

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO FERRO SOBRE A MORTE NEURONAL NA
SUBSTÂNCIA NEGRA DE RATOS DURANTE O PERÍODO NEONATAL**

BRUNO LOPES DOS SANTOS

**BELÉM - PARÁ
2006**

BRUNO LOPES DOS SANTOS

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO FERRO SOBRE A MORTE NEURONAL NA
SUBSTÂNCIA NEGRA DE RATOS DURANTE O PERÍODO NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Dra. Elizabeth Sumi Yamada

Belém – Pará

2006

BRUNO LOPES DOS SANTOS

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO FERRO SOBRE A MORTE NEURONAL NA
SUBSTÂNCIA NEGRA DE RATOS DURANTE O PERÍODO NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Dra. Elizabeth Sumi Yamada

BANCA EXAMINADORA

Julgado em: ____ / ____ / ____

Conceito: _____

A minha família, meu maior tesouro, dedico o primeiro quinhão de meus esforços.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, do fundo da alma, Àquele que mostra favores ao homem de conhecimento e ensina compreensão aos homens mortais. Abençoado és Tu, Senhor, que favorece a nós com conhecimento.

Aos homens que guiam os incertos caminhos de minha mente, como mestres da arte de compreender o mundo: Friedrich Nietzsche e Fiodor Dostoyevsky.

A minha orientadora, Profa. Elizabeth Yamada, por acreditar em meu potencial, treinar minha mentalidade científica e mostrar como se gera conhecimento, um ensinamento que carregarei até o final da vida.

Ao Prof. Edmar Tavares, pelas ajudas e conselhos, e a todos do Laboratório de Neuropatologia Experimental, companheiros que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao amigo Dilvan Peres, pela grande ajuda a mim prestada.

A James Parkinson que, como por destino, inspira-me a entender cada vez mais esta moléstia por ele descrita.

A minha família, por entender e apoiar plenamente minhas ambições e desejos.

A meu avô Waldir Lopes (*in memoriam*), por me mostrar a verdadeira face desta macabra doença, que destrói a alma antes de matar o corpo.

A meu tio Rosivaldo Lopes (*in memoriam*), recentemente retirado de nosso convívio, por tudo que representou a mim e por me fazer relembrar da insignificância do homem e sua Medicina em relação aos desígnios de Deus.

A todos que puseram uma nesga de esperança no que faço.

“Que estes amigos da Humanidade e da Ciência Médica, os quais já revelaram para nós muitos dos processos mórbidos nos quais saúde e vida se resumem, possam ser estimulados a estender suas pesquisas para esta doença, algo muito desejado; e se espera que isto possa ser conseguido pela publicação destas observações”

(James Parkinson, em “An Essay on the Shaking Palsy”, 1817)

RESUMO

O ferro (Fe) é um elemento químico que está diretamente envolvido em reações de oxi-redução por ser capaz de doar e ganhar elétrons em suas formas ferrosa e férrica, respectivamente. Em situações de sobrecarga, o ferro pode gerar radicais livres a partir de seu envolvimento nas reações de Haber-Weiss e Fenton, as quais fazem parte da cascata de geração de espécies reativas de oxigênio e produzem, no final, o radical hidroxila, o mais nocivo ao organismo. Neste contexto, sabe-se que o sistema nervoso central é altamente permeável ao ferro nas primeiras etapas da vida, e que as células dopaminérgicas são mais predispostas ao estresse oxidativo que outros tipos neuronais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração crônica de ferro no período neonatal sobre a substância negra de ratos. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, distribuídos em 3 grupos, de acordo com a duração do tratamento: (1) duração de dia pós-natal 1 (P1) até P7, (2) P8 a P14 e (3) P1 a P14, em grupos tratados com ferro e seus controles (total de 6 grupos). No tratamento, foi administrado 30mg de ferro elementar/kg de peso corporal (solução de sulfato ferroso) uma vez ao dia, no período já expresso acima. Foi feita análise do número de padrões picnóticos sugestivos de morte por apoptose de acordo com os trabalhos de Macaya e cols. (1994) e Marti e cols. (1997) e do número de neurônios marcados com imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase. O número médio de perfis picnóticos foi maior em animais tratados com ferro de P1-P7 do que em controles, sem diferenças nos outros grupos de tratamento. O número total de padrões picnóticos foi maior no grupo tratado de P1-7 em relação aos controles. O número de neurônios dopaminérgicos TH-positivos foi menor em animais expostos ao ferro. Esses resultados sugerem que a exposição a um agente agressor (ferro) no período neonatal pode causar aumento na perda neuronal da substância negra, podendo implicar em déficits futuros que propiciem ao desenvolvimento de síndrome parkinsoniana.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, ferro, apoptose, estresse oxidativo, substância negra, período neonatal

