

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE
DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Ana Luísa Gomes Santos

AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO
CONFERIDA PELA VIA DE
SINALIZAÇÃO DO NRF2 NUM MODELO
EXPERIMENTAL DE SOBRECARGA DE
FERRO *IN VIVO*

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica de Doutor Tiago Duarte, Investigador Auxiliar, Grupo *Iron and Innate Immunity*, Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC-INEB Laboratório Associado), e co-orientação de Professora Doutora Cristina Prudêncio, Professora Coordenadora com Agregação das Ciências Químicas e das Biomoléculas da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (ESTSP-IPP).

S e t e m b r o , 2 0 1 2

Agradecimentos

A todo o grupo de investigação *Iron and Innate Immunity* e ao Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC-INEB Laboratório Associado). Agradeço especialmente ao meu orientador, Tiago Duarte, pela paciência, disponibilidade constante, simpatia e pela preciosa orientação científica. Quero ainda agradecer a todos os meus colegas do grupo pelo apoio laboratorial e científico prestado.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto e à Área Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas, especialmente à Professora Cristina Prudêncio pela importante co-orientação e ao Professor Rúben Fernandes pelo apoio durante este percurso e pela paciência e disponibilidade que tiveram com os estudantes.

Aos meus colegas de mestrado companheiros de aulas, trabalhos e preocupações.

O meu maior agradecimento à minha família por permitirem que este objetivo tenha sido concretizado e por acreditarem sempre em mim... mais do que eu própria.

Ao Wilson por aturar todas as crises existenciais, de desespero, de euforia e de alegria, e por me fazer acreditar que eu era capaz...

Dedico este trabalho à minha avó e à pessoa que estaria mais orgulhosa se tivesse a possibilidade de me ver concluir este mestrado.

Este trabalho foi financiado pelo projeto PTDC/SAU-FCF/101177/2008.



Resumo

O ferro é encontrado em praticamente todos os seres vivos, sendo um cofator para proteínas que desempenham funções essenciais à vida. Nos mamíferos, a maioria do ferro está incorporada na hemoglobina ou armazenado no fígado, ligado à ferritina. É absorvido pelos enterócitos, sendo a principal forma de controlo dos seus níveis. A sobrecarga de ferro pode levar a hemocromatose, podendo ser tóxica para vários órgãos.

O fator de transcrição Nrf2 é importante na ativação de genes citoprotetores em situações de stress oxidativo/eletrofilico, colocando-se a hipótese de que poderá estar envolvido na resposta à progressão de doença devido à sobrecarga de ferro. Com o objetivo de determinar se a via do Nrf2 representa uma proteção contra a toxicidade do ferro a nível hepático, foram realizadas duas experiências nas quais murganhos C57BL/6 (B6) e Nrf2^{-/-} machos foram alimentados com dieta *standard* ou com dieta enriquecida em ferro carbonilo (FeC) (0,5% ou 2,0%).

Os resultados demonstram sobrecarga de ferro nos animais que receberam dieta enriquecida, sendo que os que receberam FeC 2,0% apresentaram níveis mais elevados de ferro hepático e sérico, bem como da saturação da transferrina. Os murganhos Nrf2^{-/-} são mais suscetíveis a esta acumulação, mostrando evidências patológicas mais graves, nomeadamente necrose hepatocítica e infiltração de células inflamatórias. A deleção do Nrf2 associado a uma dieta suplementada com FeC 2,0% parece não ser suficiente para o desenvolvimento de fibrose hepática. O estudo da expressão de genes e proteínas do metabolismo do ferro mostrou que os animais B6 e Nrf2^{-/-} são igualmente capazes de responder à sobrecarga de ferro, sugerindo que a sua diferente suscetibilidade à toxicidade do ferro não se deverá a uma regulação ineficiente da homeostasia do Fe. A dieta com FeC 2,0% aumentou a expressão de dois genes alvo do Nrf2, Nqo1 e Gsta1, o que não se verificou com os genes e proteínas GCLC e GCLM. A expressão de genes pró-inflamatórios não mostrou evidências de inflamação nestes animais.

Foi demonstrado que os animais Nrf2^{-/-} são mais suscetíveis à toxicidade do ferro, concluindo-se que a via do Nrf2 é ativada em resposta a uma dieta contendo quantidades excessivas de FeC e que confere proteção contra a acumulação de ferro em murganhos B6.

Palavras-Chave: Ferro, Dieta, Nrf2, Fígado, Hemocromatose

Abstract

Iron is found in almost all living organisms, being a cofactor for proteins that perform essential functions to life. In mammals, most of the iron is found in hemoglobin or stored in the liver bound to ferritin. Iron levels are mostly controlled via the regulation of its absorption in duodenal enterocytes. The iron overload may lead to hemochromatosis, which can be toxic to various organs.

Transcription factor Nrf2 is important in the activation of cytoprotective genes in oxidative/electrophilic stress, hence we hypothesize that it may be an important determinant of disease progression due to iron overload. With the aim of determining if the Nrf2 pathway represents a major protection against iron hepatotoxicity, two experiments were conducted in which C57BL/6 (B6) and Nrf2^{-/-} mice were fed with a standard diet enriched with carbonyl iron (CI) (0.5% or 2.0%).

The results demonstrate the development of iron overload in animals fed the enriched diet, where those who received CI 2.0% showed higher levels of hepatic and serum iron and transferrin saturation. Nrf2^{-/-} mice were more susceptible to iron accumulation, showing more severe pathology, including hepatocytic necrosis and inflammatory cell infiltration. Deletion of Nrf2 associated with a diet supplemented with CI 2.0% seems to be insufficient to the development of hepatic fibrosis. The study of the expression of genes and proteins that regulate iron metabolism showed that B6 and Nrf2^{-/-} animals are equally capable of responding to iron overload, suggesting that their different susceptibility to iron toxicity is not due to inefficient regulation of iron homeostasis. The CI 2.0% diet increased the expression of two Nrf2 target genes, Nqo1 and Gsta1, but not of GCLC and GCLM. The expression of pro-inflammatory genes was unchanged.

The current study demonstrated that the Nrf2 pathway is activated in response to a diet containing excessive amounts of CI, protecting B6 mice against the accumulation of iron. As a result, Nrf2^{-/-} animals are more susceptible to iron toxicity.

Keywords: Iron, Diet, Nrf2, Liver, Hemochromatosis

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract	x
Índice.....	xi
Índice de Abreviaturas	xv
Introdução	1
1. Objetivos.....	3
Capítulo I: Revisão Bibliográfica	5
1. Química do Ferro	6
2. Distribuição e Metabolismo do Ferro no Organismo	7
i. Absorção Intestinal (Enterócitos)	8
ii. Regulação da Hefcidina.....	10
iii. Aquisição Celular de Fe (Eritrócitos, Hepatócitos e Macrófagos).....	11
iv. LIP intracelular.....	15
3. Sistema IRE/IRP	16
4. Armazenamento de Ferro.....	17
5. Sobrecarga de Ferro	18
6. Via de Sinalização do Nrf2	20
i. Regulação da ativação do Nrf2.....	21
ii. Genes regulados pelo Nrf2.....	23
iii. Nrf2 e Resposta Hepática.....	24

Capítulo II: Métodos	27
1. Manutenção dos Animais e Tratamentos	28
2. Marcadores do Soro	29
3. Quantificação de Fe não-hémico no fígado	29
4. Histologia	31
i. Coloração Histológica Hematoxilina-Eosina (HE)	31
ii. Coloração de Perls (Azul da Prússia)	32
iii. Coloração por Tricrómio de Masson	32
5. TUNEL (<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>)	33
6. Microscopia Eletrónica de Transmissão	33
7. Imunofluorescência Indirecta	34
i. Casp-3 clivada	34
ii. 4-HNE	35
iii. α -SMA	36
8. Extração de RNA e síntese de cDNA	37
9. Real-Time Polimerase Chain Reaction (qRT-PCR)	38
10. Western Blot	39
11. Análise Estatística	42
Capítulo III: Resultados	43
1. Peso corporal, quantificação de Fe hepático, marcadores séricos de sobrecarga de Fe e de lesão hepática	44
2. Alterações histológicas e distribuição de Fe no fígado	47
3. Morte Celular	51
4. Análise ultraestrutural do tecido hepático	54
5. Pesquisa de peroxidação lipídica	56
6. Deposição de fibras de colagénio e fibrose hepática	57

7.	Expressão de genes e proteínas do metabolismo do Fe	60
8.	Expressão de genes e proteínas regulados pelo Nrf2.....	64
9.	Expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios.....	68
Capítulo IV: Discussão		69
1.	Peso corporal, quantificação de Fe hepático, marcadores séricos de sobrecarga de Fe e de lesão hepática	70
2.	Alterações histológicas e distribuição de Fe no fígado.....	72
3.	Morte Celular	73
4.	Análise ultraestrutural do tecido hepático.....	73
5.	Pesquisa de peroxidação lipídica	74
6.	Deposição de fibras de colagénio e fibrose hepática	75
7.	Expressão de genes e proteínas do metabolismo do Fe	76
8.	Expressão de genes e proteínas regulados pelo Nrf2.....	77
9.	Expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios.....	78
Conclusão.....		79
Referências Bibliográficas.....		83
Publicações		89

Índice de Abreviaturas

- 4-HNE - 4-hidroxinonenal
8-OH-dG - 8-hidroxideoxiguanosina
 α -SMA - α -actina de músculo liso
ALT - Alanina Aminotransferase
Apo-Tf - Apo-Transferrina
ARE - *Antioxidant Response Elements*
AST - Aspartato aminotransferase
B6 - C57BL/6
BMP6 - *Bone Morphogenetic Protein*
BTB - *Broad-Complex, Tramtrack, and Bric à brac*
BSA - *Bovine Serum Albumin*
bZip - *Basic Leucine-Zipper*
Casp-3 - Caspase-3 clivada
CNC - *Cap'n'Collar*
CO - Monóxido de Carbono
Col1A1 - Colagénio Tipo 1 A1
CP -Ceruloplasmina
Cul3 - Culina3
DcytB - *Duodenal cytochrome B*
dH₂O - Água desionizada
DMT1 - *Divalent Metal Transporter 1*
DTT - Ditioneitol
EpRE - *Electrophile Response Elements*
FBS - *Fetal Bovine Serum*
Fe - Ferro
FeC - Ferro Carbonilo
FLVCR - *Feline Leukemia Virus Subgroup C Cellular Receptor*
FPN - Ferroportina
GCL - Glutamato-Cisteína Ligase
GCLC - Glutamato-Cisteína Ligase subunidade Catalítica

GCLM - Glutamato-Cisteína Ligase subunidade Modificadora
GLB - *Glo Lysis Buffer*
GSH - Glutathionas
GST - Glutathiona-S-Transferase
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogénio
Hb - Hemoglobina
HCP-1 - *Haem Carrier Protein-1*
HE - Hematoxilina-Eosina
HH - Hemocromatose Hereditária
HJV - Hemojuvelina
HO-1 - Hemoxigenase-1
Holo-Tf - Holo-transferrina
IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry*
IFI - Imunofluorescência Indireta
IFN- γ - *Interferon-gama*
IL-1 β - Interleucina-1 beta
IRE - *Iron Responsive Element*
IRP - *Iron Regulatory Protein*
ISC - *Iron-Sulphur Clusters*
IVR - *Intervening region*
Keap1 - *Kelch ECH associating protein 1*
LIP - *Labile Iron Pool*
MDA - Malondialdeído
MET - Microscopia Eletrónica de Transmissão
Mfm - Mitoferrina
Neh - *Nrf2-ECH homology*
NQO1 - NADPH Quinona Oxireductase1
NRAMP1 - *Natural Resistance-Associated Macrophages Protein 1*
Nrf2 - *Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-Related Transcription Factor*
NTBI - *Non-Transferrin-Bound Iron*
O₂ - Oxigénio
O₂^{•-} - Radical Superóxido
OH[•] - Radical Hidroxilo

PBS - *Phosphate buffered saline*

ROS - Espécies Reativas de Oxigénio

sMaf - *Small Maf*

STEAP - *Six-Transmembrane Epitelial Antigen of the Prostate*

sTf - Saturação da Transferrina

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento beta

TIBC- *Total Iron Binding Capacity*

Tf - Transferrina

TfR1 - *Transferrin Receptor 1*

TfR2 - *Transferrin Receptor 2*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TUNEL - *TdT-mediated dUTP nick end labeling*

Tx100 - Triton-X 100

Tw20 - Tween 20

UTRs - *Untranslated Regions*

Introdução

Introdução

O ferro (Fe) é encontrado em praticamente todos os seres vivos, desempenhando diversas funções. No entanto, é perigoso para as células, devido ao seu poder oxidante.

A maioria do Fe do organismo está incorporada na hemoglobina (Hb) de precursores eritróides e de eritrócitos maduros, armazenado no fígado e nos macrófagos do sistema reticuloendotelial, e associado a proteínas e enzimas. É absorvido no intestino delgado pelos enterócitos, sendo a absorção a principal forma de controlo dos seus níveis, contudo os eritrócitos (eritropoiese), os hepatócitos e os macrófagos são elementos fundamentais para a normal homeostasia do Fe.

O organismo conta com vários mecanismos de homeostasia do Fe, de forma a evitar a sua acumulação ou deficiência. Para se defender dos danos provocados pela sua sobrecarga, o organismo conta com mecanismos de armazenamento de Fe, sobretudo sob a forma de ferritina, produção de hepcidina, inibição da absorção de Fe para a circulação sanguínea, e indução de enzimas antioxidantes. A sobrecarga de Fe pode levar a uma patologia denominada hemocromatose, que engloba vários tipos, e que se pode tornar tóxica para vários órgãos do corpo.

O *nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related transcription factor* (Nrf2) é um fator de transcrição importante na ativação de genes citoprotetores em situações de stress celular oxidativo ou eletrofilico. Como o Fe pode representar um perigo para as células devido ao seu poder oxidante via reação de Fenton, colocou-se a hipótese de que a via de sinalização do Nrf2 poderá estar envolvida na resposta à progressão de doença devido à sobrecarga de Fe, podendo representar uma proteção contra a sua toxicidade. Para responder a esta questão desenhou-se um estudo, a partir do qual se pretendeu avaliar a proteção conferida pela via de sinalização do Nrf2 em ratinhos C57BL/6 sujeitos a duas dietas diferentes, uma normal e outra enriquecida em Fe carbonilo (FeC), usando como controlo animais Nrf2^{-/-} criados no mesmo *background* genético. Este projeto focou-se no estudo da proteção conferida pelo Nrf2 a nível hepático, uma vez que o fígado, além de ser o órgão mais importante na destoxificação e eliminação de xenobióticos, é o principal armazenador de Fe, sendo um dos órgãos mais afetados pela sua sobrecarga.

1. Objetivos

Este estudo teve como objetivo principal avaliar a ativação da via de sinalização do Nrf2 pelo Fe, bem como a eventual proteção conferida por esta via de sinalização contra a toxicidade do Fe. Como modelo experimental, foram utilizados murganhos C57BL/6 (B6) e Nrf2^{-/-} alimentados com dieta normal ou dieta enriquecida em Fe.

Como objetivos específicos pretendeu-se avaliar as alterações do estado geral de saúde do animal (através do peso corporal e do fígado), caracterizar as alterações de marcadores séricos e de lesão hepática de sobrecarga de Fe e a quantidade de Fe acumulada nos fígados dos animais em estudo. Pretendeu-se ainda estudar as alterações histológicas do tecido hepático, assim como evidências e tipo de morte celular e alterações da célula a nível ultraestrutural. Foram também pesquisados sinais peroxidação lipídica e de fibrose hepática. A expressão de genes e proteínas importantes para a regulação dos níveis de Fe, assim como a expressão de genes e proteínas regulados pela via do Nrf2 importantes para a proteção celular, foi estudada, de forma a perceber se era alterada com a administração de uma dieta suplementada em ferro. Por fim a expressão de genes pró-inflamatórios foi estudada, para verificar se a dieta enriquecida em ferro provocava o seu aumento.

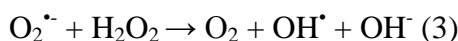
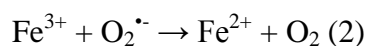
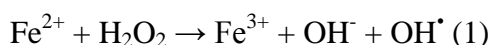
Capítulo I: Revisão Bibliográfica

I. Revisão Bibliográfica

1. Química do Ferro

O Fe é o segundo metal e o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre. Possui vários estados de oxidação (entre -II a +VI), sendo os mais importantes o II (Fe^{2+} ou Fe ferroso) e o III (Fe^{3+} ou Fe férrico), em que o primeiro é extremamente solúvel em água, enquanto o segundo é insolúvel (Crichton, 2009). Este metal é fundamental para a vida, mas devido à sua capacidade de libertar eletrões e de formar espécies reativas de oxigénio (ROS), pode ser tóxico para o organismo. O Fe possui eletrões desemparelhados, tendo a capacidade de participar em reações oxidação-redução, podendo variar entre os dois estados de oxidação referidos. Quase todas as células e tecidos precisam de Fe para funções fundamentais, que envolvem reações de oxidação-redução, como a síntese de Hb, transporte de oxigénio (O_2) e respiração celular (Kell, 2009).

A reação de Fenton (1) representa a reação química mais importante entre o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o Fe^{2+} , levando à formação de radicais hidroxilo (OH^\bullet), que são muito reativos e provocam graves danos às células (Kell, 2009). Na presença de pequenas quantidades de Fe, o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode reduzir o Fe^{3+} a O_2 e Fe^{2+} . Esta reação (2) e a reação de Fenton (1), na presença de quantidades catalíticas de Fe, originam O_2 , radicais e aniões hidroxilo. Esta reação é denominada de reação de Haber-Weiss (3) (Crichton, 2009, Kell, 2009, Kehrer, 2000).



A partir destas reações, os radicais hidroxilo e o Fe são capazes de interagir com macro e micromoléculas, inclusivamente o DNA, proteínas e lípidos insaturados, podendo provocar danos graves nestas moléculas (Kell, 2009, Eaton and Qian, 2002).

Os mamíferos desenvolveram mecanismos de homeostasia do Fe para evitar a sua acumulação anormal nas células e consequente toxicidade, e para controlar a sua libertação e utilização de acordo com as necessidades celulares.

2. Distribuição e Metabolismo do Ferro no Organismo

Um adulto contém aproximadamente 3-5g de Fe no organismo, estando a maioria incorporada na Hb de precursores eritróides e de eritrócitos maduros. A maioria do Fe restante está armazenada na forma de ferritina nos hepatócitos ($\approx 1000\text{mg}$), e nos macrófagos do sistema reticuloendotelial ($\approx 600\text{mg}$) (Figura 1) (Andrews, 1999, Wang and Pantopoulos, 2011). Quantidades menores de Fe estão armazenadas na mioglobina ($\approx 300\text{mg}$), ou associados a outras proteínas e enzimas que contêm Fe ($\approx 8\text{mg}$) (Gkouvatsos et al., 2012). A distribuição de Fe é alterada em algumas situações, como a gravidez e a deficiência ou sobrecarga de Fe (Andrews, 2000).

O Fe ligado à proteína plasmática transferrina (Tf) corresponde a menos de 0,1% do Fe total do corpo ($\approx 3\text{mg}$), mas representa a *pool* de Fe mais ativa do organismo. A medula óssea precisa de cerca de 20-30 mg de Fe por dia para a produção de eritrócitos, e estima-se que dos 30mg de Fe em circulação ligado à Tf (por dia), mais de 80% é distribuído para os eritroblastos da medula óssea (Gkouvatsos et al., 2012, Lee and Beutler, 2009).

Um adulto absorve cerca de 1-2mg de Fe por dia pela da dieta, para compensar as perdas diárias de Fe, sendo este reciclado pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial, a

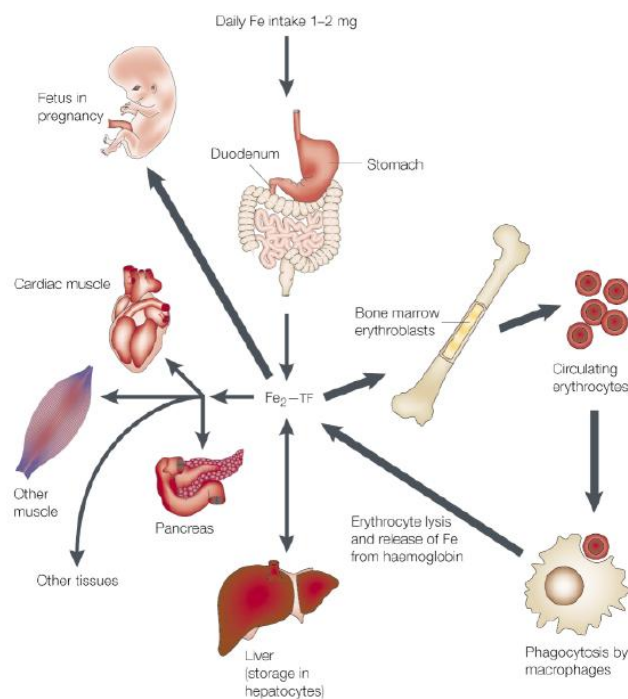


Figura 1 – Distribuição do Fe no organismo (Andrews, 2000). A maioria do Fe encontra-se na medula óssea e nos eritrócitos, sendo o restante armazenado sobretudo no fígado e nos macrófagos, responsáveis pela reciclagem do Fe dos eritrócitos senescentes. O Fe absorvido para a circulação é transportado pela Tf.

principal fonte de Fe plasmática (Gkouvatsos et al., 2012). Os níveis de Fe são controlados sobretudo através da absorção intestinal (enterócitos), mas também dependem do seu metabolismo a nível hepático, dos macrófagos e da eritropoiese.

i. Absorção Intestinal (Enterócitos)

O controlo do Fe pela absorção intestinal ocorre nos enterócitos duodenais (Figura 2). O organismo não tem a capacidade de alterar a sua excreção, uma vez que não existe nenhum mecanismo específico para controlar a eliminação de Fe, a qual ocorre normalmente pela perda de células epiteliais, de sangue, e pela transpiração (Batts, 2007, Yen et al., 2006). O Fe é obtido na dieta através de duas formas: grupo heme (proveniente de carne vermelha) e Fe^{3+} (proveniente de vegetais e grãos) (Zhang and Enns, 2009).

Para ser absorvido o Fe^{3+} tem primeiro que ser reduzido a Fe^{2+} . A *Duodenal cytochrome B* (DcytB), que tem vindo a ser descrita como a redutase férrica intestinal mais importante, localiza-se na membrana apical dos enterócitos e é induzida pela deficiência de Fe (Atanasova et al., 2005, Latunde-Dada et al., 2008).

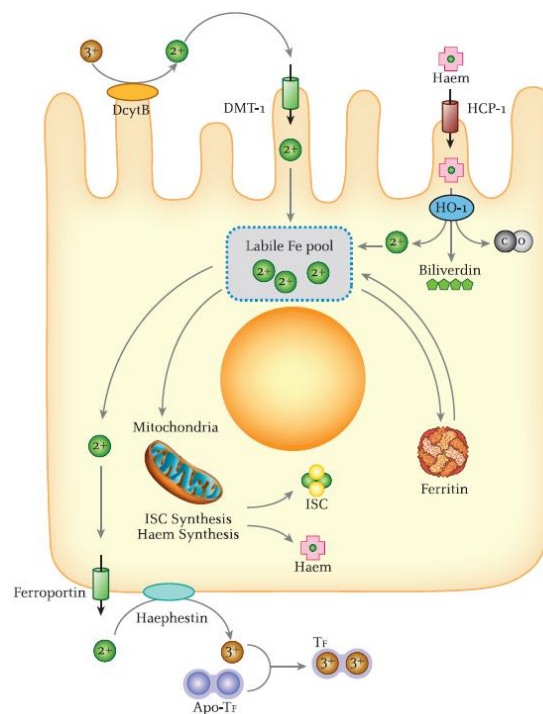


Figura 2 – Controlo dos níveis de Fe nos enterócitos duodenais (Evstatiev and Gasche, 2011). O Fe^{3+} obtido na dieta é reduzido a Fe^{2+} pela DcytB e absorvido via DMT1. O grupo heme é absorvido via HCP-1, e degradado pela HO-1, libertando o Fe^{2+} . O Fe^{2+} pode ser exportado para a circulação via ferroportina, oxidado a Fe^{3+} pela hefaestina e transportado pela Tf, ou armazenado sob a forma de ferritina.

A proteína *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1) é o mediador para a absorção do Fe^{2+} , e está localizado na membrana apical do enterócito. O transporte do Fe^{2+} do enterócito para o plasma é mediado pela ferroportina (FPN), que se localiza na membrana basal do enterócito, em macrófagos, hepatócitos e células da placenta, e esta por sua vez é mediada pela hepcidina. (Batts, 2007, Wessling-Resnick, 2006) Durante este processo o Fe é reoxidado a Fe^{3+} pela hefaestina (Vulpe et al., 1999).

A hepcidina é um péptido plasmático produzido sobretudo no fígado pelos hepatócitos, e é definido como o regulador sistêmico da homeostasia do Fe (Figura 3) (Viatte and Vulont, 2009). Este péptido liga-se à FPN das células libertadoras de Fe, provocando a sua internalização e degradação lisossomal (Nemeth et al., 2004). Assim, a sua função consiste na regulação negativa da FPN dos enterócitos e macrófagos, ou seja, um aumento de hepcidina resulta numa diminuição da absorção de Fe para o plasma, diminuindo os níveis totais de Fe no organismo, e vice-versa (Batts, 2007).

Depois de exportado do enterócito na forma Fe^{3+} , o Fe é armazenado e transportado por uma proteína plasmática, a Tf (Gomme et al., 2005). A Tf previne a precipitação do Fe^{3+} , mantém-no num estado não reativo e regula não só o transporte, mas também a sua disponibilidade para as células. Além disso, esta proteína plasmática possui um efeito bacteriostático, uma vez que ao sequestrar o Fe impede o crescimento bacteriano (Gkouvatsos et al., 2012, Brock et al., 1987).

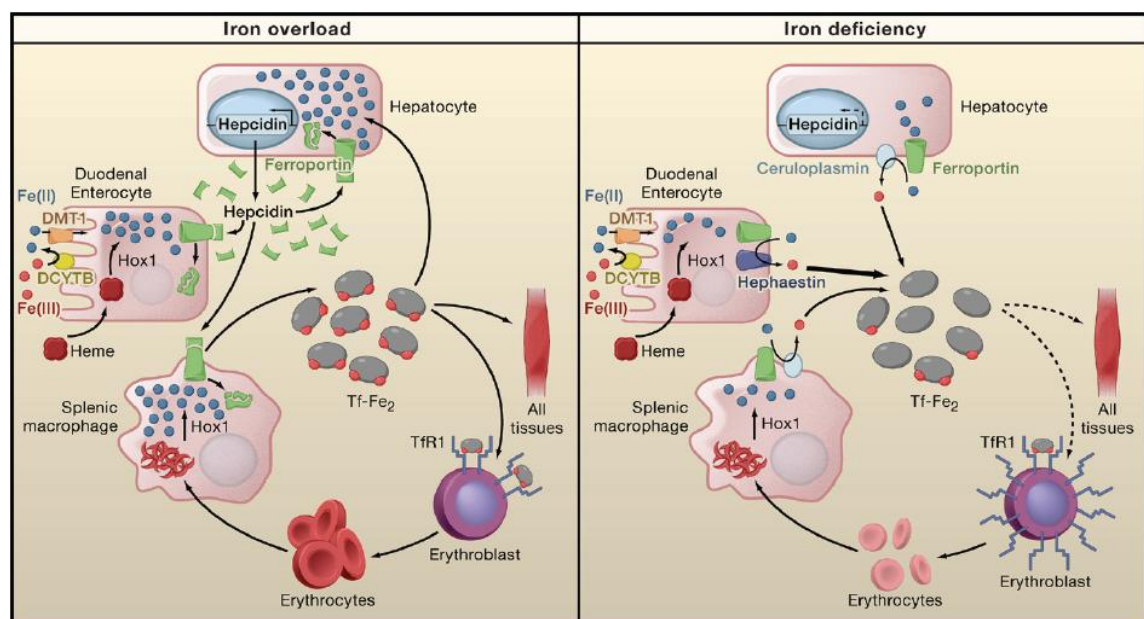


Figura 3 - Regulação sistêmica da homeostasia do Fe (Hentze et al., 2010). Quando os níveis de Fe são altos os hepatócitos produzem hepcidina, que inibe a FPN de enterócitos e macrófagos, não ocorrendo liberação de Fe para o sangue. Quando os níveis de Fe são baixos a produção de hepcidina é inibida e o Fe é libertado pela FPN.

