the groups was fed with a diet enriched with iron (0.5%) during the last 12 weeks of life.

The iron concentration in serum and liver, transferrin saturation and Hamp and Fpn1 gene expression analysis suggest that Nrf2 did not influence the amount of iron absorbed, transported and accumulated in the liver. Perl's staining showed large accumulations of iron in sinusoidal macrophages of double *knock-out* animals. The quantification of serum markers did not reveal extensive hepatic injury, and the analysis of glutathione levels and antioxidant enzymes activity failed to detect an increase in oxidative stress in the liver of these animals.

Nevertheless, the deposition of collagen fibers around "siderotic nodules" and the increased expression of the Col1a1 gene in Hfe/Nrf2<sup>-/-</sup> old animals suggest the onset of hepatic fibrosis. We conclude that Nrf2 interferes with iron accumulation in Hfe<sup>-/-</sup> mouse liver. Its absence contributes to liver injury, which may be associated with the development of fibrosis during the aging process.





## I. Introdução

---

# I. Introdução

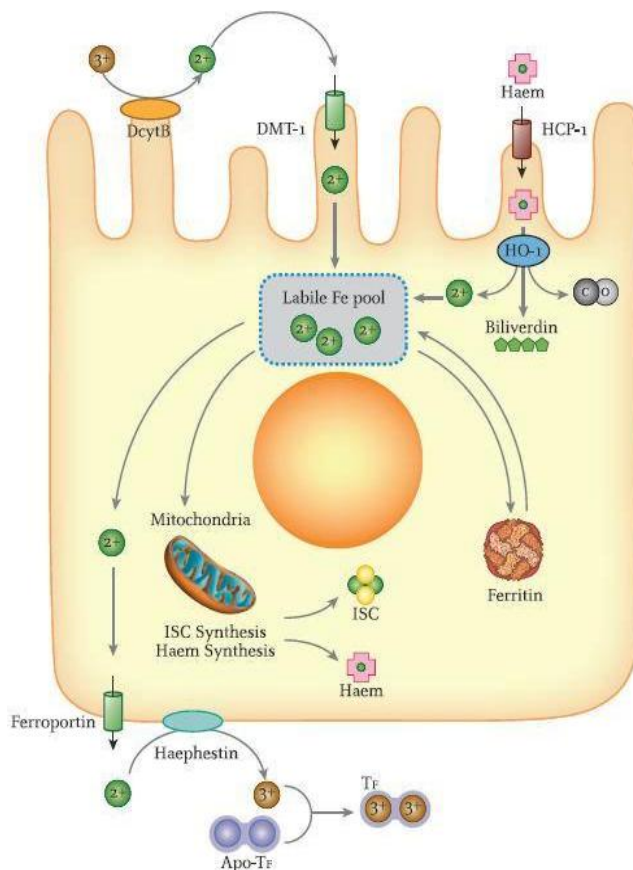
## 1. Metabolismo do Ferro

O ferro (Fe) é um elemento essencial necessário para o crescimento e sobrevivência de vários organismos, estando envolvido em várias vias metabólicas celulares. Apesar de o ferro ser um dos elementos mais abundantes do nosso planeta, algumas das formas comuns são insolúveis e a sua disponibilidade na dieta dos animais é reduzida [1]. De forma a controlar a quantidade de ferro presente no organismo, os humanos e outros animais desenvolveram mecanismos eficientes para a retenção de ferro no organismo, através da ausência de mecanismos regulados para a sua excreção [2].

O corpo humano adulto contém cerca de 3-4 g de ferro [3]. Em estado de equilíbrio, é perdido cerca de 1-2 mg de ferro do corpo por dia, através da descamação das células epiteliais do intestino e da bexiga, descamação da pele ou por perdas de sangue e de suor [4]. Essa quantidade é repostada através da absorção de ferro, proveniente da dieta, pelos enterócitos do duodeno. Os tecidos e as células que encaminham maior quantidade de ferro para o plasma são os enterócitos duodenais envolvidos na absorção de ferro através da dieta, os hepatócitos que são os principais locais de armazenamento de ferro e os macrófagos reticuloendoteliais que reciclam o ferro dos eritrócitos senescentes [5].

### 1.1. Absorção intestinal e distribuição do Ferro

Tal como outros metais, o ferro pode assumir vários estados de oxidação. As espécies mais comuns são o ferro ferroso divalente – forma reduzida solúvel ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e o ferro férrico trivalente – forma oxidada insolúvel ( $\text{Fe}^{3+}$ ) [6, 7]. A absorção do ferro inorgânico ou não-hémico envolve a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  no lúmen intestinal, através da ferriredutase citocromo *b* duodenal (DcytB<sup>9</sup>), associada à membrana dos enterócitos. Subsequentemente, o  $\text{Fe}^{2+}$  é transportado através da membrana apical dos enterócitos para o seu interior, através do transportador de metal divalente 1 (DMT1) [4]. O ferro hémico é absorvido por outro processo independente através da membrana apical dos enterócitos, pelo transportador hémico putativo, o HCP-1. Dentro da célula, o ferro é metabolizado por uma reação catalisada pela hemoxigenase 1 (HO-1) de forma a libertar o  $\text{Fe}^{2+}$  do grupo heme [2]. Nos enterócitos, o  $\text{Fe}^{2+}$  pode ser armazenado na forma de ferritina, uma proteína citoplasmática de armazenamento do ferro. Posteriormente é eliminado do corpo pelo trato gastrointestinal através da descamação das células senescentes, uma das vias mais importantes de eliminação de ferro do corpo [8]. O  $\text{Fe}^{2+}$  pode ainda ser utilizado pela mitocôndria em várias vias metabólicas [9].



**Figura 1** – Absorção, redução e exportação do ferro pelos enterócitos. Após a redução pelo DcytB, o ferro inorgânico entra na célula pelo DMT1. O ferro hémico utiliza o HCP-1 para entrar na célula onde o  $\text{Fe}^{2+}$  é libertado do grupo heme através de uma reação catalisada pela HO-1. O ferro pode ser utilizado principalmente pela mitocôndria em diferentes vias metabólicas, armazenado na ferritina ou libertado da célula via FPN. O ferro exportado é oxidado pela hephaestina e transportado pela Tf [10].

O  $\text{Fe}^{2+}$  libertado pelos enterócitos é enviado para o plasma através do transportador membranar basolateral ferroportina (FPN), localizado na membrana basolateral dos enterócitos maduros. Este processo envolve a reoxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , reação catalisada pela ceruloplasmina (ferroxidase de circulação) ou pela sua homóloga hephaestina (ferroxidase ligada à membrana basolateral dos enterócitos) que fisicamente interage com a FPN [2]. O ferro, uma vez no plasma, é transportado pela transferrina (Tf), proteína do plasma, que mantém o ferro  $\text{Fe}^{3+}$  em estado redox inerte, encaminhando-o para dentro dos tecidos. Esta proteína é constituída por dois domínios globulares de ligação do ferro e, em condições fisiológicas normais, não se encontra totalmente saturada, apenas 30% da capacidade total (Figura 1) [7].

O ferro necessário ao metabolismo normal das células dos diferentes tecidos é transportado pela Tf, que se liga aos recetores da superfície celular, onde o ferro é libertado. O ferro em excesso é transportado pela veia porta até ao fígado e acumula-se nos hepatócitos, que têm uma grande capacidade de armazenar ferro na forma de ferritina, podendo ser libertado, quando necessário ao metabolismo celular [2].

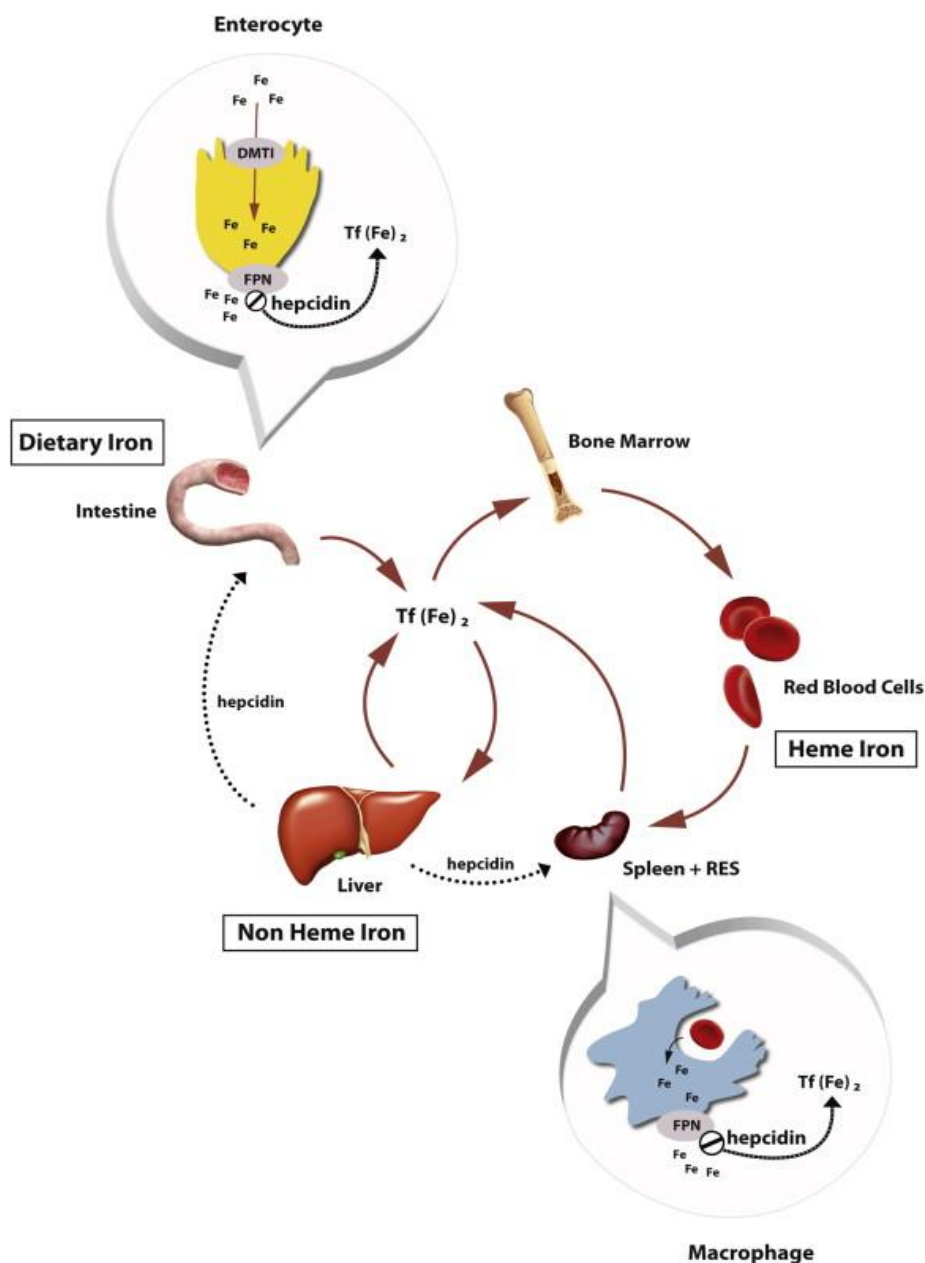
O principal local de utilização do ferro é a medula óssea, na produção da hemoglobina dos eritrócitos, durante a eritropoiése. Por dia, 20-25 mg de ferro são recuperados através da fagocitose dos eritrócitos senescentes, pelos macrófagos do baço e do sistema reticuloendotelial (RES), que metabolizam a hemoglobina e o ferro hémico. Semelhante ao que acontece nos enterócitos do intestino, a libertação do  $\text{Fe}^{2+}$  pela membrana plasmática dos macrófagos, é feita via FPN, através da reoxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$ , catalisada pela ceruloplasmina. Posteriormente o ferro  $\text{Fe}^{3+}$  é transportado através da corrente sanguínea ligado à Tf e, conforme a necessidade, pode ser reciclado e novamente utilizado na eritropoiése ou armazenado [11].

## 1.2. Regulação da homeostasia do ferro

A quantidade de ferro absorvida, em circulação e acumulada no organismo é regulada a nível celular e a nível sistémico.

A homeostasia do ferro é regulada pelas células de forma a garantir uma quantidade de ferro suficiente, indispensável às funções basais da própria célula, evitando uma elevada quantidade de ferro livre que possa promover a formação de espécies reativas de oxigénio [12]. O principal mecanismo de regulação depende de duas “proteínas reguladoras do ferro” citosólicas, a IRP1 e a IRP2, que condicionam a síntese de proteínas reguladas pelo ferro. As IRPs ligam-se aos “elementos responsivos ao ferro” (IREs) nas regiões 5´ e 3´ do ARNm codificante de proteínas envolvidas na absorção (receptor 1 da Tf (TfR1) e DMT1), no armazenamento (ferritina) e na exportação (ferroportina) do ferro. Quando a quantidade de ferro nas células é reduzida, as IRPs ligam-se à região 5´ do ARNm das IREs da ferritina e da FPN, reprimindo a sua tradução, e à região 3´ do ARNm das IREs do TfR1 e do DMT1, bloqueando a sua degradação. Quando a quantidade de ferro nas células está aumentada, as IRPs não se ligam às IREs, aumentando a síntese de ferritina e de FPN, e promovendo a degradação do ARNm do TfR1 e do DMT1 [13].

A homeostasia sistémica do ferro é controlada pela hepcidina, uma hormona peptídica, formada por 25 aminoácidos, essencialmente produzida pelo fígado. Esta hormona inibe a entrada de ferro no plasma através dos enterócitos, a libertação de ferro reciclado pelos macrófagos e a libertação de ferro armazenado nos hepatócitos [3]. Essa inibição resulta da ligação da hepcidina à FPN dos enterócitos, dos macrófagos, dos hepatócitos e de outras células, promovendo a sua fosforilação, internalização e degradação lisossomal. A FPN é o único exportador orgânico do ferro nos mamíferos e a sua degradação causa retenção intracelular do ferro, aumentando a concentração do ferro nos tecidos [7] e diminuindo o seu transporte para o plasma (Figura 2).



**Figura 2** – Homeostasia do ferro. O ferro é absorvido pelos enterócitos através do DMT1 e encaminhado para o plasma através da FPN, onde circula ligado à transferrina em direção à medula óssea e ao fígado. O ferro não-hémico é armazenado no fígado na forma de ferritina e o ferro hémico é utilizado na produção de hemoglobina. A absorção do ferro é regulada pela hepcidina através da sua ligação à ferroportina [11].

### 1.3. Regulação da Hepcidina

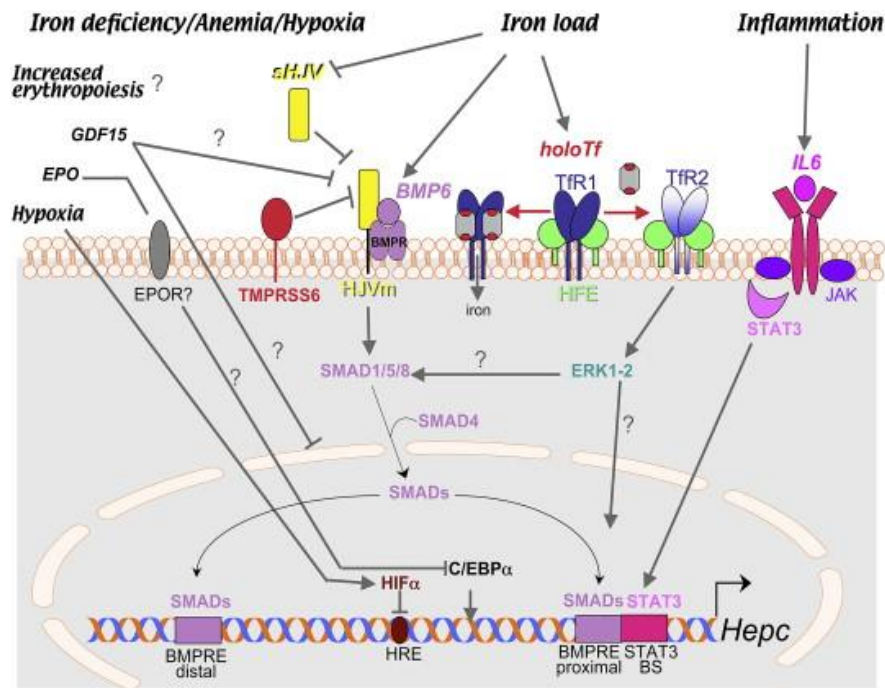
A produção de hepcidina é diretamente regulada pelo ferro. Quando a concentração de ferro no organismo é elevada, os hepatócitos produzem maior quantidade de hepcidina, limitando a absorção e liberação de ferro para o plasma. Quando a concentração de ferro no organismo é baixa, os hepatócitos produzem menor quantidade de hepcidina, permitindo a entrada de ferro no plasma.

Para além de ser regulada pelo ferro, a expressão da hepcidina também é regulada pela necessidade de ferro requerida durante a eritropoiese. Perante uma eritropoiese ativa, a produção de hepcidina está suprimida, disponibilizando maior quantidade de ferro para a produção de hemoglobina [3].

Existem outros estímulos que regulam a produção de hepcidina: em condições de hipóxia, a produção de hepcidina está suprimida e perante uma infeção ou inflamação, a produção de hepcidina está aumentada, de forma a diminuir a disponibilidade de ferro aos microrganismos, como estratégia de defesa do hospedeiro [9].

A expressão da hepcidina é regulada principalmente a nível transcricional, através de moléculas sensíveis à quantidade de ferro no organismo, que participam em vias de transdução, que regulam a síntese de hepcidina ou a sua secreção através dos hepatócitos [3]. Desta forma, os níveis de hepcidina dependem do efeito combinado de várias vias de sinalização, em situações de excesso de ferro, anemia, hipóxia, e inflamação [6] (Figura 3).

Um aumento da quantidade de ferro no plasma ativa a expressão da hepcidina através de duas vias principais de sinalização. Uma das vias de sinalização envolve a interação da proteína membrana da hemocromatose humana (HFE) com os dois recetores da transferrina, o TfR1 e o TfR2, funcionando como sensor da holotransferrina (Tf-Fe<sub>2</sub>). Quando a quantidade de ferro no plasma é baixa, o HFE liga-se à  $\beta$ 2-microglobulina permitindo a sua deslocação para a superfície da célula onde se liga ao TfR1, impossibilitando a expressão da hepcidina, permitindo a absorção de ferro pelos enterócitos [6]. Esta ligação é competitivamente inibida pela Tf-Fe<sub>2</sub>. Quando a quantidade de ferro no plasma e a saturação da transferrina aumentam, o Tf-Fe<sub>2</sub> liga-se ao TfR1, libertando o HFE do complexo. A molécula livre de HFE interage com o TfR2 formando o complexo HFE-TfR2, que induz a expressão da hepcidina, possivelmente através da via MAPK/ERK [3]. A outra via de sinalização ativa a transcrição da hepcidina através da via das BMPs (proteínas morfogénicas do osso). A ligação da BMP6 aos recetores das BMPs promove a fosforilação do complexo SMAD1-SMAD5-SMAD8, que recruta e transporta a SMAD4 para o núcleo, onde promove a transcrição da hepcidina após a ligação dos elementos de resposta da BMP (BMP-RE) à zona proximal e distal do promotor do gene da hepcidina (Hamp) [7]. A hemojuvelina (HJV), um co-recetor da BMP, desenvolve um importante papel na ativação da hepcidina induzida pelo ferro, através da formação de complexos com os recetores de BMPs, potenciando a sua ativação [3]. A serina protease transmembranar Tmprss6, essencialmente produzida no fígado, regula a concentração de HJV na membrana celular, interferindo indiretamente na síntese de hepcidina [6].



**Figura 3** – Vias de regulação da hepcidina. Em situações de excesso de ferro e inflamação, a expressão da hepcidina é ativada; em condições de hipóxia, deficiência em ferro ou elevada atividade eritróide, a expressão da hepcidina é reduzida, através de vias de sinalização específicas [6].

A baixa quantidade de ferro em situações de anemia e hipóxia inibe a síntese de hepcidina, permitindo o fornecimento de ferro para colmatar as necessidades durante a eritropoiese. Sendo os precursores eritropoiético da medula óssea os principais consumidores de ferro da holotransferrina, a eritropoiese é totalmente dependente desta fonte de ferro. Desta forma, a proteína eritropoetina (EPO) é sintetizada pelo rim em condições de hipóxia, atuando como agente anti-apoptótico dos eritroblastos através do seu recetor EPOR. Para além disso, a EPO inibe a expressão da hepcidina nos hepatócitos através da regulação do fator de transcrição proteico alpha potenciador de ligação CCAAT (C/EBP $\alpha$ ) [6].

Devido à sua função antimicrobiana, a hepcidina é também regulada em condições de inflamação e infeção, onde a sua síntese e a sua concentração no soro está aumentada. Esta regulação relaciona-se com a função da hepcidina na defesa do hospedeiro onde a restrição de ferro no organismo pode limitar o crescimento microbiano. Várias citocinas medeiam a transcrição da hepcidina durante a inflamação, principalmente a interleucina-6 (IL-6), que ativa a via do JAK-STAT3, através da ligação canónica ao promotor da hepcidina, levando à estimulação transcricional da mesma [14].

## 2. Patologias associadas à sobrecarga de ferro

Tabela 1 - Distúrbios associadas à sobrecarga de ferro no organismo (adaptado de [15, 16]).