ABSTRACT

Iron (Fe) is a chemical element directly involved in redox reactions due the possibility of donate and gain electrons in ferrous and ferric form, respectively. In overload states, the iron can generate free radicals derived from Haber-Weiss and Fenton reactions, finally resulting the generation of hydroxyl radical, the most pernicious free radical to the organism. In this context, it is known that the central nervous system is highly permeable to the iron in earlier stages of life, and the dopaminergic cells are more predisposed to the oxidative stress than another neurons. The aim of this work was to assess the effects of chronic iron administration in postnatal age over substantia nigra of rats. Lewis rats were used, distributed in 3 groups, accordingly the treatment duration: (1) from postnatal day 1 (P1) to P7, (2) P8 to P14 and (3) P1 to P14, and their controls (total of 6 groups). In treatment, it was administrated 30mg of Fe^{2+} /kg of body weight (ferrous sulfata solution) once a day, depending of the experimental group. Analysis of pyknotic profiles were made according to Macaya et al. (1994) and Marti et al. (1997), and number of marked tyrosine hydroxylase (TH) neurons by immunostaining were counted. The mean number of pyknotic profiles was higher in treated than control group only in P1-P7 duration, without differences between the other groups. The total number of pyknotic profiles was higher in treated group P1-P7. The number of TH-positive dopaminergic neurons was lower in iron-exposed animals. These results suggest, even in earlier phase of exposition to an toxic agent (iron) in neonatal period, there is already some neuron loss in substantia nigra. It may result in future impairments, predisposing the parkinsonian syndrome development.

Keywords: Parkinson's Disease, iron, apoptosis, oxidative stress, substantia nigra, neonatal period.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.1.1. Objetivo Geral.....	3
1.1.2. Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. FERRO: ASPECTOS GERAIS.....	3
2.2. METABOLISMO DO FERRO.....	5
2.2.1. Absorção de Ferro no Indivíduo Adulto.....	6
2.2.2. Absorção de Ferro no Indivíduo em Desenvolvimento.....	11
2.3. AS BARREIRAS BIOLÓGICAS, O FERRO E A TRANSFERRINA.....	12
2.4. FERRO TÓXICO: ALEITAMENTO COMO VIA DE INTOXICAÇÃO.....	15
2.4.1. Papel Fisiológico do Ferro e sua Distribuição pelo Corpo em Adultos e Crianças.....	15
2.4.2. Ferro no Leite e em Fórmulas Lácteas.....	18
2.4.3. Considerações sobre o Aleitamento Artificial e o Ferro.....	22
2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS.....	23
2.5.1. Ferro e Neurodegeneração: Evidências Experimentais.....	23
2.5.2. Ferro e Neurodegeneração: Exposição Durante o Período Neonatal.....	26
2.5.3. Apoptose na SN no Período Neonatal.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. ANIMAIS.....	31
3.2. TRATAMENTO COM FERRO.....	31

3.3.	COLETA DE MATERIAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	32
3.4.	ANÁLISE MORFOLÓGICA QUANTITATIVA.....	34
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	ANÁLISE DOS PESOS.....	36
4.2.	ANÁLISE MORFOLÓGICA QUANTITATIVA.....	38
4.2.1.	Média de Padrões Picnóticos.....	38
4.2.2.	Número Total de Perfis Picnóticos na Porção Central da Substância Negra.....	42
4.2.3.	Número Total de Neurônios TH-positivos na Substância Negra.....	45
5.	DISCUSSÃO.....	45
6.	CONCLUSÕES.....	51
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8.	ANEXOS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Absorção do ferro nos enterócitos (ANDREWS, 1999).....	6
Figura 2.	Transporte e entrada nas células de ferro ligado à transferrina (ANDREWS, 1999).....	10
Figura 3.	Diagrama esquemático do metabolismo de ferro em adultos. Sistema R/E = sistema reticulo-endotelial (Adaptada de MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).....	16
Figura 4.	Processamento Imuno-Histoquímico e Método de Análise.....	34
Figura 5.	Comparação entre o peso médio de animais tratados e controle nos diferentes dias de tratamento. <i>A</i> : período de P1-7. <i>B</i> : período de P8-14. <i>C</i> : período de 1-14. * - $p < 0,05$. Teste T.....	37
Figura 6.	Fotomicrografia da morfologia de células picnóticas. <i>A e B</i> : Secções com aumento de 30x mostrando a SN através da imunohistoquímica por TH contracorada com Nissl (<i>A</i>) e somente corada pelo método de Nissl (<i>B</i>). <i>C, D, E e F</i> : Aumento de 600x; exemplos de padrões picnóticos individuais revelados pelo método de Nissl. As setas evidenciam os corpos cromatóides típicos da morte celular por apoptose, além da picnose celular.....	39
Figura 7.	Comparação entre animais tratados e controle da média de padrões picnóticos por hemisseção de SNpc nos grupos de tratamento. <i>A</i> : padrões picnóticos típicos, <i>B</i> : padrões picnóticos atípicos, <i>C</i> : total de padrões picnóticos. * - $p < 0,05$. Teste T.....	40
Figura 8.	Comparação entre os grupos de tratamento da média de padrões picnóticos por hemisseção de SNpc nos animais tratados e controle. <i>A</i> : padrões picnóticos típicos, <i>B</i> : padrões picnóticos atípicos, <i>C</i> : total de padrões picnóticos. * - $p < 0,05$. Teste ANOVA.....	41
Figura 9.	Comparação entre animais tratados e controle do número total de padrões picnóticos em secções medianas por hemisseção de SNpc nos grupos de tratamento. <i>A</i> : padrões picnóticos típicos, <i>B</i> : padrões picnóticos atípicos, <i>C</i> : total de padrões picnóticos. * - $p < 0,05$. Teste T.....	43