A saturação da Tf (sTf) reflete a quantidade de Fe armazenada, e o balanço entre a recuperação do Fe²⁺ pelos macrófagos de eritrócitos senescentes e sua utilização na eritropoiese. Em condições normais, e em humanos, cerca de 30% da Tf está saturada. Em estados de acumulação de Fe esta é superior a 45% (Hentze et al., 2010).

Após ser absorvido, o Fe é transportado para o fígado através da veia porta, onde é armazenado e utilizado para funções hepáticas (Garrick, 2011). O Fe não absorvido pode ser armazenado no enterócito sob a forma de ferritina, ou utilizado em processos metabólicos (como síntese de heme e cofatores inorgânicos - *iron-sulphur clusters* (ISC) na mitocôndria) (Evstatiev and Gasche, 2011, Lill, 2009).

Embora não esteja bem esclarecido o mecanismo de absorção do Fe hémico, vários estudos têm demonstrado a sua entrada no enterócito através da proteína *Haem Carrier Protein-1* (HCP-1) (Shayeghi et al., 2005, Latunde-Dada et al., 2006). É depois libertado pela enzima citosólica hemoxigenase-1 (HO-1), e junta-se à *pool* de Fe do enterócito, podendo ser absorvido para o plasma, armazenado sob a forma de ferritina ou utilizado para o metabolismo celular (Evstatiev and Gasche, 2011).

ii. Regulação da Hepsidina

A produção de hepcidina nos hepatócitos é regulada por vários sinais, incluindo o nível de Fe no fígado e no plasma, hipóxia, eritropoiese e inflamação (Hentze et al., 2010).

Níveis altos de Fe armazenado no fígado desencadeiam a expressão e libertação da *Bone Morphogenetic Protein 6* (BMP6), à qual se liga o co-recetor hemojuvelina (HJV) (Babitt et al., 2006), que também interage com os recetores BMP tipos I e II. A formação deste complexo leva à ativação da cascata de sinalização SMAD pela fosforilação das proteínas SMAD1, 5 e 8, as quais interagem com a SMAD4, que leva, por sua vez, à ativação do promotor do gene *Hamp*, e transcrição da hepcidina (Figura 4) (Evstatiev and Gasche, 2011, Gkouvatsos et al., 2012).

A ativação da hepcidina pela holo-transferrina (holo-Tf) engloba a interação entre a proteína HFE, o *Transferrin Receptor 1* (TfR1), uma glicoproteína transmembranar amplamente expressa, e o *Transferrin Receptor 2* (TfR2), um homólogo do TfR1 expressa sobretudo nos hepatócitos (Figura 4).

A proteína HFE compete com a holo-Tf pelo local de ligação ao TfR1, enquanto o TfR2 se liga simultaneamente à proteína HFE e à holo-Tf (Gao et al., 2009). Assim, quando os níveis de holo-Tf são baixos, o TfR1 mantém a proteína HFE ligada, prevenindo a sua interação com o TfR2 e consequente produção de hepcidina. Por outro lado, quando os níveis de Fe no soro aumentam, a proteína HFE desloca-se para o TfR2, levando ao aumento da expressão de hepcidina. O complexo HFE/TfR2 ativa a cascata de sinalização BMP/SMAD e/ou a via de transcrição ERK/MAPK, as quais ativam a transcrição da hepcidina (Gkouvatsos et al., 2012, Hentze et al., 2010).

iii. Aquisição Celular de Fe (Eritrócitos, Hepatócitos e Macrófagos)

O principal mecanismo de absorção de Fe pelas células envolve a ligação da holo-Tf ao TfR1 (Figura 5), a qual é internalizada por endocitose mediada por clatrina. O endossoma é acidificado a um pH de 5,5 por uma bomba de prótons ATPase, o que provoca uma alteração na conformação da Tf e a libertação de Fe³⁺ (Gkouvatsos et al., 2012, Klausner et al., 1983). O Fe³⁺ para ser exportado é reduzido a Fe²⁺, sendo esta função realizada por metaloredutases da família STEAP (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate*) (Ohgami et al., 2005). O Fe²⁺ é transportado pela membrana do endossoma para o citoplasma pelo DMT1 (Fleming et al., 1998). O complexo apo-transferrina/TfR1 (apo-Tf/TfR1) volta para a membrana celular, por um processo que envolve a proteína Sec1511 (Lim et al., 2005), onde a apo-Tf é reciclada de volta para a circulação sanguínea, disponível para se ligar novamente ao Fe (Gkouvatsos et al., 2012).

Quando os níveis de Fe excedem a capacidade de ligação à Tf, este pode ficar disponível em circulação na sua forma livre não ligado à transferrina (*non-Tf-bound iron* - NTBI). O NTBI parece ser absorvido pelo fígado e pode contribuir para a acumulação de Fe na célula. Um estudo sugere que o transportador de zinco Zip14 (Slc39a14) pode estar envolvido na absorção de NTBI. O Zip14 é altamente expresso no intestino delgado, no fígado e no coração (Liuzzi et al., 2006, MacKenzie et al., 2008).

A Tf é a principal via de assimilação de Fe pelas células dos tecidos, no entanto, tipos específicos de células podem absorver Fe através de vias alternativas (Gkouvatsos et al., 2012). Um exemplo são os macrófagos, que absorvem grandes quantidades de Fe através de fagocitose de eritrócitos senescentes, mas também através de outras vias (discutidas à frente).

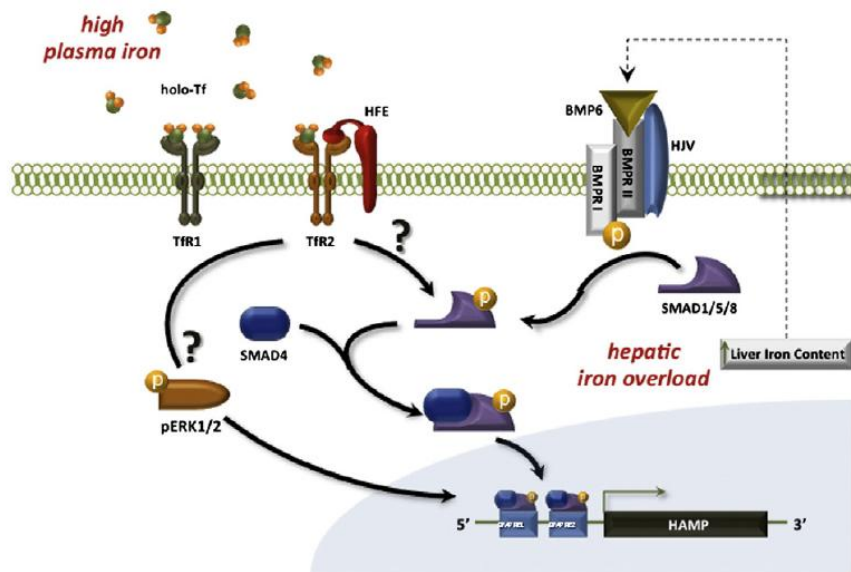


Figura 4 - Regulação da hepcidina pelo Fe sistêmico disponível (Gkouvatsos et al., 2012). O aumento do Fe armazenado no fígado leva à expressão da BMP6, que interage com a HJV e com os receptores BMP I e II, ativando a cascata de sinalização SMAD. Esta por sua vez ativa o promotor do gene HAMP e consequente transcrição da hepcidina.

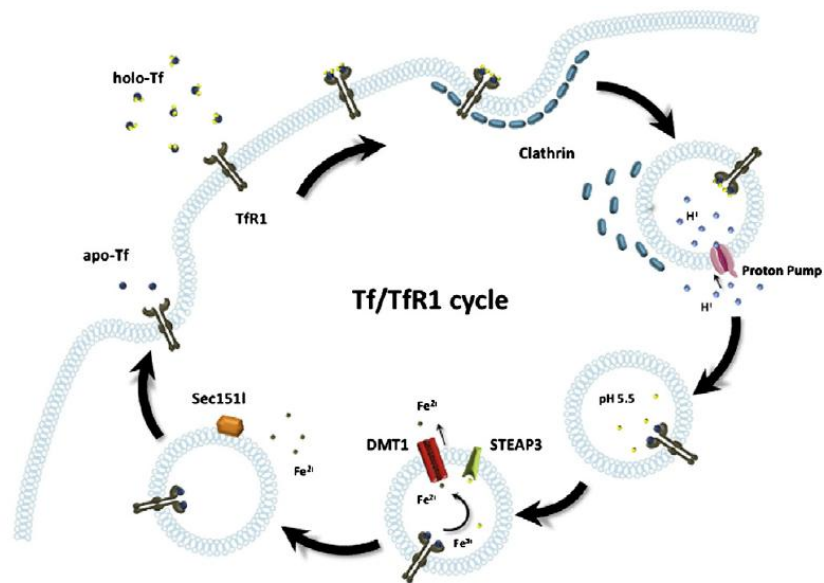


Figura 5 - Aquisição de Fe pela célula. A holo-Tf liga-se ao TfR1, e é internalizada via endocitose. O endossoma é acidificado para a liberação do Fe³⁺, o qual é reduzido a Fe²⁺ pela STEAP e exportado pelo DMT1. A apo-Tf é libertada para o plasma via TfR1 (Gkouvatsos et al., 2012).

A maioria do Fe necessário para a eritropoiese é obtido através da via holo-Tf/TfR1 (Gkouvatsos et al., 2012). O Fe intracelular é utilizado para a produção de Hb e para outras funções metabólicas da célula, podendo também ser armazenado sob a forma de ferritina ou exportado pela FPN. O heme excedente é exportado via *Feline Leukemia Virus Subgroup C Cellular Receptor* (FLVCR) ou catabolizado pela HO-1, em monóxido de carbono (CO), biliverdina e Fe^{2+} (Figura 6) (MacKenzie et al., 2008, Evstatiev and Gasche, 2011).

Os hepatócitos são os principais armazenadores de Fe e segregam a hepcidina, desempenhando um importante papel na regulação do metabolismo do Fe. Estas células têm a capacidade de absorver Fe via holo-Tf/TfR1 e Fe livre em circulação. Estes mecanismos diferem entre si, mas uma vez dentro da célula, o Fe absorvido é armazenado sob a forma de ferritina. Os hepatócitos libertam o Fe armazenado em resposta às necessidades celulares, promovendo a sua exportação para a circulação via FPN. Uma vez exportado para a circulação o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} pela ceruloplasmina (CP) e liga-se à Tf para transporte plasmático (Andrews, 2000).

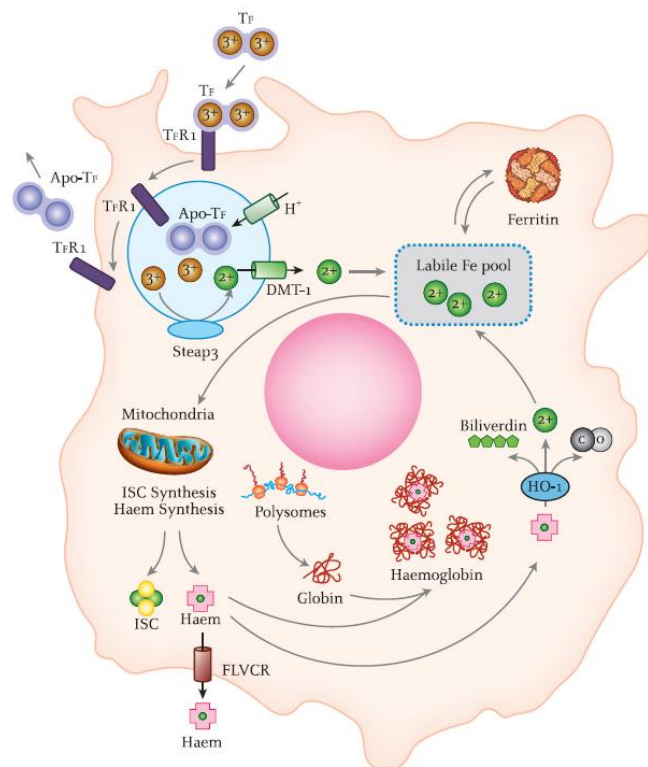


Figura 6 - Homeostasia do Fe nos eritroblastos (eritropoiese) (Evstatiev and Gasche, 2011). A maioria do Fe ligado à Tf é adquirido pelos eritroblastos via TfR1. A maioria do Fe intracelular é usado na síntese de Hb. O heme excedente é exportado via FLVCR ou catabolizado pela HO-1.

O grupo heme derivado da Hb é catabolizado em lisossomas pela HO-1 em CO, biliverdina e Fe^{2+} , o qual é exportado para a corrente sanguínea pela ferroportina (Ryter et al., 2006). O Fe^{2+} é convertido a Fe^{3+} pela CP, e armazenado pela Tf (Wang and Pantopoulos, 2011, Ryter et al., 2006). O Fe não é todo exportado para a circulação, sendo algum armazenado em ferritina ou utilizado para funções metabólicas (Ponka et al., 1998).

A Hb e o heme livres em circulação também são reciclados nos macrófagos. A Hb livre é reconhecida pelo recetor CD163, através da sua ligação à haptoglobina (Kristiansen et al., 2001, Van Gorp et al., 2010). Da mesma forma, o heme livre é capturado pela hemopexina, sendo este complexo endocitado via recetor CD91, presente na superfície dos macrófagos (Tolosano et al., 2010, Hvidberg et al., 2005, Gkouvatsos et al., 2012).

iv. LIP intracelular

Embora se tenham conseguido alguns avanços no estudo do tráfego de Fe dentro da célula, alguns aspetos continuam por perceber. Pensa-se que depois de ser internalizado via DMT1, o Fe adquirido via Tf/TfR1, forma a chamada *Labile Iron Pool* (LIP) (Gkouvatsos et al., 2012, Kakhlon and Cabantchik, 2002). Esta é uma *pool* de Fe com capacidade redox ativa, e pensa-se estar associada a vários quelantes de baixo peso molecular, tal como o citrato, ATP, AMP, pirofosfato e vários péptidos (Gkouvatsos et al., 2012).

A LIP é utilizada para a incorporação direta de Fe em proteínas ou para o seu transporte para as mitocôndrias via mitoferrina (Mfm), onde é utilizada na síntese do grupo heme e de ISC. O Fe da LIP que não é utilizado para processos metabólicos da célula pode ser exportado via FPN ou armazenado sob a forma de ferritina (Hentze et al., 2010).

Embora represente uma pequena fração do Fe total da célula ($\approx 3-5\%$), o tamanho da LIP reflete o estado de Fe celular (Gkouvatsos et al., 2012, Kruszewski, 2003). É determinada pela quantidade de Fe absorvida pela célula, utilização, armazenamento e exportação. Os níveis da LIP são regulados por sensores intracelulares, que desencadeiam respostas adaptativas homeostáticas (Gkouvatsos et al., 2012), e uma desregulação nestes mecanismos pode provocar deficiência ou sobrecarga de Fe (Hentze et al., 2010).

3. Sistema IRE/IRP

O sistema *Iron Responsive Element (IRE)/Iron Regulatory Protein (IRP)* é o sistema de detecção e regulação da homeostasia do Fe intracelular mais estudado em células de mamíferos (Evstatiev and Gasche, 2011).

O IRE é um elemento regulatório de mRNA e é constituído por uma estrutura em *hairpin* conservada. A IRP1 e a IRP2 são proteínas reguladoras pós-transcricionais da homeostasia do Fe intracelular. Estas proteínas detetam os níveis da LIP e ligam-se ao IRE localizado no mRNA alvo quando os níveis de Fe intracelular são baixos, controlando a sua expressão (Rouault, 2006). A ligação das IRP ao IRE depende da localização do IRE, que pode estar situado nas regiões não traduzidas (*untranslated regions - UTRs*) 5' ou 3' do mRNA alvo (Evstatiev and Gasche, 2011, Hentze et al., 2010).

A expressão do TfR1 e da ferritina são regulados pós-transcricionalmente através da ligação da IRP1 ou IRP2 aos IRE's nas UTRs dos respetivos RNAs. O mRNA do TfR1 contém múltiplos IREs na região 3'-UTR, enquanto os mRNA que codificam as ferritinas H e L contêm um único IRE nas regiões 5'-UTR (Wang and Pantopoulos, 2011, Rouault, 2006, Recalcati et al., 2010, Wallander et al., 2006).

Quando os níveis celulares de Fe são baixos, as IRPs ligam-se ao IRE da 3'-UTR do mRNA do TfR1, protegendo o transcrito da degradação e levando à estabilização do mRNA (Casey et al., 1988, Evstatiev and Gasche, 2011, Mullner and Kuhn, 1988, Wang and Pantopoulos, 2011). Este mecanismo leva a um aumento de TfR1 estimulando a absorção de Fe via holo-Tf/TfR1 (Wang and Pantopoulos, 2011).

Nas mesmas condições, e no caso da regulação da ferritina, as IRPs ligam-se aos IREs situados na região 5'UTR, resultando na supressão da ligação ribossomal e consequente diminuição da tradução da proteína (Evstatiev and Gasche, 2011, Aziz and Munro, 1987, Hentze et al., 1987, Rouault et al., 1988). A inibição da síntese de ferritina leva à sua diminuição, não ocorrendo armazenamento de Fe nestas condições (Wang and Pantopoulos, 2011). Por outro lado, quando há excesso de Fe na célula, ambas as IRPs se tornam inviáveis para ligação aos IREs, levando à degradação do mRNA de TfR1 e tradução da ferritina (Wang and Pantopoulos, 2011).

Este sistema de regulação pós-transcricional é utilizado pela célula para controlar proteínas de aquisição, armazenamento, utilização e exportação de Fe. Embora este sistema controle as principais proteínas de importação e utilização de Fe, as suas funções não estão limitadas ao seu metabolismo (Evstatiev and Gasche, 2011).

4. Armazenamento de Ferro

O Fe absorvido, e que não é necessário à célula, é armazenado em ferritina, a principal proteína de armazenamento de Fe. A ferritina é responsável pela captação de Fe reativo (Fe^{2+}), protegendo as células da formação de ROS mediadas pela reação de Fenton.

Cada molécula de ferritina (Figura 8) consiste em 24 subunidades de canais pesados (H) ou leves (L), codificados por genes diferentes (Arosio et al., 2009). A subunidade H tem atividade ferroxidase, convertendo o Fe^{2+} em Fe^{3+} (Lawson et al., 1989), enquanto a subunidade L dá estabilidade à estrutura e facilita a entrada do Fe^{3+} (MacKenzie et al., 2008). Quando os níveis celulares de Fe são baixos, este é libertado da ferritina.

Esta proteína encontra-se no citoplasma, no núcleo, nas mitocôndrias e no plasma (Evstatiev and Gasche, 2011, MacKenzie et al., 2008). A ferritina plasmática é um importante parâmetro clínico, uma vez que indica a quantidade de Fe armazenada. Assim, valores altos podem indicar sobrecarga de Fe, enquanto valores baixos indicam níveis diminuídos de Fe armazenado (Hentze et al., 2010).

A ferritina é uma proteína solúvel, e em colorações do Fe cora os hepatócitos e o citoplasma dos macrófagos de azul difuso e não granular. A ferritina não é característica de estados patológicos de sobrecarga de Fe. A hemossiderina é outra forma de armazenamento de Fe e resulta da degradação da ferritina. É uma proteína insolúvel, e aparece sob a forma de grânulos em colorações do Fe. A hemossiderina é encontrada em situações de acumulação de Fe, e geralmente está associada a estados tóxicos (Batts, 2007).

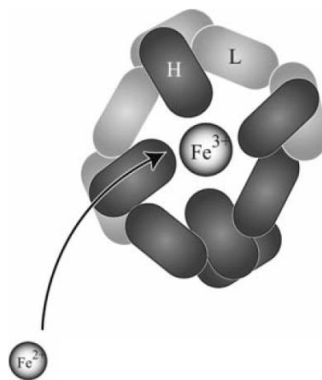


Figura 8 - Estrutura da ferritina (MacKenzie et al., 2008). A ferritina é composta por 24 subunidades L e H, em que a primeira dá estabilidade à estrutura e a segunda tem atividade de ferroxidase.

5. Sobrecarga de Ferro

O excesso de Fe no organismo pode levar à sua deposição nos tecidos, e consequentemente a doença, sendo o fígado, o coração e o pâncreas os órgãos mais afetados (Beutler, 2006, Eaton and Qian, 2002). A aquisição desregulada de Fe no organismo causa numa primeira fase o aumento da sTf, acumulando-se depois nas células dos órgãos alvo (Pietrangelo, 2010).

Para se defender dos danos provocados pela sobrecarga de Fe, o organismo conta com vários mecanismos de homeostasia do Fe. Estes mecanismos incluem o armazenamento de Fe sob a forma de ferritina (o qual pode falhar quando a sobrecarga é excessiva), a produção de hepcidina e inibição da absorção de Fe para a circulação sanguínea, e indução de enzimas antioxidantes (Eaton and Qian, 2002).

O termo hemocromatose refere-se a todas as formas de doença por deposição de Fe. Quando não está associada a outra patologia é designada de hemocromatose primária. Pode também ser secundária, quando tem como causa outras situações, como transfusões, eritropoiese inefetiva e aumento da ingestão oral de Fe (Beutler, 2006).

A Hemocromatose Hereditária (HH) é a forma de hemocromatose clinicamente mais importante. É autossômica recessiva e apresenta alterações num de vários genes, que codificam proteínas importantes para a homeostasia do Fe (MacKenzie et al., 2008).

A maioria dos casos de HH é devida a alterações em genes que regulam a hepcidina, nomeadamente o gene da proteína HFE (Feder et al., 1996), responsável pela maioria dos casos de HH (HH tipo 1), do Tfr2 (HH tipo 3) (Camaschella et al., 2000) e da HJV (hemocromatose juvenil tipo 2A) (Papanikolaou et al., 2004). Outros genes têm vindo a ser identificados como o da FPN (HH tipo 4) (Batts, 2007), e o gene que codifica a hepcidina, o gene Hamp (hemocromatose juvenil tipo 2B) (Roetto et al., 2003).

Como referido, o gene responsável pela maioria dos casos de HH é o gene HFE, e é responsável pela HH tipo 1. A mutação C282Y é a mais comum, em que indivíduos homocigóticos têm um risco acrescido de acumulação de Fe (Batts, 2007, Beutler, 2006).

A apresentação clínica da HH tipo 1 é muito variada, uma vez que a mutação C2825Y apenas predispõe para o desenvolvimento de hemocromatose, podendo outros fatores genéticos e não genéticos estar envolvidos na sua penetrância. Assim, as manifestações clínicas ocorrem mais comumente em homens de meia idade, e podem ir desde simples variações em marcadores bioquímicos a graves lesões nos órgãos afetados pela sobrecarga de Fe. Os sintomas mais comuns incluem fadiga, mal-estar, pele

escurecida, artralgia e hepatomegalia. Ao diagnóstico a sTf, enzimas hepáticas e ferritina sérica podem estar aumentadas, podendo também ocorrer fibrose, acumulação excessiva de Fe no fígado e cirrose (Pietrangelo, 2010). Análises histopatológicas de biópsia de fígado destes doentes têm revelado uma acumulação de hemossiderina nos hepatócitos, localizando-se sobretudo na zona periportal com um gradiente decrescente em direção à zona centrolobular (Pietrangelo, 2010, Batts, 2007).

O tratamento mais usual e mais eficaz é a flebotomia. Se a sobrecarga de Fe não for tratada, podem surgir complicações mais severas, como cirrose hepática, cancro, diabetes, hipogonadismo, falha cardíaca e artrite (Hentze et al., 2010, Pietrangelo, 2010).

Enquanto as formas de HH do adulto se manifestam a partir dos 30 anos, as formas de hemocromatose juvenil manifestam-se entre os 15 e 20 anos de vida. Estas formas de HH são menos comuns do que as formas de HH no adulto, mas mais severas (Batts, 2007, Beutler, 2006, Pietrangelo, 2010).

A hemocromatose juvenil é o tipo 2 de HH, e engloba duas formas, a 2A, que tem origem devido a uma mutação no gene da HJV, e a 2B, que tem origem numa mutação no gene Hamp (Batts, 2007, Beutler, 2006). Este tipo de HH pode levar a hipogonadismo irreversível, insuficiência cardíaca refratária, e mesmo morte na segunda a terceira décadas de vida (Hentze et al., 2010).

O tipo 3 de HH resulta de mutações no gene do Tfr2, é fenotipicamente semelhante à HH tipo 1, e é muito rara (Roetto et al., 2001, Beutler, 2006).

Mutações no gene da FPN dão origem ao tipo 4 de HH, e usualmente os pacientes apresentam anemia leve, acumulação de Fe nos macrófagos hepáticos, e não nos hepatócitos, ferritina sérica aumentada e sTf normal (Beutler, 2006).

Outra forma de hemocromatose autossômica recessiva é a neonatal. Não está relacionada com as formas juvenil e hereditária do adulto, embora apresente alterações histológicas semelhantes. Apresenta-se nos últimos 2-3 trimestres de gravidez, ocorrendo morte fetal, ou horas a semanas após o nascimento, com falha hepática aguda e, por vezes, de vários órgãos (Batts, 2007, Whittington, 2006).

Uma forma de HH autossômica dominante resulta duma mutação do IRE no mRNA da ferritina H, que leva a uma afinidade aumentada para as IRPs. Como consequência, a repressão da tradução da ferritina aumenta, levando a uma acumulação de Fe na célula (MacKenzie et al., 2008, Kato et al., 2001).

6. Via de Sinalização do Nrf2

O Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related transcription factor*) é um fator de transcrição bZip (*basic leucine-zipper*) e um membro da família de proteínas reguladoras *Cap'n'Collar* (CNC), descrito pela primeira vez em 1994 (Moi et al., 1994, Brigelius-Flohe and Flohe, 2011). O Nrf2 medeia a resposta celular a oxidantes e eletrófilos (indutores), pela ligação a um elemento potenciador na região promotora dos genes de proteção celular, chamado *antioxidant response element* ou *electrophile response element* (ARE ou EpRE) (Baird and Dinkova-Kostova, 2011, Itoh et al., 1997).

O Nrf2 é constituído por 605 aminoácidos divididos em 6 domínios funcionais (Figura 9), denominados de Neh1 a Neh6 (*Nrf2-ECH homology*) (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). O Neh1 contém a região CNC, o DNA de ligação bZip e o domínio de heterodimerização através do qual interage com fatores de transcrição da mesma família, as *small Maf* (sMaf), e liga-se ao DNA como um heterodímero (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). O Neh 2 é o domínio de regulação negativa do Nrf2, dado que é o local de ligação da Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*), uma proteína citosólica repressora que se liga ao Nrf2, retém-no no citoplasma e promove a sua degradação no proteossoma (Kensler et al., 2007, Brigelius-Flohe and Flohe, 2011). O Neh6 é o local de controlo do Nrf2 independente da regulação da Keap1 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011, McMahon et al., 2004). O domínio Neh3 liga-se à proteína CHD6, que funciona como um co-ativador transcricional e provoca a transcrição de genes dependentes do ARE (Nioi et al., 2005). Os domínios Neh4 e Neh5 atuam sinergicamente para a ligação a outro co-ativador transcricional, o CBP, levando à transativação dos genes alvo (Katoh et al., 2001).

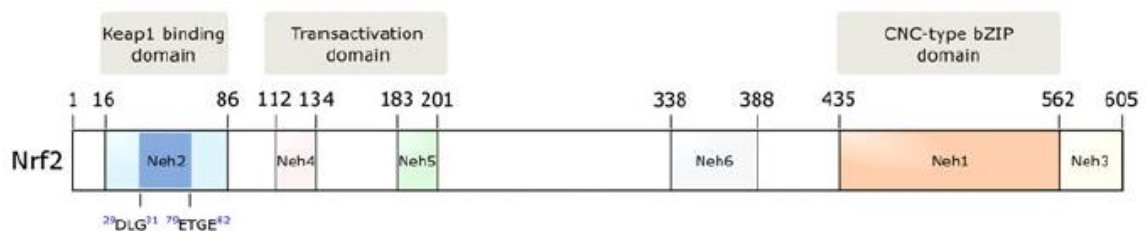


Figura 9 – Domínios funcionais do Nrf2 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). O Nrf2 é composto pelos domínios Neh2 (composto pelos locais DLG e ETGE, e responsável pela ligação à Keap1), Neh4 e Neh5 (ativação transcricional), Neh6 (controlo do Nrf2 independente da Keap1), Neh1 (contém o DNA de ligação bZip e o domínio de heterodimerização) e Neh3 (ligação à proteína CHD6).