Síndromes hereditárias	Hemocromatose por mutações no Hfe (tipo 1) C282Y/C282Y ou C282Y/H63D	
	Hemocromatose juvenil (tipo 2) Tipo 2A – mutações na HJV Tipo 2B – mutações na hepcidina	
	Hemocromatose por mutações no TfR2 (tipo 3)	
	Doenças associadas a FPN (tipo 4)	
	Aceruloplasminemia	
	Anemias relacionadas com a absorção do ferro Síndromes talassémicas Anemia sideroblástica Anemia hemolítica crónica	
	A(hipo)transferrinemia	
	Ataxia de Friedreich's	
	Sobrecarga de ferro secundária	Dieta
		Transfusão de eritrócitos
		Anemia ou inflamação
		Doenças crónicas do fígado Hepatite C Esteatose hepática não alcoólica Fígado alcoólico Porfíria cutânea tardia
		Sobrecarga dietética de ferro (Africana)
Sobrecarga de ferro neonatal		

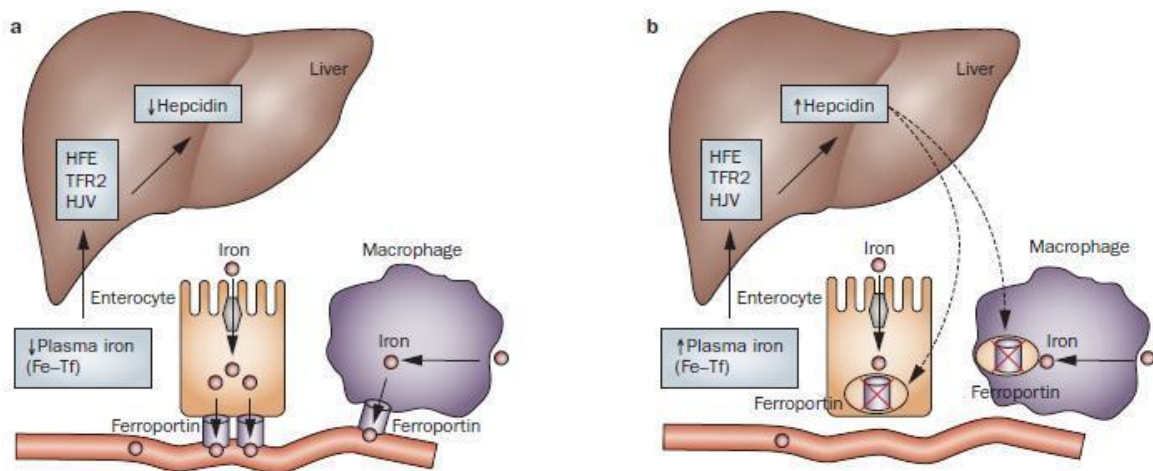
A homeostasia do ferro é mantida através do equilíbrio entre a necessidade de ferro no organismo e a absorção intestinal [16]. A acumulação excessiva de ferro no parênquima dos tecidos é extremamente tóxica, devido à capacidade de gerar espécies reativas de oxigénio (ROS) [17].

As patologias associadas ao excesso de ferro no organismo pertencem a um grupo heterogéneo de doenças de origem hereditária ou de carácter secundário [15] (Tabela 1).

### 2.1. Hemocromatose Hereditária

As diferentes formas de Hemocromatose Hereditária (HH) são caracterizadas por uma absorção excessiva e uma acumulação tóxica de ferro nas células do parênquima de órgãos vitais, relativamente à quantidade celular necessária. Este excesso de ferro produz elevadas quantidades de ROS que lesionam as estruturas intracelulares fundamentais, podendo levar à falência dos órgãos afetados [17].





**Figura 4** – A hepcidina é regulada pelas vias de sinalização das proteínas HFE, HJV e Trf2. **a** Quando a quantidade de ferro está diminuída no organismo, os níveis da hepcidina são baixos, permitindo a entrada de ferro, através da ferroportina dos enterócitos, para a corrente sanguínea e a recirculação do ferro a partir dos macrófagos para o plasma. **b** Quando a quantidade de ferro está aumentada, os níveis de hepcidina aumentam promovendo a degradação da ferroportina, diminuindo a quantidade de ferro absorvida pelos enterócitos e a sua libertação pelos macrófagos [9].

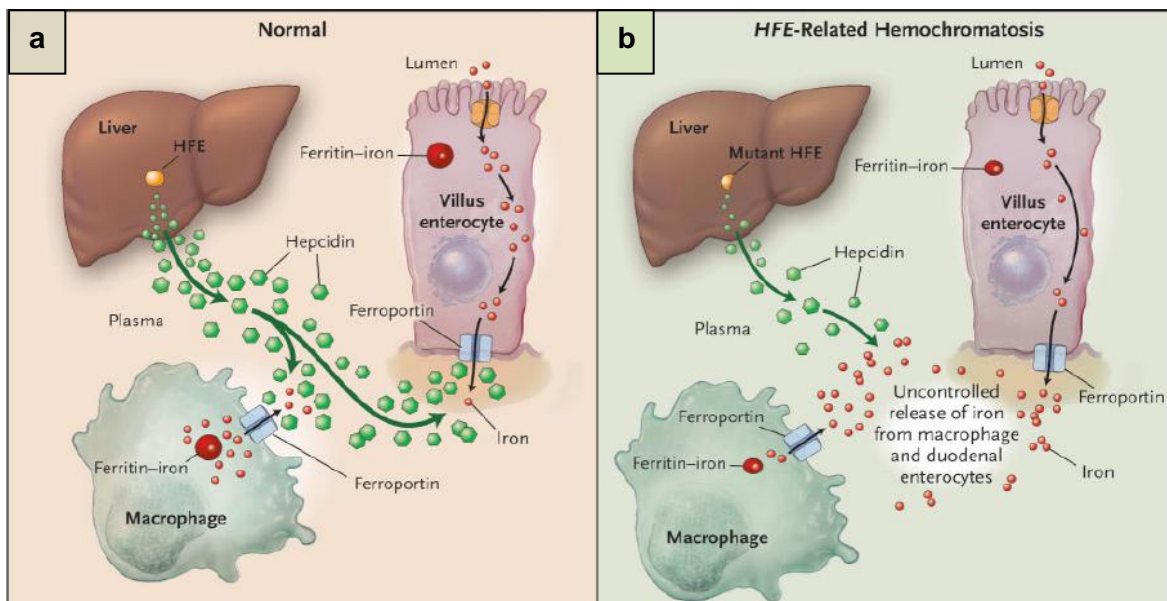
A hepcidina, através da sua interação com a ferroportina, é reconhecida como o principal regulador da homeostasia do ferro e a sua desregulação é a origem de muitas patologias associadas à homeostasia do ferro [16]. As doenças de carácter primário são causadas por mutações em genes reguladores do metabolismo do ferro: mutações no *Hamp*, que impedem a produção da proteína funcional; mutações nos genes do *Hfe*, *TfR2* e *HJV*, que inativam as respetivas vias de sinalização que regulam a expressão da hepcidina de acordo com as necessidades atuais de ferro; e mutações no gene da *FPN*, que tornam o transportador insensível à regulação feita pela hepcidina [18] (Figura 4).

Cerca de 80% dos doentes com fenótipo típico de Hemocromatose Hereditária apresentam mutações no gene *Hfe*, característico da HH tipo 1. As mutações mais comuns e com relevância clínica são a mutação C282Y e H63D [16]. A mutação H63D é caracterizada pela substituição do aminoácido histidina pelo ácido aspártico. Esta mutação é mais comum do que a mutação C282Y, mas apenas é responsável pelo desenvolvimento de HH quando combinada com a mutação C282Y, em condição de heterozigotia [19]. A mutação C282Y é uma mutação *missense* no braço curto do cromossoma 6 caracterizada pela substituição do aminoácido cisteína por uma tirosina na posição 282 da proteína HFE. Cerca de 85-90% dos doentes com HH são homozigóticos para esta mutação [16], mas apesar de ser responsável pela maioria dos casos com fenótipo típico de HH, apenas uma percentagem reduzida dos indivíduos apresentam sinais clássicos e sintomas de HH. Todos os indivíduos homozigóticos são considerados geneticamente predispostos a uma cadeia de eventos que pode culminar em danos severos em órgãos suscetíveis, apesar de ser imprevisível o grau de expressão

fenotípica nos indivíduos, devido à baixa penetrância que caracteriza a mutação. A baixa penetrância desta mutação sugere que a homozigotia é um fator necessário, porém não suficiente para a manifestação da doença. A razão pela qual alguns doentes homozigóticos para a mutação C282Y desenvolvem formas clinicamente severas da doença enquanto outros permanecem aparentemente saudáveis continua por esclarecer [19].

A sobrecarga de ferro hepático ocorre por volta da quarta ou quinta década de vida, com maior incidência no sexo masculino, seguindo-se uma progressiva sobrecarga de ferro no coração, pâncreas ou articulações. Se não for tratada, os níveis anormais de ferro no fígado podem resultar em fibrose hepática e cirrose, aumentando o risco de carcinoma hepatocelular [19]. Em termos moleculares, esta mutação interrompe uma ligação dissulfeto, necessária para a ligação do HFE à  $\beta$ 2-microglobulina [17], impedindo a sua ligação ao Tfr1, levando a diminuição da expressão da hepcidina (Figura 5).

A hemocromatose tipo 2, associada a mutações na HJV, é uma doença autossômica recessiva rara. Ao contrário da HH clássica, estes doentes apresentam características clínicas nas primeiras décadas de vida, afetando os dois géneros de forma igual, com uma evolução mais rápida e severa. As manifestações clínicas incluem deposição densa de ferro nos hepatócitos, falência cardíaca e arritmias, diabetes, hipogonadismo e por vezes problemas nas articulações. Sem tratamento por flebotomia, maior parte dos doentes não sobrevive devido a cardiomiopatias [20].



**Figura 5** – Modelo patogénico da Hemocromatose Hereditária. **a.** As proteínas HFE (modelo representado na Figura), Tfr2 e HJV são moduladores complementares da síntese da hepcidina, que regula negativamente a taxa de libertação de ferro para a corrente sanguínea pelos enterócitos e pelos macrófagos. **b.** A perda de uma das proteínas resulta no aumento do fluxo de ferro para a corrente sanguínea, apesar de alguma atividade residual da hepcidina ser sustentada pelos outros reguladores [21].

A hemocromatose tipo 3, associada a mutações na TfR2, é uma doença autossômica recessiva rara, manifestando-se na terceira e quarta década de vida. É caracterizada por um fenotípico clínico muito semelhante à hemocromatose tipo 1, apesar de os doentes apresentarem grande variação na severidade dos sintomas [20].

A hemocromatose tipo 4, associada a alterações na FPN, é uma doença autossômica dominante que se manifesta entre a quarta e a quinta década de vida, e leva ao desenvolvimento de complicações hepáticas, cardíacas e pancreáticas, assemelhando-se às outras formas de HH [20].

## **2.2. Outras patologias hereditárias**

Muitas patologias não estão associadas diretamente com a acumulação sistêmica de ferro, mas com a sua má distribuição ao longo do organismo. Normalmente estão associadas a uma acumulação de ferro em estruturas intracelulares específicas. Esta acumulação pode ocorrer nas mitocôndrias, no caso da ataxia de Friedreich's, onde se observa uma progressiva degeneração do sistema nervoso, ou em certos tipos de células ou órgãos, como nos macrófagos na anemia crônica, que destroem os eritrócitos como reação auto-imune [15].

A Aceruloplasminemia é uma doença associada a níveis baixos de ceruloplasmina devido a mutações no seu gene. A ceruloplasmina tem atividade ferroxidase, estando envolvida na libertação de ferro pelas células. Quando o gene está mutado, o ferro acumula-se nas células neuronais e gliais do cérebro, nos hepatócitos e nas células das ilhas pancreáticas [8].

A A(hipo)transferrinemia é uma condição na qual há uma diminuição acentuada ou nenhuma produção de transferrina, o que provoca uma anemia por deficiência em ferro acompanhada por uma sobrecarga de ferro no parênquima [8].

A deposição de ferro nas células do parênquima ocorre em doenças crônicas da eritropoiese, particularmente nas que apresentam defeitos na síntese de hemoglobina ou uma eritropoiese ineficiente, tal como acontece na anemia sideroblástica e talassemia. Nestas doenças, a absorção de ferro está aumentada devido à diminuição da expressão da hepcidina. Para além disso, estes pacientes necessitam de transfusões de sangue, o que intensifica a acumulação de ferro [22].

## **2.3. Distúrbios secundários**

A sobrecarga de ferro no organismo e a sua acumulação em excesso no fígado pode aumentar a lesão hepática na presença de outros fatores, tal como o álcool, quando consumido regularmente em doses elevadas, e uma dieta rica em ferro hémico.

Nos doentes que fazem transfusões sanguíneas, por cada ml de sangue recebido, cerca de 1mg de ferro entra no organismo, de forma eficaz, evitando os mecanismos de regulação que controlam a absorção do ferro pelos enterócitos [14].

As infeções e as doenças inflamatórias são uma causa comum de má distribuição de ferro, mediada pelo aumento das concentrações plasmáticas de hepcidina que restringem a liberação de ferro a partir de macrófagos e hepatócitos. Este mecanismo de proteção do hospedeiro diminui a absorção de ferro proveniente da dieta, limitando a síntese de hemoglobina, contribuindo para uma situação de anemia [14].

Algumas doenças crónicas interferem na acumulação de ferro no fígado, aumentando as suas lesões. A patofisiologia da sobrecarga de ferro na hepatite C crónica (HCV) é uma combinação da libertação de ferro pelos hepatócitos necróticos, um efeito direto da HCV na homeostasia do ferro, com a presença de mutações no Hfe ou desregulação da hepcidina. A esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) caracteriza-se pela acumulação de gordura associada a uma inflamação do fígado, não estando relacionada com o consumo de álcool, podendo apresentar um carácter benigno ou evoluir para cirrose ou mesmo carcinoma hepatocelular. O ferro hepático pode provocar stresse oxidativo, contribuindo para a evolução da doença. Na doença hepática alcoólica o ferro e o álcool atuam sinergicamente, contribuindo para o aumento do dano hepático. O álcool e os seus metabólitos produzem ROS e produtos de peroxidação lipídica, que causam danos celulares nos hepatócitos. A porfiria cutânea tardia (PCT) resulta de uma anomalia na produção do grupo heme da hemoglobina, apresentando elevadas quantidades de ferro no fígado, caracterizada por erupções vesículo-bolhosas nas mãos e na cara [16].

A sobrecarga de ferro Africana é predominante em vários países da África subsariana e tem sido atribuída ao consumo elevado de cerveja fermentada rica em ferro, fabricada tradicionalmente em casa [16].

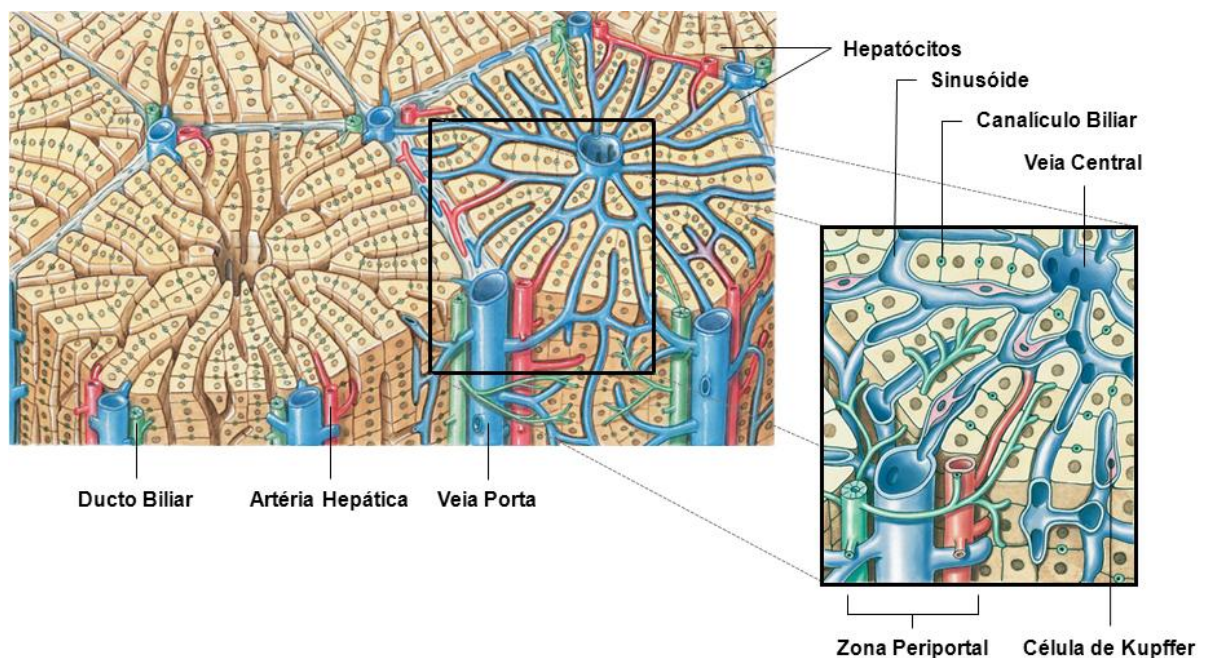
A hemocromatose neonatal é uma doença fulminante caracterizada pela elevada sobrecarga de ferro no fígado, bem como no miocárdio e nas células acinares pancreáticas e insuficiência hepática no período perinatal. O transplante de fígado é o tratamento primário, apesar da sua elevada taxa de insucesso [8].

### **3. Sobrecarga de ferro no fígado**

Os lóbulos hepáticos são principalmente constituídos por hepatócitos dispostos em camadas finas que irradiam a partir da veia central para a periferia do lóbulo. A biliar, produzida pelos hepatócitos, é drenada pelos canalículos biliares que formam o ducto biliar, que a conduz até à vesícula biliar. Entre as linhas radiais dos hepatócitos formam-se pequenos vasos sanguíneos, os sinusóides, que são revestidos por células endoteliais

sinusoidais. Os sinusóides recebem sangue rico em oxigênio da artéria hepática e nutrientes da veia porta. Dentro dos sinusóides encontram-se macrófagos envolvidos na reciclagem de eritrócitos, denominados células de Kupffer (Figura 6).

Na zona perisinusoidal, entre os sinusóides e os hepatócitos, denominado espaço de Disse, estão presentes as células estelares hepáticas (células de Ito). Estas células primárias, quando ativadas, são responsáveis pela produção de colagénio tipo I, estando por isso envolvidas na produção de fibrose hepática [23]. A fibrose hepática é um processo dinâmico e progressivo caracterizado pela deposição de matriz extracelular (ECM). O fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ 1) é a citocina pro-fibrótica mais proeminente que contribui para o desenvolvimento da fibrose hepática [24]. O aumento da sua sinalização num fígado fibrótico estimula a diferenciação das células estreladas hepáticas para miofibroblastos, positivos para  $\alpha$ -SMA (actina do musculo liso alpha), que são os principais produtores das proteínas da matriz extracelular. Esta isoforma da actina que contribui para a tensão mecânica gerada pelas células, está normalmente presente nas células do músculo liso dos vasos. Porém, também pode ser expressa em algumas células não musculares, a maior parte miofibroblastos presentes em cicatrizes e lesões fibrocontrativas, onde contribuem para a formação de fibrose [25]. O colagénio tipo I, principal componente dos tecidos fibróticos, é codificado pelo gene do Col1a1 [24].



**Figura 6** – Ilustração esquemática dos lóbulos hepáticos e dos seus componentes celulares (adaptado de [26]).

Por ser o principal órgão de armazenamento de ferro, acumulando cerca de 70% do ferro total acumulado no organismo [27], o fígado é o primeiro órgão afetado em doenças associadas à sobrecarga de ferro. O ferro catalisa a formação de radicais de oxigénio que promovem o dano celular e a ativação das células estelares hepáticas, levando ao aparecimento de fibrose e cirrose [28]. Os pacientes assintomáticos podem apresentar apenas um aumento do tamanho do fígado no exame físico ou níveis elevados das transaminases séricas. Cerca de 38-97% dos pacientes desenvolvem ferro hepático significativo, mas apenas 2-25% evoluem para fibrose hepática enquanto 4-6% desenvolvem cirrose [19]. A progressão para cirrose depende da duração da sobrecarga de ferro, a gravidade, e a presença de outros fatores de risco, como a hepatite viral crónica ou abuso de álcool. Uma vez estabelecida, a cirrose é irreversível por flebotomia [13].

A acumulação de ferro ocorre em primeiro lugar nas células Kupffer e nos hepatócitos, mas a distribuição celular da acumulação de ferro é descrita de acordo com as áreas lobulares de forma a diferenciar os diferentes tipos de siderose hepática [28]. A sobrecarga de ferro ao longo do parênquima está associada a uma hiperabsorção intestinal do ferro. O ferro entra no fígado pela veia portal e deposita-se nos hepatócitos como finos grânulos no pólo biliar das células e distribui-se pelo lóbulo de acordo com um gradiente decrescente desde as áreas periportais até às áreas centrolobulares. A deposição de ferro na zona mesenquimal pode ser observada numa fase mais tardia, quando a quantidade de ferro nos hepatócitos é mais elevada e responsável por sideronecrose [28].

Os doentes com Hemocromatose Hereditária apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, principalmente em pacientes com cirrose estabelecida. O risco aumenta na presença de outros co-fatores, tais como o abuso de álcool, hepatite viral, sexo masculino e idade acima de 55 anos. O sexo feminino tem menor propensão devido às perdas de sangue durante o parto e durante os períodos menstruais, adiando o desenvolvimento de cirrose e o aparecimento de carcinoma hepatocelular [16].

A flebotomia é o principal tratamento utilizado para aumentar a sobrevivência e diminuir as condições associadas à hemocromatose primária, associado a um diagnóstico precoce. Através deste método é removido cerca de 450 a 500 ml de sangue por semana enquanto os valores de ferritina sérica forem superiores a 50 mg/L. Quando esse valor é atingido, o tratamento de manutenção é realizado apenas de 3 em 3 meses [29].

## 4. Stresse Oxidativo

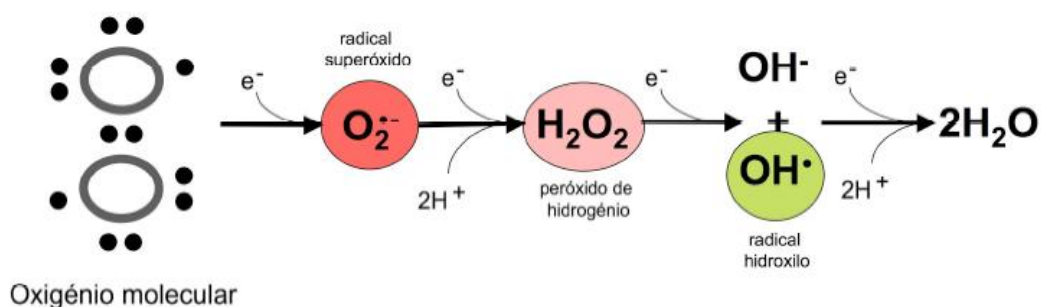
### 4.1. Espécies Reativas de Oxigénio

Apesar do oxigénio ( $O_2$ ) que respiramos ser fundamental para a produção eficiente de energia na mitocôndria, a suas propriedades tóxicas e mutagénicas exigem que as células do nosso organismo estejam providas de defesas antioxidantes [30].

A maior parte dos efeitos nefastos do oxigénio é devido às ROS, podendo ser radicais livres ou não radicais. Os radicais livres são capazes de existir de forma independente e contêm um ou mais eletrões desemparelhados, conferindo-lhes reatividade e instabilidade química. Devido à sua instabilidade, tendem a interagir com outras moléculas na sua proximidade, através da captação (oxidantes) ou da cedência (redutores) de eletrões ou átomos de hidrogénio. Deste modo, quando presentes em elevadas concentrações, podem induzir alterações severas na estrutura de moléculas fundamentais para a manutenção da homeostasia celular, resultando numa possível perda de funcionalidade ou viabilidade da célula. As espécies reativas não radicais, apesar de não conterem qualquer eletrão desemparelhado, são altamente reativas e potencialmente tóxicas para o organismo, por serem potenciais geradoras de radicais livres [31].