- Figura 10. Comparação entre os grupos de tratamento do número total de padrões picnóticos em secções medianas por hemissecção de SNpc nos animais tratados e controle. *A*: padrões picnóticos típicos, *B*: padrões picnóticos atípicos, *C*: total de padrões picnóticos. * - $p < 0,05$. Teste ANOVA..... 44
- Figura 11 Comparação entre animais tratados e controle do número total de neurônios TH-positivos na substância negra por hemissecção de SNpc no período de P1-14. * - $p < 0,05$. Teste ANOVA..... 45

1 – INTRODUÇÃO

A substância negra compacta é um núcleo mesencefálico onde estão localizados neurônios dopaminérgicos que se projetam para o neostriado. A dopamina liberada pelos terminais nigrais modula a atividade dos neurônios de projeção do neostriado participando de maneira fundamental no controle da motricidade. A importância desse núcleo fica mais evidente em uma doença neurodegenerativa caracterizada pela morte dos seus neurônios, a doença de Parkinson (DP). Os portadores da doença de Parkinson apresentam dificuldades motoras caracterizadas pela lentidão nos movimentos (bradicinesia), associada a tremor em repouso e rigidez muscular. Até o momento ainda não se sabe o que provoca a degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Diversos mecanismos parecem estar implicados no processo degenerativo, tais como a produção de radicais livres (gerando estresse oxidativo), disfunção na mitocôndria e alteração no sistema de degradação protéica pelo proteassomo, que em alguma etapa do processo acabam reforçando seus efeitos mutuamente (JENNER e OLANOW, 1996).

Estudos *post mortem* demonstram que o aparecimento dos primeiros sintomas só ocorre quando grande parte dos neurônios já degenerou sugerindo que o sistema consegue compensar a perda neuronal até um determinado limiar (ZIGMOND e cols., 1990). Portanto, quanto mais cedo esse limiar for alcançado, mais precocemente aparecerão os sintomas, de modo que, qualquer processo que a qualquer tempo provoque a perda de neurônios dopaminérgicos irá contribuir para encurtar o período pré-clínico da doença.

Parkinsonismo é um termo genérico que designa uma síndrome presente em várias doenças com etiologias diferentes e que têm em comum a presença de alguns sintomas

clássicos da DP. A doença de Parkinson representa uma das formas de parkinsonismo e também é a mais freqüente, correspondendo a cerca de 75% do total.

Ao longo dos últimos anos houve um aumento considerável na oferta de alimentos industrializados enriquecidos com substâncias como vitaminas e sais minerais com o objetivo de melhorar o aspecto nutricional dos alimentos e, com isso, prevenir determinadas doenças, como por exemplo, a anemia ferropriva. Dentre as substâncias adicionadas em diversas formulações alimentares, o ferro é muito usado, principalmente nos alimentos destinados a recém-nascidos (RN). Contudo, em comparação com o leite materno, alguns leites artificiais têm quantidades relativamente altas de ferro em suas formulações (CRESPIN, 1996). Há também situações clínicas em que a suplementação férrica é mandatória, como na prematuridade, em crianças com baixo peso ao nascer e nos casos de desnutrição e/ou anemia materna (CRESPIN, 1996). Por outro lado, sabe-se que o ferro livre é capaz de catalisar reações de oxidação que podem gerar radicais livres citotóxicos e que o acúmulo de ferro no encéfalo tem sido implicado na patogênese da doença de Parkinson (DEXTER et al., 1991). Portanto, é fundamental demonstrar se a exposição a quantidades relativamente altas de ferro durante o período neonatal é segura e se interfere de alguma forma no desenvolvimento do sistema nigroestriatal.

A partir de uma abordagem experimental em ratos (*Rattus norvegicus*), pretende-se investigar se o excesso do íon Fe^{++} aumenta a morte neuronal durante o desenvolvimento pós-natal da substância negra, cujo resultado será importante para a discussão da relação entre exposição neonatal ao ferro e possíveis implicações para o desenvolvimento futuro de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson.

1.1 - OBJETIVOS

1.1.1 - Objetivo Geral:

Testar a hipótese de que a administração de altas concentrações de ferro por via oral durante o período neonatal aumenta a taxa de morte celular na substância negra em um modelo experimental animal.

1.1.2 - Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos do tratamento com sulfato ferroso via oral durante o período neonatal sobre o número de perfis picnóticos;
- Avaliar os efeitos do tratamento sobre o número de neurônios dopaminérgicos na substância negra de ratos;

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – FERRO – ASPECTOS GERAIS:

Grande parte das propriedades do ferro é justificada por ele pertencer ao grupo dos metais de transição, um conjunto de elementos que são considerados como pontes entre os elementos metais e ametais da tabela periódica. Em geral, estes elementos são conhecidos por sua dureza, densidade, pontos de fusão e ebulição altos e condutibilidade alta de calor. Todos estes elementos têm como característica elétrons no orbitais *d*. Pelo fato deste orbital ter geometria complexa e estar sempre mais externo no átomo, seus elétrons estarão mais propícios a interagir com outros átomos (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY WEB PAGE,

2005). Porém, na prática, os elétrons que se combinam com outros elementos não são unicamente do orbital d (camada $n-1$), mas também do orbital s (camada n), uma outra característica dos metais de transição e explica o motivo desses elementos existirem em vários estados oxidativos. Isto influencia profundamente no metabolismo orgânico do ferro.