A importância do Nrf2 na resposta celular ao stress é salientada por estudos que utilizam ratinhos Nrf2^{-/-}, em que estes são viáveis e férteis, mas apresentam uma maior sensibilidade a vários xenobióticos a nível de diversos órgãos (Baird and Dinkova-Kostova, 2011, Kensler et al., 2007). Além disso, o Nrf2 é importante em doenças crónicas que envolvem stress oxidativo, como doenças inflamatórias, neurodegenerativas e cancro (Kensler et al., 2007, Jaiswal, 2010).

i. Regulação da ativação do Nrf2

Numa revisão foram referidos dois mecanismos principais de regulação da ativação do Nrf2, a modificação das cisteínas da Keap1 e a fosforilação do Nrf2 (Copples et al., 2008). Num trabalho mais recente de Baird e Dinkova-Kostova, 2011, foram revistos com detalhe modelos de ativação da via do Nrf2, incluindo o modelo de sequestro e libertação do Nrf2 e o de estabilidade desta proteína. Este último é referido como o modelo com mais suporte experimental, em que em condições basais o Nrf2 está ligado à Keap1 e marcado para ubiquitinação e degradação proteossomal pela Culina3 (Cul3)-Rbx1 E3 ubiquitina ligase. Os indutores ao reagirem com as cisteínas da Keap1, levam à estabilização do Nrf2, sua translocação para o núcleo e ativação da transcrição dos genes dependentes do ARE. Para perceber como é que o Nrf2 é regulado pela sua estabilização em resposta a indutores foram propostos os seguintes modelos: dissociação da Cul3 e da Keap1, modelo *hinge* e *latch*, vaivém nucleocitoplasmático da Keap1, ubiquitinação da Keap1 e indutores diretos do Nrf2 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

Assim, de uma forma geral, quando a célula se encontra em condições basais, o Nrf2 é mantido no citoplasma pela Keap1 (Itoh et al., 1999). A Keap1 (Figura 10) é uma proteína constituída por um domínio de dimerização BTB (*Broad-Complex, Tramtrack, and Bric à Brac*), um domínio IVR rico em cisteínas (*Intervening Region*) e um domínio Kelch, através do qual o Keap1 se liga ao Nrf2 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). A Keap1 está ligada à actina do citosqueleto e funciona como um adaptador para a Cul3, através do domínio BTB, que marca o Nrf2 para ubiquitinação e consequente e permanente degradação proteossomal (Kobayashi et al., 2004). Este sistema é muito eficiente, uma vez que em condições normais a semi-vida do Nrf2 é de cerca 20 minutos, dificultando a sua deteção (Itoh et al., 2003, McMahon et al., 2003, Klaassen and Reisman, 2010).

Quando a célula é exposta a agentes oxidantes ou eletrofílicos (Figura 11), a ligação do Nrf2 e da Keap1 é quebrada, por modificações nas cisteínas do domínio IVR, levando a uma acumulação de Nrf2 no citosol e sua translocação para o núcleo (Li and Kong, 2009, Niture et al., 2010). No núcleo, o Nrf2 heterodimeriza com uma sMaf e liga-se ao ARE. A formação do complexo Nrf2/sMaf leva à ligação das proteínas CREB e p300 (Zhu and Fahl, 2001), que estão implicadas no recrutamento de histonas acetiltransferases e RNA polimerases (Vo and Goodman, 2001). A formação deste complexo leva à transcrição de uma série de genes de proteção celular (Itoh et al., 1997, Klaassen and Reisman, 2010).

Qualquer mecanismo que altere a ligação Nrf2/Keap1 resulta numa ativação da expressão de genes regulados pelo ARE. A presença de oxidantes ou eletrófilos na célula pode desencadear um mecanismo que envolve a fosforilação do Nrf2 por cinases, que são conhecidas por provocarem a sua libertação da Keap1 (Niture et al., 2010).

Embora durante muitos anos, a pesquisa realizada tenha demonstrado e consolidado os conhecimentos acerca da regulação do Nrf2 pela Keap1, nos últimos anos têm sido desenvolvidos estudos que têm descoberto mecanismos de regulação do Nrf2 independentes da Keap1. Estes mecanismos englobam a regulação do Nrf2 pela sua interação com novas proteínas e regulação epigenética da expressão Nrf2 e Keap1. Um melhor conhecimento acerca destes mecanismos pode ser muito importante para perceber a patogénese de determinadas doenças e respetiva terapêutica (Copple, 2012).

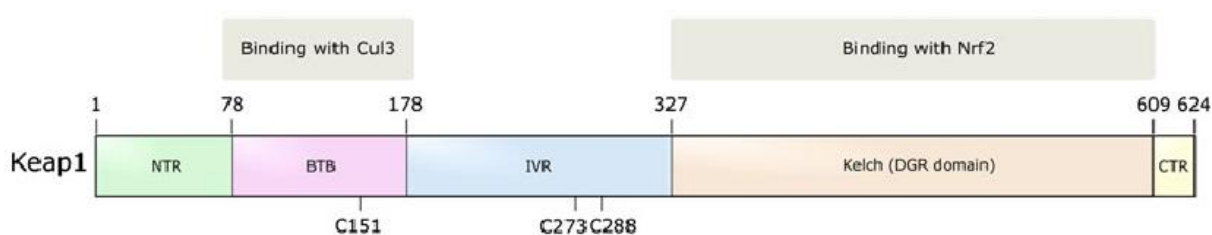


Figura 10 - Domínios funcionais da Keap1 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). A Keap1 é composta por 3 domínios principais, o BTB (ligação à Cul3), o IVR rico em cisteínas (a sua modificação influencia a libertação do Nrf2), e o domínio Kelch, local de ligação ao Nrf2. O NTR e o CTR são as regiões N-terminal e C-terminal, respetivamente.

ii. Genes regulados pelo Nrf2

A ativação da via Nrf2/ARE regula a expressão de proteínas citoprotetoras, que compreendem enzimas com funções antioxidantes, chaperonas moleculares, proteínas que potenciam a síntese e regeneração de glutatona e proteínas de fase II do metabolismo de drogas. A ativação desta via permite também o reconhecimento, reparação e eliminação de proteínas danificadas, inibe a inflamação mediada por citocinas e a autofagia, participa na reparação de nucleótidos, e ativa proteínas que regulam a expressão de recetores e outros fatores de transcrição e de crescimento (revisto em (Brigelius-Flohe and Flohe, 2011)).

Um estudo demonstrou que a sobreexpressão da via do Nrf2 aumentava a expressão e indução da NADPH Quinona Oxireductase1 (NQO1) em resposta a antioxidantes e xenobióticos (Venugopal and Jaiswal, 1996). Um outro estudo, que utilizou ratinhos Nrf2^{-/-}, confirmou a importância do Nrf2 na regulação de genes de enzimas de proteção celular, como a NQO1 e glutatona-S-transferase (GST). Este estudo demonstrou que animais desprovidos desta via apresentavam atividade e expressão diminuídas destas enzimas no fígado e no intestino quando comparados com ratinhos Nrf2^{+/+} (Itoh et al., 1997).

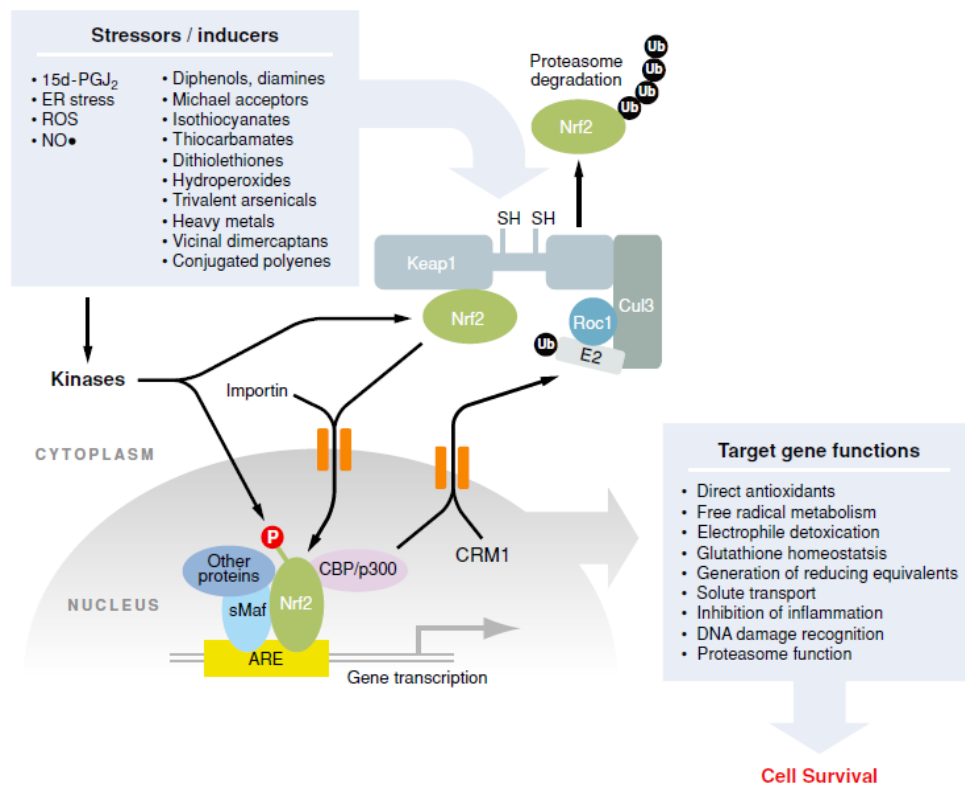


Figura 11 - Regulação da ativação do Nrf2/ARE (Kensler et al., 2007). Stressores endógenos ou exógenos provocam a libertação do Nrf2 pela Keap1, ocorrendo a sua translocação para o núcleo e interação com outras proteínas e fatores de transcrição. A formação destes complexos leva à ativação dos genes regulados pelo ARE, resultando na proteção e sobrevivência celulares.

A NQO1 é considerada um gene alvo típico do Nrf2. Esta enzima é uma flavoproteína citosólica, que compete com a citocromo P450 redutase e, catalisa a redução de dois elétrons e destoxificação de quinonas e outros compostos redox endógenos e exógenos (Ross, 2004, Joseph and Jaiswal, 1994). Assim, a NQO1 previne a formação de semiquinonas e ROS, protegendo as células contra o stress oxidativo.

As glutationas (GSH) mantêm o equilíbrio de oxidação-redução intracelular, protegem a célula contra ROS, agentes oxidantes e químicos tóxicos através da ligação direta ou conjugação enzimática de enzimas GST. A glutamato-cisteína ligase (GCL) intervém na síntese de GSH e representa o passo limitante e dependente de ATP. Fígados de animais Nrf2^{-/-} apresentam níveis diminuídos de GSH (Reisman et al., 2009), consequência da diminuição de enzimas de síntese, como a GCL. A GCL é composta por uma subunidade modificadora (GCLM) e outra catalítica (GCLC), e ambas contêm sequências ARE nos seus promotores (Klaassen and Reisman, 2010, Mulcahy and Gipp, 1995, Mulcahy et al., 1997, Seelig et al., 1984).

O Nrf2 tem sido descrito como regulador de outros genes de proteção celular mediados pela ativação do ARE, incluindo a HO-1, antioxidantes, transportadores de drogas, entre outros (Klaassen and Reisman, 2010, Niture et al., 2010).

iii. Nrf2 e Resposta Hepática

O fígado é o órgão principal de destoxificação e eliminação de xenobióticos, e por isso a compreensão da regulação transcricional das enzimas envolvidas no metabolismo de tóxicos tem sido o tema principal de muitos estudos (Klaassen and Reisman, 2010).

A capacidade do Nrf2 em ativar genes citoprotetores permite que o Nrf2 seja muito diverso na proteção conferida a nível hepático. Experiências realizadas com ratinhos Nrf2^{-/-} revelaram que estes animais apresentam uma maior suscetibilidade e dano hepático, quando expostos a acetaminofeno (um hepatotóxico) (Enomoto et al., 2001, Chan et al., 2001). A administração desta droga em ratinhos Nrf2^{-/-} causou um aumento da alanina aminotransferase (ALT) e danos celulares graves (Enomoto et al., 2001, Klaassen and Reisman, 2010). Estudos efetuados com outras drogas demonstraram que ratinhos Nrf2^{-/-} apresentavam concentrações altas de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG) no fígado, necrose centrolobular, fosfatase alcalina sérica e ALT aumentadas, lesão hepática mais extensa, dano oxidativo de DNA, coloração TUNEL positiva e morte celular por apoptose

(Umemura et al., 2006, Jiang et al., 2009, Lu et al., 2008). Um outro estudo que utilizou um modelo de fibrose hepática crónica demonstrou que ratinhos Nrf2^{-/-} apresentavam fibrose hepática e resposta inflamatória aumentada, quando comparado com ratinhos Nrf2^{+/+} (Xu et al., 2008). Assim, tem sido demonstrado que ratinhos Nrf2^{-/-} são particularmente suscetíveis a stress oxidativo e/ou eletrofílico induzido no fígado.

O mecanismo que leva à lesão hepática devido à acumulação de Fe não é bem conhecido. Estudos de Bacon et al. sugerem que o Fe facilita a formação de radicais livres, os quais levam à peroxidação lipídica, sendo esta uma das vias que leva ao dano hepático devido à sobrecarga de FeC em ratos (Bacon et al., 1983, Bacon and Britton, 1990). A peroxidação lipídica catalisada pelo Fe leva à formação de aldeídos altamente reativos, como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE), os quais se podem ligar a proteínas, fosfolípidos e DNA (Sodum and Chung, 1988, Houglum et al., 1990).

Dado que o Nrf2 é um fator de transcrição importante na ativação de genes protetores em situações de stress celular oxidativo ou eletrofílico, e como o Fe pode representar um perigo para as células devido ao seu poder oxidante via reação de Fenton, colocou-se a questão de que a sinalização do Nrf2 poderá estar envolvida na resposta à progressão de doença devido à sobrecarga de Fe, podendo representar uma proteção contra a sua toxicidade. Para responder a esta questão desenhou-se um estudo, a partir do qual se pretendeu avaliar a proteção conferida pela via de sinalização do Nrf2 em ratinhos B6 sujeitos a duas dietas diferentes, uma normal e outra enriquecida em FeC, usando como controlo animais Nrf2^{-/-} criados no mesmo *background* genético. Este projeto focou-se no estudo da proteção conferida pelo Nrf2 a nível hepático, uma vez que o fígado, além de ser o órgão mais importante na destoxificação e eliminação de xenobióticos, é o principal armazenador de Fe, sendo um dos órgãos mais afetados pela sua sobrecarga.

Capítulo II: Métodos

II. Métodos

1. Manutenção dos Animais e Tratamentos

Murganhos C57BL/6 (B6) originalmente obtidos de Charles River (Espanha) e Nrf2^{-/-} (no *background* genético C57BL/6) machos, originalmente obtidos de Riken (Japão), com 8 semanas de idade, foram alimentados *ad libitum* com dieta *standard* para roedores (Global Rodent Diet, Harlan, Estados Unidos da América - EUA) ou com dieta enriquecida FeC 0,5%, durante 8 semanas. Em paralelo decorreu outra experiência, em que animais B6 e Nrf2^{-/-} machos, com 16 semanas de idade, foram alimentados *ad libitum* com a mesma dieta *standard* para roedores ou com dieta enriquecida com uma maior quantidade de FeC (2,0%), durante 2 semanas.

Os animais foram alojados no Biotério do Instituto de Biologia Celular e Molecular (IBMC-INEB Laboratório Associado) em condições de temperatura (~22°C) e luz controladas (12 horas luz/12 horas escuro), e tiveram livre acesso a água.

No final de cada experiência, os animais foram anestesiados com isoflurano (B. Braun Medical, Portugal) e o sangue total foi colhido por via retro-orbital. De seguida foram sacrificados com dose terminal de isoflurano, seguida de deslocamento cervical, e dissecados para remoção do fígado.

As experiências foram realizadas em conformidade com as diretrizes de ética do IBMC, e os regulamentos nacionais e europeus para o cuidado e manuseio de animais de laboratório. Toda a manipulação dos animais foi realizada por profissionais devidamente acreditados para trabalho envolvendo experimentação animal (FELASA B e C).

A amostra da experiência de FeC 0,5% englobou 24 murganhos, em que 5 B6 e 5 Nrf2^{-/-} foram alimentados com dieta *standard*, 6 B6 e 8 Nrf2^{-/-} foram alimentados com dieta enriquecida em FeC 0,5%.

A amostra da experiência de FeC 2,0% englobou 22 murganhos, em que 4 B6 e 4 Nrf2^{-/-} foram alimentados com dieta *standard*, 6 B6 e 8 Nrf2^{-/-} foram alimentados com dieta enriquecida em FeC 2,0%.

Os animais foram pesados no início e no final das experiências.

2. Marcadores do Soro

A quantificação dos marcadores do soro foi efetuada no equipamento Cobas C8000 (Roche Diagnostics, Alemanha), no Centro Hospitalar do Porto. Dez minutos após a colheita do sangue, as amostras foram centrifugadas a 10 000xg durante 10 minutos. Após a centrifugação, o soro foi separado e conservado a 4°C.

A quantificação de ALT e de aspartato aminotransferase (AST) foi feita pelo método do *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) sem piridoxal-5'-fosfato. O Fe no soro foi quantificado pelo método guanidina-ferrozina e a capacidade total de ligação do Fe (TIBC: *Total Iron Binding Capacity*) foi medida pelo método da ferrozina. A sTf foi calculada através das fórmulas:

$$\text{Transferrina (Tf)} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{TIBC} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{dL}} \right)}{1,41}$$

$$\text{Saturação da Transferrina (sTf)} (\%) = \frac{(\text{Fe} \times 100)}{\text{Tf} \times 1,41}$$

3. Quantificação de Fe não-hémico no fígado

A determinação de Fe não-hémico no fígado foi efetuada pelo método batofenantrolina. Para tal foram colhidas amostras de fígado e colocadas num tubo de 1,5mL. As amostras de fígado foram pesadas (peso fresco) juntamente com o tubo, e depois o tubo vazio, e de seguida foram secas em copos de Teflon (CEM Corporation, EUA) no microondas MDS 2000 (CEM Corporation, EUA) durante 2 horas.

Depois de secos os órgãos foram pesados (peso seco) e digeridos em 1mL de mistura ácida (0,1g/mL ácido tricloroacético e 822μL ácido clorídrico a 36,5%) durante 20h a 65°C. No final deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e transferiu-se 500μL do sobrenadante para um tubo novo de 1,5mL. Para a preparação das amostras foram pipetados 1000μL de reagente cromogénio de trabalho [5 volumes dH₂O, 5 volumes acetato de sódio saturado e 1 volume de reagente cromogénio (1mg/mL sulfonato batofenantrolina, 10μL/mL ácido tioglicólico)], 50μL (experiência FeC 0,5%) ou 25μL de

amostra (experiência FeC 2,0%) e 250µL (experiência FeC 0,5%) ou 275µL (experiência FeC 2,0%) de dH₂O. O branco foi preparado da mesma forma, mas sem adição de amostra. Para a preparação do padrão foram adicionados 1000µL de reagente cromogénio de trabalho a um tubo de 1,5mL, 150µL de solução padrão de Fe [5,4µL/mL ácido clorídrico a 36,5% e 10µL/mL de solução padrão de Fe stock (1,115mg/mL FeC, 54,8µL/mL ácido clorídrico a 36,5%)] e 150µL de dH₂O.

A cor produzida pela reação do reagente cromogénio de trabalho com o Fe produziu cor, a qual foi medida por espectrofotometria a 535nm no equipamento *µQuant* (BioTek, Alemanha) (Torrence and Bothwell, 1980, Neves et al., 2009).

A quantidade de Fe não-hémico no fígado foi calculada da seguinte forma:

$$Fe \text{ tecido seco } (\mu g / g \text{ tecido seco}) = \frac{A_t - A_b}{A_p - A_b} \times \frac{Fe_p}{P_s} \times \frac{V_f}{\frac{V_a}{V_p}}$$

Onde:

A_t - Absorvância do teste

A_b - Absorvância do branco

A_p - Absorvância do padrão

Fe_p - Concentração de Fe do padrão (11,169µg/mL)

P_s - Peso do tecido seco (g)

V_f - Volume final da mistura ácida após incubação *overnight* a 65°C (1300µL)

V_a - Volume da amostra (25 ou 50µL de sobrenadante)

V_p - Volume do padrão (150µL de solução padrão de Fe)

A partir do resultado do Fe no tecido seco foi calculado o Fe no tecido fresco, a partir da fórmula:

$$Fe \text{ tecido fresco } (\mu g / g \text{ tecido fresco}) = \frac{Fe_{ts}}{P_f / P_s}$$

Onde:

Fe_{ts} - Ferro tecido seco (µg/g tecido seco)

P_f - Peso tecido fresco (g)

P_s - Peso tecido seco (g)

A partir do resultado do Fe no tecido fresco foi calculado o Fe não-hémico total no fígado, a partir da fórmula:

$$Fe\ Total\ (\mu g) = \frac{P_t}{Fe_{tf}}$$

Onde:

P_t - Peso do órgão e tubo (g)

Fe_{tf} - Ferro tecido fresco (μg/g tecido fresco)

4. Histologia

O fígado foi removido imediatamente após o sacrifício dos animais, sendo uma amostra fixada em formol tamponado a 10% durante 24 horas. De seguida, a amostra foi processada e incluída em parafina.

Foram realizados cortes do tecido com 3μm de espessura, corados com Hematoxilina-Eosina (HE), bem como pelos métodos de Perls e Tricrómio de Masson.

Previamente às colorações as lâminas foram desparafinadas e hidratadas, passando primeiro por xilol durante 10 minutos, de seguida por soluções decrescentes de etanol (100% durante 10 minutos, 96%, 70% e 50% durante 5 minutos em cada), e por fim por dH₂O, onde permaneceram até serem utilizadas.

Todas as lâminas foram observadas ao microscópio óptico e foram captadas imagens no *Light Microscope Olympus CX31 with DP-25 Camera (Imaging Software Cell^B)*, com ampliações de 100×, 400× e 1000×.

i. Coloração Histológica Hematoxilina-Eosina (HE)

Para uma avaliação histopatológica do tecido procedeu-se à coloração HE, que consistiu em desparafinar as lâminas e colocá-las durante 5 minutos em hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, Alemanha), depois em água corrente (5 minutos) e em eosina (Merck, Alemanha) por 5 minutos. No final as lâminas foram lavadas em água corrente (30 segundos).

No fim da coloração as lâminas foram desidratadas, passando por soluções crescentes de etanol (50%, 70%, 96% 5 minutos em cada e 100% durante 10 minutos) e xilol (10 minutos) e por fim montadas com Entellan (Merck, Alemanha) e lamela.

ii. Coloração de Perls (Azul da Prússia)

Para a avaliação qualitativa de hemossiderina no fígado foi realizada a coloração de Perls (azul da Prússia), adaptada do trabalho de (Meguro et al., 2003). As lâminas da experiência de FeC 0,5% foram desparafinadas e colocadas na solução de Perls (ferrocianeto de potássio 2% e ácido clorídrico 2%) durante 30 minutos, lavadas em dH₂O por 5 minutos, contrastadas com eosina (5 minutos) e de seguida com hematoxilina de Mayer (30 segundos), sendo depois lavadas em dH₂O. As lâminas da experiência de FeC 2,0% foram processadas da mesma forma, mas foi utilizado o contrastante *Nuclear Fast Red solution* (Sigma-Aldrich, Alemanha), durante 20 minutos, em vez da eosina e da hematoxilina de Mayer.

No final da coloração as lâminas foram desidratadas e montadas como referido.

iii. Coloração por Tricrómio de Masson

Para a observação de fibras de colagénio procedeu-se à coloração pelo Tricrómio de Masson, utilizando-se o kit Colorações Tricrómicas (Masson) Accustain (Sigma Aldrich, Alemanha), segundo as indicações do fabricante. As lâminas foram desparafinadas e foi aplicado mordente em solução de Bouin pré-aquecida (56°C 15 minutos) e de seguida foram arrefecidas e lavadas em água corrente. Depois foram coradas com solução de trabalho de hematoxilina férrica de Weigert (partes iguais das soluções A e B) durante 5 minutos e lavadas em água corrente (5 minutos). De seguida procedeu-se à coloração com escarlata de Biebrich e fucsina ácida (5 minutos), prosseguindo-se uma lavagem com dH₂O. As lâminas foram colocadas em solução de trabalho de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico durante 5 minutos (1 volume de solução de ácido fosfotúngstico, 1 volume de solução de ácido fosfomolibdico e 2 volumes de dH₂O) e depois em solução de anilina azul (5 minutos). Por fim, as lâminas foram colocadas em ácido acético 1% durante 2 minutos e lavadas.

No final da coloração as lâminas foram desidratadas e montadas como referido.

5. TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*)

O TUNEL é uma técnica que deteta quebras na cadeia de DNA, e foi realizada para avaliar a morte celular em amostras de tecido hepático, de acordo com as instruções do fabricante.

Foram utilizados cortes de tecido hepático parafinado, que foram desparafinados e hidratados, como já referido. De seguida procedeu-se a uma lavagem com *Phosphate buffered saline* (PBS) durante 5 minutos e depois à recuperação antigénica, incubando as amostras com proteinase K 20µg/mL em Tris-EDTA (TE)-CaCl₂ durante 20 minutos a 37°C, e depois 10 minutos à temperatura ambiente. No final da incubação as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS durante 5 minutos.

Adicionou-se a mistura de reação TUNEL (50µL *Enzyme Solution* e 450µL *Label Solution*) do kit *In Situ Cell Death Detection Kit, AP* (Roche Diagnostics, Alemanha) às lâminas, e incubou 1 hora a 37°C em câmara húmida. As lâminas foram depois lavadas três vezes em PBS durante 5 minutos. Por fim, as amostras foram colocadas em DAPI durante 15 minutos, e as lâminas foram montadas com *Vectashield*, lamela e verniz, como referido anteriormente.

O controlo positivo utilizado foi uma lâmina de tecido hepático tratada com DNase.

6. Microscopia Eletrónica de Transmissão

Para microscopia eletrónica de transmissão (MET) foram cortados pequenos fragmentos de fígado dos murganhos das experiências de FeC 0,5% e 2,0%. Após fixação em gluteraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (4°C, pH 7,2-7,4) *overnight*, as amostras de fígado foram lavadas durante 1 hora com tampão cacodilato de sódio 0,1M (4°C, pH 7,2-7,4) e contrastadas (pós-fixação) com tetróxido de ósmio 2,0% (em tampão cacodilato de sódio 0,1M, 4°C, pH 7,2-7,4) durante 2 horas em agitação e protegidas da luz. Findo este tempos as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (50%, 75% 90%, 95%, três vezes 100% durante 15 minutos em cada) e colocadas durante 15 minutos em óxido de propileno. De seguida foram impregnadas em quantidades crescentes óxido de propileno e epon (3:1, 1:1, 1:3 durante 1 hora em cada), e finalmente incluídas em epon durante 1 hora à temperatura ambiente e depois numa nova solução de epon a 55°C *overnight*.

Para cada amostra, realizaram-se cortes semi-finos (250nm de espessura) no ultramicrotomo LKB Bromma, que foram colocados numa lâmina e corados com uma solução de azul metileno (0.5g), azul b (0.5g), borax (0.5g), e 100mL dH₂O durante 20 segundos, de forma a avaliar a zona de interesse (hepatócitos periportais) para a realização de cortes ultrafinos (50nm).

Os cortes ultrafinos foram feitos no ultramicrotomo *Leica Reichert SuperNova*, colocados numa grelha e contrastados com acetato de urânio (30 minutos) e citrato de chumbo (15 minutos).

Os cortes foram observados ao microscópio eletrónico de transmissão *JEM 1400 (120 kV)* (Jeol, Japão) no Serviço de Histologia e Microscopia Eletrónica do IBMC, tendo sido captadas imagens de zonas de interesse utilizando diferentes ampliações (15000-30000×).