De acordo com a configuração eletrónica da sua molécula, o oxigénio é considerado uma molécula potencialmente oxidativa pela sua tendência para captar eletrões. Através da redução do oxigénio molecular com um, dois ou três eletrões, origina-se, respetivamente, o  $O_2^{\cdot-}$  (radical superóxido), o  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogénio) ou o  $HO^{\cdot}$  (radical hidroxilo) (Figura 7) [31].

Para além das ROS, existem outras espécies reativas associadas a outros átomos, como o carbono, o nitrogénio e o enxofre. Contudo, as ROS apresentam maior relevância biológica, não só devido à sua elevada toxicidade e às repercussões orgânicas que acarretam, mas também pelo facto de serem as mais prevalentes nos organismos vivos que utilizam o oxigénio como comburente (Tabela 2) [31].



**Figura 7** - Redução da molécula de oxigénio a água, com o conjunto de reações intermédias não enzimáticas que justificam a formação de espécies reativas de oxigénio na cadeia de transporte de eletrões (adaptado de [31]).

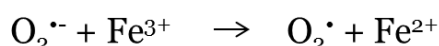
**Tabela 2** – Espécies reativas de oxigénio, radicais e não- radicais, potencialmente sintetizados nos organismos que utilizam o oxigénio como comburente [31].

Espécies Reactivas de Oxigénio	
<b>Radicais:</b>	<b>Não-Radicais:</b>
$O_2^{\cdot-}$ Superóxido	$H_2O_2$ Peróxido de hidrogénio
$OH^{\cdot}$ Hidroxilo	$HOCl^{\cdot}$ Hipoclorato
$RO_2^{\cdot}$ Peroxilo	$O_3$ Ozono
$RO^{\cdot}$ Alcoxilo	$^1O_2$ Singleto de oxigénio
$HO_2^{\cdot}$ Hidroperoxilo	$ONOO^{\cdot}$ Peroxinitrito

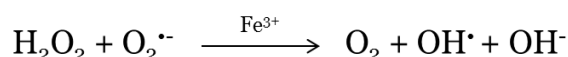
#### 4.2. Reações de Fenton e de Haber-Weiss

Apesar de ser essencial para o crescimento e sobrevivência dos organismos, o ferro assume, ao mesmo tempo, um papel nefasto devido à sua capacidade de induzir stresse oxidativo nas células, catalisando a formação de espécies reativas de oxigénio. Assim, apesar da sua abundância, a aquisição e transporte de ferro constitui um desafio para as células e organismos, devido à sua baixa solubilidade e elevada toxicidade [7].

O ciclo redox do  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , na presença de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ , fisiologicamente produzidos durante a respiração aeróbia e reações enzimáticas, produzem  $HO^{\cdot}$  [7]. Em solução, o  $Fe^{3+}$  é o estado oxidado do ferro mais estável. Por outro lado, a oxidação do ferro na sua forma livre  $Fe^{2+}$  reage com o  $H_2O_2$ , resultando na produção de uma molécula de  $OH^{\cdot}$ , através da reação de Fenton. O  $Fe^{3+}$  pode ser novamente reduzido a  $Fe^{2+}$ , sob a ação do  $O_2^{\cdot-}$  [30]:



Estas duas reacções, na presença de quantidades catalíticas de ferro, originam  $O_2$ ,  $HO^{\cdot}$  e aniões hidroxilo ( $OH^-$ ), através da reacção de Haber-Weiss [30]:



O  $HO^{\cdot}$  é a ROS que mais alterações estruturais induz nos sistemas biológicos, ao retirar um átomo de hidrogénio aos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, iniciando o processo de peroxidação lipídica, com as consequentes alterações estruturais e funcionais membranares [30]. Um dos maiores mecanismos de toxicidade



do  $O_2^{\cdot-}$  nas células é a sua capacidade para libertar quantidades de ferro da ferritina, necessárias à reação de Fenton [32].

Considerando que o ferro é um dos principais contribuintes para o stresse oxidativo nas células e é necessário à formação de ROS, há uma relação significativa entre a homeostasia do ferro e os mecanismos de resistência ao stresse oxidativo [33].

#### **4.3. Consequências do Stresse Oxidativo**

Nos seres vivos saudáveis, a produção de ROS é compensada pelos sistemas biológicos que as eliminam ou reparam os danos causados nas estruturas fundamentais das células afetadas. Se esse equilíbrio for perturbado ou se os sistemas de reparação ou substituição falharem, as células ficam em estado de stresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua desintoxicação através dos elementos antioxidantes, podendo comprometer a viabilidade das células [34].

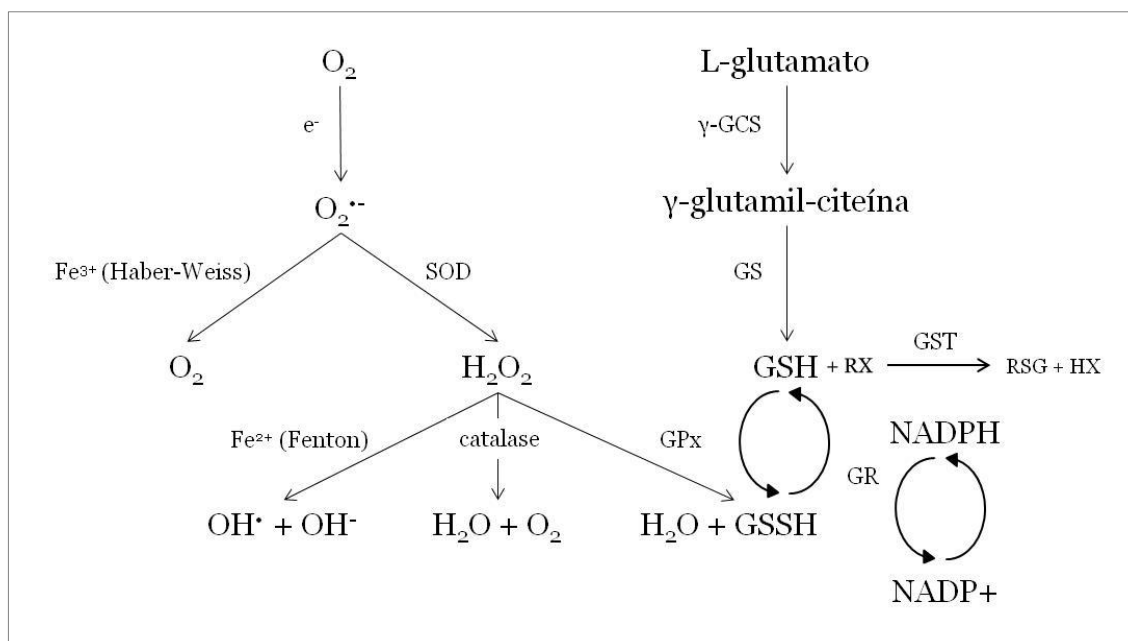
As consequências do stresse oxidativo e os alvos principais dependem do tipo de célula, do tipo de stresse imposto e da sua severidade. Muitas células respondem a uma situação de stresse oxidativo leve aumentando a taxa de proliferação ou adaptando-se ao próprio ambiente aumentando a síntese de defesas antioxidantes, de forma a restabelecer o equilíbrio. Em situações de stresse oxidativo elevado, a homeostasia das células fica comprometida devido ao dano causado em estruturas moleculares fundamentais como nos lípidos, no ADN, nas proteínas e nos carboidratos, podendo as células entrar em estado senescente, que permite a sua sobrevivência apesar de perderem a capacidade de se dividir [30].

Após a lesão, as células podem recuperar através de processos de reparação das moléculas danificadas, ou sobreviver mesmo com stresse oxidativo persistente. Por outro lado, as lesões devido ao stresse oxidativo, principalmente no ADN, podem levar à morte celular por apoptose, necrose ou outros mecanismos de morte celular [30], comprometendo a viabilidade do órgão lesado.

#### **4.4. Sistema de defesa antioxidante**

Os sistemas de defesa antioxidantes englobam substâncias biológicas ou obtidos a partir da dieta, que retardam, impedem ou eliminam os danos oxidativos de uma molécula alvo. *In vivo*, a presença de stresse oxidativo é evidenciado através do aumento dos sistemas de defesa antioxidantes, sugerindo que a célula está a responder e a tentar contrariar os efeitos causados pelo stresse oxidativo [30].

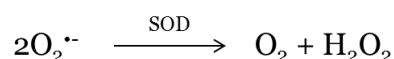
A interacção entre os vários sistemas antioxidantes descritos anteriormente estão sistematizado na Figura 8.



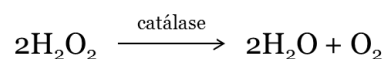
**Figura 8** – Sequência de eventos de eliminação do  $O_2^{\bullet-}$ . Inicialmente, os doadores de elétrons convertem o  $O_2$  em  $O_2^{\bullet-}$ . Através da reação de Haber-Weiss, o  $Fe^{3+}$  converte-o em  $O_2$ . A SOD elimina-o através da formação de  $H_2O_2$ , que é eliminado através da reação de Fenton, da catalase e da GPx. A GSH é sintetizada através da  $\gamma$ -GCS e da GS, e participa na reação catalisada pela GPx, através da sua oxidação a GSSH. A GR catalisa a redução da GSSH a GSH, através da oxidação do NADPH. A conjugação de muitos xenobióticos com a GSH é catalisada pela da GST. (adaptado de [35] e [36]).

As enzimas antioxidantes que efetivamente eliminam cataliticamente as ROS são a dismutase do superóxido (SOD), a catalase e a peroxidase da glutathiona (GPx).

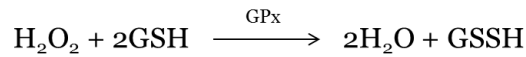
A SOD elimina o  $O_2^{\bullet-}$ , convertendo-o em  $O_2$  e em  $H_2O_2$  [35]:



Para além das reações de Fenton e de Haber-Weiss, também as enzimas catalase e GPx atuam coordenadamente para eliminar  $H_2O_2$  produzido pelo SOD e por outras fontes. A catalase catalisa diretamente a decomposição do  $H_2O_2$  em  $O_2$  [35]:

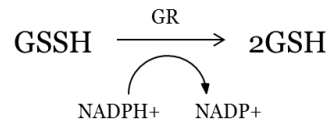


A GPx remove o  $H_2O_2$  utilizando-o na oxidação de outro substrato, preferencialmente oxidado pelas ROS, de forma a preservar as biomoléculas mais importantes, através oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSH) [35]:



A glutationa ( $\gamma$ -L-glutamina-L-cisteína glicina; GSH) modula os níveis fisiológicos de ROS e está envolvida na resposta ao stresse oxidativo da célula. É sintetizada no citoplasma de todas as células animais, catalisada pela  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase ( $\gamma$ -GCS) e pela glutationa-sintetase (GS), sendo o fígado o órgão mais ativo (Figura 8) [35].

A redutase da glutationa (GR) catalisa a redução da GSSH a GSH, através da oxidação da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Esta enzima contribui para o ciclo redox normal da glutationa total (GSX), mantendo os níveis de GSH celular adequados [30]:



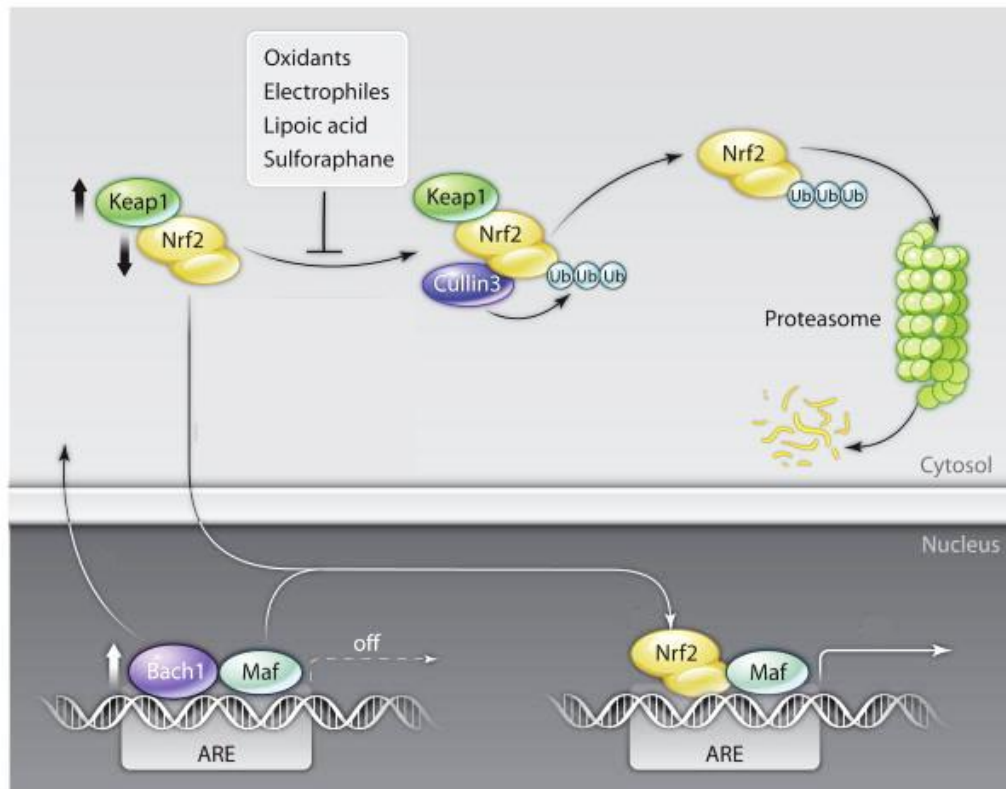
Muitos xenobióticos são metabolizados em conjunto com a GSH, catalisada pela S-transferase da glutationa (GST), que promove a sua conjugação. Desta forma, a presença de elevadas quantidades de xenobióticos pode levar à diminuição da concentração de GSH hepática, prejudicando a capacidade de defesa antioxidante do fígado [30].



## 5. A via de sinalização do Nrf2

Devido aos danos celulares e ao conseqüente desenvolvimento de patologias provocados pelos ROS e pelos eletrófilos, as células desenvolveram mecanismos dinâmicos e adaptativos para contrariar o stresse celular, através da produção de enzimas e proteínas antioxidantes [37], que previnem a morte celular. Normalmente, as enzimas de desintoxicação não estão expressas na sua capacidade máxima mas são altamente induzíveis por ativação transcricional, conferindo uma proteção catalítica, versátil e de longa duração contra o dano oxidativo [38].

A indução desta resposta protetora necessita da ativação da via Keap1-Nrf2-ARE. O fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear eritróide 2 - fator relacionado 2) controla a transcrição de enzimas antioxidantes e enzimas responsáveis pela produção de antioxidantes. Quando a célula está exposta a uma produção descontrolada de agentes oxidantes e eletrófilos, o Nrf2 entra no núcleo e forma um heterómero com membros da família das *small* MAFs que reconhece e se liga aos elementos de resposta antioxidante (AREs) que são sequências de ADN localizadas na região promotora dos genes antioxidantes alvo. Esta ligação permite recrutar elementos transcricionais para a expressão e ativação dos genes regulados. Em condições basais, a atividade do Nrf2 é negativamente regulada pelo Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), uma proteína repressora citosólica que se liga ao Nrf2, que reprime a sua atividade transcricional e promove a sua degradação proteossomal por ubiquitinação. O Keap1 é constituído por resíduos de cisteína que funcionam como sensores primários de sinais de stresse. A modificação oxidativa resulta na sua conformação do Keap1, permitindo a libertação do Nrf2, que se desloca para o núcleo, procedendo à transcrição de genes antioxidantes [39] (Figura 9).



**Figura 9** – A indução da resposta antioxidante depende da transcrição de genes que codificam proteínas com funções antioxidantes e citoprotectoras. Esta resposta transcricional é regulada pelo Nrf2 através da sua ligação aos AREs, que recruta os elementos transcricionais. Na ausência de stresse oxidativo, o Keap1 promove a degradação do Nrf2 [39].

O grande espectro de genes e vias reguladas pelo Nrf2 em resposta a xenobióticos comprova que este fator de transcrição está envolvido na regulação de várias vias metabólicas, importantes para a sobrevivência da célula. Em resposta ao stresse oxidativo, o Nrf2 coordena a regulação da expressão de antioxidantes, como a SOD e a OH-1, de genes associados à via da glutatona, como a GPx, a GR, e de enzimas de regeneração do NADPH. O Nrf2 coordena ainda a expressão de enzimas destoxicantes de xenobióticos, como a GST e a Nqo1 (NADPH Quinona Oxireductase 1) [38]. Estas enzimas antioxidantes e de desintoxicação de xenobióticos atuam de forma coordenada com o objetivo de atenuar os danos causados por ROS e eletrófilos.

Vários estudos anteriores demonstraram que o Nrf2 protege o fígado de várias toxinas hepáticas através da indução de genes antioxidante, atenuando o stresse oxidativo celular. Liu J. *et. al.* [40], através do estudo de 14 hepatotóxicos em murganhos C57BL/6, demonstraram que a ativação gradual do Nrf2 oferecia uma proteção, totalmente dependente do Nrf2, contra a hepatotoxicidade conferida por tetracloreto de carbono, paracetamol, microcistina, faloidina, furosemida, cádmio e ácido litocólico. A sua ativação também ofereceu uma proteção moderada contra o dano hepático provocado por etanol, arsénio, bromobenzeno e álcool alílico. Por outro lado, Reisman A. *et. al.* [41], através da utilização de CDDO-Im, um indutor de genes citoprotetores através da via do Keap1-Nrf2-ARE, e da administração de acetaminofeno em murganhos C57BL/6 Nrf2<sup>-/-</sup>, comprovaram que o CDDO-Im induz a expressão de genes citoprotetores dependentes do Nrf2, protegendo o fígado do dano hepático induzido pelo acetaminofeno.

Num estudo anterior, realizado por Silva-Gomes S. *et. al.*[42], foi observado que os murganhos Nrf2<sup>-/-</sup> desenvolvem lesões hepáticas marcadas quando alimentados com uma dieta enriquecida com ferro. Assim, o Nrf2 protege o fígado de murganhos contra a toxicidade proveniente de uma dieta enriquecida com ferro, prevenindo a morte celular dos hepatócitos. O Nrf2 foi assim identificado como um potencial modificador da doença hepática em patologias associadas ao excesso de ferro.



## II. Objetivos

---

## II. Objetivos

A maior parte dos indivíduos com HH são homozigóticos para a mutação C282Y no gene Hfe. A razão pela qual alguns desses doentes desenvolvem formas clinicamente severas da doença enquanto outros permanecem aparentemente saudáveis continua por esclarecer. A hipótese na qual este estudo se apoia sugere que a resistência celular ao stresse oxidativo, provocado pela acumulação excessiva de ferro, impede a progressão da doença na HH, associada à mutação do gene Hfe e noutras patologias associadas à sobrecarga de ferro.

Este estudo pretendeu relacionar o eventual desenvolvimento de lesões hepáticas em murganhos Hfe<sup>-/-</sup> (modelo animal de HH onde a deposição de ferro ocorre espontânea e gradualmente) e a supressão genética do fator de transcrição Nrf2. Desta forma, pretendeu-se avaliar o papel da via de sinalização coordenada pelo Nrf2 na homeostasia do ferro e na proteção contra a toxicidade hepática do ferro.



### **III. Material e Métodos**

---

### III. Material e Métodos

#### 1. Material

A menos que indicado de outra forma, todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos de Sigma-Aldrich, Alemanha.

#### 2. Manutenção dos animais

Para a elaboração do trabalho experimental foram usados murganhos do sexo feminino com background genético C57BL/6 (B6) provenientes da empresa Charles River (Espanha) e subsequentemente criados no biotério do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC). Além do grupo controlo (B6), foram utilizados murganhos *knock-out* para o gene Hfe (Hfe<sup>-/-</sup>), murganhos *knock-out* para o gene Nrf2 (Nrf2<sup>-/-</sup>) obtidos de Riken (Japão), e murganhos duplo *knock-out* para os genes Hfe e Nrf2 (Hfe/Nrf2<sup>-/-</sup>), gerados especificamente para a elaboração deste trabalho experimental. Os animais foram alojados no biotério do IBMC com condições de temperatura (~22°C) e luz controladas (12 horas luz/12 horas escuro), e água e dieta *ad libitum*. Os animais foram alimentados com dieta standard para roedores (*Global RodentDiet*, Harlan, Estados Unidos da América - EUA) durante todo o tempo de experimentação e pesados no final de cada experiência. As experiências foram realizadas em conformidade com as recomendações da Convenção Europeia para a Proteção de Animais Vertebrados usados para Experimentação ou outros Propósitos Científicos (ETS123) e com as Diretivas 86/609/EEC e Regras Portuguesas (DL 129/92). O protocolo utilizado para a experimentação animal foi aprovado pela autoridade nacional competente Direção Geral de Veterinária (DGV) e pelo comité ético do Instituto.

A experiência realizada consistiu em três tempos experimentais. Os murganhos foram mantidos no biotério, alimentados com dieta standards para roedores durante todo o tempo de experimentação. Ao fim de 6, 12 e 18 meses de vida, os murganhos foram sacrificados. No primeiro tempo experimental, os animais foram divididos em dois grupos, em que um dos grupos foi alimentado com uma dieta enriquecida com ferro (0,5%), durante as últimas 12 semanas de vida. Em cada tempo experimental foram sacrificados 4 a 8 animais por grupo, tal como indicado na tabela 3. No final de cada experiência, os animais foram anestesiados com isoflurano (B. Braun Medical, Portugal) e uma amostra de sangue foi colhida por via retro-orbital. Após o sacrifício com dose terminal de isoflurano e deslocamento cervical, foram colhidas amostras de fígado.

**Tabela 3**– Amostragem dos 3 tempos experimentais decorridos durante 6, 12 e 18 meses.

	6 meses	6 meses dieta rica em ferro	12 meses	18 meses
B6	8	6	6	6
Nrf2 <sup>-/-</sup>	4	5	6	6
Hfe <sup>-/-</sup>	4	5	4	6
Hfe/Nrf2 <sup>-/-</sup>	6	8	4	5
Total	22	24	20	23

### 3. Métodos

#### 3.1. Parâmetros hematológicos

Para a contagem de células vermelhas, quantificação da hemoglobina e determinação do hematócrito, 150 µL do sangue colhido foram diluídos em PBS heparinizado numa diluição de 1:1. Devidamente identificadas, as amostras foram encaminhadas para o Centro Hospitalar do Porto (Serviço de Hematologia Clínica, Hospital de Santo António), onde foram obtidos os parâmetros hematológicos por citometria (Coultercounter Beckman LH-780).