Outra característica dos metais de transição se refere ao potencial de ionização e eletronegatividade. O potencial de ionização e a eletronegatividade dos metais de transição é crescente da esquerda para a direita (períodos) e de baixo para cima (famílias) na tabela periódica. Quando se compara o segundo potencial de ionização com o terceiro, nota-se uma diferença também crescente nesta ordem: Sc, Ti, V, Fe, Cr, Co, Mn, Ni, Cu, Zn. O Zn tem um potencial de ionização de aproximadamente 22eV, quanto o Sc tem um pouco menos que 12eV. Isso indica que há uma facilidade muito grande de o íon Sc^{2+} se tornar Sc^{3+} em relação a transformação Zn^{2+}/Zn^{3+} . Desta seqüência, o Fe é o quarto com menor terceiro potencial de ionização (diferença de 14,46eV), o que contribui para sua dinâmica em reações de oxidação-redução (ORGEL, 1970).

Uma reação de oxidação-redução é aquela na qual ocorrem variações dos números de oxidação dos átomos de certos elementos, sendo que o número de oxidação é o número que designa a carga real ou aparente de um átomo em função da diferença de eletronegatividade entre ele e seus ligantes (SARDELLA, 1999). Quando dois ou mais compostos reagem entre si, estabelecem-se diferenças de eletronegatividade entre eles, pois há interação entre átomos diferentes e também distintos eletronegativamente. Com isso, surge um processo de transferência de elétrons entre os átomos, que passam dos menos eletronegativos para os mais eletronegativos. Quando um átomo perde elétrons, dizemos que ele sofreu uma oxidação e causou uma redução, e quando um átomo ganha elétrons, ele sofreu uma redução e causou uma oxidação. A oxidação e a redução são conceitos interdependentes: não existe uma oxidação sem uma redução (SARDELLA, 1999).

Sendo o ferro um átomo de eletronegatividade mediana, a transferência de seus elétrons nos orbitais 3p e 4s depende do quão eletronegativo o átomo ao qual se combinar seja. Na eletronegatividade, percebemos que estes elementos são mais eletronegativos (ganham mais elétrons) que os metais das famílias IA e IIA e menos que os ametais. Como a grande maioria dos átomos existentes no corpo são ametais (C, O, N), em destaque o oxigênio, quando entram em reação com o Fe, geralmente retiram elétrons da última camada do ferro, o que explica o motivo do ferro existir geralmente em formas iônicas e, principalmente, na forma férrica (mais oxidada), dado o baixo nível do terceiro potencial de ionização deste elemento. Entretanto, o hidrogênio é um dos elementos menos eletronegativos da tabela, permitindo que ceda elétrons aos átomos mais eletronegativos e seja um dos principais agente redutores da natureza. É por isso que o meio ácido (rico em H^+) propicia a transformação de Fe^{3+} a Fe^{2+} (SARDELLA, 1999).

Sabe-se também que íons de metal de transição com carga maior que 3+ não podem existir em meio aquoso, pois quanto menos elétrons existirem na última camada, mais eletronegativo o íon se torna, podendo levar até a sua reação com a água e conseqüente formação de óxidos metálicos. Isso justifica a dificuldade da forma férrica se solubilizar em água ($K_{sp} = 10^{-39}M$ e em pH 7,0, $[Fe^{3+}] = 10^{-18}$) (CRICHTON e PIERRE, 2001).

2.2 - METABOLISMO DO FERRO

Didaticamente, podemos dividir a absorção do ferro em dois momentos: a captação, onde o ferro passa da luz intestinal para dentro dos enterócitos através da membrana apical, e a transferência (ou exportação/efluxo), que consiste na passagem dos íons intracelulares para o plasma através da membrana basolateral.

2.2.1 – Absorção de Ferro no Indivíduo Adulto:

Em adultos, o ferro é absorvido pelo intestino delgado no jejuno e, principalmente, no nível do duodeno, através dos enterócitos, que são formados nas criptas de Lieberkühn, onde posteriormente migram para as vilosidades intestinais (CONRAD e cols., 2000). Para ser absorvido plenamente, este ferro disponível entra por 3 processos, que constituem na captação dos átomos para dentro das células intestinais, o transporte intracelular e a saída do ferro para o plasma pela membrana basolateral enterocítica.