7. Imunofluorescência Indireta

A avaliação qualitativa da caspase-3 clivada (Casp-3 clivada), do 4-HNE e da α -actina de músculo liso (α -SMA) foi feita a partir de imunofluorescência indireta (IFI). Para tal, foram realizados cortes de tecido, os quais foram desparafinados e hidratados, como referido anteriormente, e para cada um dos casos foi seguido protocolo descrito.

Todas as lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência e foram captadas imagens no *Zeiss AxioSkop, AxioCam MR ver.2.0* (Carl Zeiss, Alemanha), *Axiovision 4.7* (Carl Zeiss, Alemanha), com ampliações entre 100 e 400×.

i. Casp-3 clivada

Depois de desparafinados e hidratados, procedeu-se à recuperação antigénica dos tecidos. Para tal, as lâminas foram colocadas em tampão citrato 10mM pH 6,0, procedendo-se ao seu aquecimento em microondas a 700w até entrar em ebulição. Depois de entrar em ebulição baixou-se para 100w durante 10 minutos, não permitindo que o tampão fervesse. Decorrido este tempo deixou-se arrefecer durante 30 minutos, lavando-se de seguida com PBS duas vezes durante 5 minutos.

Para diminuir o *background* as lâminas foram colocadas em 0,2M NH₄Cl, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se uma etapa de bloqueio com 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS)-0,3% Tx10 -PBS durante 1 hora à temperatura ambiente.

Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário policlonal *Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody* (Cell Signaling Technology, EUA), numa diluição de 1:500 em 1% *Bovine Serum Albumin* (BSA)-0,3% Triton-X 100 (Tx100)-PBS, que incubou *overnight* a 4°C. Após esta incubação as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos com PBS.

Posteriormente os tecidos foram incubados (1 hora no escuro, à temperatura ambiente) com anticorpo secundário policlonal *Alexa Fluor 568 rabbit anti—mouse IgG* (Life Technologies, EUA), numa diluição de 1:1000 em 1% BSA-0,3% Tx100-PBS. As lâminas foram novamente lavadas três vezes com PBS durante 5 minutos.

Após a coloração dos núcleos celulares (ácidos nucleicos) com DAPI (15 minutos no escuro), as lâminas foram secas, colocou-se meio de montagem *Vectashield* e lamela por cima dos tecidos (seladas com verniz).

Foi utilizada uma lâmina contendo *Jurkat cells* com ou sem tratamento com *etoposide* (um inibidor da topoisomerase II) (Cell Signaling Technology, EUA), que serviram como controlo positivo e negativo, respetivamente.

ii. 4-HNE

Depois de desparafinados e hidratados, os tecidos foram permeabilizados com PBS-Tx100-Tween 20 (Tw20) 0,1%, durante 5 minutos. Para a recuperação antigénica as lâminas foram colocadas em tampão citrato 10mM pH 6,0, procedendo-se ao seu aquecimento em microondas a 350w 4 vezes 5 minutos. Deixou-se arrefecer lentamente, lavou-se com PBS-Tx100-Tw20 0,1% durante 5 minutos e seguiu-se uma etapa de bloqueio com BSA 5%-PBS-Tx100-Tw20 0,1% durante 1 hora. As lâminas foram lavadas durante 5 minutos em PBS e depois foram incubadas 1 hora com *MOM IgG Blocking Reagent Solution* (18µL *MOM IgG Blocking Reagent Solution* e 500µL PBS 1x) do kit *Mouse On Mouse* (M.O.M.) (Vector Laboratories, EUA). No final do tempo de incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes durante 2 minutos com PBS e de seguida foram colocadas durante 5 minutos em *MOM diluent* (120µL concentrado proteico e 1380µL PBS) do kit M.O.M..

Os tecidos foram marcados com anticorpo primário *Anti-4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) mAb, clone HNEJ-2* (Kamiya Biomedical Company, EUA), numa diluição de 1:50 em *MOM Diluent*, que incubou *overnight* a 4°C. No final da incubação as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos com PBS.

Posteriormente os tecidos foram incubados (1 hora no escuro, à temperatura ambiente) com anticorpo secundário policlonal *Alexa Fluor 488 goat anti—mouse IgG* (Life Technologies, EUA), numa diluição de 1:500 em *MOM Diluent*. De seguida as lâminas foram lavadas duas vezes durante 5 minutos, depois 30 minutos a 4°C, e novamente duas vezes durante 5 minutos com PBS.

Após a coloração dos núcleos celulares (ácidos nucleicos) com DAPI (15 minutos no escuro), as lâminas foram secas, colocou-se meio de montagem *Vectashield* (Vector Laboratories, Reino Unido) e lamela por cima dos tecidos (seladas com verniz).

Para controlo negativo utilizou-se uma amostra processada em simultâneo com as restantes lâminas, com a única diferença de ter sido incubada com PBS em vez de anticorpo primário.

iii. α -SMA

Depois de desparafinados e hidratados, os tecidos foram lavados três vezes durante 5 minutos com PBS e depois permeabilizados com Tx100 0,2%. Seguiram-se três lavagens de 5 minutos cada com PBS. Para a recuperação antigénica as lâminas foram colocadas em tampão citrato 10mM pH 6,0, procedendo-se ao seu aquecimento no microondas. Após a solução ter começado a ferver, diminuiu-se a potência do microondas, não deixando que a solução entrasse em ebulição, durante 10 minutos. Após a recuperação antigénica, as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos com PBS. Seguiu-se uma etapa de bloqueio com *MOM IgG Blocking Reagent Solution* do kit M.O.M. (90 μ L *MOM IgG Blocking Reagent Solution* e 2,5mL PBS) durante 1 hora.

Após duas lavagens de 2 minutos com PBS, os tecidos foram incubados em *MOM Diluent* durante 5 minutos (600 μ L concentrado proteico e 7,5mL de PBS). De seguida foram incubados com o anticorpo primário *Monoclonal Anti-Actin, α Smooth Muscle Clone IA4* (Sigma Aldrich, Alemanha), numa diluição de 1:800 em *MOM Diluent*, que incubou *overnight* a 4°C. No final da incubação as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos em PBS.

Posteriormente os tecidos foram incubados (1 hora no escuro, à temperatura ambiente) com anticorpo secundário policlonal *Alexa Fluor 488 goat anti—mouse IgG*, numa diluição de 1:1000 em PBS. Após a incubação seguiram-se três lavagens durante 5 minutos com PBS (no escuro).

Após a coloração dos núcleos celulares (ácidos nucleicos) com DAPI (15 minutos no escuro), as lâminas foram secas, colocou-se meio de montagem *Vectashield* e lamela por cima dos tecidos (seladas com verniz).

Para controlo negativo utilizou-se uma amostra processada em simultâneo com as restantes lâminas, com a única diferença de ter sido incubada com PBS em vez de anticorpo primário.

8. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA das amostras de tecidos hepático e duodenal foi extraído pelo método *TRIzol* (Life Technologies, EUA), de acordo com as indicações do fabricante. Para tal foi adicionado 1mL de *TRIzol Reagent* a cada fragmento de tecido, o qual foi homogeneizado e deixado à temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida as amostras foram centrifugadas a 12000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e foram adicionados 200µL de clorofórmio, homogeneizou-se vigorosamente e incubou-se à temperatura ambiente cerca de 2-3 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 12000xg durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e foram adicionados 500µL de isopropanol, homogeneizou-se por inversão e deixou-se incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguiu-se uma nova centrifugação a 12000xg durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol a 75%. Após agitação no vórtex, as amostras foram centrifugadas a 10000xg durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi depois removido e as amostras foram deixadas a secar à temperatura ambiente. No final o *pellet* de RNA foi ressuscitado em 400µL de água livre de RNases e incubado cerca de 10-15- minutos a 55-60°C.

A concentração de RNA foi determinada através da medição da absorvância a 260nm no equipamento *NanoDrop* (ThermoScientific, EUA), e a sua integridade foi avaliada utilizando um sistema de eletroforese capilar automatizado conjuntamente com o kit *Experion RNAStdSens Analysis* (Bio-Rad Laboratories, EUA). Posteriormente

procedeu-se à remoção de DNA contaminante e síntese de cDNA utilizando os kits *Turbo DNA-free* (Ambion, EUA) e *ThermoScript RT-PCR System* (Life Technologies, EUA), respetivamente e de acordo com as indicações do fabricante.

Na remoção de DNA contaminante para uma quantidade final de 4µg de RNA foram pipetados 2,5µL de *10x TURBO DNase Buffer* e 1µL de *TURBO DNase* e perpez-se o volume de 25µL com água livre de RNases. As amostras foram incubadas durante 30 minutos a 37°C, foram depois adicionados 2,5µL de *DNase Inactivation Reagent* e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10000xg durante 1,5 minutos e transferiu-se o RNA para um tubo novo.

Para a síntese de cDNA pipetou-se 1µL de *Primer Oligo (dT)*, 9µL de RNA (amostra) e 2µL de *dNTP mix* e incubou-se durante 5 minutos a 65°C. No final deste tempo as amostras foram colocadas no gelo. De seguida foram adicionados 4µL de *5x cDNA Synthesis Buffer*, 1µL de ditiotreitol (DTT) *0,1M*, 1µL de *RNaseOUT*, 1µL de *DEPC-Treated Water* e 1µL de *ThermoScript RT*. Seguiram-se as incubações a 55°C durante 60 minutos e depois 85°C 5 minutos. Depois adicionou-se 1µL de *RNase H* e incubou-se durante 20 minutos a 37°C. Por fim as amostras foram diluídas (1:2) em *DEPC-Treated Water*.

9. Real-Time Polimerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Para a amplificação e quantificação das reações de qRT-PCR foi utilizado o equipamento *iQ5 Real-Time PCR System* e o *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, EUA).

As amostras e os padrões (preparados a partir de amostras do grupo B6 com dieta enriquecida em Fe em três diluições: 1, 1:10 e 1:100) foram processados em duplicado e para cada reação foram pipetados 10µL de *iQ SYBR Green Supermix*, 0,08µL de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 8,84µL de água livre de RNase e 1µL de amostra (cDNA). O protocolo de amplificação consistiu em: desnaturação a 95°C durante 3,5 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 30s (desnaturação), 59°C durante 45s (*annealing*) e extensão a 72°C durante 30s. Para a construção da curva de desnaturação houve ainda uma etapa final, em que ocorreram aumentos de 0,5°C, num intervalo de temperaturas de 55 a 95°C, e leitura de fluorescência a cada incremento de temperatura.

Os primers utilizados (STAB Vida, Portugal) foram desenhados de acordo com a sequência a amplificar através do programa *Primer3*, exceto os primers dos genes *Hamp*, *Hamp2* e *Gsta1* que foram retirados de outros trabalhos (Ilyin et al., 2003, Sugimoto et al., 2010), e estão descritos no Quadro 1.

A quantidade de cada transcrito foi estimada através da respetiva curva padrão e normalizada a partir do gene controlo endógeno, o gene da β -actina (*Actb*).

10. Western Blot

Para a avaliação semi-quantitativa da expressão proteica foram utilizados lisados de tecido hepático. Para tal, as amostras de fígado foram homogeneizadas com *beads* de cerâmica e 500 μ L de tampão RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH = 8,0, 1% NP-40, 0,5% desoxicolato de sódio, 100mM EDTA, 0,1% SDS) por amostra. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (1000xg, 4°C, 10 minutos) e recolheu-se o sobrenadante para um tubo novo. Para a quantificação de proteína utilizou-se o kit *BioRad DC Protein Assay*, de acordo com as instruções do fabricante, e leu-se a absorvância a 750nm por espectrofotometria no equipamento *μ Quant* (BioTek, Alemanha).

As amostras (50 μ g/10 μ L para FPN e 30 μ g/10 μ L para restantes proteínas) para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) foram preparadas com DTT 1M e *Glo Lysis Buffer 2x* (GLB), e incubadas durante 15 minutos a 94°C (banho seco), exceto as amostras para a quantificação da ferroportina, que foram incubadas durante 30 minutos a 37°C.

Os géis de separação e de *stacking* foram preparados segundo o Quadro 2, para a separação das proteínas por SDS-PAGE. Foram utilizados géis de separação de poliacrilamida a 10% para todas as proteínas, exceto para a ferritina, onde se utilizou um gel de separação a 15%. As amostras foram pré-aquecidas a 94°C durante 5 minutos e foram adicionados 10 μ L de amostra por poço e 10 μ L de padrão de peso molecular. As amostras correram no gel de *stacking* a 100V e foram separadas a 120V em tampão de eletroforese (10x para 1000mL: 30,3g Tris-base, 144g glicina, 10g SDS e perfazer com dH₂O) (tempo máximo aproximadamente 1h30).

Quadro 1 - Sequências de primers para qRT-PCR.

Gene	Sequência de Primer Forward (5' → 3')	Sequência Primer Reverse (5' → 3')
Actb (β -actina)	GGCGGACTGTTACTGAGCTGCGTTT	CAAAGCCATGCCAATGTTGTCTCTT
Nqo1	GTGCAGAAGCGAGCTGGAAATACTC	CGAATCTTGATGGAGGACTGGATGC
Gclc	AGGTTGACGAGAACATGAAAGTGGC	CCGCCTTTCAGATGTCTTTCCTGA
Gclm	CCTCCTGCTGTGTGATGCCAC	GCAGTTCTTTCGGGTCATTGTG
Nfe2l2 (Nrf2)	CTAAAGCACAGCCAGCACATTCTCC	TTGGGATTCACGCATAGGAGCAC
Fpn1	TTGGTGACTGGGTGGATAAGAATGC	CGCAGAGGATGACGGACACATTC
Hamp (Ilyin et al., 2003)	CCTATCTCCATCAACAGATG	AACAGATACCACACTGGGAA
Hamp2 (Ilyin et al., 2003)		AACAGATACCACAGGAGGGT
Col1a1	TCCTGGCAACAAAGGAGACAC	GGGCTCCTCGTTTTCTTCT
Tgfb1	CTAATGGTGGACCGCAACAAC	CACTGCTTCCCGAATGTCTGA
Acta2	ACCCAGCACCATGAAGATCAAG	AGGTAGACAGCGAAGCCAGGA
Gsta1 (Sugimoto et al., 2010)	GACTGTGAGCTGAGTGGAGAAGAA	CCGGCCATTGCAGCAA
Ifng	TGGCAAAGGATGGTGACATG	GACTCCTTTTCCGCTTCCTGA
Tnf	CTGTAGCCCACGTCGTAGCA	CGGCAGAGAGGAGGTTGACT
Il1b	GTACAAGGAGAACCAAGCAACGAC	GGTGGGTGTGCCGTCTTTCA

Quadro 2 - Preparação dos géis para separação proteica por SDS-PAGE.

	Gel de Separação (10%)	Gel de Separação (15%)	Gel de <i>Stacking</i>
30% acrilamida/ 0,4% bisacrilamida	2,08mL	3,14mL	276,6 μ L
Tris	2,5mL (pH=8,8)	2,5mL (pH=8,8)	350 μ L (pH=6,8)
dH₂O	1,6mL	0,52mL	1,005mL
SDS 10%	62,6 μ L	62,6 μ L	16,6 μ L
TEMED	2,16 μ L	2,16 μ L	1 μ L
APS	21 μ L	21 μ L	8,3 μ L

Após a separação por SDS-PAGE as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (para 1000mL: 100mL tampão de eletroforese 10x, 500mL dH₂O, 200mL etanol a 100% e perfazer com dH₂O) a 100V durante 1-1h30. Depois da transferência as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau e captadas imagens após o aparecimento de bandas.

Seguiu-se uma etapa de bloqueamento com uma solução de leite em pó magro 5% em PBS-Tween 1x durante 1h em agitação. As membranas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 1x durante 5 minutos e colocadas num recipiente. Foi adicionado o anticorpo primário específico para a proteína a quantificar (Quadro 3) diluído em leite em pó magro a 2,5% para o anticorpo da FPN e 5% para os restantes, incubando 1h à temperatura ambiente em agitação. As membranas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 1x durante 5 minutos.

O anticorpo secundário foi selecionado de acordo com o anticorpo primário utilizado: *Horseradish Peroxidase conjugate of goat anti—rabbit IgG* (Life Technologies, EUA) (diluição de 1:5000 em leite em pó magro 5%), *Amersham ECL Anti-rat IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from goat)* (GE Healthcare, Alemanha) (diluição 1:4000 em leite em pó magro 5%), e incubou 1h à temperatura ambiente com agitação. As membranas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 1x durante 5 minutos.

As membranas foram reveladas no equipamento ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, EUA), depois de serem adicionados 500µL de *Luminata Forte Western HRP Substrate* (Millipore, Billerica, MA, USA). A densitometria das bandas foi realizada usando o programa *Image Lab Software*.

Para *loading control* quantificou-se a β -actina.

Quadro 3 - Anticorpos primários utilizados para Western-Blot.

Proteína	Anticorpo Primário	Diluição
FPN	<i>Rat polyclonal FPN (Ab 1C7) (Amgen)</i>	4µg/mL
Ferritina	<i>Rabbit polyclonal to Ferritin, AB75973 (Abcam, Reino Unido)</i>	1:1000
NQO1	<i>Rabbit polyclonal to NQO1 (Abcam)</i>	1:1000
GCLC	<i>Rabbit polyclonal GCLC Antibody (Novus Biologicals)</i>	1:500
β-actina	<i>Rabbit polyclonal To beta actin, AB8227 (Abcam, Reino Unido)</i>	1:5000

11. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como mediana \pm desvio interquartil. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a determinação de diferenças significativas entre os grupos experimentais com o programa *GraphPad Prism* versão 5.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

Capítulo III: Resultados

III. Resultados

Para avaliar a ativação da via de sinalização do Nrf2 pelo Fe, bem como a eventual proteção conferida por esta via contra a toxicidade do Fe, foram realizadas duas experiências com murganhos B6 e Nrf2^{-/-} machos, em que os animais foram alimentados *ad libitum* com dieta *standard* para roedores ou com dieta enriquecida em FeC. Na primeira experiência foi utilizado FeC a 0,5% durante 8 semanas, enquanto que na segunda foi utilizado FeC a 2,0% durante 2 semanas.

1. Peso corporal, quantificação de Fe hepático, marcadores séricos de sobrecarga de Fe e de lesão hepática

Nas Tabelas I e II estão registadas as medianas do peso corporal (início e fim de cada experiência), do peso relativo do fígado, da quantificação de Fe não-hémico hepático e dos marcadores séricos de sobrecarga de Fe e de lesão hepática por grupo de animais das experiências de FeC 0,5% e 2,0%, respetivamente, assim como as diferenças estatísticas significativas entre grupos.

Na primeira experiência (FeC 0,5%) não foram registadas diferenças significativas ao nível do peso corporal e do peso relativo do fígado entre os quatro grupos experimentais. A quantidade de Fe não-hémico no fígado aumentou significativamente nos grupos com dieta FeC 0,5% para aproximadamente o triplo dos valores registados nos respetivos controlos. Não foram porém observadas diferenças significativas ao nível do Fe sérico ou da sTf. Os níveis das transaminases hepáticas permaneceram inalterados, o que sugere a ausência de dano hepático nos animais expostos à concentração de Fe mais baixa.

No final da segunda experiência verificou-se que os animais Nrf2^{-/-} alimentados com dieta FeC 2,0% apresentavam uma diminuição significativa do peso corporal, em relação ao respetivo grupo controlo. O facto dos animais Nrf2^{-/-} terem perdido cerca de 20% do seu peso corporal determinou que esta experiência fosse terminada às 2 semanas, de forma a respeitar um *humane endpoint* previamente estipulado (um animal que perca 20% do seu peso deverá ser sacrificado, de forma a minimizar o seu sofrimento). Os animais B6 com dieta FeC 2,0% apresentaram uma ligeira diminuição do peso corporal em

Tabela I - Peso corporal, ferro hepático, marcadores séricos de sobrecarga de Fe e lesão hepática em animais alimentados com dieta FeC 0,5%.

Grupo	Experiência FeC 0,5%			
	B6 <i>standard</i>	B6 FeC 0,5%	Nrf2-/- <i>standard</i>	Nrf2-/- FeC 0,5%
Peso corporal inicial (g)	20,9 ± 3,9 (N = 5)	23,4 ± 5,0 (N = 6)	21,6 ± 2,8 (N = 5)	22,3 ± 5,5 (N = 8)
Peso corporal final (g)	26,7 ± 7,0 (N = 5)	30,6 ± 5,4 (N = 6)	27,3 ± 4,7 (N = 5)	31,1 ± 3,3 (N = 8)
Peso relativo fígado	0,048 ± 0,006 (N = 5)	0,054 ± 0,002 (N = 6)	0,046 ± 0,002 (N = 5)	0,050 ± 0,005 (N = 8)
Fe não-hémico fígado (µg)	78,94 ± 35,04 (N = 5)	266,3 ± 94,2* (N = 6)	90,81 ± 14,91 (N = 5)	278,7 ± 37,3** (N = 8)
Fe soro (µg/dL)	118,0 ± 37,5 (N = 5)	153,5 ± 77,3 (N = 6)	148,0 ± 30,0 (N = 5)	165,0 ± 43,0 (N = 7)
sTf (%)	35,85 ± 11,45 (N = 4)	40,70 ± 16,78 (N = 6)	39,90 ± 9,45 (N = 4)	44,40 ± 14,7 (N = 7)
AST (U/L)	79,00 ± 45,00 (N = 5)	70,50 ± 9,50 (N = 6)	108,00 ± 35,50 (N = 5)	99,00 ± 51,00 (N = 7)
ALT (U/L)	26,00 ± 10,50 (N = 5)	24,50 ± 11,75 (N = 6)	43,00 ± 24,18 (N = 5)	30,71 ± 10,67 (N = 7)

Mediana ± desvio interquartil. * P < 0,05 *versus* B6 *Standard*; ** P < 0,05 *versus* Nrf2-/- *Standard*. Teste de Kruskal-Wallis.

relação ao grupo controlo (correspondendo a aproximadamente metade da perda verificada no grupo Nrf2-/-), contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa. O peso relativo do fígado aumentou significativamente no grupo Nrf2-/- com dieta FeC 2,0% em relação ao respetivo controlo.

O grupo Nrf2-/- com dieta FeC 2,0% apresentou um aumento significativo (cerca de 4 vezes) de Fe não-hémico no fígado em relação aos valores registados para o grupo controlo e, embora a diferença não seja significativa, o grupo B6 com dieta FeC 2,0% apresentou um aumento de mais de 3 vezes quando comparado com o grupo controlo.

O Fe sérico aumentou significativamente no grupo B6 com dieta FeC 2,0% em relação ao grupo controlo, o que também se verificou no grupo Nrf2-/- com dieta FeC 2,0% quando comparado com o grupo Nrf2-/- dieta *standard*, ainda que esta diferença não seja significativa. A sTf aumentou substancialmente em ambos os grupos com dieta FeC 2,0% (para valores superiores a 90% saturação), embora a diferença só fosse estatisticamente significativa no grupo Nrf2-/-.

Tabela II - Peso corporal, ferro hepático, marcadores séricos de sobrecarga de Fe e lesão hepática em animais alimentados com dieta FeC 2,0%.

Grupo	Experiência FeC 2,0%			
	B6 <i>Standard</i>	B6 FeC 2,0%	Nrf2-/- <i>Standard</i>	Nrf2-/- FeC 2,0%
Peso corporal inicial (g)	28,5 ± 1,6 (N = 4)	25,4 ± 3,9 (N = 6)	25,0 ± 1,7 (N = 4)	26,90 ± 2,4 (N = 8)
Peso corporal final (g)	29,8 ± 1,4 (N = 4)	22,9 ± 2,2 (N = 6)	25,1 ± 1,3 (N = 4)	21,1 ± 2,2** (N = 8)
Diferença de pesos (final - inicial) (g)	1,1 ± 1,5 (N = 4)	-3,3 ± 1,9 (N = 6)	0,1 ± 0,9 (N = 4)	-6,0 ± 1,9** (N = 8)
Peso relativo fígado	0,048 ± 0,006 (N = 4)	0,047 ± 0,006 (N = 6)	0,039 ± 0,011 (N = 4)	0,050 ± 0,007** (N = 8)
Fe não-hémico fígado (µg)	200,3 ± 48,2 (N = 4)	671,8 ± 175,0 (N = 6)	149,4 ± 56,5 (N = 4)	635,8 ± 153,5** (N = 8)
Fe soro (µg/dL)	135,0 ± 21,7 (N = 4)	229,5 ± 43,0* (N = 6)	135,0 ± 23,2 (N = 4)	209,5 ± 16,3 (N = 6)
sTf (%)	39,7 ± 6,8 (N = 4)	91,5 ± 1,2 (N = 6)	38,2 ± 1,6 (N = 4)	92,9 ± 5,1** (N = 7)
AST (U/L)	80,0 ± 75,0 (N = 4)	113,0 ± 63,0 (N = 6)	160,0 ± 46,0 (N = 3)	190,0 ± 146,0 (N = 5)
ALT (U/L)	26,0 ± 4,0 (N = 4)	30,0 ± 9,2 (N = 6)	36,0 ± 1,0 (N = 3)	93,0 ± 66,5*** (N = 6)

Mediana ± desvio interquartil. * P < 0,05 *versus* B6 *Standard*; ** P < 0,05 *versus* Nrf2-/- *Standard*; *** P < 0,05 *versus* B6 FeC 2,0%. Teste de Kruskal-Wallis.

Nos níveis de AST não se verificaram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Por outro lado, os níveis de ALT no grupo Nrf2-/- dieta FeC 2,0% aumentaram significativamente quando comparado com os animais B6 alimentados com a mesma dieta. Também se verifica um aumento dos valores deste grupo em relação ao grupo controlo (Nrf2-/- dieta *standard*), contudo este não foi significativo, provavelmente devido ao reduzido número de indivíduos amostrados no grupo controlo (N = 3).

2. Alterações histológicas e distribuição de Fe no fígado

A observação de potenciais alterações histológicas do tecido hepático e do padrão de distribuição de Fe foi efetuada com recurso às colorações HE e Perls, respetivamente.

A coloração HE permite avaliar a arquitetura do tecido e eventual lesão hepática. Os animais controlo das duas experiências apresentaram uma arquitetura do tecido hepático normal, com hepatócitos mono ou binucleados com nucléolos bem visíveis.

Na primeira experiência (Figura 12) os animais B6 com dieta FeC 0,5% (N=5) apresentaram, no geral, uma arquitetura do tecido hepática típica, à exceção de um animal no qual foram encontradas áreas de tecido em morte celular. O mesmo se verificou nos murganhos Nrf2^{-/-} com dieta FeC 0,5% (N=8), em que o tecido não apresentava danos, contudo em 3 destes animais foram encontradas zonas do tecido com hepatócitos que apresentavam aumento do volume celular.

Na experiência de FeC 2,0% (Figura 12) os animais B6 com dieta enriquecida apresentaram áreas localizadas em que os hepatócitos tinham o seu volume aumentado, sugerindo morte celular. Os animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentavam morte celular mais extensa (Figura 12), com inchamento dos hepatócitos e, em casos mais agudos, presença de hepatócitos em balão (*ballooned hepatocytes*), corpos de Councilman, infiltrados de glóbulos brancos mononucleares e hemorragia (Figura 13).

Após a avaliação do estado geral do tecido hepático, procedeu-se à coloração de Perls (Figuras 14 e 15), de forma a verificar e caracterizar a distribuição de Fe no fígado. Esta coloração confirmou a inexistência de depósitos de Fe no fígado dos animais controlo (dieta *standard*) em ambas as experiências.

Na primeira experiência observou-se que animais B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 0,5% apresentavam deposição de Fe nos hepatócitos da zona periportal com um gradiente decrescente em direção à zona centrolobular, que se encontrava livre de depósitos de Fe.

Na segunda experiência observou-se que os animais B6 com dieta enriquecida (FeC 2,0%) apresentavam deposição de Fe nos hepatócitos da zona periportal com um gradiente decrescente em direção à zona centrolobular, que se encontrava livre de depósitos de Fe. Nos animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% observou-se uma coloração azul mais forte e uma deposição de ferro extensível à zona centrolobular, com exceção de dois animais em que não se verificaram diferenças na distribuição de FeC entre as zonas periportal e centrolobular, apresentando-se todo o tecido corado.

A Figura 16 mostra com maior detalhe que, em animais B6, o Fe fornecido na dieta sob a forma de FeC (2,0%) é armazenado principalmente no interior dos hepatócitos periportais, não se depositando nos hepatócitos da zona centrolobular.