#### 3.2. Quantificação dos marcadores no soro

Para a determinação do ferro no soro, o sangue colhido foi centrifugado a 13 000 rpm durante 10 minutos e recolhido o soro limpo. Os soros obtidos foram transferidos para novos tubos devidamente identificados, e encaminhados para o Centro Hospitalar do Porto (Serviço de Bioquímica Clínica, Hospital de Santo António).

O ferro não hémico no soro e a capacidade total de ligação do ferro (TIBC) foram quantificados recorrendo aos métodos guanidina-ferrozina e ferrozina, respetivamente, por espectrofotometria. A partir desses valores, foi possível determinar a concentração e a saturação da transferrina através das fórmulas I e II:

$$[I] \quad \text{Transferrina (Tf) (mg/dL)} = \frac{TIBC_{(\mu\text{g} / \text{dL})}}{1,41}$$

$$[II] \quad \text{Saturação da transferrina (sTf) (\%)} = \frac{[Fe] \times 100}{Tf \times 1,41}$$

A quantificação da atividade das transaminases ALT (alanina transaminase) e AST (aspartato aminotransferase) no soro foi efetuada de acordo com o método descrito pela “Federação Internacional de Química Clínica” (IFCC) no Centro Hospitalar do Porto (Serviço de Bioquímica Clínica, Hospital de Santo António), por espectrofotometria.

Todos os marcadores quantificados por espectrofotometria recorreram à utilização de um autoanalisador (Cobas C8000 - RocheDiagnosis).

### 3.3. Quantificação de ferro não-hémico no fígado

A quantidade de ferro não hémico dos tecidos foi medida através do método da batofenantrolina [43]. As amostras de fígado, com cerca de 120 mg, foram colocadas em copos Teflon livres de ferro, (ACV – Advanced Composite Vessels, CEM Corporation, Mathews, NC, USA) e posteriormente secas num micro-ondas próprio (MDS 2000, CEM Corporation, Mathews, NC, USA), durante 2 horas. Posteriormente, as amostras secas foram pesadas e digeridas em 1 mL de solução de mistura ácida (30% de ácido hidrocórico e 10% de ácido tricloroacético) durante 20 horas a 65°C. Após digestão, transferiu-se 500 µL do sobrenadante para um novo tubo. Para a preparação das amostras, adicionou-se 1000 µL de reagente cromogénio (5 volumes de água desionizada, 5 volumes de acetato de sódio saturado e 1 volume de reagente cromogénio – 1mg/mL sulfonato batofenantrolina e 10 µL/mL ácido tioglicólico) num novo tubo. Neste volume diluiu-se 25 µL de sobrenadante de amostra. O branco foi preparado da mesma forma, mas em vez da amostra adicionou-se igual volume de solução de mistura ácida, anteriormente sujeita às mesmas condições de digestão das amostras. A solução standard foi preparada adicionando 1000 µL de reagente cromogénio, 150 µL de solução padrão de Fe (5,4 µL/mL de ácido clorídrico a 36,5% e 10 µL/mL de solução stock de padrão de Fe - 1,115 mg/mL FeC, 54,8 µL/mL ácido clorídrico a 36,5%) e 150 µL de H<sub>2</sub>O destilada. A quantidade de água destilada final adicionada às várias soluções permitiu perfazer o volume final de 1300 µL.

Da reação entre o reagente cromogénio e o Fe obteve-se um produto com cor que foi medido por espectrofotometria a 535 nm. As quantidades de Fe no tecido seco e no tecido fresco foram calculadas através da equação III e da equação IV, respetivamente. Tendo em conta a concentração de Fe no tecido fresco, calculou-se a quantidade de Fe não-hémico total no fígado, através da equação V.

$$[III] \quad [\text{Fe}] \text{ no tecido seco } (\mu\text{g/g tecido seco}) = \frac{A_A - A_B}{A_S - A_B} \times \frac{Fe_s}{P_s} \times \frac{\frac{V_f}{V_{am}}}{\frac{V_f}{V_{STD}}}$$

$$[IV] \quad [\text{Fe}] \text{ no tecido fresco } (\mu\text{g/g tecido fresco}) = \frac{Fe_{ts}}{\frac{P_f}{P_s}}$$

$$[V] \quad \text{Fe total } (\mu\text{g}) = \frac{P_t}{Fe_{tf}}$$

$A_A$  (absorvância da amostra),  $A_B$  (absorvância do branco),  $A_S$  (absorvância do standard);  $Fe_s$  (concentração do ferro do standard = 11.169  $\mu\text{g/Fe ml}$ );  $P_s$  (peso seco da amostra de tecido usada (g));  $V_f$  (volume final da mistura (1300  $\mu\text{l}$ ));  $V_{am}$  (volume de amostra digerida usado),  $V_{STD}$  (volume de standard (150  $\mu\text{l}$  de solução padrão de Fe));  $Fe_{ts}$  (ferro tecido seco ( $\mu\text{g/g}$ )),  $P_f$  (peso tecido fresco (g)),  $P_s$  (peso tecido seco (g));  $P_t$  (Peso do órgão e tubo (g)),  $Fe_{tf}$  (Ferro tecido fresco ( $\mu\text{g/g}$  tecido fresco)).

### 3.4. Análise histológica do fígado

Após a extração do fígado, foram cortados pequenos fragmentos de tecido, com cerca de 0,5 cm de espessura, e fixados em Formol 4% durante 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os fragmentos foram processados num processador histológico automático que permitiu a sua desidratação através de uma série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanização em *clearRite* e impregnação em parafina, durante 1 hora em cada solução. Após o processamento, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina, cortados em secções de 3  $\mu\text{m}$  e as lâminas com os cortes foram secas a 37°C durante a noite. Os cortes de tecido foram desparafinados em dois banhos de xilol e hidratados através de uma série decrescente de álcoois (100%, 95%, 70% e 50%) e água destilada, durante 10 minutos em cada solução.

A coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) é a mais utilizada das colorações histológicas por ser uma técnica simples de executar, com capacidade para demonstrar claramente um enorme número de diferentes estruturas tecidulares [44]. Nesta coloração, os tecidos hidratados foram corados com hematoxilina de Mayer durante 5 minutos e posteriormente lavados em água corrente durante 5 minutos. Foram depois corados com Eosina (Merck, Alemanha) a 0,1% durante 1 minuto e lavadas em água destilada. Por fim, foram desidratados numa série crescente de álcoois (50%, 70%, 95% e 100%) durante 30 segundos em cada solução e diafanizados em xilol até à montagem com *entellan*.

Na coloração de Perls o tratamento dos tecidos é feito com uma solução ácida de ferrocianidro, resultando no desmascaramento do ferro férrico na forma de hidróxido  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , através da diluição do ácido hidrolórico. Desta forma, o ferro férrico reage com a solução de ferrocianeto de potássio diluído de forma a produzir um composto azul insolúvel, o ferrocianeto férrico (*Prussian Blue*) [44]. Os tecidos foram submersos na

solução de Perls (ferrocianeto de potássio a 2% com ácido hidrolórico a 2%) durante 30 minutos e lavados posteriormente em água destilada durante 5 minutos. O contraste foi feito com a solução corante *Nuclear Fast Red* durante 20 minutos. Após a lavagem com água destilada, os cortes foram desidratados numa série crescente de álcoois (50%, 70%, 95% e 100%) durante 30 segundos em cada solução e diafanizados em xilol até à montagem com *entellan*.

A coloração de *Sirius Red* é uma das técnicas histoquímicas mais utilizadas para evidenciar fibras de colagénio [44]. Os tecidos foram inicialmente contrastados com hematoxilina de Mayer durante 8 minutos e posteriormente lavados em água corrente durante 5 minutos. De seguida os cortes foram corados com a solução de *Sirius Red* a 0,1% durante 1 hora e posteriormente diferenciados com água acidificada 0,5%. Após lavagem com água destilada, os cortes foram desidratados em álcool 100%, diafanizados em xilol e montados com *entellan*.

Através da observação dos cortes histológicos corados com Perls avaliou-se a distribuição ferro nas células do parênquima do fígado. Este método, descrito por Nash *et al* [45], caracteriza o teor de ferro corado em 4 graus diferentes. O grau 0 representa a ausência de ferro corado nas células do fígado e os graus de 1 a 3 representam a sucessiva acumulação de ferro no parênquima, desde a deposição predominante de ferro na zona periportal (grau 1), que se estende até à zona média do parênquima (grau 2), atingindo os hepatócitos centrolobulares (grau 3). Perante uma classificação intermédia entre dois graus, foi sempre considerado o grau superior. A acumulação de ferro presente no tecido reticuloendotelial foi observada e registada mas não interferiu com esta classificação.

### **3.5. Imunohistoquímica contra a Ferroportina**

Dos mesmos blocos de parafina usados para as colorações histológicas, os fragmentos foram cortados em secções de 3 µm e colocadas em lâminas adesivadas com APES [(3-aminopropil)triétoxissilano], para melhor adesão do corte, posteriormente secos a 37°C durante a noite. Os cortes de tecido foram desparafinados utilizando o meu método anteriormente descrito.

Após hidratação das lâminas, procedeu-se à recuperação antigénica submergindo as lâminas em tampão citrato (10mM a pH 6.0) num micro-ondas a 700 Watts até ebulição e de seguida a 100 Watts durante 10 minutos. Após o arrefecimento da solução durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas em PBS com Tween20. De forma a evitar ligações não específicas, os cortes foram sujeito ao bloqueio com 5% de BSA em PBS com Tween20 durante 1 hora à temperatura ambiente. De seguida, a solução de bloqueio foi rejeitada e adicionado o anticorpo primário anti-ferroportina (Amgen 1C7) numa diluição

de 1:100 em PBS com 2,5% de BSA e Tween20, durante a noite a 4°C. Após a lavagem com PBS, procedeu-se à marcação com o anticorpo secundário (Sigma A6066) numa diluição de 1:100 em PBS com Tween20, durante 2 hora à temperatura ambiente. De seguida as lâminas foram lavadas com PBS com Tween20 e posteriormente submersas em PBS. O cromogénio utilizado para a revelação foi o NBT/BCIP. Esta solução, composta por 1 mL de tampão (0,1 M de Tris-HCL a pH 9.5 a 20°C, 0,1 M de NaCl e 0,05 M de MgCl<sub>2</sub>), 10 µL de Levamisole e 20 µL de NBT/BCIP, ficou a atuar nos tecidos durante cerca de 5 minutos, sendo a marcação controlada através da observação microscópica da lâmina usada como controlo positivo. Após lavagem com água destilada, os cortes foram contrastados com Verde Metilo durante 5 minutos e posteriormente lavados com água destilada, desidratados numa série crescente de álcoois e diafanizados em xilol até à montagem com *entellan*.

### **3.6. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes**

Para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, foram utilizados fragmentos de fígado homogeneizados em tampão fosfato (25 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM de NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e 0,1% Triton X-100 a pH 7,0). Do homogeneizado final, retirou-se 20 µL para quantificação de proteínas, e o restante foi centrifugado a 13 000xrpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi guardado em alíquotas a -80°C [46].

Para a determinação da atividade da catalase, o sobrenadante foi diluído 750x em solução amortecedora de fosfatos (SAF – 25 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 30 mM de NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O com pH 7,0). Foram adicionados 0,6 mL de amostra e 0,3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM numa cuvete de quartzo e, após agitação, leu-se a diminuição de absorvância. A leitura foi realizada num espectrofotómetro durante 30 segundos, a 240 nm [46, 47].

Para a determinação da atividade da SOD, o sobrenadante foi diluído 20x em SAF (50 mM de NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e 0,1 mM de EDTA.2Na.2H<sub>2</sub>O com pH 7,8) e posteriormente centrifugado a 15000xg durante 5 minutos. Em uma placa de 96 poços adicionou-se 200 µL de solução A (0,11% de xantina; 0,1 M de NaOH com 0,068% de NBT em SAF), 50 µL de sobrenadante do centrifugado, 50 µL de SAF e 50 µL de solução B (± 0,29 U/ml oxidase da xantina em EDTA 0,1 mM). A leitura espectrofotométrica da cinética foi realizada a 550 nm durante 2 minutos [46, 48].

Para a determinação da atividade da GR, o sobrenadante foi diluído 40x em SAF (200 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2 mM de EDTA.2Na.2H<sub>2</sub>O com pH 7,0) e posteriormente centrifugado a 15 000xg durante 5 minutos. Numa placa de 96 poços adicionou-se, 100 µL de SAF, 30 µL de GSSG a 10 mM, 90 µL de água destilada e 50 µL de sobrenadante do centrifugado. Após a adição de 30 µL NADPH (1 mM em Tris-HCl com pH 7,0 a 10

mM, protegido da luz), efetuou-se a leitura espectrofotométrica da cinética da reação a 340 nm durante 5 minutos [46, 49].

Para a quantificação da GSX e da GSSG, as amostras de sobrenadante do homogeneizado foram tratadas com igual volume de ácido perclórico (PCA) a 10% em SAF (57,3 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 81,2 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 0,62 mM de EDTA dissódico, com pH 7,5). Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 2 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi usado para o ensaio. Para a determinação da atividade da GSX, o sobrenadante da diluição inicial foi diluído 10x em PCA a 5%. A cada amostra foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{KHCO}_3$  (0,076 M com pH 7,4). Após centrifugação a 13 000rpm durante 1 minuto a 4°C, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante numa placa de 96 poços e 65  $\mu\text{L}$  de solução reagente (NADPH a 3,36 mM e *ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) ou DTNB* a 20 mM, em SAF), incubando posteriormente a 30°C durante 15 minutos. Por fim, adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de solução de redutase da glutatona (10 unidades por mL de SAF) e efetuou-se a leitura espectrofotométrica da cinética da reação a 405 nm durante 3 minutos. Para a determinação da atividade da GSSG, o sobrenadante da diluição inicial não foi diluído. A cada amostra foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de 2-vinilpiridina e a reação foi incubada durante 1 hora a 4°C, com agitação. A cada amostra foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{KHCO}_3$  a 0,076 M. Após centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto a 4°C, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante em uma placa de 96 poços e 65  $\mu\text{L}$  de solução reagente, incubando posteriormente a 30°C durante 15 minutos. Por fim, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de solução de redutase da glutatona e efetuou-se a leitura espectrofotométrica da cinética da reação a 405 nm durante 3 minutos. A GSH é determinada por cálculo, subtraindo a GSSG à GSX, através da seguinte fórmula [46, 50].

$$\text{GSH} = \text{GSX} - 2\text{GSSH}$$

Para a determinação da atividade da GST, o sobrenadante foi diluído 200x em SAF (100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 1 mM de  $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a pH 6,5) e posteriormente centrifugado a 15000xg durante 5 minutos. Numa placa de 96 poços adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de SAF, 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante do centrifugado da amostra e 15  $\mu\text{L}$  de GSH a 20 mM. Após a adição final de 15  $\mu\text{L}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (20 mM, em etanol a 95%) efetuou-se a leitura espectrofotométrica da cinética da reação a 340 nm durante 5 minutos, com intervalos de 1 minuto [46, 51].

Para a determinação da atividade da GPx, o sobrenadante foi diluído 200x em SAF (100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a pH 7,0) e centrifugado a 15 000xg durante 5 minutos. Numa placa de 96 poços foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de SAF, 30  $\mu\text{L}$  de sobrenadante do



centrifugado da amostra, de solução de GR (2,4 U/mL de SAF), de GSH (10 mM), de  $\text{NaN}_3$  (10 mM em SAF) e de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (10 mM em SAF), e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após a adição de 30  $\mu\text{L}$  de NADPH (1,5 mM em  $\text{NaHCO}_3$  a 0,1%) e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,5 mM), efetuou-se a leitura espectrofotométrica da cinética da reação a 340 nm durante 5 minutos, com intervalos de 1 minuto [46, 52].

### 3.7. Extração de ARN e síntese de ADNc de fígado

As amostras de fígado permaneceram guardadas a  $-80^\circ\text{C}$  até serem processadas. O ARN total das amostras de fígado foi extraído pelo método TRIzol (Life Technologies, EUA), de acordo com as indicações do fabricante. As amostras de tecido com peso variável entre 50 e 100 mg foram homogeneizadas em 1 mL de reagente TRIzol e posteriormente incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após centrifugação a  $12\ 000\times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, agitou-se vigorosamente e incubou-se 3 minutos à temperatura ambiente. Esta solução permite obter 3 fases após centrifugação a  $12\ 000\times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Na fase aquosa encontra-se o ARN, separado do ADN (interfase) e das proteínas (fase orgânica). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, misturou-se e deixou-se incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente, possibilitando a formação de precipitado de ARN. A centrifugação seguinte, a  $12\ 000\times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , permitiu a formação de um pellet de ARN no fundo do tubo, que foi depois lavado com 1 mL de etanol a 75%. Após a lavagem, centrifugou-se a  $7500\times g$ , durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e descartou-se o etanol, permitindo a secagem parcial do pellet à temperatura ambiente. Para ressuspender o pellet de ARN, foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de água purificada e incubou-se a  $60^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, até o pellet se dissolver completamente. O ARN foi de seguida quantificado e guardado a  $-80^\circ\text{C}$ . A concentração de ARN foi determinada por espectrofotometria a 260 nm no equipamento *NanoDrop* (ThermoScientific, EUA) e a sua integridade foi avaliada utilizando um sistema de eletroforese capilar automatizado conjuntamente com o kit *Experion RNAStdSensAnalysis* (Bio-Rad Laboratories, EUA).

A descontaminação do ADN das amostras de ARN com *DNase* foi realizada recorrendo ao kit *Turbo DNA-free* (Ambion, EUA). Para uma quantidade final de 4  $\mu\text{g}$  de ARN, adicionou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de *10x TURBO DNase Buffer* com 1  $\mu\text{L}$  de *TURBO DNase*, perfazendo um volume de 25  $\mu\text{L}$  com água livre de *RNases*. Após incubar durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , adicionou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de *DNase Inactivation Reagent* e incubou-se durante 2 minutos à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram centrifugadas a  $10000\times g$  durante 1,5 minutos e a solução final de ARN foi transferida para um novo tubo.

Para a síntese de ADNc foi utilizado o kit *ThermoScript RT-PCR System* (Life Technologies, EUA) de acordo com as indicações do fabricante. A 9 µL de amostra, adicionou-se 1 µL de *PrimerOligo (dT)* e 2 µL de *dNTP mix*. Após uma incubação durante 5 minutos a 65°C, as amostras foram colocadas em gelo e adicionou-se 4 µL de *5x cDNA Synthesis Buffer*, 1 µL de ditionotreitól (DTT) 0,1 M, 1 µL de *RNase OUT*, 1 µL de em água tratada com *DEPC* (Dietilpirocarbonato) e 1µL de *ThermoScript RT*. Após uma incubação durante 60 minutos a 55°C e 5 minutos a 85°C, adicionou-se 1 µL de *RNase H* e incubou-se durante 20 minutos a 37°C. Por fim as amostras foram diluídas 1:2 em água tratada com *DEPC* para inativar enzimas *RNase*.

### **3.8. Determinação da expressão genética**

A expressão genética dos animais foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR) utilizando o equipamento *iQ5 Real-Time PCR System* e o *iQSYBR Green Supermix* (*Bio-Rad Laboratories*, EUA) para amplificar e quantificar as reações.

As amostras utilizadas correspondem aos animais com 12 e 18 meses e as soluções padrão foram preparadas a partir de uma mix de 2 µL de cada amostra, em 3 diluições diferentes: 1, 1:10 e 1:100.

Numa placa de 96 poços adicionou-se, em duplicado, 1 µL de amostra ADNc ou 1 µL de cada padrão. A cada poço misturou-se 10 µL de *iQSYBR Green Supermix*, 0,08 µL de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*) e 8,84 µL de água livre de *RNase*.

As condições de amplificação foram: desnaturação a 95°C durante 3,5 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos (desnaturação), 59°C durante 45 segundos (*annealing*) e extensão a 72°C durante 30 segundos. Para a construção da curva de desnaturação recorreu-se a uma etapa final, com aumentos de 0,5°C num intervalo de temperaturas entre 55 a 95°C, com leitura de fluorescência a cada incremento de temperatura.

Os *primers* utilizados (STAB Vida, Portugal), descritos na tabela 4, foram desenhados de acordo com a sequência a amplificar através do programa *Primer3* (T. L. Duarte, comunicação pessoal), exceto os *primers* dos genes *Hamp* e *Gsta1* que foram retirados de outros trabalhos [53, 54] e os *primers* para *Hprt* (gene da enzima Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jorge Pinto (IBMC). A quantidade de cada transcrito foi estimada através da respetiva curva padrão e normalizada a partir do gene controlo endógeno, o gene *Hprt*.

**Tabela 4** – Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por qRT-PCR.

Gene	Sequência de <i>PrimerForward</i> (5'→ 3')	Sequência <i>Primer Reverse</i> (5'→ 3')
Hprt	AGATGGGAGGCCATCACATTGT	ATGTCCCCCGTTGACTGATCAT
Fpn1	TTGGTGACTGGGTGGATAAGAATGC	CGCAGAGGATGACGGACACATTC
Hamp [53]	CCTATCTCCATCAACAGATG	AACAGATACCACACTGGGAA
Acta2 ( $\alpha$ -Sma)	ACCCAGCACCATGAAGATCAAG	AGGTAGACAGCGAAGCCAGGA
Col1a1	TCCTGGCAACAAAGGAGACAC	GGGCTCCTCGTTTTCTTCT
Tgf- $\beta$ 1	CTAATGGTGGACCGCAACAAC	CACTGCTTCCCGAATGTCTGA
Nqo1	GTGCAGAAGCGAGCTGGAAATACTC	CGAATCTTGATGGAGGACTGGATGC
Gsta1 [54]	GACTGTGAGCTGAGTGGAGAAGAA	CCGGCCATTGCAGCAA

#### 4. Análise estatística

Os resultados expressos correspondem às médias dos valores obtidos em cada grupo e respetivo desvio padrão. Para determinar as diferenças significativas entre os grupos experimentais foi utilizada a análise de variância (“one-way ANOVA”) e o teste para múltiplas comparações de *Tukey*, recorrendo ao programa *GraphPadPrism* versão 5.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ .