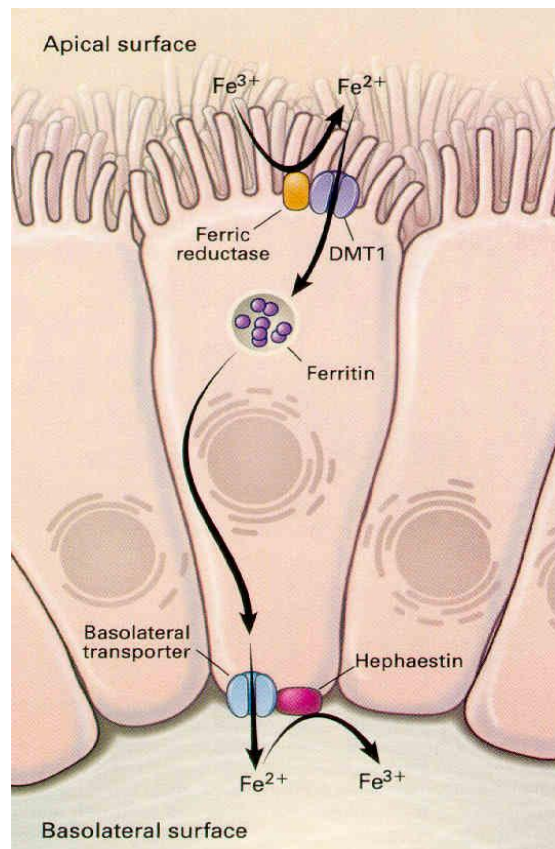


FIGURA 1 - Absorção do ferro nos enterócitos (ANDREWS, 1999).

A ferritina é uma proteína grande composta por 24 subunidades pesadas e leves que se associam para se ligar a, aproximadamente, 2300 átomos de ferro. Duas subunidades, em especial, parecem ter diferentes funções no metabolismo do ferro. A ferritina H está relacionada com a utilização do ferro, enquanto a ferritina L é mais relativa à função de

armazenamento celular (LEVENSON e TASSABEHJI, 2004). Isto se torna relevante porque a razão de ferritina H:L avalia o padrão de utilização e armazenamento da célula. Em tecidos como o fígado e o baço, há uma predominância da fração L sobre a H, por suas funções clássicas de depósito, enquanto que em órgãos onde há demanda maior de ferro em seus metabolismos (como o encéfalo e o coração), a razão H:L se torna mais alta (LEVENSON e TASSABEHJI, 2004).

Pelo seu papel na utilização e depósito de ferro, as concentrações de ferritina são mais altas no citosol e nos lisossomos, onde é degradada. Ainda há uma forma mitocondrial de ferritina (MtF), que faz quelação de ferro e tem atividade de ferroxidase, protegendo a mitocôndria da oxidação e de injúria (CORSI e cols., 2002, apud LEVENSON e TASSABEHJI, 2004).

Os organismos mamíferos são incapazes de controlar a excreção do excesso de ferro absorvido, logo todo controle deve ser feito no sentido de regular sua absorção, assim como o transporte de ferro do enterócito para o plasma (ANDREWS, 1999). Os mecanismos que regulam a absorção do ferro ainda estão sendo estudados, mas se entende que quando as células da cripta se tornam enterócitos absorptivos, eles estão programados para agirem de acordo com 3 vias reguladoras hipotéticas: a regulação de ingesta, regulação de depósito e a regulação eritropoiética, para assim modularem a entrada de ferro nas vilosidades, baseadas em uma espécie de “set point” das concentrações do metal (ANDREWS, 1999). Demonstrou-se que esta programação depende das concentrações de ferro no interior das células da cripta (ROY e ENNS, 2000). Contudo, ainda são muito incertos os fatores responsáveis pela programação das células da cripta.

A regulação de ingesta é modulada pela quantidade de ferro consumido recentemente na dieta. Foi visto que, quando ferro é administrado em grandes quantidades por via oral, os

enterócitos se tornam resistentes à entrada do íon, no que se chamou de “bloqueio da mucosa”, explicado provavelmente pela concentração de ferro nestes enterócitos terem ultrapassado o “set point” programado (ANDREWS, 1999).

A outra via hipotetizada é a da regulação de depósito, e se baseia nas concentrações de ferro de todos depósitos do organismo (fígado, tecido muscular esquelético e sangue), ao invés de somente na quantidade de ingesta, como a primeira. Quando os níveis férricos nestes depósitos estão abaixo de um nível crítico (“set point”), alguns mecanismos são acionados e aumentam a captação de ferro até as reservas alcançarem seus níveis basais (ROY e ENNS, 2000). Sua ação ocorre provavelmente através da reprogramação das células precursoras dos enterócitos, situadas nas criptas de Lieberkühn (ANDREWS, 1999), talvez modificando seu perfil de proteínas responsáveis pela absorção ou regulando a velocidade da diferenciação destas células. Experimentos em animais sugerem que mudanças nos depósitos corporais de ferro alteram os níveis do transportador DMT1 (ANDREWS, 1999).

O último mecanismo, a regulação eritropoiética, não está relacionado com os níveis de ferro diretamente. Ao invés, é modulado pela eritropoiese da medula óssea, que requer um certo nível de ferro para produzir eritrócitos fisiologicamente normais (ANDREWS, 1999). Esta via tem uma grande capacidade de aumentar a captação do íon, onde indivíduos anêmicos podem absorver entre 20 a 40 mg de ferro por dia, proporções estas muito maiores que as alcançadas na regulação de depósito (ROY e ENNS, 2000). É provável que exista uma sinalização entre a medula óssea e os enterócitos (ANDREWS, 1999; ROY e ENNS, 2000).

Em geral, todos estes mecanismos atuam em diferentes níveis de controle, mas têm o objetivo comum de impedir as condições patológicas de deficiência e excesso do ferro no organismo. Com isso, a homeostase do ferro é mantida rigorosamente em animais adultos;

porém, esta regulação dos organismos no período gestacional e neonatal não segue a mesma lógica.