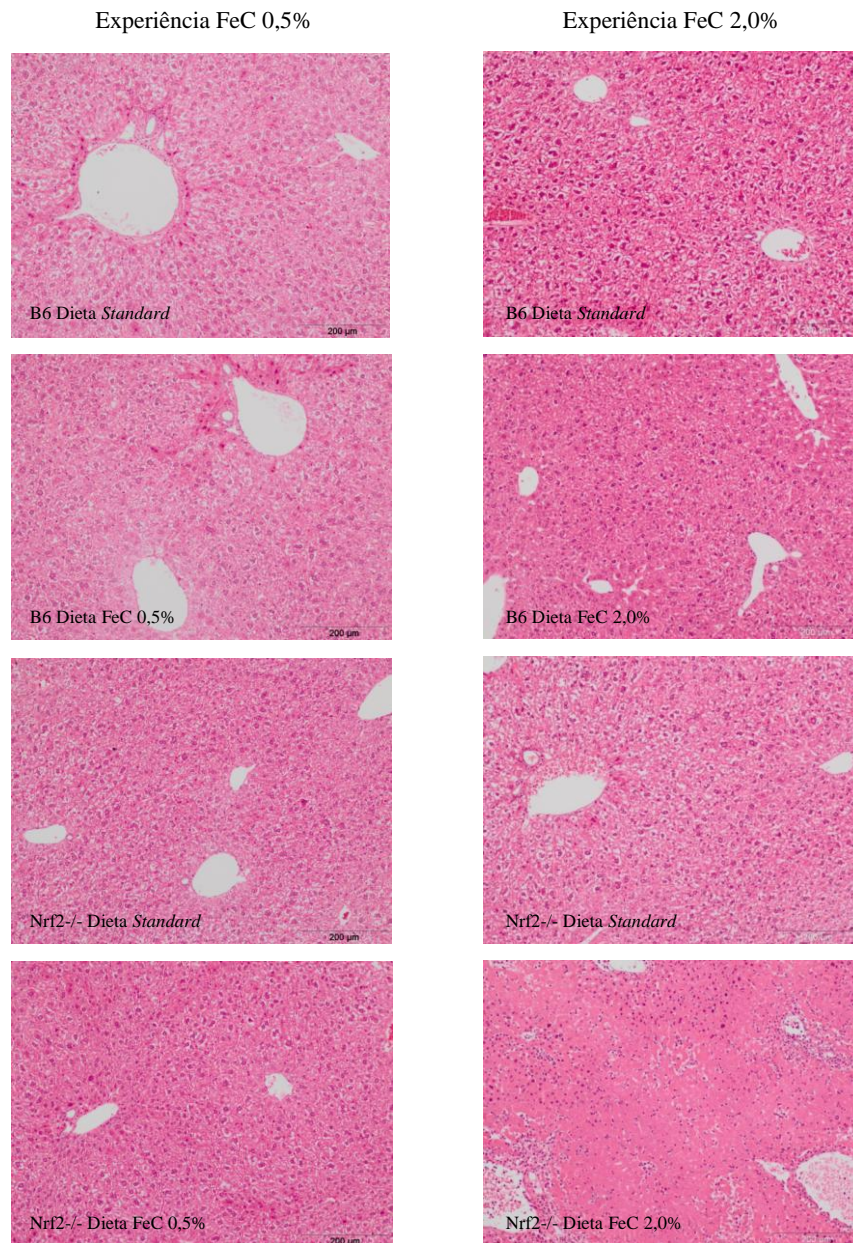


Figura 12 - Histologia hepática de murganhos em duas experiências de sobrecarga de Fe (0,5% de FeC à esquerda e 2,0% à direita). Coloração HE para avaliação da arquitetura do tecido e eventual lesão hepática. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 100×).

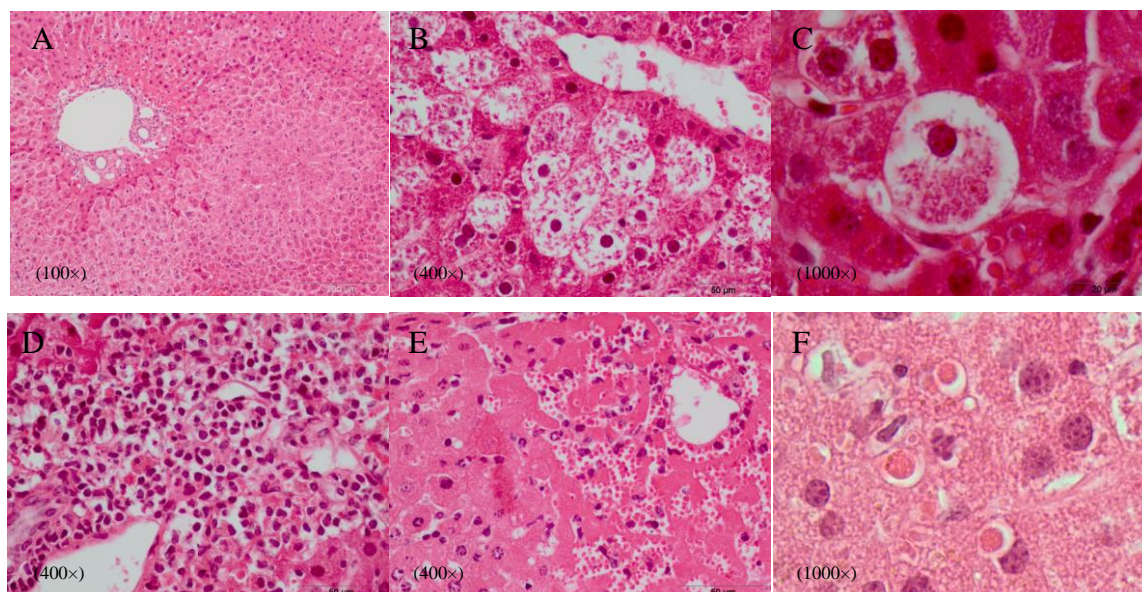


Figura 13 - Coloração HE de tecido hepático onde são observadas áreas extensas de morte celular (A), com presença de hepatócitos em balão (B e C), infiltrados de glóbulos brancos mononucleares (D), hemorragia (E) e corpos de Councilman (F) em animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0%. (Ampliação original indicada na figura).

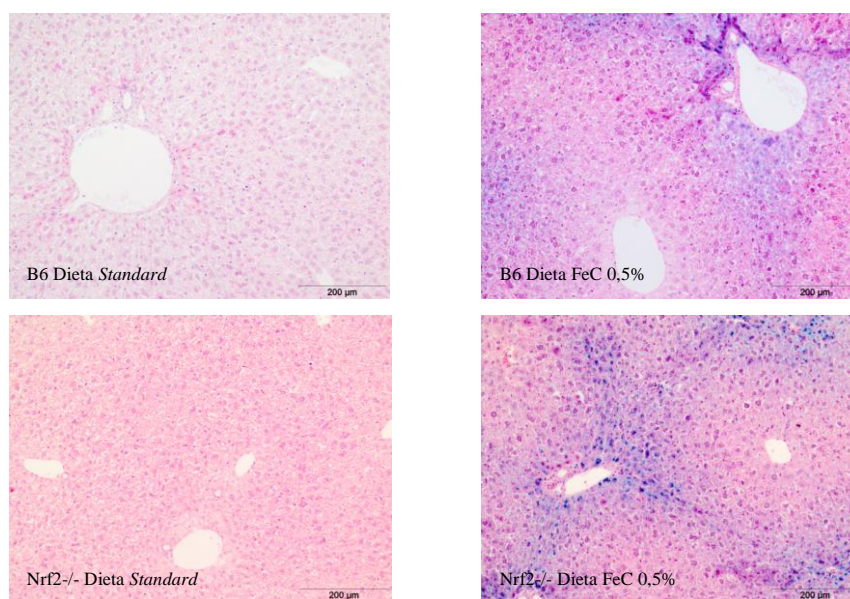


Figura 14 - Coloração de Perls para verificação e caracterização da distribuição de Fe em murganhos da experiência de FeC 0,5%. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 100x).

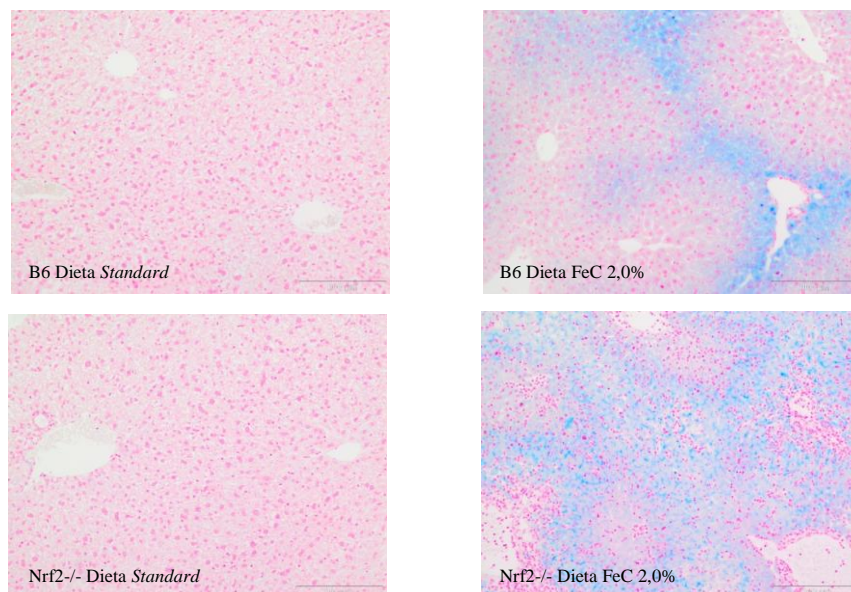


Figura 15 - Coloração de Perls para verificação e caracterização da distribuição de Fe em murganchos da experiência de FeC 2,0%. As imagens seleccionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 100×).

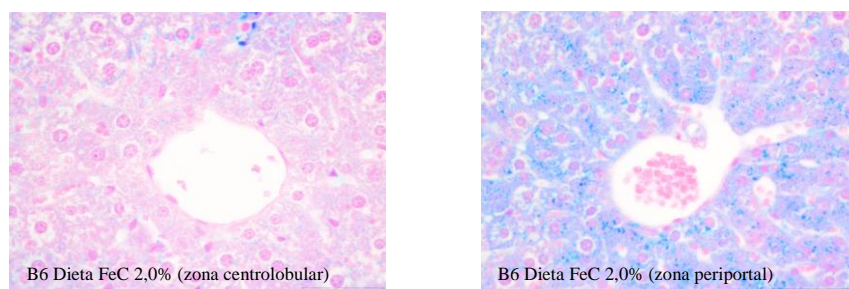


Figura 16 - Coloração de Perls onde se observa que a deposição de FeC ocorre sobretudo nos hepatócitos periportais, não se observando marcação nas mesmas células da zona centrolobular. (Ampliação original 400×).

3. Morte Celular

A coloração HE permitiu observar áreas de tecido hepático com evidências de morte celular. Existem também estudos que demonstram que animais Nrf2^{-/-} apresentam coloração TUNEL positiva e morte celular por apoptose, devido à administração de determinadas drogas (Umemura et al., 2006, Jiang et al., 2009, Lu et al., 2008).

A técnica TUNEL foi realizada para a pesquisa de morte celular nas duas experiências realizadas. Na primeira experiência (FeC 0,5%) não foram encontrados resultados sugestivos de morte celular de tecido hepático em nenhum dos grupos experimentais (Figura 17). O controlo positivo apresentou positividade em todo o tecido.

Na segunda experiência verificou-se que o grupo Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentava células em morte celular numa área extensa de tecido hepático. Não foi encontrada marcação positiva nos animais B6 com a mesma dieta (Figura 18). De seguida, procedeu-se à IFI para pesquisa de Casp-3 clivada (Figura 18), para verificar se a morte celular observada no TUNEL era apoptose mediada por esta caspase. Este estudo revelou-se negativo para todos os grupos de animais, sugerindo que a morte celular observada não é apoptose. Os controlos negativo e positivo da IFI da Casp-3 clivada estão apresentados na Figura 19.

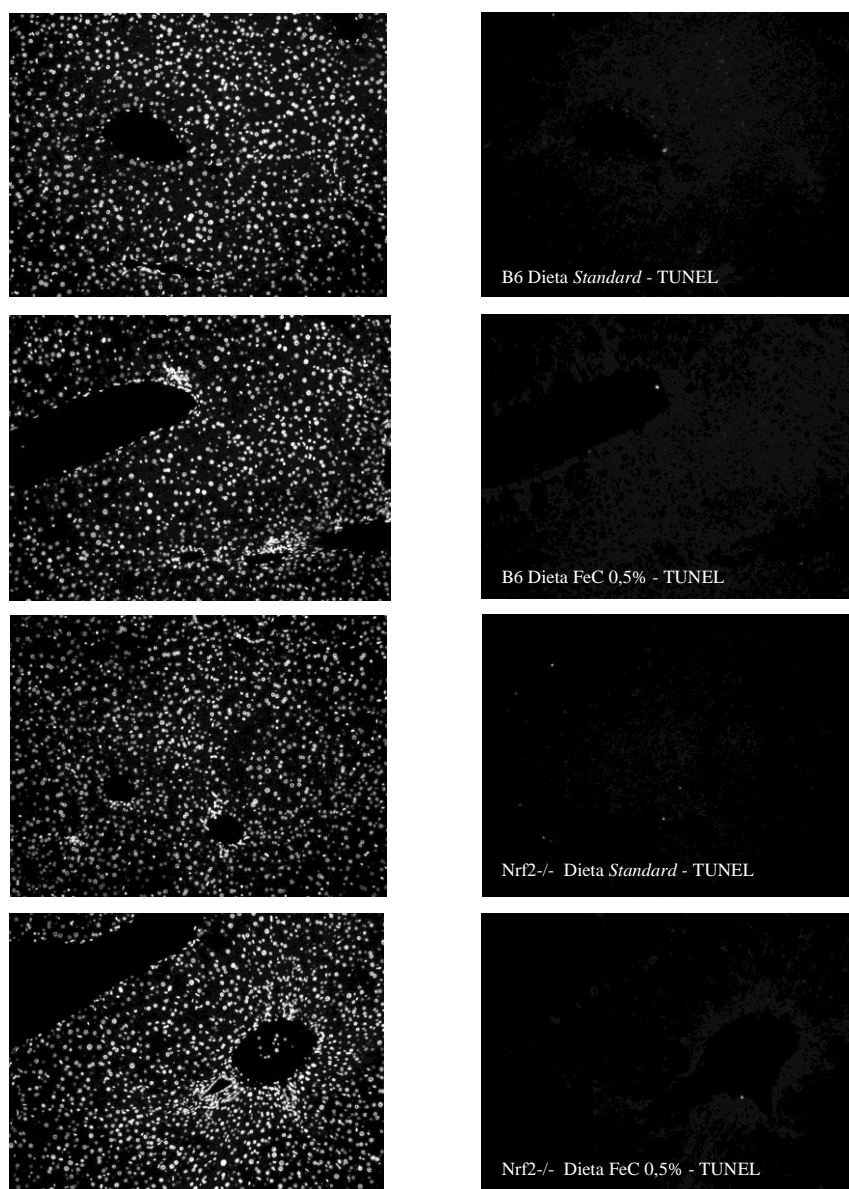


Figura 17 - Técnicas TUNEL para pesquisa de morte celular em tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 0,5%. Na coluna da esquerda está representado o canal correspondente ao DAPI, a coluna da direita corresponde ao canal para a observação do resultado obtido por TUNEL. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 100×).

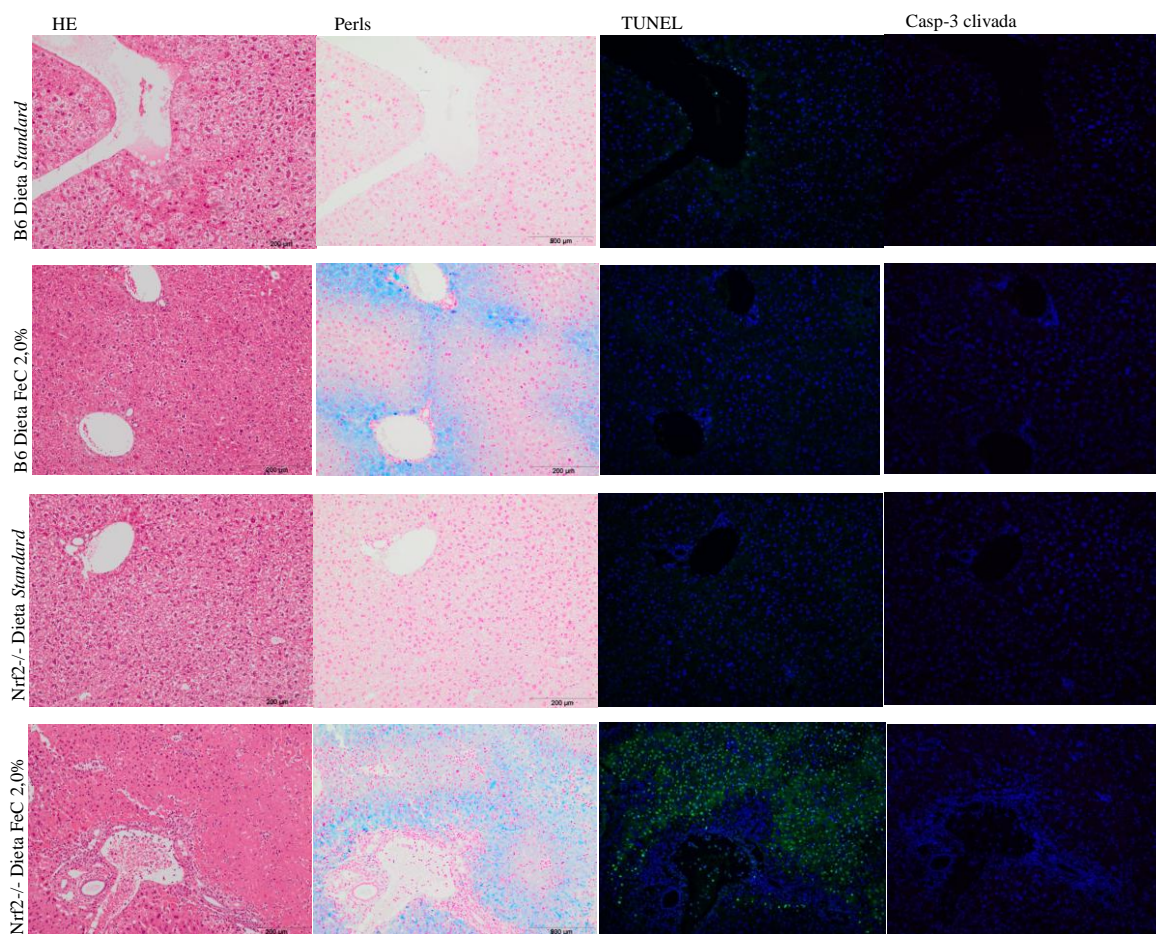


Figura 18 - Técnica TUNEL para pesquisa de morte celular e imunofluorescência indireta para pesquisa de Casp-3 clivada em tecido hepático de murganços da experiência de FeC 2,0%. As colorações HE e Perls estão também apresentadas. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 100×).

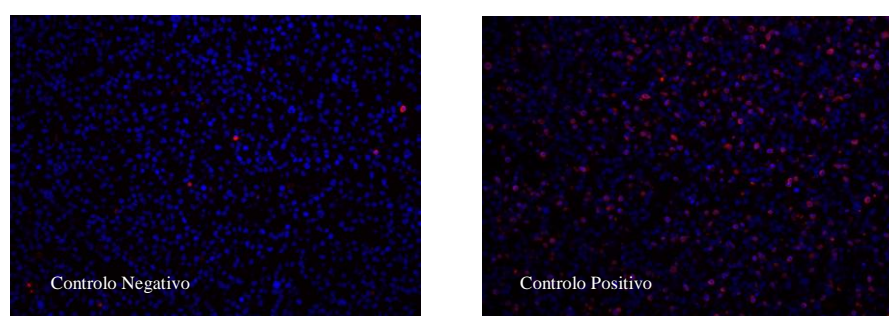


Figura 19 - Controlos negativo (esquerda) e positivo (direita) da imunofluorescência indireta para a pesquisa de Casp-3 clivada, consistindo numa lâmina contendo *Jurka Cells* sem ou com tratamento com *etoposide* (um inibidor da topoisomerase II), respetivamente. (Ampliação original 100×).

4. Análise ultraestrutural do tecido hepático

Para uma observação interna das células hepáticas e dos seus organelos procedeu-se à MET. Foram inicialmente preparados cortes semi-finos das amostras de fígado de forma a seleccionar zonas periportais, as quais correspondem à maior acumulação de Fe proveniente da dieta (tal como demonstrado anteriormente). Nos animais dos grupos controlo observou-se uma arquitetura normal das células hepáticas e dos seus organelos, nomeadamente das mitocôndrias (que apresentavam forma regular e cristas intactas), retículo endoplasmático e núcleo. Foi igualmente detetada a presença de glicogénio e de gotículas lipídicas (Figura 20).

Na primeira experiência, o grupo de animais B6 com dieta FeC 0,5% apresentou uma arquitetura normal das células hepáticas e dos seus organelos, semelhante ao observado no grupo controlo. Contudo foram observadas estruturas sugestivas de corpos autofágicos e lisossomas, os quais continham uma grande quantidade de material eletrodense, que se pensa ser Fe. Nos animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 0,5% foram detetadas algumas mitocôndrias destruídas, fibras de colagénio, além de glicogénio, gotículas lipídicas e estruturas sugestivas de corpos autofágicos e lisossomas carregados de Fe (Figura 21).

Na segunda experiência os animais B6 com dieta FeC 2,0% apresentaram uma arquitetura celular normal, com mitocôndrias com cristas bem definidas, deposição de glicogénio, algumas gotículas lipídicas e estruturas sugestivas de lisossomas carregados de Fe. Por outro lado, os animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentaram grande destruição celular, com mitocôndrias dilatadas e severamente danificadas, apresentando inclusivamente rompimento da membrana (Figura 22).

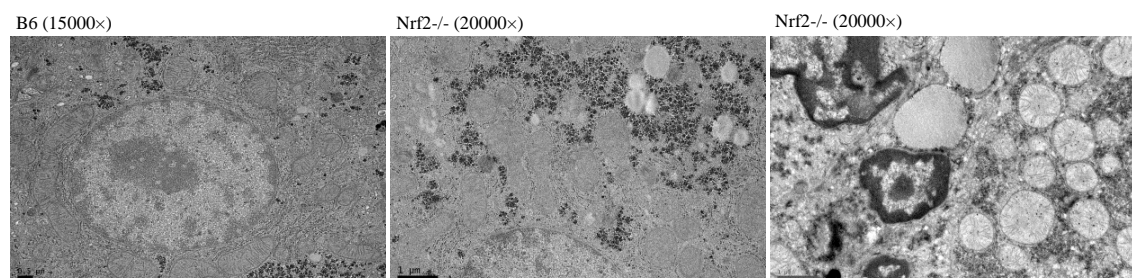


Figura 20 - Microscopia eletrónica de transmissão em tecido hepático de murganhos B6 e Nrf2^{-/-} com dieta *standard*. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. Na figura à direita as gotas lipídicas aparecem associadas a uma célula estrelada hepática (ou célula de Ito). (Ampliação original indicada na figura).

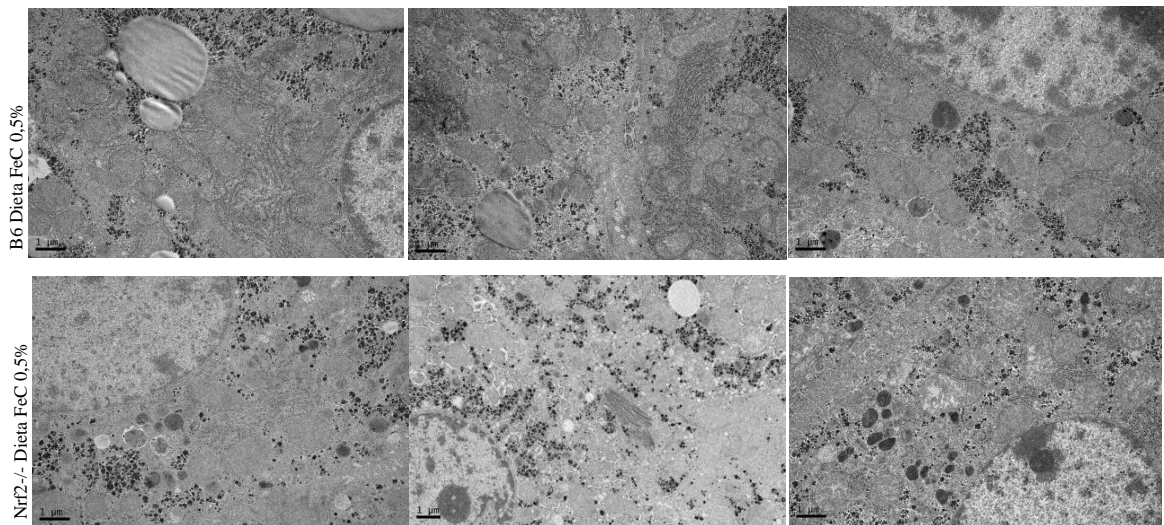


Figura 21 - Microscopia eletrônica de transmissão em tecido hepático de murganhos B6 e Nrf2-/- com dieta FeC 0,5%. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 15000×).

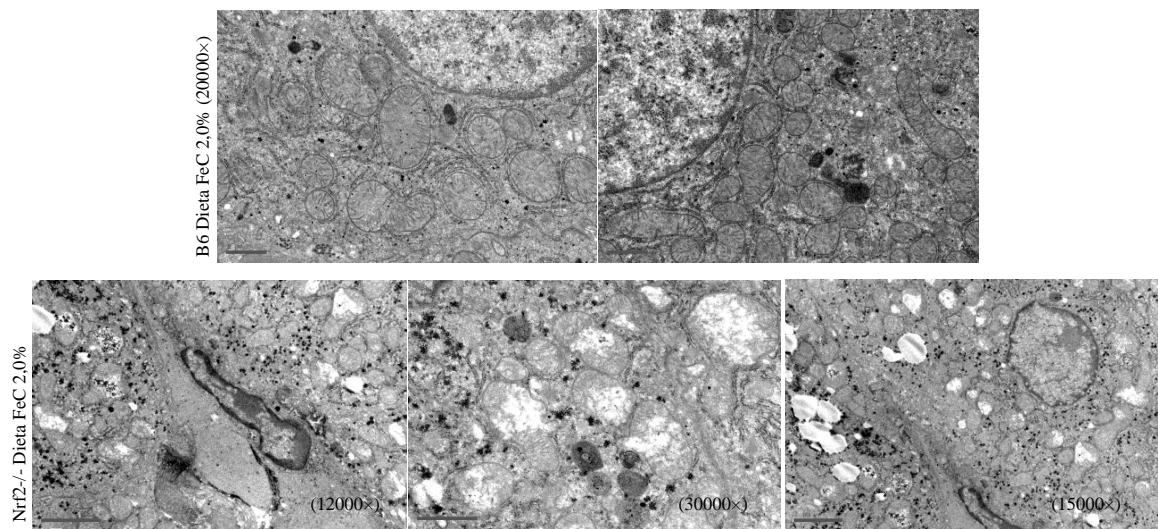


Figura 22 - Microscopia eletrônica de transmissão em tecido hepático de murganhos B6 e Nrf2-/- com dieta FeC 2,0%. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original indicada na figura).

5. Pesquisa de peroxidação lipídica

Como o mecanismo que leva à lesão hepática devida à acumulação de ferro, envolve peroxidação lipídica procedeu-se à pesquisa de 4-HNE, a partir de IFI nos fígados dos murganhos da experiência de FeC 2,0%. Contudo não foram encontradas evidências específicas de positividade para o 4-HNE devido à sobrecarga de Fe, nem diferenças entre os animais Nrf2^{-/-} e B6, uma vez que foi observada fluorescência em todos os grupos experimentais (Figura 23).

No controlo negativo não foram observados quaisquer sinais de positividade.

Esta pesquisa não foi realizada na experiência de FeC 0,5%, dado que a histologia destes murganhos não revelou danos do tecido hepático que justificassem este estudo.