## IV. Resultados

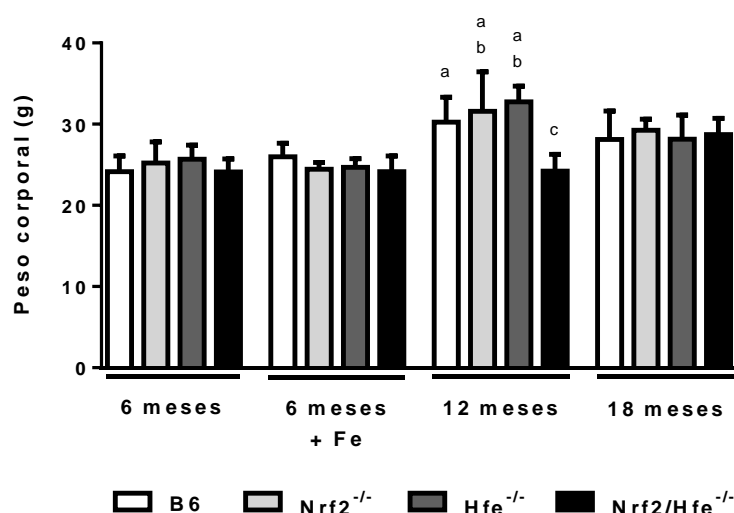
---

## IV. Resultados

Neste trabalho experimental foram comparados vários parâmetros entre murganços com os genótipos  $Hfe^{-/-}$ ,  $Nrf2^{-/-}$  ou  $Hfe/Nrf2^{-/-}$ , considerando como controlo os animais C57BL/6 (B6), que são *wild-type* para ambos os genes. Este estudo foi também elaborado numa perspetiva temporal, considerando animais com 6 meses, alimentados com uma dieta standard ou com uma dieta enriquecida com 0,5% de Fe nas 12 últimas semanas, 12 e 18 meses de vida.

### 1. Alteração do peso corporal

Todos os animais foram pesados antes do seu sacrifício (Figura 10). Aos 6 meses, quer com dieta standard, quer com dieta enriquecida com ferro, os diferentes grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas. Nos animais com 12 meses foi observado um aumento significativo do peso final em relação aos grupos correspondentes com 6 meses de idade, quer com dieta standard, quer com dieta enriquecida com ferro, à exceção do grupo  $Nrf2/Hfe^{-/-}$ . Este grupo, quando comparado com os outros grupos experimentais da mesma idade, registou uma diminuição significativa no peso final. Aos 18 meses de idade, os animais dos 4 grupos experimentais apresentaram um aumento de peso relativamente aos animais de 6 meses, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa, mas não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos experimentais.



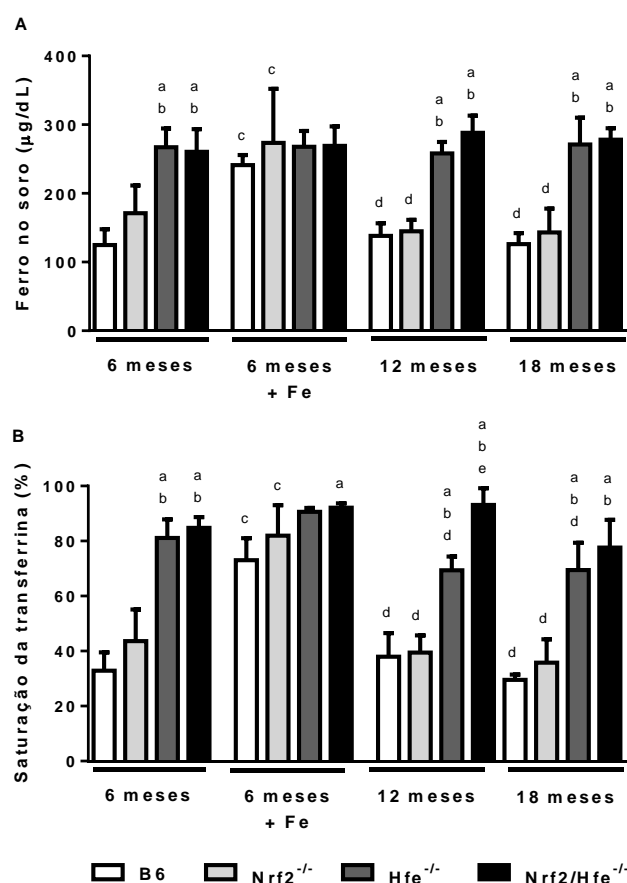
**Figura 10** - Peso corporal final. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. animais B6,  $Nrf2^{-/-}$  e  $Hfe^{-/-}$  da mesma condição.

## 2. Quantidade de ferro no soro e saturação da transferrina

Na Figura 11 estão representadas a quantificação do ferro no soro e a saturação da transferrina, nos vários grupos experimentais.

Ao fim de 6, 12 ou 18 meses com dieta standard, os animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  apresentaram uma maior concentração de ferro no soro, em comparação com os animais B6 e  $Nrf2^{-/-}$ . Não foi registada nenhuma alteração significativa na concentração de ferro no soro entre os animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$ .

Nos animais com 6 meses + Fe observou-se uma concentração de ferro no soro semelhante entre os grupos. Nos grupos B6 e  $Nrf2^{-/-}$  registou-se um aumento na concentração de ferro no soro em comparação com os animais dos mesmos grupos com 6 meses alimentados com dieta standard. Os grupos  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  não apresentaram alterações significativas entre si e apresentaram uma concentração de ferro no soro semelhante aos animais dos mesmos grupos com 6, 12 e 18 meses.



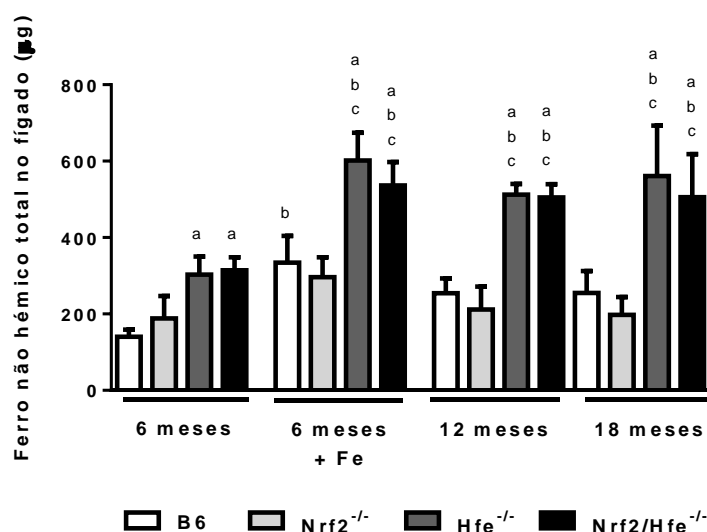
**Figura 11** - Quantificação do ferro no soro (A) e saturação da transferrina (B). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. animais  $Nrf2^{-/-}$  da mesma condição; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>d</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe; <sup>e</sup>  $p < 0.05$  vs. animais  $Hfe^{-/-}$  da mesma condição.

A saturação da transferrina no soro revelou alterações semelhantes às observadas na concentração de ferro no soro nos animais com 6 meses. No entanto, nos animais com 12 meses, para além do aumento significativo da saturação da transferrina entre os grupos  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  em relação aos grupos B6 e  $Nrf2^{-/-}$ , observou-se um aumento significativo na saturação da transferrina do grupo  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  quando comparada com o grupo  $Hfe^{-/-}$ . Os animais  $Hfe^{-/-}$  apresentaram uma saturação da transferrina significativamente inferior em comparação com o mesmo grupo de animais com 6 meses. Aos 18 meses a tendência manteve-se apesar de a saturação da transferrina nos animais  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  diminuir, de forma não significativa, em comparação com os animais com 12 meses. Relativamente aos animais com 6 meses + Fe, registou-se um aumento significativo da saturação da transferrina nos grupos B6 e  $Nrf2^{-/-}$  em comparação com os mesmos grupos de animais com 6 meses, 12 meses e 18 meses alimentados com dieta standard.

### 3. Quantidade de ferro total não-hémico no fígado

Na Figura 12 encontra-se representada a quantificação do ferro total não hémico no fígado dos animais pertencentes aos vários grupos experimentais.

Em todas as condições registou-se um aumento na quantidade de ferro total não hémico no fígado nos grupos  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$ , em comparação com os grupos B6 e  $Nrf2^{-/-}$ . É de salientar que entre os grupos B6 e  $Nrf2^{-/-}$  e entre os grupos  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$ , não foram registadas alterações significativas.



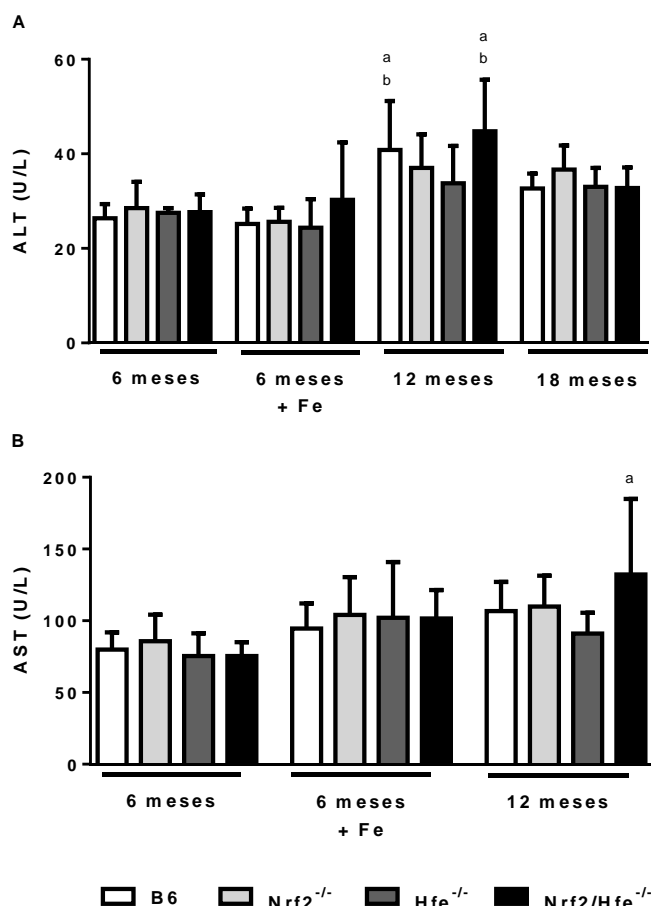
**Figura 12** – Quantificação do ferro total não hémico no fígado. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. animais  $Nrf2^{-/-}$  da mesma condição.



Nos animais com 6 meses + Fe, 12 meses e 18 meses registou-se um aumento significativo na quantidade de ferro hepático nos animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  quando comparados com os animais com 6 meses, alimentados com dieta standard. Nos animais B6 com 6 meses +Fe registou-se um aumento significativo da quantidade de ferro total no fígado, quando comparados com os animais B6 com 6 meses alimentados com dieta standard. Porém, a quantidade de ferro hepático parece ter deixado de aumentar a partir dos 12 meses de idade, em todos grupos.

#### 4. Concentração de marcadores séricos de dano hepático

Na Figura 13 está representada a quantificação da atividade das transaminases ALT (A) e AST (B) no soro.



**Figura 13** – Concentração dos marcadores séricos ALT (A) e AST (B). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe.

O marcador ALT apresentou concentrações semelhantes entre os grupos de animais com 6 meses de idade de diferentes dietas. Nos animais com 12 meses registou-se um aumento significativo deste marcador nos grupos B6 e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> comparativamente aos mesmos grupos dos animais com 6 meses de idade, considerando as 2 dietas. Porém, aos 18 meses não foram encontradas alterações entre os diferentes grupos experimentais. Comparativamente aos outros grupos etários, os animais com 18 meses apresentaram uma concentração de ALT superior aos animais com 6 meses, mas inferior aos animais com 12 meses, embora essas diferenças não tenham sido consideradas significativas pelo teste realizado. No que diz respeito à AST, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos de animais com 6 e 12 meses de idade. A única exceção é o grupo Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> com 12 meses de idade que apresentou um aumento significativo na atividade da AST, relativamente ao mesmo grupo dos animais com 6 meses de idade com dieta standard, não sendo porém significativamente diferente do grupo Hfe<sup>-/-</sup> com 12 meses. Não foi possível efetuar a medição da atividade da AST em animais com 18 meses de idade.

## **5. Alterações histológicas, distribuição do ferro no fígado e fibrose**

Através da coloração histológica de Hematoxilina-Eosina foi possível avaliar o eventual aparecimento de lesões hepáticas a partir da observação da arquitetura dos tecidos e dos diferentes componentes celulares (Figura 14). Todos os grupos experimentais apresentaram uma arquitetura do tecido hepático aparentemente normal, não havendo também evidência histológica de morte celular por necrose ou apoptose. Nos animais Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, porém, foram encontradas acumulações de material pigmentado (amarelado) distribuídas essencialmente pelas zonas sinusoidais. Comparando os animais deste genótipo aos 6, 12 e 18 meses de idade, estas acumulações parecem ter aumentado de tamanho à medida que os animais foram envelhecendo.

O padrão de distribuição de ferro foi observado e caracterizado recorrendo à coloração de Perls. Apesar de a acumulação de ferro no parênquima ter sido observada em animais de todas as idades, registaram-se diferenças no padrão definido pela sua distribuição. Relativamente aos grupos B6 e Nrf2<sup>-/-</sup>, nos animais com 6 meses, alimentados com dieta standard, e com 12 meses de idade não apresentaram acumulação de ferro nos hepatócitos (grau de siderose 0). Nos animais com 6 meses + Fe observaram-se pequenas acumulações de ferro nos hepatócitos na zona periportal que, em alguns animais, se estendeu pelas zonas média e centrolobular.

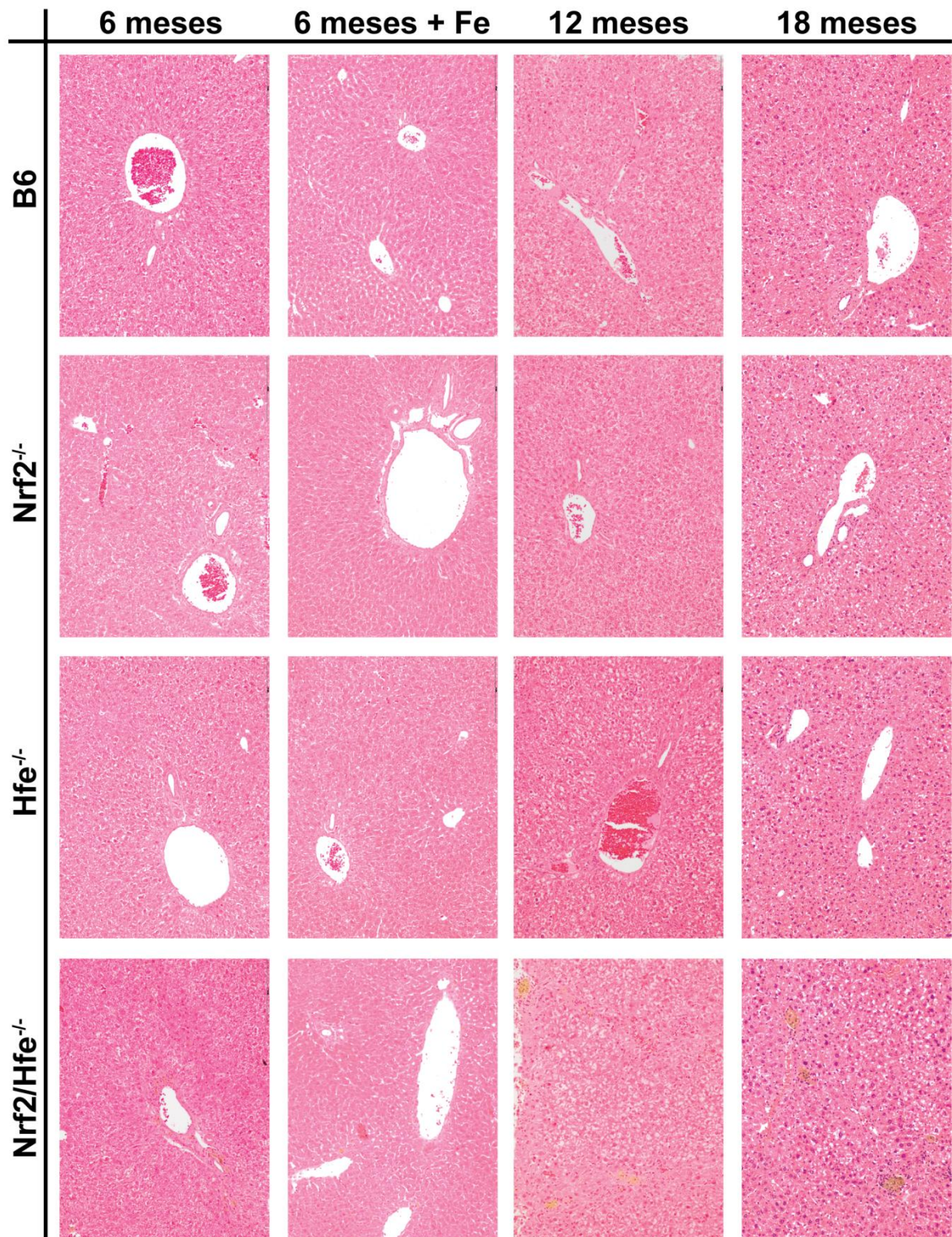
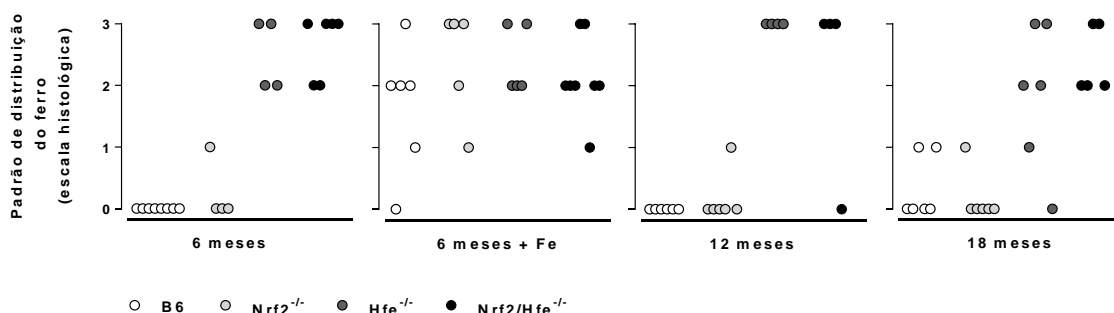


Figura 14 – Cortes histológicas do fígado, representativas de cada grupo experimental dos animais com 6, 12 e 18 meses, corados com HE, para avaliação da arquitetura do tecido e eventual lesão hepática. (Ampliação original 100x)

Aos 18 meses, a maioria dos animais B6 e Nrf2<sup>-/-</sup> não apresentou marcação do ferro nos tecidos, embora alguns animais tenham apresentado uma leve marcação de ferro nas células de Kupffer da zona periportal, que não foi considerada na avaliação do grau de siderose hepática registada na Figura 15. Os animais Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, de todos os

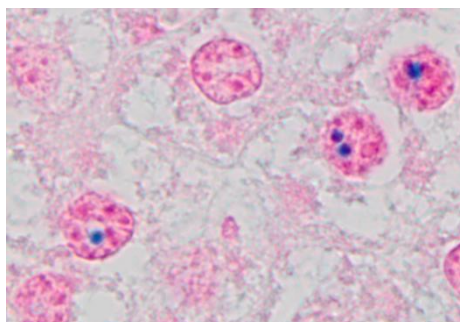
grupos etários e com diferentes dietas, não apresentaram diferenças entre eles na distribuição do ferro no parênquima, exibindo extensas áreas de coloração azul que correspondiam aos depósitos de ferro nos hepatócitos, desde a zona periportal, estendendo-se à zona média, até à zona centrolobular (graus de siderose 1-3). É de salientar que foi nos animais com 6 meses + Fe que se observou uma maior homogeneidade na distribuição do ferro no parênquima entre todos os grupos experimentais, estando não só confinado às zonas periportal/média, mas também ao longo de todo o parênquima e zonas centrolobulares (Figuras 15 e 17).

Apesar da acumulação de ferro estar distribuída nos hepatócitos, distribuída por todo o parênquima nos animais *Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>*, o ferro encontrava-se principalmente armazenado em agregados de macrófagos sinusoidais (“nódulos sideróticos”) e por vezes no interior dos hepatócitos periportais. O tamanho e a intensidade da coloração dos “nódulos sideróticos” aumentaram com a idade, culminando aos 18 meses com grandes acumulações de cor azul escura, comparativamente aos animais com 6 e 12 meses (Figura 17).



**Figura 15** - Avaliação do grau de siderose hepática baseado no método descrito por Nash et al [45], nos cortes histológicos corados com Perls. (grau 0 - ausência de ferro; grau 1 a 3 - sucessiva acumulação de ferro no parênquima, desde a zona periportal (grau 1), até à zona média do parênquima (grau 2), atingindo os hepatócitos centrolobulares (grau 3).

Nos animais *Hfe<sup>-/-</sup>* com 12 e 18 meses registaram-se acumulações de ferro no interior dos núcleos de alguns hepatócitos dispersos pelo parênquima (Figura 16).