O transporte do ferro no sangue é feito a partir da transferrina (Tf), uma glicoproteína de aproximadamente 80 kDa que se liga a 2 átomos de Fe^{3+} com alta afinidade ($K_d \sim 10^{-23}$ M) de maneira reversível. Faz parte de uma família de glicoproteínas associadas ao ferro, que incluem lactoferrina, melanoferrina e ovoferrina (MOOS e MORGAN, 2000). Sua síntese acontece principalmente no fígado, porém pode ocorrer também no cérebro (BLOCH e cols., 1985; DZIEGIELWSKA e cols., 1984; DICKSON e cols., 1985, apud MOOS e MORGAN, 2000), testículos (SKINNER e GRISWOLD, 1980, apud MOOS e MORGAN, 2000) e glândulas mamárias (JORDAN e MORGAN, 1969, apud MOOS e MORGAN, 2000) em formas similares. A Tf pode existir em 3 formas no soro: (1) forma livre de ferro, chamada apotransferrina (apo-Tf), com um íon Fe (monoférrica) e dois íons (diférrica) (MOOS e MORGAN, 2000). O ferro ao qual se liga não provém somente da dieta, mas também da degradação da hemoglobina oriunda de fagócitos de eritrócitos velhos (WESSLING-RESNICK, 2000).

A Tf possui 2 domínios de tamanhos equivalentes. Cada domínio contém um sítio específico para o ferro. A afinidade do ferro à transferrina varia com o pH do meio: quando o pH está em 7,4, a ligação se torna quase irreversível; contudo, em pH abaixo de 6,5, a afinidade reduz e o íon é liberado da proteína (MOOS e MORGAN, 2000).

A transferrina leva o ferro aos reticulócitos, hepatócitos e outros tipos celulares que possuam o receptor de transferrina (TfR), uma glicoproteína transmembrana com 2 subunidades de 90 kDa ligadas por pontes dissulfeto, e cada unidade é capaz de se ligar a uma molécula de Tf (MOOS e MORGAN, 2000). No encéfalo, há presença de TfR em todas os tipos celulares, notando-se o fato de a inativação do gene codificador da TfR provocar

diminuição do desenvolvimento do sistema hematopoiético e nervoso (KATABAWA e cols., 1999, apud EISENSTEIN, 2000).

Para entrar na célula-alvo, o ferro ligado a transferrina usa o seguinte mecanismo: no pH neutro do meio extracelular, a Tf diférrica se liga ao TfR na membrana celular. Este complexo Tf-TfR é endocitado para dentro do citoplasma por ação de invaginações mediadas por clatrininas. Além do complexo Tf-TfR, existe nesse endossomo uma bomba protônica que transporta H^+ para o meio endossomal e um transportador do tipo DMT1. O aporte de H^+ para dentro do endossomo faz com que o pH caia a 5,5-6,5 e a afinidade entre Tf e íons férricos diminua, sendo os últimos liberados. Com isso, o DMT1 transporta estes íons para o citoplasma da célula. O endossomo volta à superfície da célula, e o então complexo apo-Tf-TfR se desfaz, permitindo que tanto a apotransferrina quanto o receptor de transferrina possam ser reutilizados por outros íons Fe^{3+} (EISENSTEIN, 2000; ANDREWS, 1999).