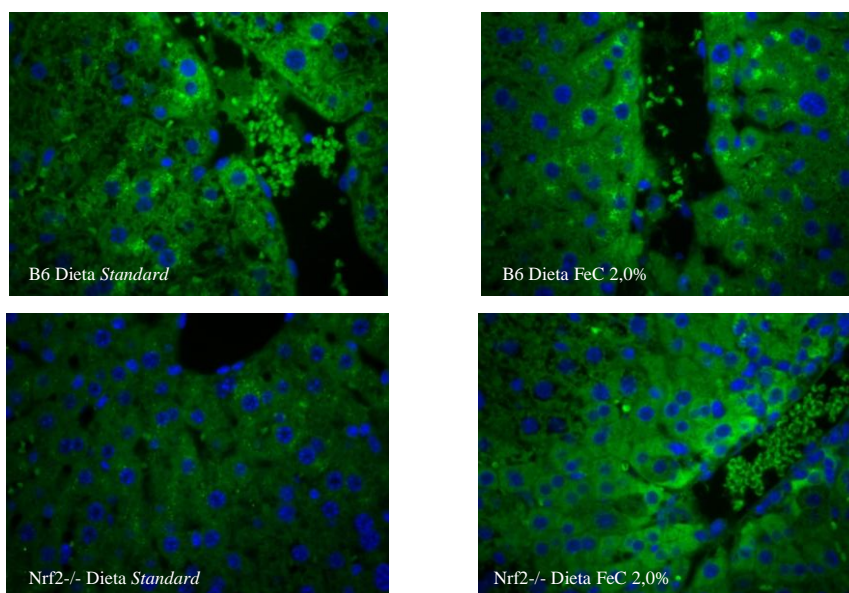


Figura 23 - Imunofluorescência indireta para pesquisa de 4-HNE em tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 2,0%. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 200×).

6. Deposição de fibras de colagénio e fibrose hepática

A formação de fibrose no fígado e a cirrose são dois dos principais sinais da HH ao diagnóstico, e que contribuem para uma diminuição da qualidade de vida destes doentes. Está também demonstrado que os murganhos Nrf2^{-/-} são mais suscetíveis ao desenvolvimento de fibrose hepática do que os animais *wild type*, quando expostos a determinados xenobióticos (Xu et al., 2008). Procedeu-se então à coloração de Tricrómio de Masson (Figura 24), de forma a verificar se murganhos Nrf2^{-/-} eram mais suscetíveis à formação de fibras de colagénio do que murganhos Nrf2^{+/+} (B6) alimentados com dieta enriquecida em FeC 2,0%. Esta coloração não permitiu detetar nenhuma evidência de formação de fibras de colagénio devido à sobrecarga de Fe, nem foram registadas diferenças entre os animais Nrf2^{-/-} e B6 (as fibras de colagénio apresentam uma tonalidade azul quando coradas por este método).

A fibrose hepática é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular. O fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) é considerado a principal citocina pró-fibrótica, contribuindo para o desenvolvimento de fibrose do fígado, através da ativação da diferenciação das células estreladas hepáticas (células de Ito) para miofibroblastos positivos para α -SMA, que são os principais produtores das proteínas da matriz extracelular, como o colagénio e a fibronectina (Oh et al., 2012). Uma vez que a coloração de Tricrómio de Masson não possibilitou tirar conclusões acerca da formação de fibrose em animais alimentados com dieta enriquecida em FeC 2,0% e como está demonstrado que a via do Nrf2 está envolvida na proteção contra a fibrose hepática (Oh et al., 2012), procedeu-se à técnica de qRT-PCR para o estudo da expressão dos genes pró-fibróticos *Tgfb1*, *Acta2* (gene da α -SMA) e colagénio tipo 1 A1 (*Col1a1*) e, perante os resultados obtidos, a uma técnica de IFI para a pesquisa de positividade para a α -SMA no tecido hepático dos murganhos da experiência de FeC 2,0%.

A quantificação de mRNA do gene *Tgfb1* (Figura 25) revelou um aumento da sua expressão nos animais B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% em relação aos respetivos controlos, não sendo contudo esta diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, a quantificação de mRNA do gene *Acta2* (Figura 25) demonstrou um aumento estatisticamente significativo da expressão génica nos animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% em relação ao grupo B6 com a mesma dieta e, embora não seja uma diferença significativa, em relação aos valores registados para o respetivo controlo (cerca do dobro). Quanto ao

gene *Col1a1* não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 25).

Pela técnica de IFI não foram verificadas evidências específicas de positividade para a α -SMA devido à sobrecarga de Fe, nem diferenças entre os animais *Nrf2*^{-/-} e B6 (Figura 26). A positividade observada nas imagens está associada às células endoteliais.

A pesquisa de deposição de fibras de colagénio e de fibrose hepática não foi realizada na experiência de FeC 0,5%, uma vez que a histologia destes murganhos não revelou danos do tecido hepático nem morte celular que justificassem este estudo.

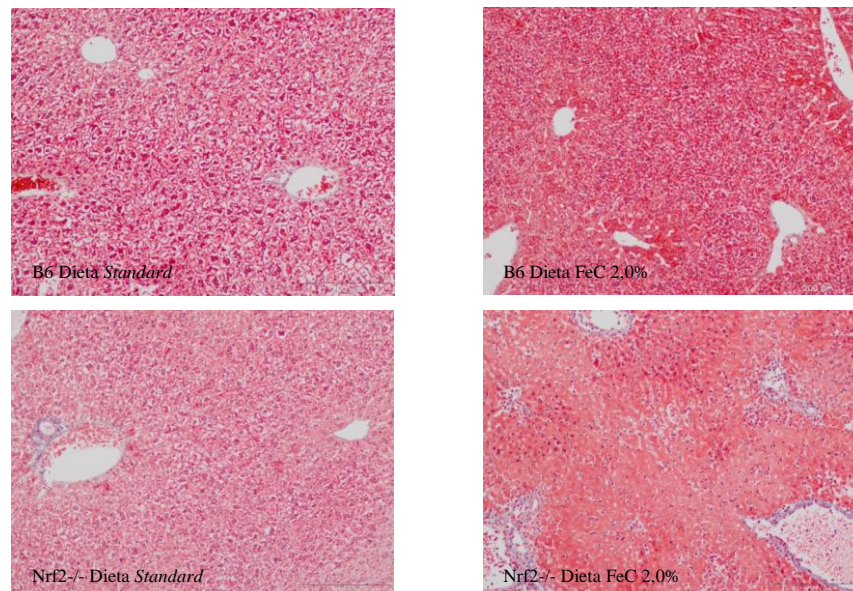


Figura 24 - Coloração de Tricrómio de Masson para a pesquisa de fibras de colagénio em murganhos da experiência de FeC 2,0%. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação original 100 \times).

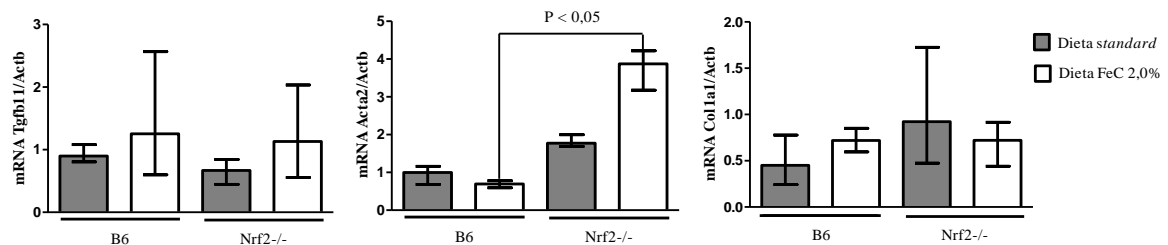


Figura 25 - Quantificação da expressão de mRNA de genes pró-fibróticos em fígados de murganhos da experiência de FeC 2,0%. (Teste de Kruskal-Wallis. B6 e *Nrf2*^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 e *Nrf2*^{-/-} dieta FeC 2,0% N = 6).

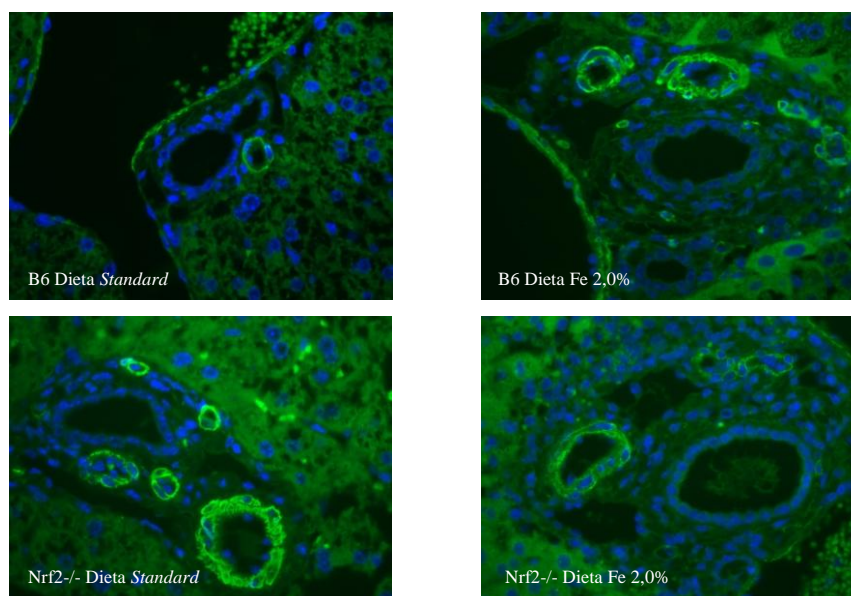


Figura 26 - Imunofluorescência indireta para pesquisa de α -SMA em tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 2,0%. As imagens selecionadas são representativas de cada grupo experimental. (Ampliação 400 \times).

7. Expressão de genes e proteínas do metabolismo do Fe

A expressão de alguns dos genes e proteínas primordiais para o metabolismo do Fe foi quantificada, de forma a pesquisar alterações nos seus níveis e a verificar se estas ocorriam a nível transcricional ou pós-transcricional, e se diferiam com o tipo de dieta (*standard* ou rica em FeC) e genótipo (B6 ou Nrf2^{-/-}).

Por qRT-PCR, procedeu-se à quantificação dos níveis de mRNA dos genes da FPN (Slc40a1/Fpn1) e da hepcidina. Esta última, em murganhos, é codificada pelos genes Hamp e Hamp2.

Na primeira experiência (FeC 0,5%), foi registado um aumento significativo da expressão do gene Hamp no grupo B6 com dieta FeC 0,5% em relação ao respetivo grupo controlo (Figura 27). A expressão do gene Hamp aumentou duas vezes nos animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 0,5% em relação ao controlo, embora a diferença não seja estatisticamente significativa. A expressão do gene Fpn1 sofreu um pequeno aumento nos animais B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 0,5% em relação aos respetivos controlos, mas estas diferenças não são estatisticamente significativas. Não foram encontradas alterações nos níveis de expressão do gene Hamp2.

Na segunda experiência (FeC 2,0%) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o gene Fpn1 entre os grupos experimentais (Figura 28). No que diz respeito ao gene Hamp, embora não se verifiquem diferenças significativas, os grupos B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentam um aumento de mais do dobro quando comparado com os respetivos controlos. Os animais do grupo B6 com dieta FeC 2,0% apresentaram um aumento estatisticamente significativo da expressão do gene Hamp2 em relação ao grupo controlo. O grupo Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% também apresentou um aumento (cerca de 6 vezes mais) deste gene em comparação com o grupo controlo, contudo esta diferença não é significativa.

A pesquisa de alterações e quantificação da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo do Fe foi realizada por western-blot. Na experiência de FeC 0,5% procedeu-se à quantificação de FPN em extratos proteicos de tecido hepático, e na experiência FeC 2,0% foi quantificada a FPN e a ferritina total.

Na primeira experiência (FeC 0,5%) as bandas correspondentes à FPN apareceram com muito *background* (Figura 29), e por isso não se realizou densitometria para quantificação da sua expressão. Contudo, pela observação das bandas reveladas na

membrana de nitrocelulose, parece não haver um aumento na expressão da FPN com a dieta FeC 0,5% em relação à dieta *standard*. A análise das bandas correspondentes à β -actina permite concluir que os resultados obtidos para a FPN não foram afetados pelo desigual carregamento das amostras (*loading*).

Assim como na primeira experiência, na segunda (FeC 2,0%) as bandas correspondentes à FPN apareceram com muito *background* (Figura 30), e por isso não se realizou a densitometria. Contudo, pela observação das bandas reveladas na membrana de nitrocelulose, parece não haver também um aumento na expressão da FPN com a dieta FeC 2,0%. Por outro lado, pela observação da membrana para a pesquisa de ferritina total, verificou-se um aumento da densidade das bandas correspondentes aos animais B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% em relação aos respetivos controlos. Este aumento foi quantificado por densitometria (Figura 30). O aumento da expressão proteica da ferritina total foi confirmada, verificando-se que os animais B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentavam um aumento de cerca de 7 e 8 vezes mais, respetivamente, em relação aos respetivos controlos, contudo esta diferença só foi significativa entre os grupos Nrf2^{-/-}.

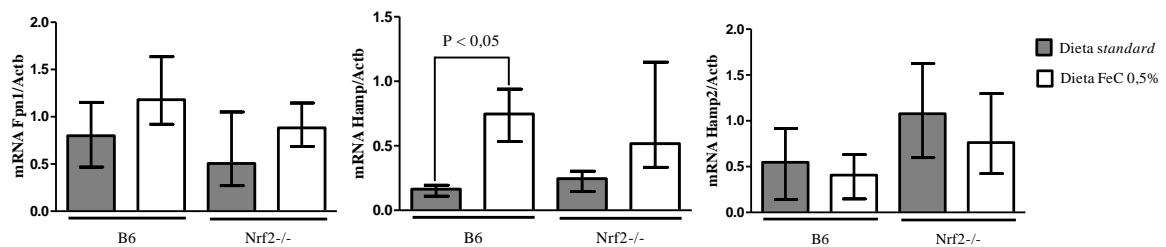


Figura 27 - Expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo de Fe (Fpn1, Hamp e Hamp2) em fígados de murganhos da experiência de FeC 0,5%. (Teste de Kruskal-Wallis. Fpn1 e Hamp: B6 e Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 dieta FeC 0,5% N = 5, Nrf2^{-/-} dieta FeC 0,5% N = 8. Hamp2: B6 dieta *standard* N = 3, B6 dieta FeC 0,5% N = 4, Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, Nrf2^{-/-} dieta FeC 0,5% N = 7).

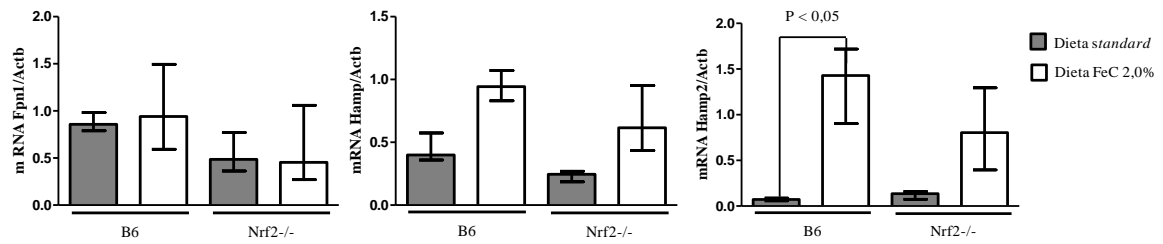


Figura 28 - Expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo de Fe (Fpn1, Hamp e Hamp2) em fígados de murganhos da experiência de FeC 2,0%. (Teste de Kruskal-Wallis. B6 e Nrf2-/- dieta *standard* N = 4, B6 e Nrf2-/- dieta FeC 2,0% N = 6).

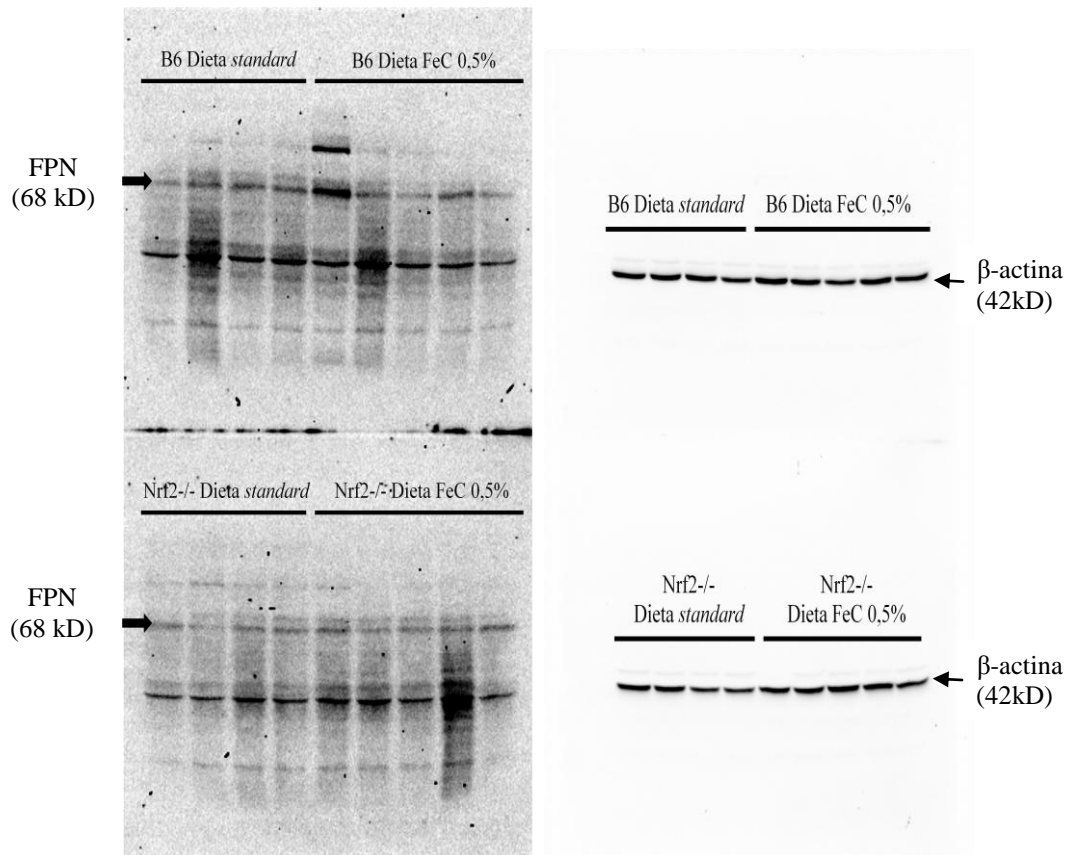


Figura 29 - A expressão proteica da FPN foi verificada por western-blot em amostras de tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 0,5%. A imagem da esquerda representa as membranas de nitrocelulose utilizadas para a pesquisa de FPN, enquanto que a imagem da direita representa as membranas utilizadas para a pesquisa de β -actina.

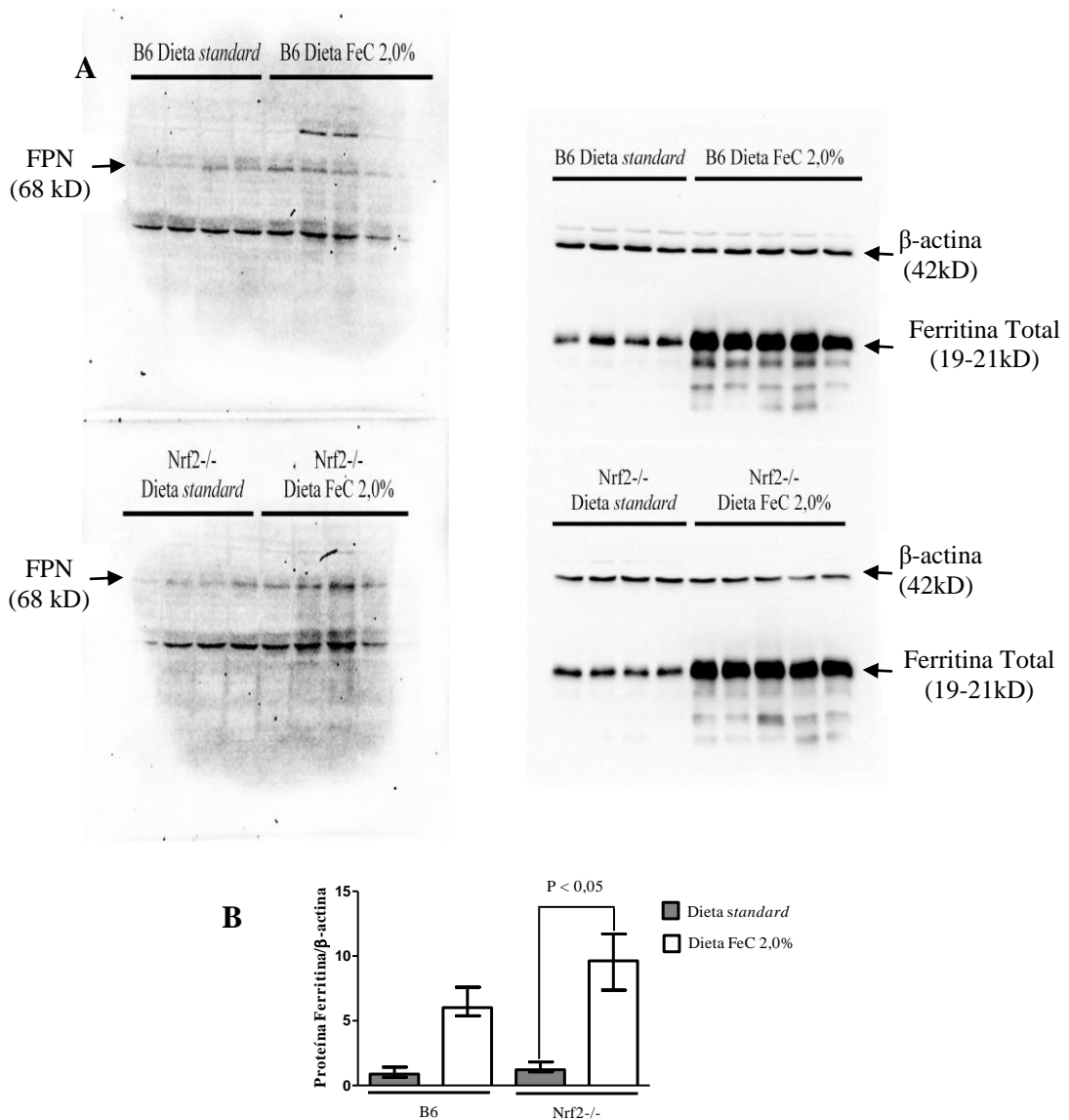


Figura 30 - A expressão proteica de FPN e ferritina total foi verificada por western-blot em amostras de tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 2,0%. **A.** A imagem da esquerda representa as membranas de nitrocelulose utilizadas para a pesquisa de FPN, a imagem da direita representa as membranas utilizadas para a pesquisa de ferritina total e β-actina. **B.** Expressão proteica de ferritina total (densitometria) em fígados de murganhos da experiência de FeC 2,0%. (Teste de Kruskal-Wallis. B6 e Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 e Nrf2^{-/-} dieta FeC 2,0% N = 5).

8. Expressão de genes e proteínas regulados pelo Nrf2

O Nrf2 é um importante fator na resposta celular ao stress provocado por oxidantes e eletrófilos ativando uma série de enzimas citoprotetoras. Assim, foram pesquisadas eventuais alterações, provocadas pela dieta de FeC (0,5% ou 2,0%), na expressão de alguns dos principais genes e proteínas regulados pelo Nrf2, nas duas estirpes de murganhos.

Para estudar eventuais alterações na expressão de genes regulados pelo Nrf2 procedeu-se à quantificação de mRNA por qRT-PCR. Em ambas as experiências foram quantificados os genes Nrf2 (Nfe2l2), Gclc e Nqo1. Na experiência de FeC 2,0% foram também quantificados os genes Gclm e Gsta1.

Na experiência de FeC 0,5% verificou-se, tal como esperado, uma substancial diminuição da expressão do gene Nrf2 nos animais Nrf2^{-/-} (Figura 31). Relativamente ao gene Gclc, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo, apesar de um ligeiro aumento nos grupos B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 0,5% em relação aos respetivos controlos. A expressão do gene Nqo1 não foi induzida pela dieta enriquecida com FeC 0,5%. Contudo verificou-se uma diminuição da sua expressão basal nos animais Nrf2^{-/-} com dieta *standard*.

Tal como na experiência de FeC 0,5%, na experiência de FeC 2,0% verificou-se que a expressão do gene Nrf2 se encontrava também substancialmente diminuída nos animais Nrf2^{-/-} quando comparado com os animais B6 (Figura 32). A expressão do gene Nqo1 aumentou mais de 3 e 2 vezes nos grupos B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% respetivamente, em relação aos respetivos controlos, embora esta diferença não tenha sido significativa. A expressão do gene Gsta1 também aumentou ligeiramente nos grupos com dieta enriquecida em FeC 2,0% comparando com os controlos. Por outro lado, a expressão dos genes que regulam a síntese da GSH (Gclc e Gclm) diminuiu em ambas as estirpes com dieta FeC 2,0%.

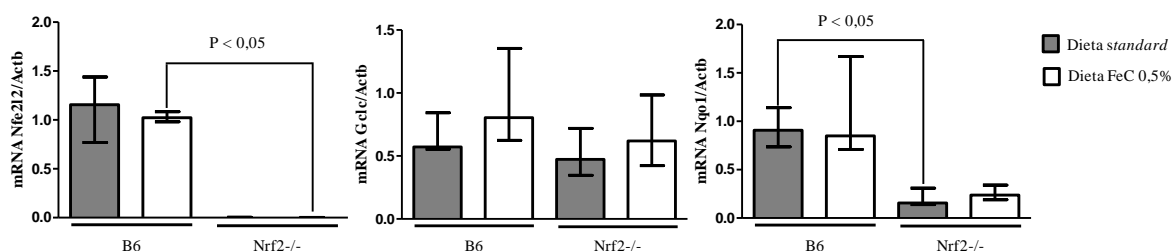


Figura 31 - Expressão de mRNA de genes regulados pelo Nrf2 (Gclc e Nqo1) em fígados de murganhos da experiência de FeC 0,5%. (Teste de Kruskal-Wallis. B6 e Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 dieta FeC 2,0% N = 5, Nrf2^{-/-} dieta FeC 2,0% N = 8).

A pesquisa de alterações e quantificação da expressão de proteínas reguladas pelo Nrf2 (NQO1 e GCLC) em extratos proteicos de tecido hepático foi realizada por western-blot. A observação das bandas na membrana de nitrocelulose e os cálculos obtidos por densitometria (Figura 33) permitiram concluir que a expressão proteica de NQO1 aumentou mais de 2 vezes nos animais B6 com dieta FeC 0,5% em relação ao respetivo controlo, embora esta diferença não tenha atingido significância estatística. A expressão proteica de GCLC aumentou ligeiramente no mesmo grupo experimental. Não foram observados quaisquer aumentos nos animais Nrf2^{-/-}.

De acordo com os resultados da expressão génica, a expressão proteica de NQO1 aumenta mais de 3 e 2 vezes nos animais B6 e Nrf2^{-/-} com a dieta FeC 2,0% respetivamente, em relação aos respetivo controlo. A expressão da proteína GCLC diminuiu em ambos os grupos de animais com dieta FeC 2,0% quando comparado com os respetivos controlos, ainda que as diferenças não fossem estatisticamente significativas (Figura 34).