**Figura 16**- Acumulações nucleares de ferro em hepatócitos de um animal *Hfe<sup>-/-</sup>* com 12 meses.

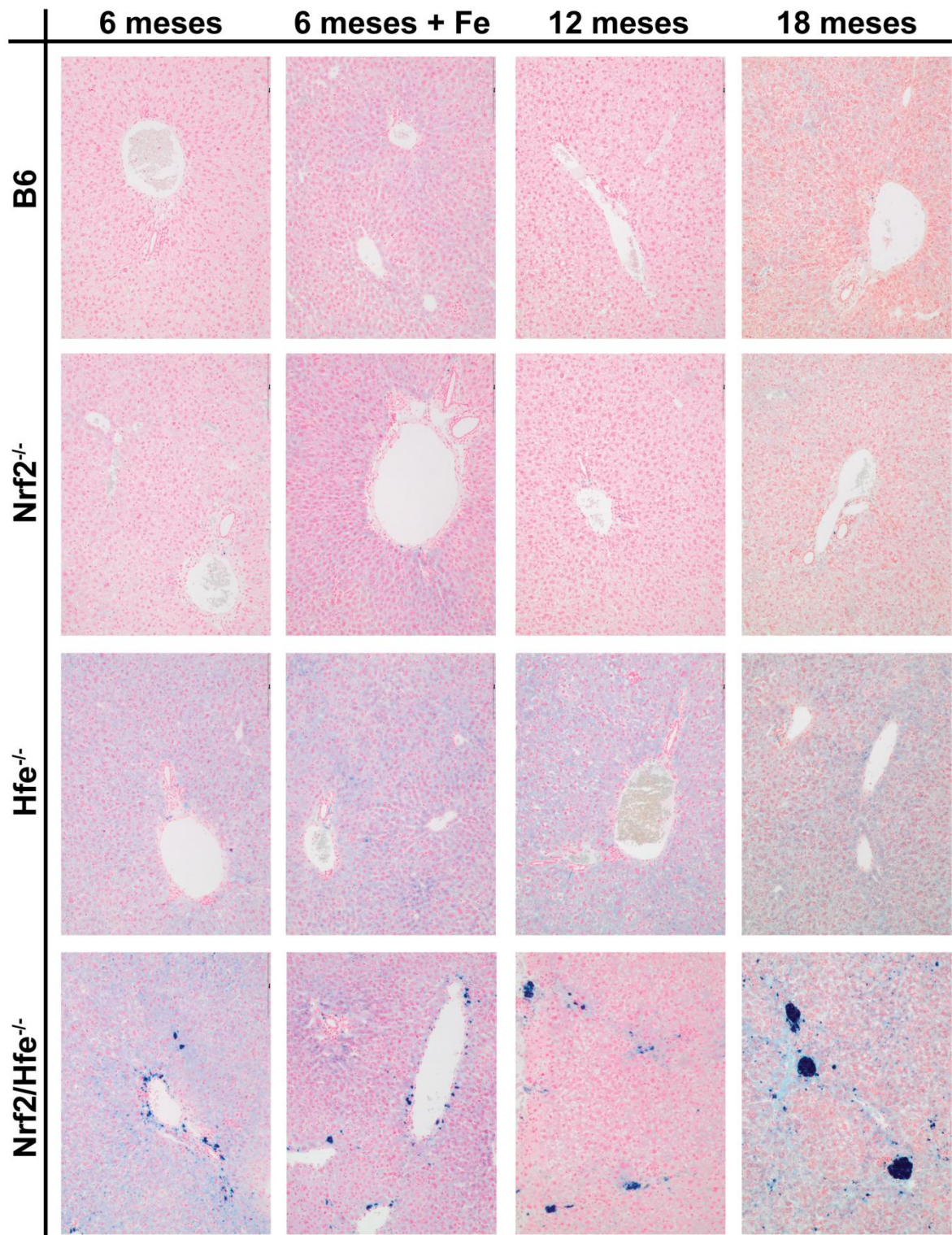
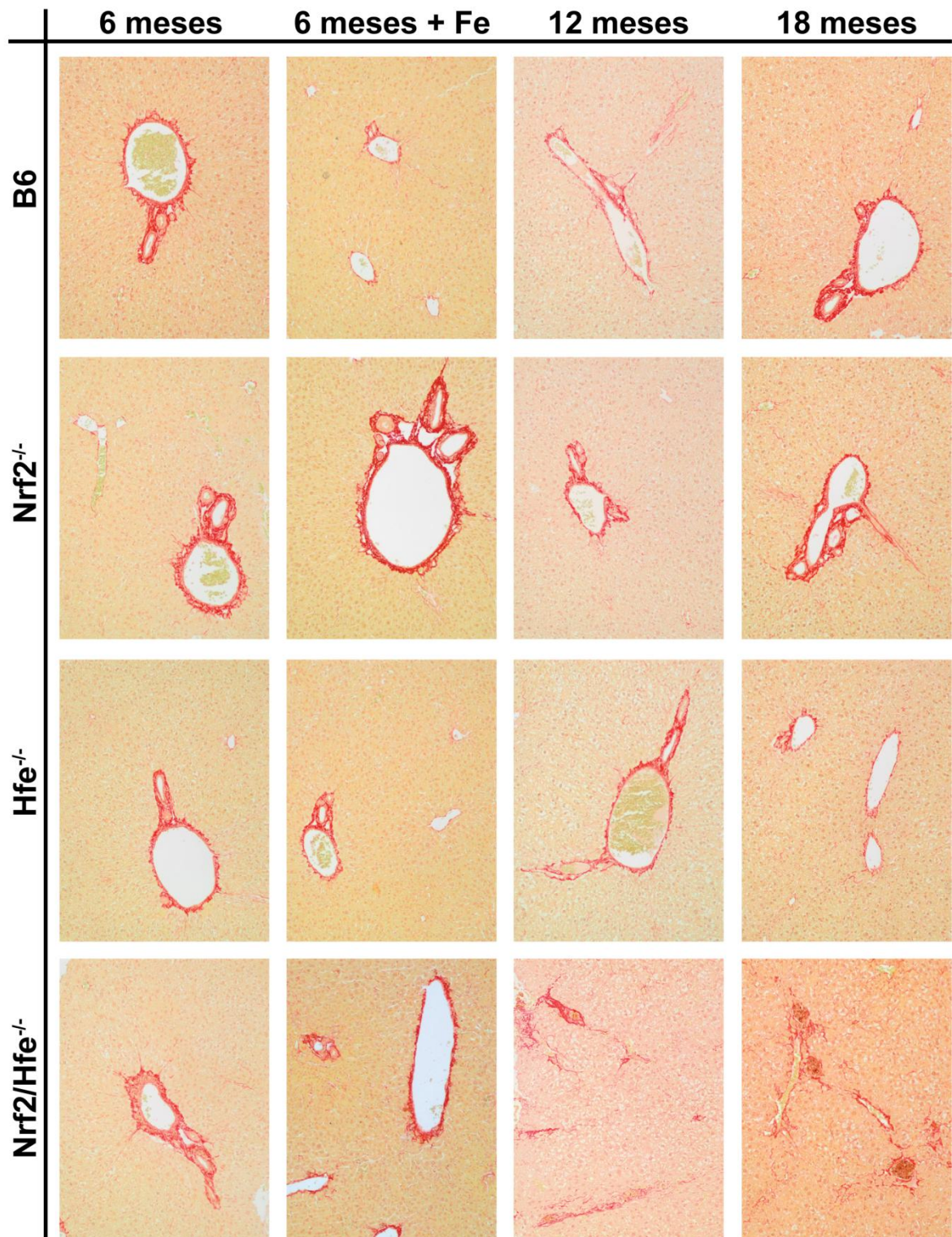
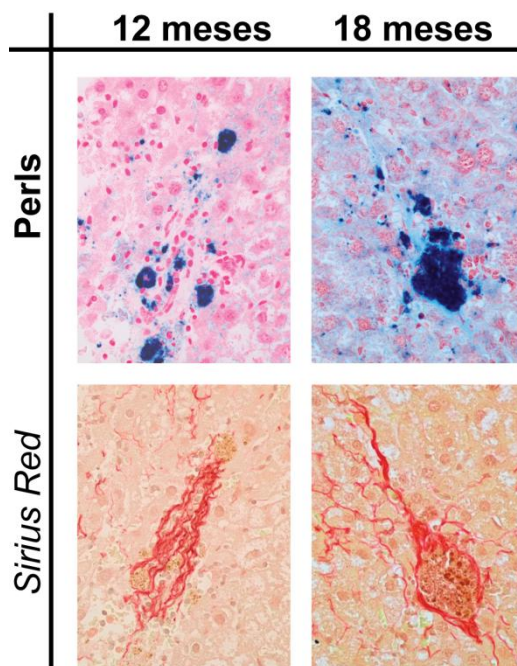


Figura 17 - Cortes histológicas do fígado, representativas de cada grupo experimental dos animais com 6, 12 e 18 meses, corados com Perls, para caracterização do padrão de distribuição do ferro. (Ampliação original 100x)



**Figura 18** - Cortes histológicos do fígado, representativos de cada grupo experimental dos animais com 6, 12 e 18 meses, corados com *Sirius Red* para observação das fibras de colagênio (a vermelho) e eventual formação de fibrose hepática. (Ampliação original 100x)



**Figura 19** - Cortes histológicos com coloração histológica de Perls (em cima) e de Sirius Red (em baixo), representativos dos grupos *Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>* dos animais com 12 e 18 meses, onde é possível observar a deposição de fibras de colagénio em redor dos “nódulos sideróticos”. (Ampliação original 400x)

A formação excessiva de fibras de colagénio e a sua deposição no tecido hepático pode levar ao desenvolvimento de fibrose hepática. A sua contínua formação descontrolada pode evoluir para cirrose e posteriormente, com o agravamento da condição clínica, para hepatocarcinoma [55].

Desta forma, a deposição de fibras de colagénio foi investigada através da visualização da marcação histológica de *Sirius Red* (Figura 18). Na generalidade dos grupos experimentais, foi observada uma deposição de fibras de colagénio exclusivamente à volta dos vasos sanguíneos do fígado. Porém, nos animais *Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>* com 12 e 18 meses observou-se também deposição de fibras de colagénio à volta dos “nódulos sideróticos”, estendendo-se pelo parênquima (Figuras 19).

## 6. Expressão de genes associados ao metabolismo do ferro, alvos da via do Nrf2, e pró-fibróticos no fígado

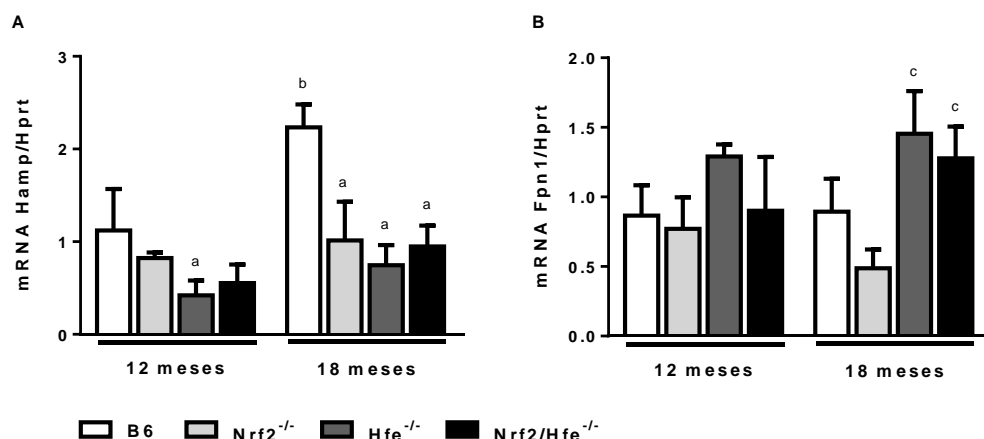
A quantificação do ARNm permitiu pesquisar alterações na transcrição de genes relacionados com o metabolismo do ferro, como o da hepcidina (*Hamp*) e o da ferroportina (*Fpn1*) (Figura 20). Esta análise integrou os animais com 12 e 18 meses, nos quais as possíveis alterações metabólicas associadas à acumulação de ferro puderam ser quantificadas e interpretadas. Aos 12 meses, o estudo da expressão genética da

hepcidina revelou que há uma diminuição na sua expressão nos animais Nrf2<sup>-/-</sup>, Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, quando comparados com os animais B6, embora esta diferença só tenha sido significativa no grupo Hfe<sup>-/-</sup>. Aos 18 meses, a expressão do Hamp manteve-se nos animais Nrf2<sup>-/-</sup>, Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> enquanto que o grupo B6 aumentou de forma significativa. Tanto aos 12 como aos 18 meses, foi o grupo Hfe<sup>-/-</sup> que apresentou o menor valor de expressão do Hamp, em relação aos restantes grupos com a mesma idade. A expressão do Fpn1 nos animais Hfe<sup>-/-</sup> aos 12 meses foi superior aos restantes grupos de animais, porém de uma forma não significativa. Aos 18 meses, a sua expressão nos animais Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> aumentou significativamente e os animais Nrf2<sup>-/-</sup> diminuíram de forma não significativa, em relação aos animais com o mesmo genótipo com 12 meses.

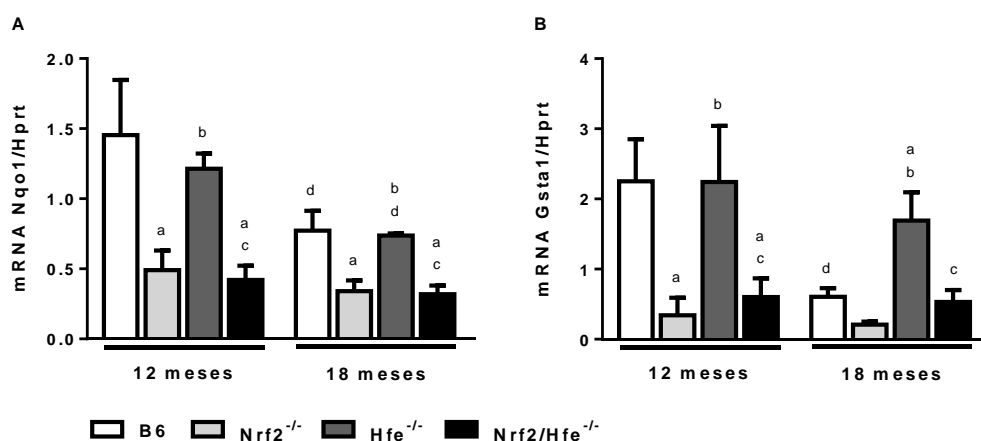
A quantificação do ARNm permitiu também pesquisar alterações na transcrição de dois genes diretamente regulados pelo fator de transcrição NRF2, o gene Nqo1 e o Gsta1 em animais com 12 e 18 meses (Figura 21). Aos 12 meses, a expressão dos genes Nqo1 e Gsta1 encontrava-se significativamente diminuída nos animais Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, em comparação com os animais B6 e Hfe<sup>-/-</sup>, com a mesma idade. Aos 18 meses, os grupos B6 e Hfe<sup>-/-</sup> registaram uma diminuição significativa da expressão do gene Nqo1, enquanto que os grupos Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> registaram valores semelhantes aos observados em animais com 12 meses de idade. Contudo, o padrão dos 4 grupos, aos 18 meses, mostrou ser semelhante aos animais com 12 meses. A expressão do gene Gsta1, nos animais com 18 meses, diminuiu significativamente nos animais B6, enquanto que os restantes grupos mantiveram os valores registados aos 12 meses.

De forma a confirmar os resultados visualizados nos animais com 12 e 18 meses na marcação histológica das fibras de colagénio, quantificou-se o ARNm nos genes pró-fibróticos Tgf-β1, α-Sma e Col 1a1 (Figura 22). Aos 12 meses não foram registadas alterações significativas na expressão dos genes pró-fibróticos entre os quatro grupos experimentais. Nos animais com 18 meses registou-se um aumento significativo da expressão do ARNm do gene Col1a1 nos animais Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, comparativamente aos grupos Nrf2<sup>-/-</sup> e Hfe<sup>-/-</sup> com a mesma idade e ao mesmo grupo de animais com 12 meses. A expressão do gene Tgfβ diminuiu em todos os grupos aos 18 meses de idade, embora a diferença só fosse estatisticamente significativa nos grupos Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>.

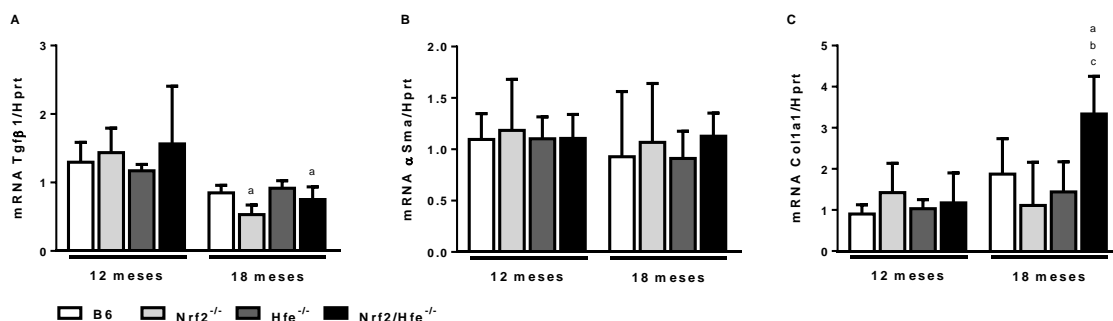




**Figura 20** - Quantificação da expressão de ARNm de genes relacionados com o metabolismo do ferro, Hamp (A) e Fpn1 (B) no fígado dos animais com 12 e 18 meses. <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição.



**Figura 21** - Quantificação da expressão de ARNm dos genes diretamente regulados pelo fator de transcrição Nrf2 (Nqo1 e Gsta1) no fígado dos animais com 12 e 18 meses. <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais B6 da mesma condição; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>d</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade.



**Figura 22** - Quantificação da expressão de ARNm dos genes pró-fibróticos αSma (A), Col1a1 (B) e Tgfβ1 (C) no fígado dos animais com 12 meses e 18 meses. <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição.

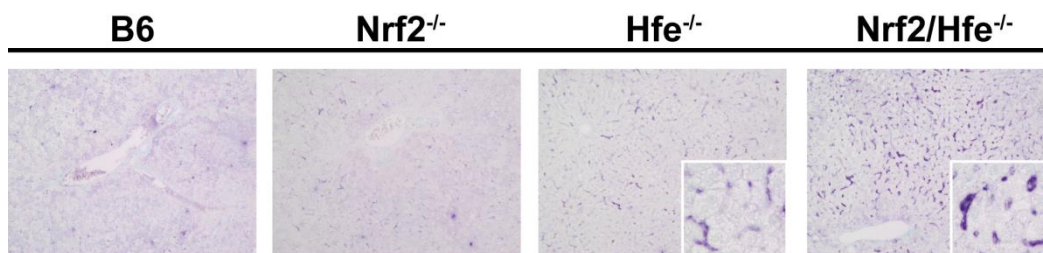


Figura 23 – Imunohistoquímica indireta contra a FPN nos animais com 12 meses (ampliação 100x e 400x).

## 7. Marcação imunohistoquímica da ferroportina

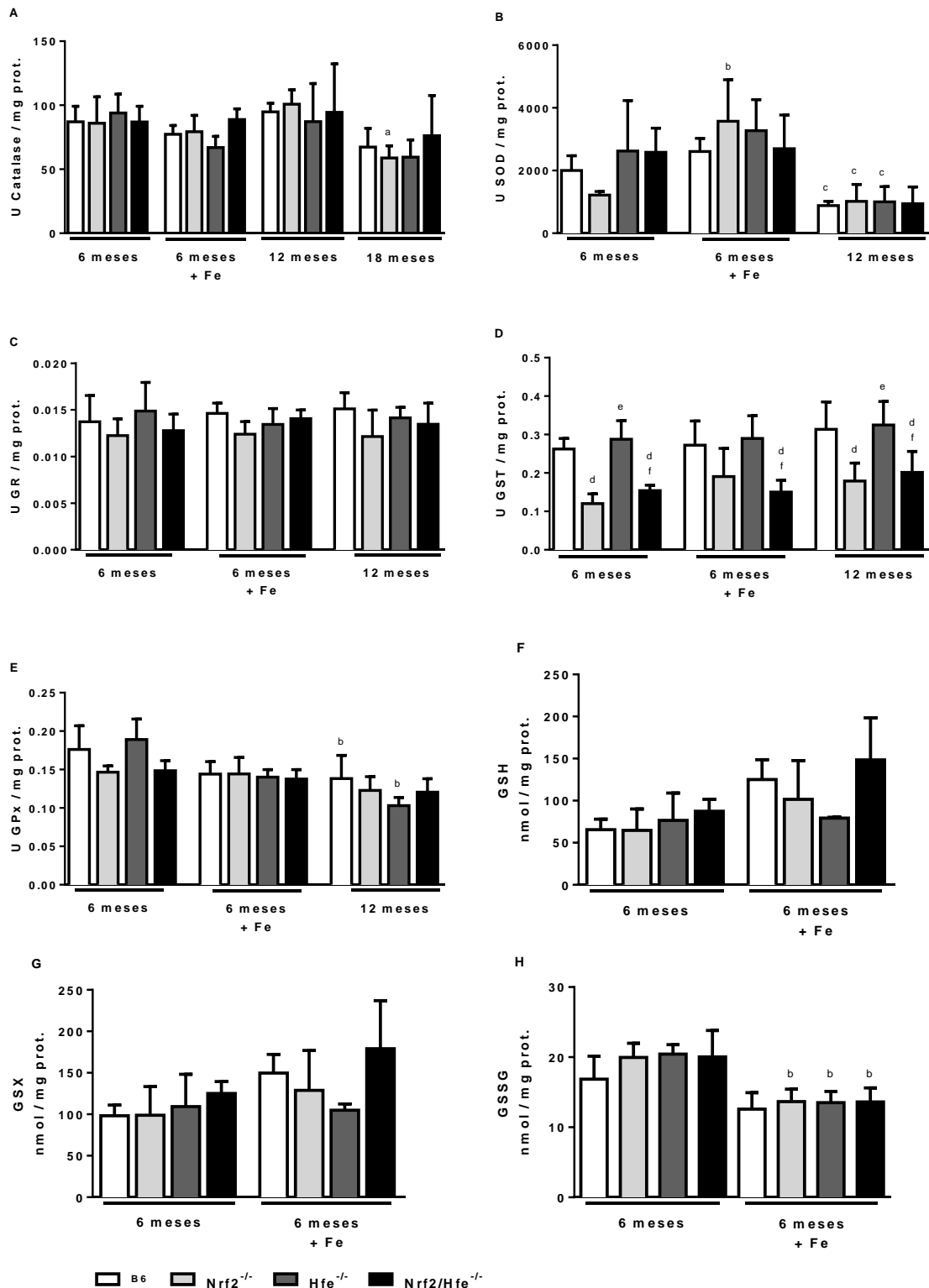
De forma a corroborar os resultados obtidos na quantificação da expressão genética do *Fpn1* nos animais com 12 meses, procedeu-se à deteção da proteína no fígado por imunohistoquímica (Figura 23). Não foi possível realizar a técnica aos 18 meses.

A homeostasia sistémica do ferro é controlada pela hepcidina que inibe a entrada de ferro no plasma através da sua ligação à FPN das células, promovendo a sua degradação. A FPN é o único exportador orgânico do ferro nos mamíferos e a sua degradação causa retenção intracelular do ferro, aumentando a concentração do ferro nos tecidos [7].

Nos animais B6 e *Nrf2*<sup>-/-</sup> não se observou marcação específica para a ferroportina, ao contrário do grupo *Hfe*<sup>-/-</sup> e *Nrf2/Hfe*<sup>-/-</sup>, onde se observou marcação específica. Comparando os dois grupos, registou-se um aumento na quantidade e na intensidade da marcação membranar nos animais *Nrf2/Hfe*<sup>-/-</sup> ao longo de todo o tecido.