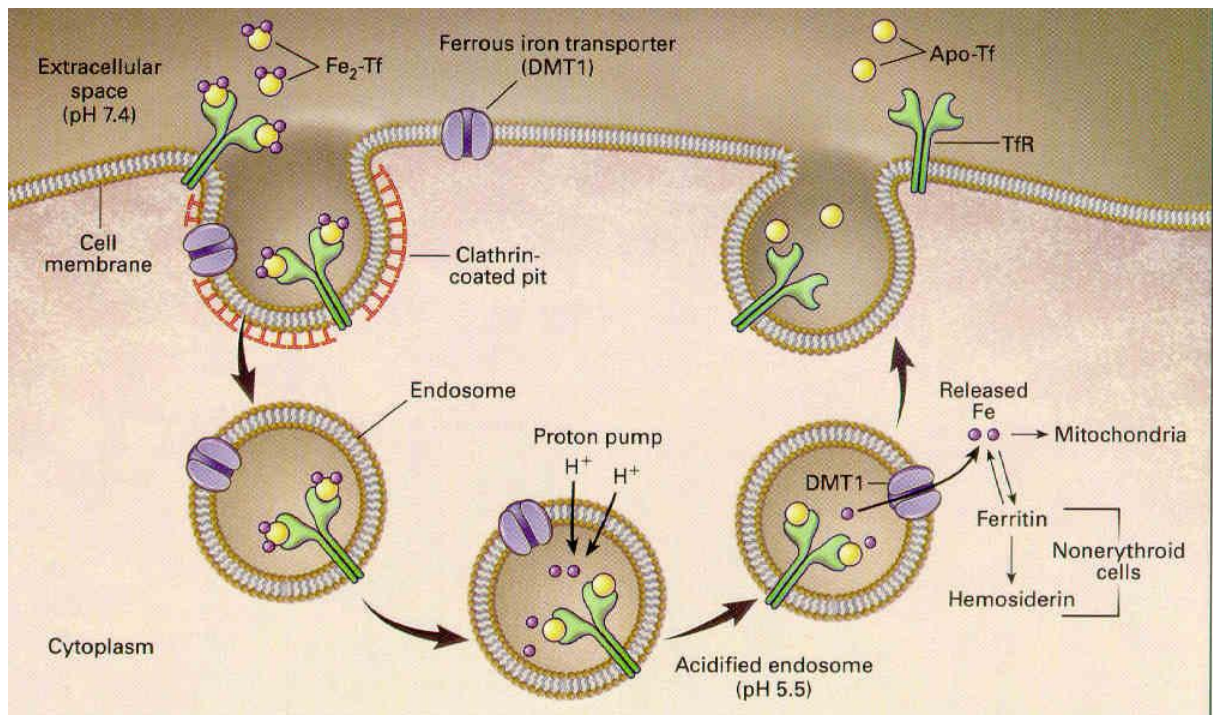


FIGURA 2 - Transporte e entrada nas células de ferro ligado à transferrina (ANDREWS, 1999).

Existem outras prováveis vias de transporte de ferro independente de transferrina, que seriam feitas por proteínas de sua família, já supracitadas. Contudo, consistem em exceções (WESSLING-RESNICK, 2000).

2.2.2 – Absorção do Ferro no Indivíduo em Desenvolvimento:

Existe uma relação muito próxima entre o grau de maturação e as funções absorptivas do intestino. Com isso, não existe um padrão único de absorção, mas sim padrões específicos ligados ao período do desenvolvimento. Estas mudanças podem ser específicas (quanto ao transporte de um soluto ou vários similares a esse) ou inespecíficas, onde as mudanças afetam o transporte de várias substâncias diferentes. Quanto ao ferro, os dois tipos são importantes (PÁCHA, 2000).

Nas mudanças inespecíficas, dois fatores são preponderantes: (1) verificou-se que o desenvolvimento pós-natal dos enterócitos estava relacionado com a amplificação da superfície de microvilosidades, influenciada pelo rápido crescimento da mucosa intestinal e, em espécies altriciais, pela lenta taxa de reposição celular, resultando em um aumento total da superfície de absorção epitelial. A taxa lenta de reposição é devido ao longo tempo de vida dos enterócitos neste período do desenvolvimento, fazendo com que vários fenótipos de enterócitos coexistam na mucosa. Além disso, (2) existem diferenças na distribuição de transportadores no eixo cripta-vilosidade entre o intestino adulto e o imaturo. O transporte de nutrientes na mucosa em desenvolvimento não está localizada somente na parte alta das vilosidades, como no intestino adulto, mas também na parte baixa das vilosidade e nas criptas, o que altera o *status* absorptivo de íons como o ferro (PÁCHA, 2000).

Quanto aos mecanismos específicos de absorção de sais minerais, animais na fase de sucção têm uma alta capacidade de absorção para esses elementos, o que é facilitado pela alta biodisponibilidade do leite materno. Verifica-se que tanto os processos de absorção passivos e mediados por carreadores estão presentes no intestino imaturo, e que já existem transportadores específicos para o ferro. A absorção do ferro aumentada no intestino neonatal mesmo com depósitos repletos foi comprovada, principalmente em ratos (em comparação com cobaias) (NAYLOR e HARRISON, 1995). Segundo Ezekiel (1967, apud KEEN e cols., 1981), até o 14^o dia, ratos neonatos podem absorver até 100% de todo ferro ingerido, taxa que cai para 25% com 30 dias e se torna de 5-10% em animais adultos. Golub e cols. (1996) afirmam que, nos ratos em P12, 78% de ferro é absorvido. Em parte, esta absorção aumentada é devido à absorção ser feita tanto no jejuno quanto no íleo, e pelos fatores inespecíficos já discutidos. O processo de regulação da absorção de ferro nos animais em desenvolvimento ainda está em investigação, porém estas evidências indicam uma forte possibilidade deste metal ser absorvido em níveis muito elevados no período neonatal (PÁCHA, 2000).

2.3 – AS BARREIRAS BIOLÓGICAS, O FERRO E A TRANSFERRINA

No sangue, o ferro pode estar ligado à transferrina, em depósitos independentes de proteínas ou ligado a outras proteínas da família da Tf (p.ex., melanotransferrina), e em sua passagem pelo encéfalo, tem as barreiras como impedimento de sua livre entrada. Por muito tempo, o processo de entrada do ferro no encéfalo foi questionado, e na década de 1980, vários trabalhos abordaram este assunto até que, em 1990, Taylor e Morgan (apud MOOS e MORGAN, 2000) hipotetizaram o transporte de ferro ligado a Tf através de endocitose da célula endotelial e sua posterior liberação no citoplasma da célula, da mesma maneira como ocorria no intestino delgado.