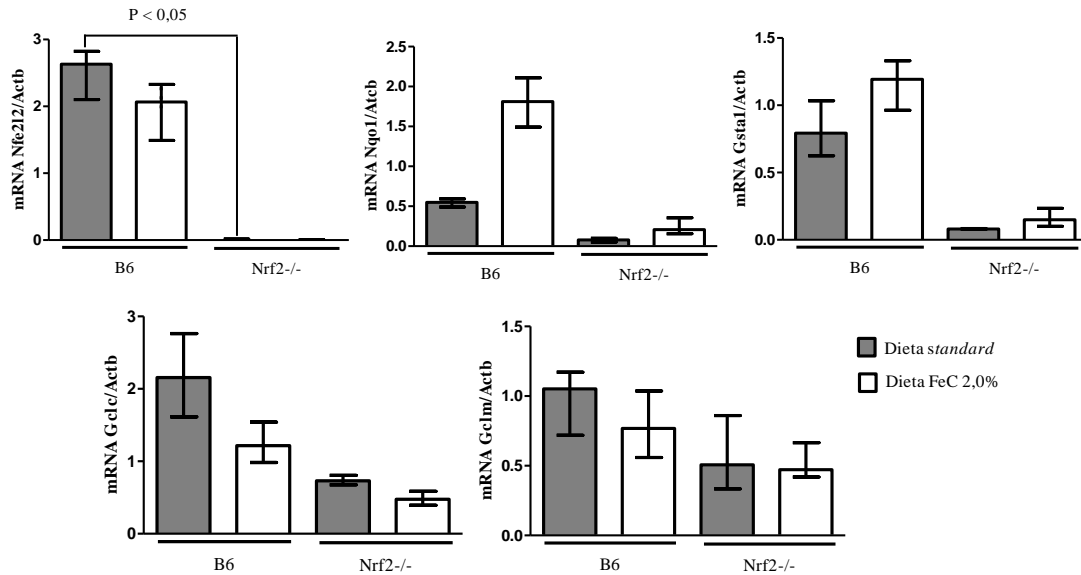


Figura 32 - Expressão de mRNA de genes regulados pelo Nrf2 (Nqo1, Gsta1, Gclc e Gclm) em fígados de murganhos da experiência de FeC 2,0%. (Teste de Kruskal-Wallis. B6 e Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 e Nrf2^{-/-} dieta FeC 2,0% N = 6).

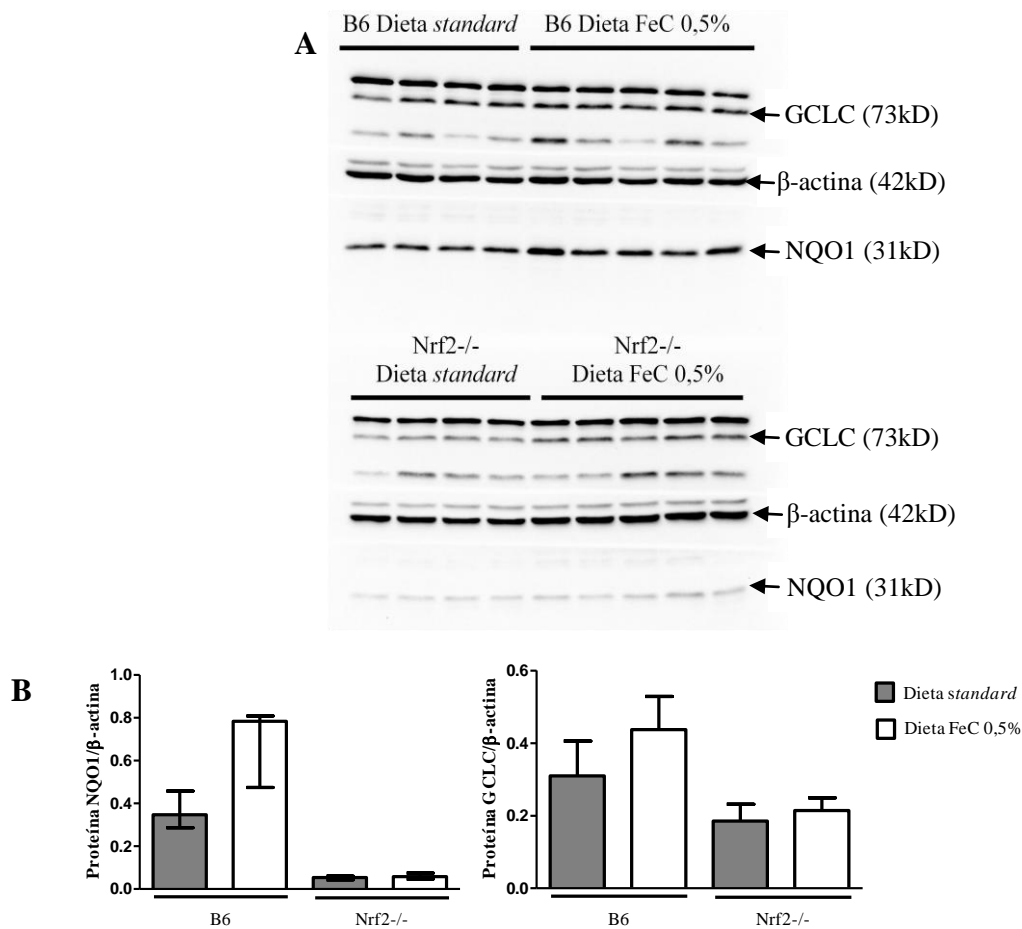


Figura 33 - A expressão de proteínas reguladas pelo Nrf2 (GCLC e NQO1) foi verificada por western-blot em amostras de tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 0,5%. **A.** Na imagem estão representadas as bandas obtidas para as proteínas GCLC, NQO1 e β -actina. **B.** Expressão de proteínas (densitometria) reguladas pelo Nrf2 (NQO1 e GCLC) em fígados de murganhos da experiência de FeC 0,5%. (Teste de Kruskal-Wallis. B6 e Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 e Nrf2^{-/-} dieta FeC 2,0% N = 5).

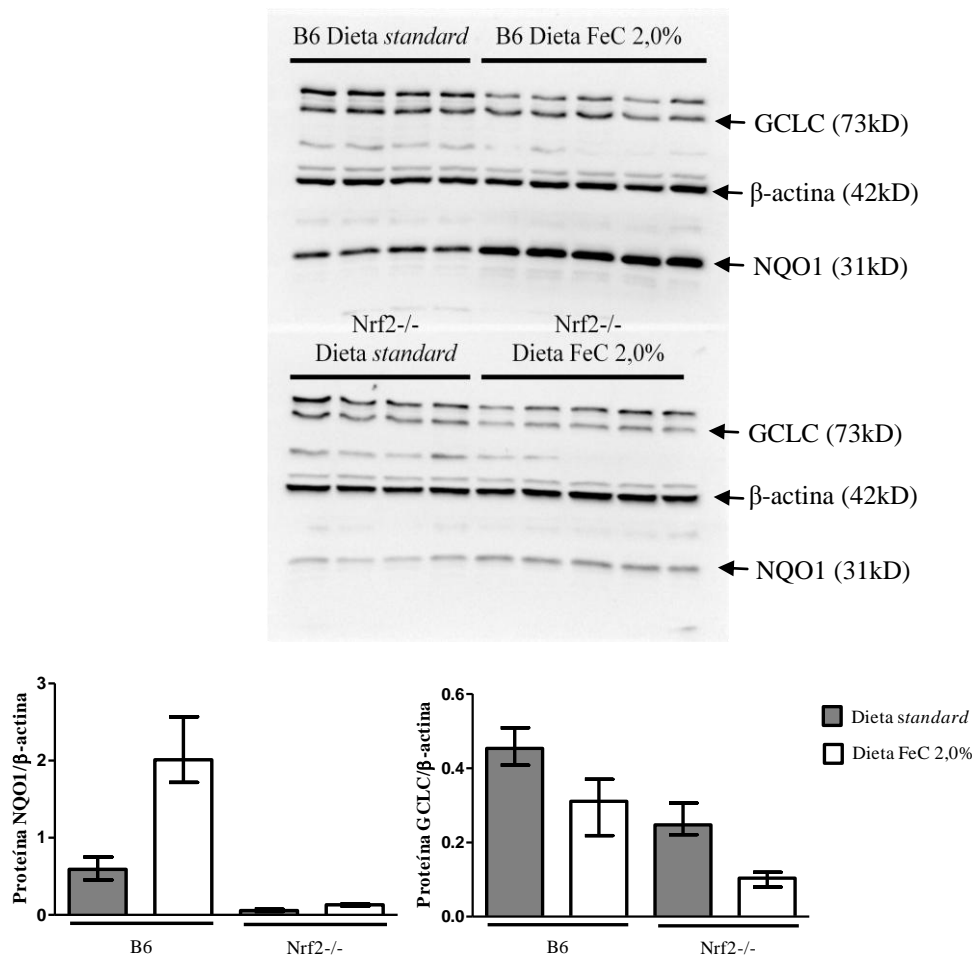


Figura 34 - A expressão de proteínas reguladas pelo Nrf2 (GCLC e NQO1) foi verificada por western-blot em amostras de tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 2,0%. Na imagem estão representadas as bandas obtidas para as proteínas GCLC, NQO1 e β -actina. **A.** Na imagem estão representadas as bandas obtidas para as proteínas GCLC, NQO1 e β -actina. **B.** Expressão de proteínas (densitometria) reguladas pelo Nrf2 (NQO1 e GCLC) em fígados de murganhos da experiência de FeC 2,0%. (Teste de Kruskal-Wallis. B6 e Nrf2-/- dieta *standard* N = 4, B6 e Nrf2-/- dieta FeC 2,0% N = 5).

9. Expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios

Sabe-se que o Nrf2 está envolvido na proteção de doenças inflamatórias, tendo sido demonstrado que ratinhos Nrf2^{-/-} apresentam maior suscetibilidade do que ratinhos *wild type* (Kensler et al., 2007). Assim procedeu-se ao estudo de algumas das citocinas envolvidas no processo inflamatório, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α , gene Tnf), a Interleucina-1 beta (IL-1 β , gene Il1b) e o Interferon-gama (IFN- γ , gene Ifng).

A quantificação de mRNA do gene Tnf não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Contrariamente à nossa hipótese, a expressão dos genes Il1b e Ifng estava diminuída nos animais com dieta FeC 2,0%.

A quantificação da expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios não foi realizada na experiência de FeC 0,5%, uma vez que a histologia destes murganhos não revelou danos do tecido hepático nem morte celular, que sugerissem processos inflamatórios significativos.

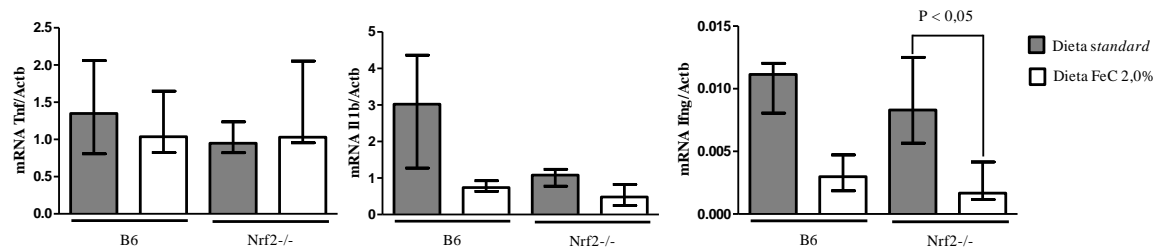


Figura 35 - Expressão de mRNA de genes envolvidos em processos inflamatórios (Tnf, Il1b e Ifng) em fígados de murganhos da experiência de FeC 2,0%. (Teste de Kruskal-Wallis. Tnf e Il1b: B6 e Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 dieta FeC 2,0% N = 6, Nrf2^{-/-} dieta FeC 2,0% N = 5. Ifng: B6 e Nrf2^{-/-} dieta *standard* N = 4, B6 e Nrf2^{-/-} dieta FeC 2,0% N = 6.).

Capítulo IV: Discussão

IV. Discussão

O FeC tem vindo a ser utilizado em vários estudos de sobrecarga de Fe que utilizam roedores como modelo experimental. Neste tipo de estudos, os animais são sujeitos a uma dieta enriquecida em Fe, a qual resulta numa deposição excessiva de Fe no parênquima do fígado e de outros órgãos, de uma forma semelhante ao que se observa em doenças humanas de absorção excessiva de Fe como a HH (Moon et al., 2012, Pigeon et al., 1999, Park et al., 1987).

A apresentação clínica da HH é muito variada, ocorrendo casos em que não há manifestações clínicas, podendo a sua penetrância ser determinada por fatores genéticos e não genéticos. A sobrecarga de Fe nestes pacientes pode representar um perigo para as células devido ao poder oxidante do Fe via reação de Fenton. O Nrf2 é um fator de transcrição importante na ativação de genes protetores em situações de stress celular oxidativo ou eletrofílico, e por isso colocou-se a hipótese de que a via de sinalização do Nrf2 poderá estar envolvida na resposta à progressão de doença devido à sobrecarga de Fe, podendo representar uma proteção contra a sua toxicidade. Assim desenhou-se um estudo, a partir do qual se pretendeu avaliar a proteção conferida pela via de sinalização do Nrf2 em murganhos B6 sujeitos a duas dietas diferentes, uma normal e outra enriquecida em FeC. Este estudo focou-se na pesquisa da proteção conferida a nível hepático, dado que o fígado é o principal armazenador de Fe e o órgão mais importante na destoxificação e eliminação de xenobióticos.

Este projeto englobou duas experiências nas quais o FeC foi adicionado à dieta dos murganhos, tendo estas diferido na percentagem de FeC que foi administrada (0,5% ou 2,0% de FeC).

1. Peso corporal, quantificação de Fe hepático, marcadores séricos de sobrecarga de Fe e de lesão hepática

Os animais B6 e Nrf2^{-/-} que receberam dieta FeC 0,5% durante 8 semanas registaram um aumento significativo do Fe não-hémico do fígado em relação aos controlos, o que revela uma sobrecarga de Fe a nível hepático. Esta sobrecarga foi, aparentemente, confinada ao fígado, uma vez que não se observaram alterações a nível

sistémico, permanecendo o Fe sérico e a sTf inalterados. Apesar da sobrecarga de Fe hepática ser óbvia, os níveis das transaminases hepáticas permaneceram inalterados, o que sugere a ausência de dano hepático. Os animais (B6 e Nrf2^{-/-}) apresentaram ainda aumento do peso corporal, sugerindo que os mesmos se mantiveram saudáveis ao longo da experiência.

Por outro lado, os animais alimentados com dieta enriquecida com FeC a 2,0% apresentaram uma diminuição do peso corporal em relação aos respetivos grupos controlo ao fim de apenas 2 semanas, diferença que foi mais pronunciada na estirpe Nrf2^{-/-}. Os animais Nrf2^{-/-} perderam cerca do dobro do peso corporal em relação aos animais B6 que receberam o mesmo tipo de dieta, o que sugere que os primeiros apresentam um estado geral mais agravado devido à sobrecarga de Fe do que os segundos.

O grupo Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentou ainda um aumento significativo do peso relativo do fígado, o que poderá indicar um aumento do volume das células hepáticas, e também um reflexo da perda de peso nestes indivíduos. Estudos em que é utilizado FeC (Trodec et al., 2006, Park et al., 1987, Pigeon et al., 1999) demonstraram que animais sujeitos a este modelo de sobrecarga de Fe desenvolvem hepatomegalia, o que está de acordo com os resultados obtidos neste projeto e com o que ocorre nos doentes com HH.

No presente estudo, os animais B6 e Nrf2^{-/-} que receberam dieta enriquecida com FeC 2,0% armazenaram quantidades de Fe hepático superiores às encontradas nos animais que receberam FeC 0,5%. Esta observação está de acordo com um estudo que utilizou dietas enriquecidas com várias percentagens de FeC em ratinhos BALB/cJ, observando um aumento do Fe hepático com o aumento da concentração de FeC administrado (Pigeon et al., 1999). Ao contrário da experiência de FeC 0,5%, os resultados da experiência de FeC 2,0% sugerem que a acumulação de Fe foi sistémica, dado que se observou um aumento da quantidade de Fe sérico nos grupos B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0%. Os resultados obtidos para a sTf apoiam esta hipótese, uma vez que os seus níveis estão aumentados para os grupos com dieta enriquecida para valores que se aproximam da saturação total. O facto de a capacidade de retenção de Fe no fígado ter sido excedida poderá explicar o aumento dos níveis de Fe no soro e da sTf.

O estudo das transaminases AST e ALT, para a pesquisa da eventual lesão hepática, revelaram não existir diferenças entre os grupos experimentais para a AST (a qual não é específica do fígado), ao contrário dos resultados obtidos para a ALT, em que os seus níveis aumentaram nos animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% em relação ao grupo B6 com o

mesmo tipo de dieta, e em relação ao respetivo grupo controlo. Estes resultados aliados à diminuição do peso corporal, ao aumento do peso relativo do fígado, da quantidade de Fe não-hémico no fígado e dos níveis da sTf sugerem que os animais Nrf2^{-/-} têm maior suscetibilidade à sobrecarga de Fe no fígado e, conseqüentemente, à lesão hepática.

Outro estudo, que tinha como objetivo investigar se a dieta suplementada com FeC aumentava a suscetibilidade para o desenvolvimento de fibrose devido ao álcool e tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratinhos C3H machos, revelou resultados consistentes, em que os animais tratados (mesmo os que só receberam FeC) apresentavam um aumento significativo dos pesos relativos do fígado e da atividade da ALT (Arezzini et al., 2003).

2. Alterações histológicas e distribuição de Fe no fígado

Para a pesquisa de alterações histológicas e distribuição do Fe no fígado foram realizadas as colorações HE e Perls.

Os resultados obtidos pelas colorações referidas dos fígados dos murganhos da experiência de FeC 0,5% sugerem a inexistência de lesão hepática significativa, apesar de ocorrer uma acumulação de Fe nos hepatócitos da zona periportal. Por outro lado, na experiência de FeC 2,0% os achados histológicos revelaram uma maior lesão hepática. Os animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentaram morte celular extensa (sugestiva de necrose), com inchamento dos hepatócitos (o que é consistente com o aumento do peso relativo do fígado) e, em casos mais agudos, presença de hepatócitos em balão (*ballooned hepatocytes*), corpos de Councilman, infiltrados de glóbulos brancos mononucleares e hemorragia. Estes resultados sugerem que estes animais se encontravam num estado de doença já avançado, o que poderá justificar a perda de peso corporal, discutida anteriormente.

A distribuição de Fe no tecido hepático está de acordo com o que se verifica em humanos com doenças de sobrecarga de Fe (como a HH) e com outros estudos realizados em modelos animais de acumulação de Fe, em que se observa uma sobrecarga de Fe na zona periportal com um gradiente decrescente em direção à zona centrolobular, na qual os hepatócitos estão livres de Fe (Moon et al., 2012, Pigeon et al., 1999, Park et al., 1987). Contudo o grupo Nrf2^{-/-} apresentou uma coloração mais forte. Em dois animais o Fe encontrava-se igualmente distribuído pelas zonas periportal e centrolobular, possivelmente

devido à sua libertação por parte dos hepatócitos periportais em necrose. Estes resultados, aliados aos discutidos anteriormente, sugerem que os animais Nrf2^{-/-} são mais suscetíveis à acumulação de Fe e sua toxicidade.

3. Morte Celular

A histologia de tecido hepático e a técnica de TUNEL confirmaram que a dieta FeC 0,5% não provocou danos graves a nível hepático. Por outro lado, a experiência de FeC 2,0% revelou positividade do TUNEL nos animais Nrf2^{-/-} com dieta enriquecida em áreas extensas do tecido hepático, sobretudo nas zonas periportais, áreas em que a deposição de Fe era mais marcada. Esta é mais uma evidência de que animais Nrf2^{-/-} são mais suscetíveis à toxicidade do Fe, sugerindo que a via de sinalização do Nrf2 confere proteção a nível hepático contra a acumulação do Fe neste órgão.

Perante estes resultados procedeu-se à IFI para a pesquisa de células positivas para a Casp-3 clivada. A Casp-3 é um fator crucial para a morte celular por apoptose e é ativada em células apoptóticas, quer pela via intrínseca (receptores de morte) quer pela via extrínseca (mitocondrial) (Tait and Green, 2010). No entanto, esta revelou-se negativa em todos os grupos experimentais, sugerindo que a morte celular observada no TUNEL não é apoptose. Estes resultados e os observados nas colorações HE e Perls (aumento de volume de hepatócitos, com a presença de hepatócitos em balão, infiltrados de glóbulos brancos mononucleares e hemorragia) sugerem que o tipo de morte celular dos hepatócitos devido à toxicidade provocada pela sobrecarga de FeC é necrose. Esta hipótese está de acordo com o estudo de Arezzini et al., 2003, onde foi verificado que os animais expostos apenas a FeC apresentavam áreas de necrose hepática, embora esta fosse mais extensa nos animais tratados com FeC e CCl₄ (hepatotóxina que causa necrose tecidual).

4. Análise ultraestrutural do tecido hepático

A MET permitiu uma observação intracelular mais detalhada dos danos provocados pelo FeC. Assim verificou-se que a toxicidade provocada pela acumulação de Fe está associada à destruição das mitocôndrias, o que poderá eventualmente decorrer da formação

de ROS no seu interior, provocando lesão hepática extensa. A destruição das mitocôndrias foi observada nos animais Nrf2^{-/-}, os quais apresentavam já muitos danos ao fim de apenas 2 semanas (experiência FeC 2,0%), ao contrário dos animais *wild-type*, o que sugere que esta via de sinalização confere proteção aos animais neste modelo de sobrecarga de Fe, e que quanto maior a concentração de FeC administrada maior as lesões verificadas a nível hepático.

O estudo de Park et al. (1987), que também pesquisou alterações ultraestruturais nos hepatócitos devido à acumulação de FeC, revelou a deposição massiva de Fe, autofagocitose mitocondrial, lesão membranar e observação de gotículas de gordura (as quais não foram observadas nos grupos controlo) em ratos *wild-type* ao fim de 8 meses de tratamento com FeC 2,5%. No presente estudo foram observadas alterações (Fe aparentemente acumulado no interior de lisossomas e destruição mitocondrial) nos animais Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% ao final de apenas 2 semanas. Os animais *wild-type* (B6) com dieta enriquecida não apresentaram alterações ultraestruturais evidentes, contudo se fossem submetidos a um tempo de tratamento semelhante ao estudo de Park et al. (1987), poderiam, eventualmente, apresentar danos a nível dos organelos celulares.

5. Pesquisa de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é apontada como um dos principais mecanismos de toxicidade do Fe, causando lesão hepática. Outros estudos de modelos animais de sobrecarga de Fe têm vindo a demonstrar a presença de MDA e 4-HNE em animais com dieta enriquecida em FeC (Arezzini et al., 2003, Houglum et al., 1990). A presença destes produtos de peroxidação lipídica também tem sido reportada em fígados de pacientes humanos com doenças de acumulação de Fe (Young et al., 1994). Assim foi pesquisada a presença de células positivas para o 4-HNE, um dos principais e mais reativos produtos da peroxidação lipídica, por IFI. Contudo não foi possível tirar conclusões, uma vez que foram observadas células positivas em todos os grupos experimentais, não se verificando diferenças entre dietas, nem entre estirpes de murganhos.

6. Deposição de fibras de colagénio e fibrose hepática

A coloração de Tricrómio de Masson foi realizada em tecido hepático de murganhos da experiência de FeC 2,0% para verificar a existência de fibras de colagénio e, no caso de estas estarem presentes, se se formavam nos locais padrão de deposição de Fe, ou seja na zona periportal hepática. No entanto, os resultados obtidos com esta coloração não permitiram tirar conclusões acerca da deposição de fibras de colagénio, uma vez que não se observaram resultados indicativos de uma deposição patológica nos diferentes grupos de animais em estudo. Estes resultados poderão ser explicados pelo facto dos hepatócitos terem passado por um processo de morte celular, em princípio necrose, muito rápido, e por isso não ter havido tempo para a formação de fibras de colagénio.

Uma vez que a deposição de fibras de colagénio e o desenvolvimento de fibrose podia já estar a ocorrer, mas ainda não ser visível, decidiu-se quantificar a expressão dos genes pró-fibróticos *Tgfb1*, *Acta2* e *Colla1*. Verificou-se um aumento ligeiro e não estatisticamente significativo da expressão do gene *Tgfb1* nos grupos B6 e *Nrf2*^{-/-} com dieta FeC 2,0% em relação aos controlos e do gene *Acta2* no grupo *Nrf2*^{-/-} com dieta FeC 2,0% em relação ao grupo controlo (cerca de 2,2 vezes), o que poderá representar uma fase inicial da formação de fibrose, e uma maior suscetibilidade por parte dos animais *Nrf2*^{-/-} a este tipo de dano hepático. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Xu et al. (2008), que revela que animais *Nrf2*^{-/-} são mais suscetíveis à formação de fibrose devido à administração de CCl_4 , definindo a via de sinalização do Nrf2 como protetora para este tipo de lesão hepática.

Os resultados obtidos para o gene *Colla1* não estão de acordo com os anteriores, não se tendo verificado diferenças entre os grupos experimentais.

Na pesquisa de células positivas para a α -SMA por IFI não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais que permitissem tirar conclusões acerca do desenvolvimento de fibrose hepática. No estudo de Arezzini et al. (2003) foram identificadas células estelares ativadas através da coloração positiva para a α -SMA nos animais alimentados com FeC, mas esta foi mais evidente nos animais que receberam FeC e CCl_4 . Nesse mesmo estudo a deposição de fibras de colagénio foi escassa, mesmo após 12 semanas de tratamento com FeC. Assim o FeC poderá não ser suficiente, por si só, para ativar as células estelares, sendo necessário um outro potenciador. A nossa hipótese é que a deleção do fator de transcrição Nrf2 poderia potenciar o desenvolvimento de fibrose.

Os resultados obtidos no estudo de Arezzini et. al., 2003 sugerem que a sobrecarga de Fe potencia o dano hepático e acelera o processo de fibrose, porém este autor refere outros estudos que reportam uma deposição escassa de colagénio em animais sujeitos a uma dieta enriquecida em FeC (Park et al., 1987), o que parece estar de acordo com os resultados obtidos neste projeto. No estudo de Pigeon et al. (1999) também não foram observadas evidências significativas de fibrose hepática.

7. Expressão de genes e proteínas do metabolismo do Fe

A dieta enriquecida com FeC 0,5% conduziu a aumentos na expressão dos genes Fpn1 e Hamp que só foram estatisticamente significativos no grupo B6. O aumento da expressão do Fpn1 poderá ser explicado pela necessidade das células hepáticas exportarem o Fe intracelular, de forma a evitar a sua toxicidade. Por outro lado, como já descrito, a hepcidina é o regulador sistémico do Fe, e os seus níveis aumentam com o aumento da quantidade de Fe no organismo. Assim, o aumento da expressão do gene Hamp ocorre para que os níveis de FPN nos enterócitos diminuam e, conseqüentemente diminua a absorção de Fe no duodeno (Batts, 2007).

A dieta suplementada com FeC 2,0% conduziu a um aumento da expressão dos genes Hamp e Hamp2 nos animais B6 e Nrf2 com dieta enriquecida. A acumulação de Fe hepática e sistémica, leva a que os níveis de hepcidina aumentem de forma a evitar a absorção de Fe para a circulação sanguínea.

Quanto à expressão proteica da FPN não foi possível proceder à sua quantificação, uma vez que as bandas obtidas na membrana de nitrocelulose estavam associadas a um nível elevado de ruído. Porém, a sua observação revelou não haver alterações da expressão nos quatro grupos de animais em estudo em ambas as experiências.

Na experiência de FeC 2,0% também se quantificou a expressão proteica de ferritina total, a qual é rapidamente induzida pela acumulação de Fe, verificando-se que esta era maior nos grupos B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0%. O aumento da expressão de ferritina total devido à administração de uma dieta enriquecida em Fe está de acordo com um estudo recente (Moon et al., 2012), em que foi administrada uma dieta rica em Fe (sob a forma *3,5,5-trimethyl-hexanoyl-ferrocene* - TMHF) durante 1, 2 ou 4 semanas a murganhos C57BL/6, e demonstrou que os animais sujeitos à administração de Fe

apresentam um aumento da expressão de ferritina, a qual continua elevada durante as 4 semanas de tratamento.

A partir dos resultados observados nas duas experiências pode-se concluir que os animais B6 e Nrf2^{-/-} são igualmente capazes de responder à sobrecarga de Fe ativando a expressão da hepcidina e da ferritina total, o que sugere que a sua diferente suscetibilidade à toxicidade do Fe não se deverá a uma regulação ineficiente da homeostasia do Fe.

8. Expressão de genes e proteínas regulados pelo Nrf2

A expressão de genes e proteínas regulados pelo Nrf2 também foi estudada. Na experiência de 0,5% não foram detetadas diferenças significativas na expressão dos genes Gclc e Nqo1, embora a expressão proteica de ambos aumente nos animais B6 com dieta 0,5% FeC. O aumento da expressão proteica de GCLC e NQO1 nos animais B6 com dieta FeC 0,5% está de acordo com o estudo de Moon et al. (2012), o qual refere que a sobrecarga de Fe leva ao aumento da expressão de genes e proteínas regulados pela via do Nrf2, como é o caso do GCLC e do NQO1. Uma vez que o GCLC participa na eliminação de ROS da célula por via da síntese da GSH, esta diferença poderá contribuir para que a célula consiga eliminar as ROS formadas devido à toxicidade do Fe de uma forma mais eficiente. Será importante realçar ainda que os níveis de expressão basal das duas proteínas são mais elevados nos animais B6.