## 8. Atividade enzimática associada ao estado redox

A atividade das enzimas e a quantidade de glutathione do sistema de defesa antioxidante foram determinadas de forma a avaliar se, na ausência da via de sinalização do *Nrf2*, a acumulação de ferro no tecido hepático resultaria numa alteração do estado redox (Figura 24). Foi analisada a atividade das enzimas catalase, SOD, GR, GST, GPx, e a quantidade de GSH, GSX e GSSG. A atividade da catalase apresentou valores semelhantes ao longo do tempo, não tendo sido observadas variações entre os vários grupos de animais. Porém, aos 18 meses, registou-se uma diminuição significativa na sua atividade nos animais *Nrf2*<sup>-/-</sup> em relação aos animais com 12 meses (Figura 24 A). Relativamente à SOD, os animais com 6 meses + Fe apresentaram um aumento da atividade em relação aos animais com dieta normal, que foi significativo apenas para o grupo *Nrf2*<sup>-/-</sup>. Contudo, aos 12 meses, a sua atividade diminuiu significativamente (Figura 24 B).



**Figura 24** - Determinação da atividade da catalase (A), SOD (B), GR (C), GST (D), e GPx (E) e da quantidade de GSH (F), GSX (G) e GSSG (H). <sup>a</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 12 meses de idade; <sup>b</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade; <sup>c</sup> p<0.05 vs. animais com o mesmo genótipo com 6 meses de idade + Fe; <sup>d</sup> p<0.05 vs. animais B6 da mesma condição; <sup>e</sup> p<0.05 vs. animais Nrf2<sup>-/-</sup> da mesma condição; <sup>f</sup> p<0.05 vs. animais Hfe<sup>-/-</sup> da mesma condição.

A GR apresentou valores semelhantes entre as 3 condições, existindo uma tendência, não significativa, para a diminuição da sua atividade em todos os grupos de animais Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> (Figura 24 C). A atividade da GST apresentou um padrão semelhante ao longo do tempo, não registrando alterações devido à dieta enriquecida em ferro. Contudo, foi evidente a diminuição da sua atividade nos grupos experimentais Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, apresentando valores significativamente diferentes dos grupos B6 e Hfe<sup>-/-</sup> (Figura 24 D). Relativamente à atividade da GPx, registou-se uma diminuição não significativa nos grupos Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> nos animais com 6 meses. Nos animais com 6 meses + Fe a sua atividade foi semelhante em todos os grupos e semelhantes à dos grupos Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> dos animais com 6 meses. Nos animais com 12 meses, observou-se uma tendência semelhante, apesar de os animais Hfe<sup>-/-</sup> terem acentuado essa diminuição, relativamente aos mesmos grupos da experiência de 6 meses (Figura 24 E). A quantidade de GSH e GSX registou um aumento não significativo em resposta à dieta enriquecida, excetuando o grupo Hfe<sup>-/-</sup>, no qual foi observado o efeito oposto (Figura 24 F e G). A quantidade de GSSG foi significativamente menor nos animais com 6 meses + Fe, relativamente aos animais com 6 meses, à exceção do grupo B6, no qual a diferença não foi considerada significativamente diferente pelo teste utilizado. (Figura 24 H).

## V. Discussão

---

## V. Discussão

Através da realização deste trabalho experimental foi possível avaliar o impacto da via de sinalização regulada pelo fator de transcrição Nrf2 em murganhos  $Hfe^{-/-}$ , modelo animal da HH no qual a deposição de ferro ocorre de forma espontânea. Foram estudados murganhos fêmeas da estirpe C57BL/6 (B6),  $Hfe^{-/-}$ ,  $Nrf2^{-/-}$  e duplo *knock-out* ( $Hfe/Nrf2^{-/-}$ ) com 6, 12 e 18 meses. A dieta de alguns murganhos com 6 meses foi ainda enriquecida com 0,5% de ferro nas últimas 12 semanas de vida, de forma a acelerar a deposição de ferro no organismo e determinar um eventual efeito protetor do Nrf2 contra a toxicidade do ferro.

### 1. Impacto do gene Nrf2 na acumulação de ferro

A concentração de ferro presente no soro, oriundo quer da absorção pelos enterócitos, quer da sua libertação pelos macrófagos e tecidos, não se alterou com a idade em nenhum dos 4 grupos experimentais. Aos 6, 12 e 18 meses, registou-se apenas um aumento significativo na concentração de ferro no soro nos animais alimentados com dieta standard  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  relativamente aos grupos B6 e  $Nrf2^{-/-}$ , comprovando a predisposição genética para um aumento da concentração de ferro no organismo dos animais com ausência do gene  $Hfe$ . Por outro lado, a ausência do gene Nrf2 não condicionou a concentração de ferro no soro, visto que os animais  $Nrf2^{-/-}$  apresentaram valores de concentração semelhantes aos animais B6 e que os animais  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  apresentaram valores semelhantes aos animais  $Hfe^{-/-}$ . Nos animais com 6 meses de idade sujeitos a uma dieta enriquecida com ferro, observou-se um aumento na concentração de ferro no soro nos animais B6 e  $Nrf2^{-/-}$  para valores semelhantes aos dos animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$ . Estes dois últimos grupos mantiveram os valores de concentração de ferro registados nos animais dos mesmos grupos experimentais com 6, 12 e 18 meses. Assim, aos 6 meses de idade, o enriquecimento da dieta com ferro não predispôs os animais com ausência do gene  $Hfe$  para uma sobrecarga de ferro superior aos animais controlo.

No soro, o ferro é transportado pela transferrina. A sua saturação representa a quantidade de ferro que é conduzido no plasma entre os vários tecidos que o utilizam. Desta forma, os resultados obtidos corroboram o que anteriormente foi observado na análise da concentração de ferro no soro. Apesar de os grupos  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  com 6, 12 e 18 meses terem apresentado valores de concentração de transferrina semelhantes, é de salientar que aos 12 meses, a diferença entre estes dois grupos, embora pequena,

foi significativa. Visto que esta alteração apenas se registou aos 12 meses, é plausível assumir que o número reduzido de animais usados neste grupo experimental (n=4) poderá justificar esta diferença. O enriquecimento da dieta com ferro durante as últimas 12 semanas de vida dos animais com 6 meses levou a um aumento da absorção de ferro pelos enterócitos, justificando o aumento da saturação da transferrina nos animais B6 e Nrf2<sup>-/-</sup>. É possível que a quantidade de ferro introduzida na dieta não tenha sido suficiente para provocar um aumento, tanto na concentração de ferro no soro, como na saturação de ferro na transferrina nos animais Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>. Por outro lado, assume-se que o ferro em excesso terá sido armazenado na ferritina dos tecidos, não se mantendo em circulação.

O ferro em excesso no organismo acumula-se principalmente na ferritina dos hepatócitos pelo que a quantificação do ferro total no fígado se tornou necessária para a compreensão do aparecimento de eventuais lesões hepáticas associadas à acumulação progressiva de ferro ao longo do envelhecimento dos animais. A quantidade de ferro total presente no fígado dos animais Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> aumentou com a idade, ao contrário dos grupos B6 e Nrf2<sup>-/-</sup> que não registaram alterações significativas na quantidade de ferro presente no fígado, ao longo do tempo. Isto significa que, devido à ausência do gene do Hfe<sup>-/-</sup>, o ferro acumulou-se no fígado de forma gradual. Esta acumulação ocorreu independentemente do gene Nrf2, visto que a quantidade de ferro registada foi semelhante entre os grupos Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> aos 6, 12 e 18 meses. A adição de ferro à dieta dos animais com 6 meses levou a uma acumulação superior de ferro no fígado em todos os grupos experimentais, comparativamente à quantidade acumulada nos animais com a mesma idade alimentados com dieta standard. Os animais Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> apresentaram níveis de ferro no fígado semelhantes aos dos animais do mesmo genótipo com 12 e 18 meses de idade e dieta standard. Desta forma, a velocidade de acumulação do ferro no fígado foi superior nos animais com 6 meses devido à quantidade de ferro introduzido na dieta nas últimas 12 semanas.

Em animais “wild-type” para o gene Hfe, o aumento da quantidade de ferro nos tecidos e da saturação da transferrina leva a uma maior produção de hepcidina pelos hepatócitos, promovendo a degradação da ferroportina, limitando a absorção e libertação de ferro para o plasma [9]. Nos grupos de animais com ausência do gene Hfe a produção de hepcidina encontra-se reduzida, levando à diminuição da degradação da ferroportina. Consequentemente, a regulação da absorção do ferro e sua libertação para o plasma ao nível dos enterócitos fica comprometida. Isto justifica o aumento da quantidade de ferro no soro e no fígado e da saturação da transferrina nos animais com ausência do gene Hfe. Por outro lado, o Nrf2 parece não ter influenciado a quantidade de ferro absorvido, transportado e acumulado no fígado, sendo que os grupos Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> de cada

grupo etário apresentaram valores semelhantes em todos os parâmetros de medição do ferro.

Os hepatócitos são o principal local de armazenamento do ferro do organismo e em condições normais estas células são capazes de armazenar de forma controlada o ferro na ferritina. Contudo, quando há uma acumulação exagerada de ferro no organismo, a capacidade de armazenamento na ferritina é ultrapassada, ocorrendo a desnaturação da proteína e a libertação o ferro armazenado para o citoplasma dos hepatócitos [56].

A quantificação de ferro total no fígado revelou que, em todas as idades, a quantidade de ferro é semelhante entre os animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$ . Porém, através da coloração de Perls, foi possível observar que a distribuição e acumulação do ferro no fígado são diferentes nos dois grupos. Nos animais  $Hfe^{-/-}$  o ferro encontra-se acumulado no parênquima, enquanto que nos animais  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  o ferro é encontrado tanto ao longo de todo o parênquima como nas células que povoam os sinusóides hepáticos, provavelmente as células de Kupffer. Uma vez que a quantidade de ferro no fígado é semelhante mas a sua distribuição é diferente, é possível concluir que a ausência do gene  $Nrf2$  nos animais terá modulado a distribuição do ferro pelo tecido hepático. De facto, a coloração de hematoxilina-eosina revelou a presença de acumulações de material pigmentado no fígado dos murganhos  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  que a coloração de Perls confirmou tratarem-se de aglomerados de ferro. A presença dessas grandes acumulações nos macrófagos sinusoidais nos animais  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  poderá ser o resultado da resposta fagocitária dos macrófagos na presença de elevadas concentrações de ferro que sucessivamente se acumularam no fígado.

Os animais envelhecidos (12 e 18 meses de idade), nos quais foi suprimida a expressão dos genes  $Nrf2$ ,  $Hfe$  ou ambos, expressaram uma quantidade inferior do gene  $Hamp$  relativamente aos animais B6. A supressão do gene  $Hfe$  resulta na diminuição da expressão do  $Hamp$  devido à ausência da via de sinalização da proteína HFE que, em condições normais, está envolvida na ativação da expressão da hepcidina [21]. A indução da expressão da hepcidina terá ficado comprometida nos animais  $Hfe^{-/-}$ , levando à diminuição da degradação de ferroportina, o que terá permitido a absorção contínua de ferro proveniente da dieta, justificando a acumulação de ferro no fígado. Curiosamente, os animais  $Nrf2^{-/-}$  também apresentaram uma expressão do  $Hamp$  inferior aos animais B6, sugerindo que este fator de transcrição poderá estar envolvido na ativação de alguma via reguladora da hepcidina. Desta forma, quando ativado por agentes que induzem stresse oxidativo celular, o NRF2 poderá aumentar a expressão da hepcidina de forma a controlar a entrada de ferro nas células, evitando a presença de mais um elemento potencialmente tóxico na célula. Não há no entanto até ao momento nenhum estudo científico que demonstre a participação do fator de transcrição NRF2 na regulação da



expressão da hepcidina. Aos 18 meses, a expressão do Hamp aumenta nos animais B6, embora se mantenha inalterada nos restantes grupos experimentais relativamente aos animais com 12 meses. Tanto quanto foi possível averiguar noutros estudos, este aumento da expressão da hepcidina com a idade não foi reportado anteriormente.

Aos 12 meses, os animais  $Hfe^{-/-}$  apresentaram um aumento não significativo na expressão do ARNm da ferroportina relativamente aos outros grupos experimentais com a mesma idade. Nos animais  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2^{-/-}$  o nível de expressão da ferroportina foi semelhante ao dos animais B6. Isto sugere que o Nrf2 poderá regular positivamente a transcrição da ferroportina, o que é apoiado pela diminuição (ainda que não estatisticamente significativa) da sua expressão em animais  $Nrf2^{-/-}$  com 18 meses de idade. A regulação da ferroportina através do Nrf2 foi já descrita em alguns estudos com macrófagos e ferro hémico [57, 58]. Contudo, o papel do Nrf2 na homeostasia do ferro ainda está por esclarecer. Com o contínuo envelhecimento dos animais, a expressão da ferroportina nos animais controlo manteve-se. Os animais  $Nrf2^{-/-}$  acentuam a diminuição da expressão da ferroportina, ao contrários dos animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  que aumentaram os níveis de expressão da ferroportina. Este aumento assinalado nos animais  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  revela que a ferroportina é regulada por vários mecanismos e que com o envelhecimento, a ativação da ferroportina pelo Nrf2 poderá ter-se tornado menos eficiente.

A marcação imunohistoquímica da ferroportina em animais com 12 meses de idade revelou um aumento da expressão nos animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  comparativamente aos animais B6 e  $Nrf2^{-/-}$ . A intensidade da expressão nos animais  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  deve-se a uma acumulação da proteína aparentemente na membrana dos macrófagos do fígado (células de Kupffer). Esta acumulação pode ter resultado de mecanismos pós-transcricionais que se sobrepõem à expressão do ARNm. A ferroportina pode ser regulada pós-transcricionalmente através do sistema IRP, da hepcidina ou por microARN [59]. Os animais  $Hfe^{-/-}$  e  $Nrf2/Hfe^{-/-}$  com 12 meses apresentam menor expressão do gene Hamp em relação aos animais controlo, o que resultará numa menor degradação da ferroportina e sua acumulação na membrana dos macrófagos.

## **2. Papel protetor conferido pelo Nrf2 contra o dano hepático**

Comparando todos os animais com 6 meses, conclui-se que o enriquecimento com 0,5% de ferro na dieta durante 12 semanas não influenciou o peso final dos animais. O peso registado foi semelhante entre todos os animais dos diferentes grupos experimentais, o que leva a considerar que a ausência do gene Nrf2 não condicionou o ganho de peso em animais  $Hfe^{-/-}$ . Os animais com 12 meses registaram um peso final

significativamente superior ao peso final dos animais com 6 meses, à exceção do grupo Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> que apresentou um peso final semelhante. Através da pesquisa do valor do peso corporal normal em murganhos fêmeas C57BL/6 usados como controlos noutros estudos [60, 61], é possível concluir que o peso corporal médio registado em murganhos com 12 meses é aproximadamente de 25 g. O aumento registado nos animais B6, Nrf2<sup>-/-</sup> e Hfe<sup>-/-</sup> pode ser explicado por uma possível pré-disposição genética destes animais para o aumento de tamanho, e consequentemente do seu peso corporal, superior à média dos C57BL/6 aos 12 meses. Aos 18 meses, os animais apresentaram um peso final superior, relativamente aos animais com 6 meses. Apesar de nenhuma destas alterações ser significativa, o aumento de peso relativamente aos animais com 6 meses pode ser explicado pela idade superior dos animais e consequente aumento de tamanho. Isto exclui a influência da acumulação de ferro ou da ausência do Nrf2<sup>-/-</sup> na diminuição do peso corporal final.

Na presença de dano hepatocelular ocorre libertação das transaminases ALT e AST para a corrente sanguínea. A ALT é sintetizada principalmente no fígado e a AST, para além do fígado, é também sintetizada no músculo-esquelético e nos eritrócitos. Desta forma, o aumento dos níveis de ALT é geralmente mais específico para a deteção de dano hepático [62, 63]. Através da análise da concentração de AST no soro, registou-se que nem a idade nem a dieta enriquecida com ferro provocaram lesões hepáticas detetáveis por este marcador sérico. Por outro lado, a concentração de ALT no soro registou um aumento significativo nos animais com 12 meses nos grupos B6 e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> relativamente aos animais com 6 meses alimentados quer com dieta standard quer com dieta enriquecida com ferro. Contudo, os animais com 18 meses não acompanharam o aumento da concentração de ALT observada nos animais com 12 meses, registando valores semelhantes aos animais com 6 meses. A relação entre a diminuição dos valores de ALT com o aumento da idade foi referida em alguns estudos em humanos descritos por Dong H. *et. al.* [64], embora permaneça um pouco ambígua. No entanto, um estudo realizado por Le Couteur D., *et. al.* [65] comprovou essa relação, apesar de os mecanismos que levam a essa associação permanecerem ainda pouco claros.

As lesões hepáticas crónicas devidas à lesão prolongada do parênquima celular estimulam a produção de miofibroblastos, que derivam das células estelares hepáticas ativadas e/ou dos fibroblastos portais. Esta resposta fibrótica é caracterizada pela progressiva acumulação de componentes da matriz extracelular rica em fibras de colagénio [66], observáveis através da coloração de *Sirius Red*. Nos animais Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> com 6 meses + Fe, 12 e 18 meses foi observado um aumento de fibras de colagénio no tecido. Porém, é nos animais mais velhos que essa deposição parece estar relacionada com a acumulação de ferro nos macrófagos sinusoidais. Com o envelhecimento dos

animais, observou-se a formação de fibras de colagénio em redor dos “nódulos sideróticos”, talvez numa tentativa de delimitar o aumento progressivo dos mesmos, sendo esta característica mais pronunciada nos animais com 18 meses. Esta evolução com a idade sugere que a contínua acumulação de ferro e conseqüente deposição de fibras de colagénio, poderá evoluir para um cenário de fibrose hepática e posteriormente cirrose, que são conseqüências clínicas da sobrecarga de ferro no fígado associadas à Hemocromatose Hereditária [16].

A acumulação de ferro no fígado leva à formação de ROS, provocando stresse oxidativo e mutações no ADN nas células do fígado, podendo acelerar o desenvolvimento do dano hepático e progressão da fibrose hepática. Esta resposta do tecido é caracterizada pela acumulação de matriz extracelular. Após uma lesão hepática grave, a reparação da arquitetura normal do tecido é realizada através de uma reação inflamatória complexa e de um processo de transformação da matriz caracterizada pelo equilíbrio entre a sua síntese e a sua degradação (fibrólise). Por outro lado, se a agressão ao tecido e a deposição da matriz extracelular forem prolongadas e desreguladas, o que normalmente acontece em lesões hepáticas crónicas, o parênquima do fígado é continuamente substituído por tecido de cicatrização, caracterizada por um desequilíbrio entre a síntese excessiva de matriz e a sua degradação [67]. A progressão da doença acompanhada de uma fibrose progressiva leva ao aparecimento de cirrose hepática [68], situação que se pode agravar com o desenvolvimento de um carcinoma hepatocelular, usualmente associado às transformações malignas que surgem na presença de cirrose, sendo uma causa frequente de morte prematura em humanos [56]. Nos murganhos *Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>* o desenvolvimento de fibrose hepática parece ocorrer mais precocemente, em relação aos animais *Hfe<sup>-/-</sup>*, sugerindo que o *Nrf2* poderá conferir uma proteção contra a evolução das lesões hepáticas associada à Hemocromatose Hereditária, para uma situação de cirrose ou mesmo carcinoma hepatocelular.

O aumento da deposição de fibras no tecido hepático revelado através da coloração de cortes histológicos com Sirius Red levou-nos a analisar a expressão dos genes pró-fibróticos *Tgf-β1*, *α-Sma* e *Col1a1*. Os genes *Tgf-β1* e *α-Sma* parecem não ter interferido na produção de colagénio, que foi no entanto confirmada pelo aumento significativo da expressão genética do gene *Col1a1* nos animais *Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>* com 18 meses de idade. Apesar de o *TGF-β1* ser um potente estimulador da síntese de colagénio, existem estudos que comprovam que a sua síntese pode ser induzida por outros fatores. Buttner *C. et. al.* [69] demonstraram, em fibroblastos de pulmão humano, que a Interleucina-4 (IL-4) medeia a produção de colagénio. Gressner A. [70], *et. al.* revelaram que, para além da *TGF-β1*, a interleucina-1 (IL-1) e a leptina promovem a ativação das células estelares hepáticas, aumentando a síntese de colagénio. Isto poderá justificar os níveis

aumentados da expressão do Col1a1 nos animais Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> com 18 meses, comparativamente ao mesmo grupo com 12 meses, apesar dos níveis normais obtidos na expressão do Tgf-β1. Curiosamente, apesar de a α-SMA ser um marcador positivo dos miofibroblastos, a expressão do seu gene não se alterou nos animais Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup> com 18 meses, onde o aumento da expressão do gene Col1a1 foi verificado. A α-SMA está presente principalmente nas células do músculo liso dos vasos e nos miofibroblastos. Considerando que as células musculares lisas se encontram em grande quantidade no tecido hepático associadas aos vasos sanguíneos, é possível que o seu aumento nos miofibroblastos não tenha sido suficiente ao ponto de ser detetado pela técnica de PCR em tempo real.

Apesar de a quantificação dos marcadores séricos não confirmarem a presença de lesões hepáticas, a formação das fibras de colagénio em redor dos “nódulos sideróticos” e o aumento da expressão do gene Col1a1, sugerem o aparecimento de fibrose hepática, que normalmente surge associada ao aparecimento de lesões hepáticas.

### **3. Ativação de genes e enzimas antioxidantes nos animais Hfe<sup>-/-</sup>**

A transcrição dos genes Nqo1 e Gsta1 é regulada principalmente pelo fator de transcrição Nrf2 [38]. Tal como seria de esperar, aos 12 meses de idade os animais que não expressam o gene Nrf2 (Nrf2<sup>-/-</sup> e Hfe/Nrf2<sup>-/-</sup>) apresentaram uma expressão significativamente inferior destes dois genes. Curiosamente foi observada uma diminuição da expressão do ARNm dos genes Nqo1 e Gsta1 em todos os grupos de animais com 18 meses, comparativamente aos mesmos grupos com 12 meses. O envelhecimento natural das próprias células poderá ter levado a uma condição de falência e a uma perda de capacidade de resposta das células. Rahman *et al* [71] referiu que o aumento normal de danos oxidativos nos tecidos ao longo da idade pode estar relacionado com a disfunção de mecanismos de defesa antioxidante, que efetivamente protegem os indivíduos mais novos de danos oxidativos. Shih *et al* [72] e Suh *et al* [73] confirmaram que essa diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante ao longo do envelhecimento está relacionada com a diminuição da expressão do Nrf2.