A dieta contendo FeC 2,0% conduziu a um aumento (não significativo) da expressão génica e proteica do NQO1 no grupo B6 com dieta FeC 2,0% quando comparado com o respetivo grupo controlo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na experiência de FeC com concentração mais baixa. Os animais B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% apresentaram também um ligeiro aumento da expressão do gene Gsta1 quando comparado com o grupo controlo, embora não seja uma diferença significativa. Tal como para o gene Nqo1, o aumento de expressão do Gsta1 diminuiu no grupo Nrf2^{-/-}. Estes resultados sugerem que a Gsta1 é um gene alvo da via de sinalização do Nrf2, já demonstrado em Itoh et al. (1997), e que a sua expressão se encontra aumentada de forma a proteger a célula contra a toxicidade do Fe, juntamente com outros genes de detoxificação.

Ao contrário do verificado na experiência de FeC 0,5%, a expressão génica e proteica do GCLC diminuiu (não significativamente) nos grupos B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% em relação aos respetivos grupos controlo. O estudo da expressão génica do Gclm revelou resultados semelhantes aos do Gclc.

O estudo de Moon et al. (2012) refere que a via do Nrf2 regula a expressão das proteínas GCL e GSTs, levando ao seu aumento em situações de stress celular. Os resultados obtidos na experiência de FeC 2,0% não estão de acordo com este estudo quanto aos resultados obtidos para as proteínas GCLC e GCLM, uma vez que se observou uma ligeira diminuição da sua expressão nos grupos com dieta de Fe. Pelo contrário, a expressão do gene da GSTA1 (o tipo de GST mais expressa no fígado) aumentou ligeiramente nos animais com dieta enriquecida em Fe, o que está de acordo com o estudo de Moon et. al. (2012), que utilizou Fe sob a forma TMHF.

Com estes resultados pode-se concluir que há diferenças na expressão basal destes genes e proteínas. Além disso, as dietas suplementadas com FeC parecem aumentar a expressão de alguns deles (Nqo1 e Gsta1), mas não dos que estão relacionados com a síntese de GSH (Gclc e Gclm).

A ativação da via de sinalização do Nrf2 poderia ter sido pesquisada por técnicas mais diretas, como imunofluorescência indireta (a qual apresentaria positividade nos núcleos dos hepatócitos) e western-blot de extratos nucleares. Estas técnicas foram efetuadas, porém não foram bem sucedidas, o que se poderá ter ficado a dever à inespecificidade do anticorpo anti-Nrf2.

9. Expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios

A quantificação da expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios revelou não haver diferenças significativas entre os quatro grupos de animais em estudo (Tnfa) ou que houve mesmo uma diminuição da expressão (Il1b e Ifng) em animais B6 e Nrf2^{-/-} com dieta FeC 2,0% em comparação com os respetivos grupos controlo. Estes resultados contrariam os resultados previstos, uma vez que se esperava que os grupos com dieta de FeC 2,0% apresentassem um aumento destes genes em relação aos grupos com dieta *standard*, devido a processos inflamatórios causados pela toxicidade do Fe.

Conclusão

Conclusão

O desenvolvimento deste projeto permitiu descrever o efeito da deleção genética do fator de transcrição Nrf2 no desenvolvimento de patologia provocada por duas dietas enriquecidas em FeC, uma de 0,5% e outra de 2,0%, durante 8 e 2 semanas, respetivamente. As alterações histopatológicas podem ser comparadas com o que se verifica em doenças humanas de sobrecarga de Fe, como é o caso da HH. Com este estudo foi possível estudar a concentração do Fe hepático e sérico, o padrão de distribuição do Fe no fígado, as alterações histológicas e ultraestruturais das células hepáticas, o nível lesão hepática e morte celular. O presente estudo permitiu ainda investigar a possível deposição de fibras de colagénio e formação de fibrose hepática, e por fim as alterações provocadas a nível das expressões génicas e proteicas de proteínas do metabolismo do Fe, de proteínas reguladas pelo Nrf2 e envolvidas em processos de inflamação.

Na experiência de FeC 0,5% verificou-se uma acumulação de Fe no fígado, que não chegou a causar danos significativos neste órgão. Por outro lado, na experiência de FeC 2,0% verificou-se que a acumulação de Fe não foi localizada, mas sim sistémica e que os animais Nrf2^{-/-} com dieta enriquecida apresentavam um estado geral decadente. Perante estes resultados conclui-se que a deleção do fator de transcrição Nrf2 confere maior suscetibilidade no desenvolvimento de patologia associada à sobrecarga de Fe.

Relativamente à histologia, conclui-se que uma dieta FeC 0,5% não provoca grandes alterações, ao contrário da dieta de FeC 2,0%, que causa graves alterações do tecido hepático, sendo esta mais grave nos animais Nrf2^{-/-}.

A pesquisa de morte celular em tecido hepático dos murganhos da experiência de FeC 0,5% não revelou diferenças evidentes entre os tipos de estirpes e de dietas, enquanto que a experiência de FeC 2,0% revelou morte celular extensa em tecido hepático de animais Nrf2^{-/-}. Estes resultados sugerem que a via de sinalização do Nrf2 protege contra a morte celular hepática provocada pela acumulação de FeC. O tipo de morte celular parece não ser apoptose, sugerindo tratar-se de necrose.

O estudo ultraestrutural dos hepatócitos mostrou que a acumulação de Fe leva à destruição mitocondrial, sendo esta mais severa com o aumento da concentração de FeC administrada. Esta destruição poderá ocorrer devido à formação de ROS no interior da mitocôndria, levando à destruição mitocondrial e celular.

Embora a peroxidação lipídica seja um dos processos de toxicidade do Fe, neste estudo não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, não sendo possível concluir quanto ao desenvolvimento deste mecanismo.

Na experiência de FeC 2,0% não foi observada deposição evidente de fibras de colagénio, nem células positivas para a α -SMA. O estudo de genes pró-fibróticos revelou algumas alterações sugestivas de formação de fibrose, contudo estas não foram evidentes. Assim, os resultados obtidos demonstram que a acumulação de Fe provoca lesão hepática, e que eventualmente poderá acelerar o processo de fibrose. Porém, como já discutido, outros autores concluíram que são necessários fatores adicionais para que o desenvolvimento de fibrose ocorra, colocando-se a hipótese de que na presença de um evento lesionante, a ação do Fe poderá amplificar e propagar esse dano, devido à sua citotoxicidade (Arezzini et al., 2003). A deleção do Nrf2 não será, portanto, suficiente para o desenvolvimento de fibrose, pelo menos ao fim de 2 semanas (tempo de duração deste estudo).

A expressão de genes e proteínas do metabolismo do Fe demonstrou estar de acordo com o que teoricamente acontece durante a acumulação excessiva de Fe (levando a um aumento da ferritina e da hepcidina). Os resultados obtidos para a expressão de genes e proteínas regulados pelo Nrf2 mostram que ocorre a ativação da via do Nrf2, provocada pela acumulação de Fe e sua toxicidade. Esta ativação leva ao aumento da expressão genes e proteínas (Nqo1 e Gsta1) que protegem a célula contra oxidantes e eletrófilos.

A experiência de FeC 0,5% provocou uma acumulação de Fe hepática, com a alteração de alguns genes e proteínas do metabolismo do Fe e citoprotetores, no entanto, não provocou danos extensos a nível hepático e da saúde geral dos animais. Por outro lado, a experiência de FeC 2,0% não só levou à acumulação de Fe hepática, mas possivelmente também sistémica, provocando lesão hepática e morte celular extensa nos animais sujeitos a esta dieta, sobretudo os Nrf2^{-/-}.

Com este estudo foi demonstrado que os animais Nrf2^{-/-} são mais suscetíveis à toxicidade provocada pelo Fe, podendo-se assim concluir que a via de sinalização do Nrf2 desempenha um papel determinante na proteção contra a acumulação de Fe no organismo de murganhos com o *background* genético B6.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ANDREWS, N. C. 1999. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 341, 1986-95.
- ANDREWS, N. C. 2000. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet*, 1, 208-17.
- AREZZINI, B., LUNGHI, B., LUNGARELLA, G. & GARDI, C. 2003. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 486-95.
- AROSIO, P., INGRASSIA, R. & CAVADINI, P. 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 589-99.
- ATANASOVA, B. D., LI, A. C., BJARNASON, I., TZATCHEV, K. N. & SIMPSON, R. J. 2005. Duodenal ascorbate and ferric reductase in human iron deficiency. *Am J Clin Nutr*, 81, 130-3.
- AZIZ, N. & MUNRO, H. N. 1987. Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 8478-82.
- BABITT, J. L., HUANG, F. W., WRIGHTING, D. M., XIA, Y., SIDIS, Y., SAMAD, T. A., CAMPAGNA, J. A., CHUNG, R. T., SCHNEYER, A. L., WOOLF, C. J., ANDREWS, N. C. & LIN, H. Y. 2006. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*, 38, 531-9.
- BACON, B. R. & BRITTON, R. S. 1990. The pathology of hepatic iron overload: a free radical--mediated process? *Hepatology*, 11, 127-37.
- BACON, B. R., TAVILL, A. S., BRITTENHAM, G. M., PARK, C. H. & RECKNAGEL, R. O. 1983. Hepatic lipid peroxidation *in vivo* in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest*, 71, 429-39.
- BAIRD, L. & DINKOVA-KOSTOVA, A. T. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*, 85, 241-72.
- BATTS, K. P. 2007. Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol*, 20 Suppl 1, S31-9.
- BEUTLER, E. 2006. Hemochromatosis: genetics and pathophysiology. *Annu Rev Med*, 57, 331-47.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. & FLOHE, L. 2011. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*, 15, 2335-81.
- BROCK, J. H., MAINOU-FOWLER, T. & MCGREGOR, S. J. 1987. Transferrins and defence against infection. *Ann Ist Super Sanita*, 23, 935-41.
- CAMASCHELLA, C., ROETTO, A., CALI, A., DE GOBBI, M., GAROZZO, G., CARELLA, M., MAJORANO, N., TOTARO, A. & GASPARINI, P. 2000. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*, 25, 14-5.
- CASEY, J. L., HENTZE, M. W., KOELLER, D. M., CAUGHMAN, S. W., ROUAULT, T. A., KLAUSNER, R. D. & HARFORD, J. B. 1988. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science*, 240, 924-8.
- CHAN, K., HAN, X. D. & KAN, Y. W. 2001. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4611-6.
- COPPLE, I. M. 2012. The keap1-nrf2 cell defense pathway - a promising therapeutic target? *Adv Pharmacol*, 63, 43-79.
- COPPLE, I. M., GOLDRING, C. E., KITTERINGHAM, N. R. & PARK, B. K. 2008. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*, 246, 24-33.
- CRICHTON, R. 2009. *Iron Metabolism - From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*, John Wiley & Sons, Ltd.
- EATON, J. W. & QIAN, M. 2002. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med*, 32, 833-40.
- ENOMOTO, A., ITOH, K., NAGAYOSHI, E., HARUTA, J., KIMURA, T., O'CONNOR, T., HARADA, T. & YAMAMOTO, M. 2001. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci*, 59, 169-77.
- EVSTATIEV, R. & GASCHÉ, C. 2011. Iron sensing and signalling. *Gut*.
- FEDER, J. N., GNIRKE, A., THOMAS, W., TSUCHIHASHI, Z., RUDDY, D. A., BASAVA, A., DORMISHIAN, F., DOMINGO, R., JR., ELLIS, M. C., FULLAN, A., HINTON, L. M., JONES, N. L., KIMMEL, B. E., KRONMAL, G. S., LAUER, P., LEE, V. K., LOEB, D. B., MAPA, F. A., MCCLELLAND, E., MEYER, N. C., MINTIER, G. A., MOELLER, N., MOORE, T., MORIKANG, E., PRASS, C. E., QUINTANA, L., STARNES, S. M., SCHATZMAN, R. C., BRUNKE, K. J., DRAYNA, D. T., RISCH, N. J., BACON, B. R. & WOLFF, R. K. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*, 13, 399-408.

- FLEMING, M. D., ROMANO, M. A., SU, M. A., GARRICK, L. M., GARRICK, M. D. & ANDREWS, N. C. 1998. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1148-53.
- GAO, J., CHEN, J., KRAMER, M., TSUKAMOTO, H., ZHANG, A. S. & ENNS, C. A. 2009. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*, 9, 217-27.
- GARRICK, M. D. 2011. Human iron transporters. *Genes Nutr*, 6, 45-54.
- GKOUVATSOS, K., PAPANIKOLAOU, G. & PANTOPOULOS, K. 2012. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta*, 1820, 188-202.
- GOMME, P. T., MCCANN, K. B. & BERTOLINI, J. 2005. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today*, 10, 267-73.
- HENTZE, M. W., CAUGHMAN, S. W., ROUAULT, T. A., BARRIOCANAL, J. G., DANCIS, A., HARFORD, J. B. & KLAUSNER, R. D. 1987. Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science*, 238, 1570-3.
- HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U., GALY, B. & CAMASCHELLA, C. 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142, 24-38.
- HOUGLUM, K., FILIP, M., WITZTUM, J. L. & CHOJKIER, M. 1990. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *J Clin Invest*, 86, 1991-8.
- HVIDBERG, V., MANIECKI, M. B., JACOBSEN, C., HOJRUP, P., MOLLER, H. J. & MOESTRUP, S. K. 2005. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*, 106, 2572-9.
- ILYIN, G., COURSELAUD, B., TROADEC, M. B., PIGEON, C., ALIZADEH, M., LEROYER, P., BRISSOT, P. & 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.
- ITOH, K., CHIBA, T., TAKAHASHI, S., ISHII, T., IGARASHI, K., KATOH, Y., OYAKE, T., HAYASHI, N., SATOH, K., HATAYAMA, I., YAMAMOTO, M. & NABESHIMA, Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 313-22.
- ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATOH, Y., ISHII, T., IGARASHI, K., ENGEL, J. D. & YAMAMOTO, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13, 76-86.
- ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATOH, Y., ISHII, T., O'CONNOR, T. & YAMAMOTO, M. 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, 8, 379-91.
- JAISWAL, A. K. 2010. *Nrf2/INrf2 (Keap1) Signaling in Oxidative Stress and Cellular Protection*, Baltimore, University of Maryland School of Medicine.
- JIANG, T., HUANG, Z., CHAN, J. Y. & ZHANG, D. D. 2009. Nrf2 protects against As(III)-induced damage in mouse liver and bladder. *Toxicol Appl Pharmacol*, 240, 8-14.
- JOSEPH, P. & JAISWAL, A. K. 1994. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8413-7.
- KAKHLON, O. & CABANTCHIK, Z. I. 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*, 33, 1037-46.
- KATO, J., FUJIKAWA, K., KANDA, M., FUKUDA, N., SASAKI, K., TAKAYAMA, T., KOBUNE, M., TAKADA, K., TAKIMOTO, R., HAMADA, H., IKEDA, T. & NIITSU, Y. 2001. A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet*, 69, 191-7.
- KATOH, Y., ITOH, K., YOSHIDA, E., MIYAGISHI, M., FUKAMIZU, A. & YAMAMOTO, M. 2001. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells*, 6, 857-68.
- KAWABATA, H., YANG, R., HIRAMA, T., VUONG, P. T., KAWANO, S., GOMBART, A. F. & KOEFFLER, H. P. 1999. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*, 274, 20826-32.
- KEHRER, J. P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50.
- KELL, D. B. 2009. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics*, 2, 2.

- KENSLER, T. W., WAKABAYASHI, N. & BISWAL, S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 89-116.
- KLAASSEN, C. D. & REISMAN, S. A. 2010. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol*, 244, 57-65.
- KLAUSNER, R. D., ASHWELL, G., VAN RENSWOUDE, J., HARFORD, J. B. & BRIDGES, K. R. 1983. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 2263-6.
- KOBAYASHI, A., KANG, M. I., OKAWA, H., OHTSUJI, M., ZENKE, Y., CHIBA, T., IGARASHI, K. & YAMAMOTO, M. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*, 24, 7130-9.
- KRISTIANSEN, M., GRAVERSEN, J. H., JACOBSEN, C., SONNE, O., HOFFMAN, H. J., LAW, S. K. & MOESTRUP, S. K. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409, 198-201.
- KRUSZEWSKI, M. 2003. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res*, 531, 81-92.
- LATUNDE-DADA, G. O., SIMPSON, R. J. & MCKIE, A. T. 2008. Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. *J Nutr*, 138, 991-5.
- LATUNDE-DADA, G. O., TAKEUCHI, K., SIMPSON, R. J. & MCKIE, A. T. 2006. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett*, 580, 6865-70.
- LAWSON, D. M., TREFFRY, A., ARTYMIUK, P. J., HARRISON, P. M., YEWDALL, S. J., LUZZAGO, A., CESARENI, G., LEVI, S. & AROSIO, P. 1989. Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett*, 254, 207-10.
- LEE, P. L. & BEUTLER, E. 2009. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol*, 4, 489-515.
- LI, W. & KONG, A. N. 2009. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*, 48, 91-104.
- LILL, R. 2009. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460, 831-8.
- LIM, J. E., JIN, O., BENNETT, C., MORGAN, K., WANG, F., TRENOR, C. C., 3RD, FLEMING, M. D. & ANDREWS, N. C. 2005. A mutation in Sec1511 causes anemia in hemoglobin deficit (hbd) mice. *Nat Genet*, 37, 1270-3.
- LIUZZI, J. P., AYDEMIR, F., NAM, H., KNUTSON, M. D. & COUSINS, R. J. 2006. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13612-7.
- LU, Y., GONG, P. & CEDERBAUM, A. I. 2008. Pyrazole induced oxidative liver injury independent of CYP2E1/2A5 induction due to Nrf2 deficiency. *Toxicology*, 252, 9-16.
- MACKENZIE, E. L., IWASAKI, K. & TSUJI, Y. 2008. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 10, 997-1030.
- MCCMAHON, M., ITOH, K., YAMAMOTO, M. & HAYES, J. D. 2003. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*, 278, 21592-600.
- MCCMAHON, M., THOMAS, N., ITOH, K., YAMAMOTO, M. & HAYES, J. D. 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degen and the redox-insensitive Neh6 degen. *J Biol Chem*, 279, 31556-67.
- MEGURO, R., ASANO, Y., IWATSUKI, H. & SHOUMURA, K. 2003. Perfusion-Perls and -Turnbull methods supplemented by DAB intensification for nonheme iron histochemistry: demonstration of the superior sensitivity of the methods in the liver, spleen, and stomach of the rat. *Histochem Cell Biol*, 120, 73-82.
- MOI, P., CHAN, K., ASUNIS, I., CAO, A. & KAN, Y. W. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9926-30.
- MOON, M. S., MCDEVITT, E. I., ZHU, J., STANLEY, B., KRZEMINSKI, J., AMIN, S., ALIAGA, C., MILLER, T. G. & ISOM, H. C. 2012. Elevated Hepatic Iron Activates NF-E2-Related Factor 2-Regulated Pathway in a Dietary Iron Overload Mouse Model. *Toxicol Sci*, 129, 74-85.
- MULCAHY, R. T. & GIPP, J. J. 1995. Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 227-33.
- MULCAHY, R. T., WARTMAN, M. A., BAILEY, H. H. & GIPP, J. J. 1997. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem*, 272, 7445-54.

- MULLNER, E. W. & KUHN, L. C. 1988. A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell*, 53, 815-25.
- NEMETH, E., TUTTLE, M. S., POWELSON, J., VAUGHN, M. B., DONOVAN, A., WARD, D. M., GANZ, T. & KAPLAN, J. 2004. Hpcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306, 2090-3.
- NEVES, J. V., WILSON, J. M. & RODRIGUES, P. N. 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. *Dev Comp Immunol*, 33, 848-57.
- NIOI, P., NGUYEN, T., SHERRATT, P. J. & PICKETT, C. B. 2005. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 25, 10895-906.
- NITURE, S. K., KASPAR, J. W., SHEN, J. & JAISWAL, A. K. 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol*, 244, 37-42.
- OH, C. J., KIM, J. Y., MIN, A. K., PARK, K. G., HARRIS, R. A., KIM, H. J. & LEE, I. K. 2012. Sulfuraphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling. *Free Radic Biol Med*, 52, 671-82.
- OHGAMI, R. S., CAMPAGNA, D. R., GREER, E. L., ANTIOCHOS, B., MCDONALD, A., CHEN, J., SHARP, J. J., FUJIWARA, Y., BARKER, J. E. & FLEMING, M. D. 2005. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, 37, 1264-9.
- PAPANIKOLAOU, G., SAMUELS, M. E., LUDWIG, E. H., MACDONALD, M. L., FRANCHINI, P. L., DUBE, M. P., ANDRES, L., MACFARLANE, J., SAKELLAROPOULOS, N., POLITOU, M., NEMETH, E., THOMPSON, J., RISLER, J. K., ZABOROWSKA, C., BABAKAUFF, R., RADOMSKI, C. C., PAPE, T. D., DAVIDAS, O., CHRISTAKIS, J., BRISSOT, P., LOCKITCH, G., GANZ, T., HAYDEN, M. R. & GOLDBERG, Y. P. 2004. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 36, 77-82.
- PARK, C. H., BACON, B. R., BRITTENHAM, G. M. & TAVILL, A. S. 1987. Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Lab Invest*, 57, 555-63.
- PIETRANGELO, A. 2010. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*, 139, 393-408, 408 e1-2.
- PIGEON, C., TURLIN, B., IANCU, T. C., LEROYER, P., LE LAN, J., DEUGNIER, Y., BRISSOT, P. & LOREAL, O. 1999. Carbonyl-iron supplementation induces hepatocyte nuclear changes in BALB/CJ male mice. *J Hepatol*, 30, 926-34.
- PONKA, P., BEAUMONT, C. & RICHARDSON, D. R. 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol*, 35, 35-54.
- RECALCATI, S., MINOTTI, G. & CAIRO, G. 2010. Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxid Redox Signal*, 13, 1593-616.
- REISMAN, S. A., YEAGER, R. L., YAMAMOTO, M. & KLAASSEN, C. D. 2009. Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol Sci*, 108, 35-47.
- ROBB, A. D., ERICSSON, M. & WESSLING-RESNICK, M. 2004. Transferrin receptor 2 mediates a biphasic pattern of transferrin uptake associated with ligand delivery to multivesicular bodies. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C1769-75.
- ROETTO, A., PAPANIKOLAOU, G., POLITOU, M., ALBERTI, F., GIRELLI, D., CHRISTAKIS, J., LOUKOPOULOS, D. & CAMASCHELLA, C. 2003. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 33, 21-2.
- ROETTO, A., TOTARO, A., PIPERNO, A., PIGA, A., LONGO, F., GAROZZO, G., CALI, A., DE GOBBI, M., GASPARINI, P. & CAMASCHELLA, C. 2001. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood*, 97, 2555-60.
- ROSS, D. 2004. Quinone reductases multitasking in the metabolic world. *Drug Metab Rev*, 36, 639-54.
- ROUAULT, T. A. 2006. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*, 2, 406-14.
- ROUAULT, T. A., HENTZE, M. W., CAUGHMAN, S. W., HARFORD, J. B. & KLAUSNER, R. D. 1988. Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science*, 241, 1207-10.
- RYTER, S. W., ALAM, J. & CHOI, A. M. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, 86, 583-650.
- SEELIG, G. F., SIMONDSSEN, R. P. & MEISTER, A. 1984. Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem*, 259, 9345-7.

- SHAYEGHI, M., LATUNDE-DADA, G. O., OAKHILL, J. S., LAFTAH, A. H., TAKEUCHI, K., HALLIDAY, N., KHAN, Y., WARLEY, A., MCCANN, F. E., HIDER, R. C., FRAZER, D. M., ANDERSON, G. J., VULPE, C. D., SIMPSON, R. J. & MCKIE, A. T. 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 122, 789-801.
- SODUM, R. S. & CHUNG, F. L. 1988. 1,N²-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res*, 48, 320-3.
- SOE-LIN, S., APTE, S. S., ANDRIOPOULOS, B., JR., ANDREWS, M. C., SCHRANZHOFER, M., KAHAWITA, T., GARCIA-SANTOS, D. & PONKA, P. 2009. Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 5960-5.
- SUGIMOTO, H., OKADA, K., SHODA, J., WARABI, E., ISHIGE, K., UEDA, T., TAGUCHI, K., YANAGAWA, T., NAKAHARA, A., HYODO, I., ISHII, T. & 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.
- TAIT, S. W. & GREEN, D. R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 621-32.
- TOLOSANO, E., FAGOONEE, S., MORELLO, N., VINCHI, F. & FIORITO, V. 2010. Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxid Redox Signal*, 12, 305-20.
- TORRENCE, J. D. & BOTHWELL, T. H. 1980. Tissue iron stores. *Methods in haematology*, 104-9.
- TROADEC, M. B., COURSELAUD, B., DETIVAUD, L., HAZIZA-PIGEON, C., LEROYER, P., BRISSOT, P. & LOREAL, O. 2006. Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes. *J Hepatol*, 44, 391-9.
- UMEMURA, T., KUROIWA, Y., KITAMURA, Y., ISHII, Y., KANKI, K., KODAMA, Y., ITOH, K., YAMAMOTO, M., NISHIKAWA, A. & HIROSE, M. 2006. A crucial role of Nrf2 in in vivo defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol. *Toxicol Sci*, 90, 111-9.
- VAN GORP, H., DELPUTTE, P. L. & NAUWYNCK, H. J. 2010. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol*, 47, 1650-60.
- VENUGOPAL, R. & JAISWAL, A. K. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14960-5.
- VIATTE, L. & VAULONT, S. 2009. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie*, 91, 1223-8.
- VO, N. & GOODMAN, R. H. 2001. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 276, 13505-8.
- VULPE, C. D., KUO, Y. M., MURPHY, T. L., COWLEY, L., ASKWITH, C., LIBINA, N., GITSCHIER, J. & ANDERSON, G. J. 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*, 21, 195-9.
- WALLANDER, M. L., LEIBOLD, E. A. & EISENSTEIN, R. S. 2006. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 668-89.
- WANG, J. & PANTOPOULOS, K. 2011. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*, 434, 365-81.
- WESSLING-RESNICK, M. 2006. Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G1-6.
- WHITINGTON, P. F. 2006. Fetal and infantile hemochromatosis. *Hepatology*, 43, 654-60.
- XU, W., HELLERBRAND, C., KOHLER, U. A., BUGNON, P., KAN, Y. W., WERNER, S. & BEYER, T. A. 2008. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab Invest*, 88, 1068-78.
- YEN, A. W., FANCHER, T. L. & BOWLUS, C. L. 2006. Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress. *Am J Med*, 119, 391-9.
- YOUNG, I. S., TROUTON, T. G., TORNEY, J. J., MCMASTER, D., CALLENDER, M. E. & TRIMBLE, E. R. 1994. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. *Free Radic Biol Med*, 16, 393-7.
- ZHANG, A. S. & ENNS, C. A. 2009. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J Biol Chem*, 284, 711-5.
- ZHU, M. & FAHL, W. E. 2001. Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 212-9.

Publicações

Publicações

Parte dos resultados deste trabalho foram apresentados em duas comunicações orais e foram submetidos à revista *Hepatology* para publicação.

Comunicações Oraís:

Silva-Gomes, S., Santos, A. G., Caldas, C., Neves, J. V., Rodrigues, P. N., Duarte, T.L. Understanding the role of Nrf2 signalling in the cellular defence against iron toxicity: Nrf2 protects against dietary iron-induced liver injury. 16th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research - International, 6-9 September 2012. London, UK.

Santos, A. G., Gomes, S. S., Caldas, C., Neves, J. V., Rodrigues, P. N., Duarte, T.L. Nrf2 protects mice against dietary iron-induced liver injury. Third Scientific Retreat of the Institute for Health Research and Innovation (I3S), 11-12 May 2012. Porto, Portugal.

Artigo Submetido:

Silva-Gomes, S., Santos, A. G., Caldas, C., Neves, J. V., Rodrigues, P. N., Duarte, T.L. Transcription Factor Nrf2 Protects Mice Against Iron-induced Liver Injury.