Com a absorção de ferro em excesso através do aumento da sua concentração na dieta ou através da ausência do gene Hfe observou-se um aumento na acumulação de ferro no fígado. Esta acumulação poderá ser responsável pelo aumento de lesões hepáticas como resultado do stresse oxidativo imposto pelo ferro. Esperava-se que a produção de espécies reativas de oxigénio, e em particular do radical superóxido, ativassem os sistemas de defesa antioxidante. Muitas dessas enzimas, nomeadamente a SOD, a OH-1, a GPx, a GR, a GST e a Nqo1 são reguladas total ou parcialmente pelo

fator de transcrição Nrf2 e a sua ausência poderá interferir no normal funcionamento desses sistemas antioxidantes.

A atividade da enzima catalase parece não ter sido influenciada pela dieta em ferro porque os animais com seis meses alimentados com uma dieta enriquecida com ferro mantiveram os valores registados nos animais com 6 meses alimentados com dieta standard. Por outro lado, a ausência do gene *Hfe*<sup>-/-</sup> não interferiu na atividade da catalase em nenhum grupo etário. Marmol *et. al.* [74] observaram em ratos *Wistar* machos com 1,5, 3, 18 e 24 meses de idade, que a atividade da catalase no fígado não apresentou alterações significativas com a idade. Aos 18 meses apenas se observou uma diminuição significativa nos animais *Nrf2*<sup>-/-</sup> relativamente ao mesmo grupo com 12 meses. Esta alteração pode significar que a ausência do Nrf2 limitou a atividade da catalase, embora não tenha sido registada mais nenhuma alteração. Desta forma, a catalase é uma enzima que parece ser pouco afetada pela ausência do fator de transcrição Nrf2.

O aumento da atividade da SOD nos animais B6 alimentados com uma dieta enriquecida com ferro sugere que a sua atividade está relacionada com o aumento da quantidade de ferro no fígado. Embora não significativo, esse aumento é corroborado por Zhang Y. *et. al.* [75]. Neste estudo usaram ratos *Wistar* machos, divididos em diferentes grupos, de acordo com a dose de ferro recebida, e demonstram que a atividade da SOD no fígado aumenta quanto maior for a dose de ferro administrada nos animais. A SOD é regulada, em parte, pelo Nrf2. Isto justifica por um lado a atividade reduzida da enzima nos animais *Nrf2*<sup>-/-</sup> comparativamente aos animais B6, com 6 meses alimentados com dieta standard. Por outro lado, os animais *Nrf2/Hfe*<sup>-/-</sup> da mesma idade e dieta, absorveram e acumularam ferro em excesso, o que provavelmente estimulou enzimas antioxidantes, nomeadamente a SOD, através de outros mecanismos de regulação que não a via do Nrf2. Com o envelhecimento dos animais, segundo alguns autores, a atividade da SOD mantém-se ou apenas aumenta ligeiramente [71, 76, 77]. Aos 12 meses, comparativamente com a registada aos 6 meses, a atividade da SOD parece ter diminuído para valores semelhantes em todos os grupos, embora essa diferença não seja significativa. Um estudo anterior realizado por Van Raamsdonk, J. [78] demonstrou que, em *Caenorhabditis elegans* nos quais o gene que codifica a SOD foi silenciado, a atividade da enzima não alterou a esperança média de vida, pois estes recorrem a outros mecanismos compensatórios de forma a controlar o stresse oxidativo e os danos por ele provocados. Desta forma, é provável que a SOD atue na presença de níveis reduzidos de radicais superóxido. Com o aumento da idade e a acumulação de danos celulares, a sua resposta ao stresse oxidativo é provavelmente efetuada por outros mecanismos mais eficientes, reduzindo a sua atividade.

A GR participa no ciclo redox normal da glutathiona total: ao reduzir a GSSG contribui para a manutenção dos níveis adequados de GSH. Muitos xenobióticos são metabolizados em conjunto com a GSH, num processo catalisado pela GST, que promove o seu gasto. A GSH deixa de estar disponível pois fica ligada a uma molécula/xenobiótico. Desta forma, a atividade da GR e da GST relacionam-se e por isso terão apresentado um padrão de atividade semelhante neste trabalho. Com a introdução de ferro na dieta, a atividade destas enzimas não se alterou comparativamente aos animais com a mesma idade alimentados com dieta standard. Como anteriormente referido, a quantidade de ferro introduzida não foi suficiente para provocar graves lesões nos hepatócitos que justificassem o aumento dos mecanismos de proteção antioxidantes. Da mesma forma, a idade parece não ter tido influência no aumento da atividade destas enzimas. É de referir que a GR e a GST são fundamentalmente reguladas pelo fator de transcrição Nrf2. A atividade destas enzimas nos animais Nrf2<sup>-/-</sup> e Hfe/Nrf2<sup>-/-</sup> ficou comprometida, em comparação com os grupos B6 e Hfe<sup>-/-</sup> de todas os grupos etários. A diferença de valores registados na GR não foi significativa, mas na GST essa discrepância de valores entre os grupos com ausência do gene Nrf2 e os grupos controlo acentuou-se de forma significativa, comprovando a regulação destas enzimas pelo fator de transcrição Nrf2.

A GR catalisa a redução da GSSG a GSH, usando o NADPH e a GPx atua de forma a preservar a GSSG através da oxidação da GSH. Os animais alimentados com uma dieta enriquecida com ferro acumularam maior quantidade de ferro e a sua contínua acumulação nos hepatócitos poderá ter causado stresse oxidativo. Essa hepatotoxicidade poderá ter levado ao aumento a síntese de GSH. Isto permitiria explicar o seu aumento observado, embora não significativo, em todos os grupos de animais alimentados com dieta enriquecida com ferro, comparativamente aos respectivos grupos de animais alimentados com dieta standard. Este aumento parece ter-se acentuado nos animais Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, devido à sucessiva acumulação espontânea de ferro em animais com ausência do factor de transcrição de genes antioxidantes, o Nrf2. A conjugação da GSH com espécies reactivas e/ou xenobióticos, que são metabolizadas e posteriormente excretados do corpo, poderá diminuir a sua quantidade disponível para a oxidação em GSSG. Isto poderá explicar a sua diminuição nos animais com 6 meses alimentados com uma dieta enriquecida com ferro, comparativamente aos animais com a mesma idade alimentados com uma dieta standard. Por outro lado, essa oxidação poderá ser inibida pela GPx que é consumida de acordo com a sucessiva acumulação de ferro no fígado. Os animais com 6 meses alimentados com dieta enriquecida com ferro e os animais com 12 meses acumularam uma maior quantidade de ferro no fígado, o que refletiu uma inibição da actividade da GPx. Apesar de esta diminuição não ser significativa, a

actividade da GPx parece estar relacionada com o efeito da acumulação de ferro no fígado através da dieta e ao longo do tempo. Se nos animais com 6 meses, alimentados com dieta standard, se refletiu o papel transcripcional do Nrf2, através da diminuição da actividade da enzima nos animais Nrf2<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>, nos animais com 6 meses, alimentados com dieta enriquecida com ferro, e com 12 meses, essa diferença não foi evidente, permitindo concluir que existirão mecanismos alternativos para a regulação da GPx que evitam a diminuição da sua actividade em consequência do aumento do ferro no fígado, espontâneo ou induzido pela dieta. A contínua inibição de GSH e GPx justificam a diminuição da quantidade de GSSG, registada nos animais com 6 meses + Fe. Esta diminuição é significativa e, tal como nas anteriores enzimas, é inversamente proporcional à quantidade de ferro acumulada no fígado. A quantidade de GSH e de GSSG (e consequentemente da GSX) não parece ter sido influenciada pela ausência do gene Nrf2 provavelmente por estas moléculas não serem diretamente reguladas por este fator, existindo outros mecanismos para a sua regulação em consequência do aumento da quantidade de ferro no fígado.

Resumindo, o Nrf2 parece influenciar a atividade de algumas enzimas por ele regulado na presença de stresse oxidativo presente nos animais Hfe<sup>-/-</sup> e Nrf2/Hfe<sup>-/-</sup>. A quantidade de ferro no organismo e a idade dos animais parecem não ter induzido grandes alterações na atividade das enzimas antioxidantes e na quantidade da glutathione, possivelmente devido à baixa concentração de ferro adicionado à dieta e ao envelhecimento natural das próprias células que poderá ter levado a uma redução da sua capacidade de resposta antioxidante.





## VI. Conclusão

---

## VI. Conclusão

A homeostasia do ferro é regulada pelas células de forma a evitar uma elevada quantidade de ferro livre que possa promover a formação de espécies reativas de oxigénio. Os indivíduos com HH apresentam quantidades exageradas de ferro acumulado no fígado, o que pode evoluir para fibrose hepática e cirrose, aumentando o risco de carcinoma hepatocelular. O fator de transcrição Nrf2 controla a transcrição de enzimas antioxidantes importantes para a sobrevivência da célula e dos tecidos.

Ao longo deste estudo, foi possível avaliar o papel conferido pelo Nrf2, de forma a poder correlacionar a sua função protetora com a ausência de sintomas e de alterações hepáticas na maioria dos portadores da mutação C282Y no gene Hfe em homozigotia.

Nos animais com ausência do gene Hfe, a quantidade de ferro acumulada com origem na dieta enriquecida com 0,5% de ferro ou ao longo do envelhecimento dos animais ocorreu independentemente da presença ou da ausência do Nrf2. Este fator de transcrição parece não ter influenciado diretamente na quantidade de ferro absorvido, transportado e acumulado no fígado. Por outro lado, a sua presença moldou o padrão de distribuição do ferro ao longo do tecido hepático. Enquanto nos animais Hfe<sup>-/-</sup> o ferro se localizou essencialmente ao longo do parênquima, no citoplasma dos hepatócitos, em animais Nrf2<sup>-/-</sup> o ferro distribuiu-se tanto ao longo do parênquima, como nas células de Kupffer. Em animais envelhecidos essas acumulações formaram grandes aglomerados (“nódulos sideróticos”).

Curiosamente, apesar de aparentemente não ter influenciado na quantidade de ferro absorvido e acumulado pelo organismo, a análise da expressão dos genes relacionados com o metabolismo do ferro sugeriu que o Nrf2 está envolvido na regulação da expressão da hepcidina e da ferroportina, apesar de o seu papel na homeostasia do ferro ainda estar por esclarecer.

Aparentemente, o Nrf2 não interferiu com o peso final dos animais nem com a quantidade dos marcadores séricos de lesão hepática quantificados ao longo de toda a experiência.

Nos animais duplo *knock-out* com 18 meses registou-se um aumento na expressão do gene do col1a1 em comparação com os animais controlo e na deposição das fibras em redor dos “nódulos sideróticos”. A contínua acumulação de ferro e o aparecimento de eventuais lesões hepáticas poderão ter levado ao aparecimento de fibrose hepática. Desta forma, o Nrf2 poderá ter assumido um papel protetor contra o dano hepático, evitando o aparecimento de lesões, impedindo a evolução da patologia para fibrose.

Na ausência do gene Nrf2 a expressão dos genes antioxidantes por ele regulado ficou comprometida, diminuindo as capacidades de defesa antioxidantes das células, expondo o tecido ao aparecimento de lesões hepáticas. No entanto, o facto de não terem sido detetadas alterações substanciais nos níveis de glutathione nem na atividade de enzimas antioxidantes, sugere que a ausência do Nrf2 não predispôs os animais Hfe<sup>-/-</sup> para um stresse oxidativo, apesar do excesso de ferro hepático.

Este estudo permitiu concluir que a presença do gene Nrf2 interfere essencialmente na distribuição do ferro em excesso acumulado no fígado. O papel protetor a ele atribuído em estudos anteriores é evidenciado neste estudo através da ausência de fibras de colagénio sugestivas de fibrose, nos animais que apresentam o gene Nrf2. Em futuras investigações na área da Hemocromatose Hereditária humana, a desregulação da via de sinalização no Nrf2 pode ser associada ao desenvolvimento de formas clinicamente severas da doença, devido a um aumento de stresse oxidativo e lesões hepáticas.



## Referências Bibliográficas

1. Ganz, T. and Nemeth, E. (2011) Heparidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 62: 347-60.
2. Wang, J. and Pantopoulos, K. (2011) Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 434: 365-81.
3. Ganz, T. and Nemeth, E. (2012) Heparidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1434-43.
4. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142: 24-38.
5. Andrews, N. C. (2005) Molecular control of iron metabolism. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 159-69.
6. Viatte, L. and Vaulont, S. (2009) Heparidin, the iron watcher. *Biochimie* 91: 1223-8.
7. Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., and Devireddy, L. (2012) Mechanisms of Mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 51: 5705-24.
8. Andrews, N. C. (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341: 1986-95.
9. Utzschneider, K. M. and Kowdley, K. V. (2010) Hereditary hemochromatosis and diabetes mellitus: implications for clinical practice. *Nat Rev Endocrinol* 6: 26-33.
10. Evstatiev, R. and Gasche, C. (2012) Iron sensing and signalling. *Gut* 61: 933-52.
11. Johnson, E. E. and Wessling-Resnick, M. (2012) Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes Infect* 14: 207-16.
12. Andrews, N. C. and Schmidt, P. J. (2007) Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol* 69: 69-85.
13. Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S., and Leibold, E. A. (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1468-83.
14. Ganz, T. and Nemeth, E. (2012) Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a011668.
15. Pietrangelo, A. (2007) Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 46: 1291-301.
16. Siddique, A. and Kowdley, K. V. (2012) Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther* 35: 876-93.

17. Pietrangelo, A. (2010) Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 139: 393-408, 408 e1-2.
18. Andrews, N. C. (2008) Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 112: 219-30.
19. Ayonrinde, O. T., Milward, E. A., Chua, A. C., Trinder, D., and Olynyk, J. K. (2008) Clinical perspectives on hereditary hemochromatosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 45: 451-84.
20. Olynyk, J. K., Trinder, D., Ramm, G. A., Britton, R. S., and Bacon, B. R. (2008) Hereditary hemochromatosis in the post-HFE era. *Hepatology* 48: 991-1001.
21. Pietrangelo, A. (2004) Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 350: 2383-97.
22. Wood, M. J., Skoien, R., and Powell, L. W. (2009) The global burden of iron overload. *Hepatol Int* 3: 434-44.
23. Jonker, J. W., Stedman, C. A., Liddle, C., and Downes, M. (2009) Hepatobiliary ABC transporters: physiology, regulation and implications for disease. *Front Biosci* 14: 4904-20.
24. Inagaki, Y. and Okazaki, I. (2007) Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 56: 284-92.
25. Wang, J., Zohar, R., and McCulloch, C. A. (2006) Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res* 312: 205-14.
26. Martini F.H., I., Nath J.L., Bartholomew E.F., Fundamentals of Anatomy Physiology. 9th Edition ed. 2012, San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings.
27. Lambing, A., Kachalsky, E., and Mueller, M. L. (2012) The dangers of iron overload: bring in the iron police. *J Am Acad Nurse Pract* 24: 175-83.
28. Moyer, T. P., Highsmith, W. E., Smyrk, T. C., and Gross, J. B., Jr. (2011) Hereditary hemochromatosis: laboratory evaluation. *Clin Chim Acta* 412: 1485-92.
29. Jhang, J. S. and Schwartz, J. (2012) Phlebotomy or bloodletting: from tradition to evidence-based medicine. *Transfusion* 52: 460-2.
30. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Free radicals in biology and medicine. 4th ed. 2007, Oxford ; New York: Oxford University Press. xxxvi, 851 p., 8 p. of plates.
31. Ferreira, F., Ferreira, R., and Duarte, J. A. (2007) Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto* 7: 257-275.

32. Halliwell, B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 70: 257-65.
33. Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C., and Vinckx, T. (2011) Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* 3: 540-9.
34. Wu, J. Q., Kosten, T. R., and Zhang, X. Y. (2013) Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
35. Bogdanova, A. Y. and Nikinmaa, M. (2001) Reactive oxygen species regulate oxygen-sensitive potassium flux in rainbow trout erythrocytes. *J Gen Physiol* 117: 181-90.
36. Weydert, C. J. and Cullen, J. J. (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5: 51-66.
37. Lee, J. M., Li, J., Johnson, D. A., Stein, T. D., Kraft, A. D., Calkins, M. J., Jakel, R. J., and Johnson, J. A. (2005) Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* 19: 1061-6.
38. Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89-116.
39. Sykiotis, G. P. and Bohmann, D. (2010) Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 3: re3.
40. Liu, J., Wu, K. C., Lu, Y. F., Ekuase, E., and Klaassen, C. D. (2013) Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 305861.
41. Reisman, S. A., Buckley, D. B., Tanaka, Y., and Klaassen, C. D. (2009) CDDO-Im protects from acetaminophen hepatotoxicity through induction of Nrf2-dependent genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 236: 109-14.
42. Silva-Gomes, S., Santos, A. G., Caldas, C., Silva, C. M., Neves, J. V., Lopes, J., Carneiro, F., Rodrigues, P. N., and Duarte, T. L. (2013) Transcription factor NRF2 protects mice against dietary iron-induced liver injury by preventing hepatocytic cell death. *J Hepatol*.
43. Torrence JD, B. T., Tissue iron stores. *Methods in haematology*, ed. JD, C. 1980, New York: Churchill Livingstone Press.
44. Bancroft, J. D. and Stevens, A., *Theory and practice of histological techniques*. 5th ed. 2002, Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone. 800.

45. Nash, S., Marconi, S., Sikorska, K., Naeem, R., and Nash, G. (2002) Role of liver biopsy in the diagnosis of hepatic iron overload in the era of genetic testing. *Am J Clin Pathol* 118: 73-81.
46. Assuncao, M., Santos-Marques, M. J., Monteiro, R., Azevedo, I., Andrade, J. P., Carvalho, F., and Martins, M. J. (2009) Red wine protects against ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *J Agric Food Chem* 57: 6066-73.
47. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-6.
48. Flohe, L. and Otting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105: 93-104.
49. Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-90.
50. Santos-Marques, M. J., Carvalho, F., Sousa, C., Remiao, F., Vitorino, R., Amado, F., Ferreira, R., Duarte, J. A., and de Lourdes Bastos, M. (2006) Cytotoxicity and cell signalling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes. *Toxicology* 224: 210-8.
51. Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C., and Mannervik, B. (1985) Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol* 113: 499-504.
52. Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-21.
53. Ilyin, G., Courselaud, B., Troadec, M. B., Pigeon, C., Alizadeh, M., Leroyer, P., Brissot, P., and Loreal, O. (2003) Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett* 542: 22-6.
54. Sugimoto, H., Okada, K., Shoda, J., Warabi, E., Ishige, K., Ueda, T., Taguchi, K., Yanagawa, T., Nakahara, A., Hyodo, I., Ishii, T., and Yamamoto, M. (2010) Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G283-94.
55. Deugnier, Y. and Turlin, B. (2007) Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol* 13: 4755-60.
56. Kew, M. C. (2009) Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 286: 38-43.
57. Marro, S., Chiabrando, D., Messana, E., Stolte, J., Turco, E., Tolosano, E., and Muckenthaler, M. U. (2010) Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica* 95: 1261-8.



58. Harada, N., Kanayama, M., Maruyama, A., Yoshida, A., Tazumi, K., Hosoya, T., Mimura, J., Toki, T., Maher, J. M., Yamamoto, M., and Itoh, K. (2011) Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch Biochem Biophys* 508: 101-9.
59. Sangokoya, C., Doss, J. F., and Chi, J. T. (2013) Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin. *PLoS Genet* 9: e1003408.
60. Montero Girard, G., Vanzulli, S. I., Cerliani, J. P., Bottino, M. C., Bolado, J., Vela, J., Becu-Villalobos, D., Benavides, F., Gutkind, S., Patel, V., Molinolo, A., and Lanari, C. (2007) Association of estrogen receptor-alpha and progesterone receptor A expression with hormonal mammary carcinogenesis: role of the host microenvironment. *Breast Cancer Res* 9: R22.
61. Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Roberson, P. K., Kousteni, S., O'Brien, C. A., Bellido, T., Parfitt, A. M., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., and Manolagas, S. C. (2007) Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem* 282: 27285-97.
62. Oh, R. C. and Hustead, T. R. (2011) Causes and evaluation of mildly elevated liver transaminase levels. *Am Fam Physician* 84: 1003-8.
63. Aragon, G. and Younossi, Z. M. (2010) When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. *Cleve Clin J Med* 77: 195-204.
64. Dong, M. H., Bettencourt, R., Barrett-Connor, E., and Loomba, R. (2010) Alanine aminotransferase decreases with age: the Rancho Bernardo Study. *PLoS One* 5: e14254.
65. Le Couteur, D. G., Blyth, F. M., Creasey, H. M., Handelsman, D. J., Naganathan, V., Sambrook, P. N., Seibel, M. J., Waite, L. M., and Cumming, R. G. (2010) The association of alanine transaminase with aging, frailty, and mortality. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65: 712-7.
66. Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2013) Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*.
67. Lotersztajn, S., Julien, B., Teixeira-Clerc, F., Grenard, P., and Mallat, A. (2005) Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 605-28.
68. Hernandez-Gea, V. and Friedman, S. L. (2011) Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 6: 425-56.
69. Buttner, C., Skupin, A., and Rieber, E. P. (2004) Transcriptional activation of the type I collagen genes COL1A1 and COL1A2 in fibroblasts by interleukin-4: analysis of the functional collagen promoter sequences. *J Cell Physiol* 198: 248-58.

70. Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., and Dooley, S. (2002) Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7: d793-807.
71. Rahman, M. M., Sykiotis, G. P., Nishimura, M., Bodmer, R., and Bohmann, D. (2013) Declining signal dependence of Nrf2-MafS-regulated gene expression correlates with aging phenotypes. *Aging Cell* 12: 554-62.
72. Shih, P. H. and Yen, G. C. (2007) Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. *Biogerontology* 8: 71-80.
73. Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M., and Hagen, T. M. (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3381-6.
74. Marmol, F., Sanchez, J., Lopez, D., Martinez, N., Xaus, C., Peralta, C., Rosello-Catafau, J., Mitjavila, M. T., and Puig-Parellada, P. (2010) Role of oxidative stress and adenosine nucleotides in the liver of aging rats. *Physiol Res* 59: 553-60.
75. Zhang, Y., Huang, Y., Deng, X., Xu, Y., Gao, Z., and Li, H. (2012) Iron overload-induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin. *Eur J Pharmacol* 680: 95-101.
76. Honma, T., Tsuduki, T., Sugawara, S., Kitano, Y., Ito, J., Kijima, R., Tsubata, M., Nakagawa, K., and Miyazawa, T. (2013) Aging decreases antioxidant effects and increases lipid peroxidation in the Apolipoprotein E deficient mouse. *J Clin Biochem Nutr* 52: 234-40.
77. Sasaki, T., Unno, K., Tahara, S., and Kaneko, T. (2010) Age-related increase of reactive oxygen generation in the brains of mammals and birds: is reactive oxygen a signaling molecule to determine the aging process and life span? *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1: S10-24.
78. Van Raamsdonk, J. M. and Hekimi, S. (2012) Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5785-90.