A transferrina também é produzida no encéfalo. Seus níveis são baixos após o nascimento, mas aumentam no processo de desenvolvimento até 10% do que é sintetizada no fígado no adulto (LEVIN e cols., 1984, apud MOOS e MORGAN, 2000). Sua presença foi confirmada em células epiteliais dos plexos coróides, astrócitos e oligodendrócitos, sobretudo nos plexos coróides (ALDRED e cols., 1987, apud MOOS e MORGAN, 2000), onde toma caráter espécie-específico: ratos têm altos níveis de Tf, enquanto camundongos, cães e coelhos possuem taxas menores, e no homem seus níveis são indetectáveis (TU e cols., apud MOOS e MORGAN, 2000); em células gliais, os oligodendrócitos são responsáveis pela maior expressão da Tf em encéfalos de ratos e humanos (LEVIN e cols., apud MOOS e MORGAN, 2000). Além destas células que sintetizam Tf, outras a contêm, como células endoteliais dos capilares encefálicos, neurônios e células ependimárias, provavelmente transportadas dos meios extracelulares e intersticiais e do plasma.

Um fato interessante é o aumento da expressão de melanotransferrina no encéfalo, que se liga às membranas das células endoteliais capilares por uma âncora de glicofosfatidilinositol, permitindo sua ligação ao Fe e mediando sua entrada nestas células (KENNARD e cols., 1995, apud MOOS e MORGAN, 2000). Provavelmente, esta via alternativa de entrada do ferro no encéfalo permite a entrada de íons Fe não-ligados a Tf, os quais aumentam bastante em estados de sobrecarga de ferro. Verificou-se que esta proteína está elevada no plasma de pacientes com doença de Alzheimer (KENNARD e cols., 1995, apud MOOS e MORGAN, 2000).

Quanto à expressão de receptores de Tf, verificou-se que ocorre de maneira heterogênea, em regiões não correlatas com a distribuição de ferro no encéfalo (HILL e cols., 1995, apud MOOS e MORGAN, 2000). Os receptores foram detectados em células endoteliais dos capilares, células epiteliais dos plexos coróides, neurônios, células microgliais amebóides, astrócitos reativos e oligodendrócitos *in vitro* (MOOS e MORGAN, 2000). Esta

expressão varia de acordo com a fase do desenvolvimento: na fase mais rápida do estirão encefálico (em ratos, nos dias P10-20), tem-se a maior expressão de receptores de Tf nas células endoteliais dos capilares e replicação deste mesmo tipo celular (TAYLOR e MORGAN, 1990, apud MOOS e MORGAN, 2000).

Em ratos, percebe-se um padrão bifásico na taxa de transporte de Fe do plasma para o encéfalo: há uma curva linear ascendente até P15 e, após isso, decai a níveis basais em P30 (TAYLOR e MORGAN, 1990, apud MOOS e MORGAN, 2000). Em um modelo de administração de ferro intravenoso em ratos, o transporte de ferro para o encéfalo é significativamente maior em animais de 15 dias do que os valores vistos nos ratos de 63 dias (CROWE e MORGAN, 1992, apud MOOS e MORGAN, 2000).

A necessidade de ferro para o desenvolvimento encefálico é tão importante neste período, que 50-100% de toda geração diária de Tf no rato de 15-21 dias ocorre no encéfalo, para assim permitir o aporte aumentado de Fe (CROWE e MORGAN, 1992, apud MOOS e MORGAN, 2000). Este fato caracteriza bem a situação do animal pós-natal em desenvolvimento, que utiliza de vários mecanismos para otimizar a absorção, transporte e passagem pela BHE do íon Fe, atingindo um bom estirão encefálico. Esta “janela” no metabolismo do ferro dos animais pós-natais pode vir a ser um fator de aumento das taxas de estresse oxidativo e morte celular, com possíveis conseqüências neurodegenerativas, principalmente no binômio “substância negra-doença de Parkinson”.

2.4 - O FERRO “TÓXICO” E O ALEITAMENTO COMO VIA DE INTOXICAÇÃO

2.4.1 – Papel Fisiológico do Ferro e sua Distribuição pelo Corpo em Adultos e Crianças:

Homens adultos hígidos têm normalmente cerca de 3,6 g de ferro corpóreo total, enquanto a mulher adulta eumenorréica tem 2,4 g. Esta diferença provém da constante perda menstrual feminina. No estado balanceado, 1 a 2 mg de ferro entram e deixam o corpo todos os dias. O ferro dietético é absorvido pelos enterócitos duodenais, circula no plasma ligado à transferrina e, em sua maioria, combina-se à hemoglobina nos precursores eritróides e em eritrócitos maduros. Cada eritrócito contém um bilhão de átomos de ferro. Aproximadamente 10 a 15% do metal estão presentes em fibras musculares (mioglobina) e em outros tecidos (na forma de enzimas e citocromos) (ANDREWS, 1999; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

O ferro não é excretado ativamente do organismo pela urina ou nas fezes. É somente perdido nas células que descamam na pele e nas superfícies interiores do corpo – intestinos, trato urinário e vias aéreas, resultando numa perda total média de 14 µg/kg de peso/dia. Em um homem adulto médio, isto significa cerca de 1 mg, enquanto que numa mulher amenorréica de 55 kg seja estimado em 0,8 mg/dia (FAO/WHO, 2002).

A distribuição do ferro na criança é um evento à parte, por suas particularidades. O recém-nascido (RN) a termo tem aproximadamente 250-300 mg de ferro (75 mg/kg de peso). Nos 2 primeiros meses, a concentração de hemoglobina se reduz pela aumentada oferta de oxigênio no ar atmosférico comparada a do transporte intrauterino, levando a uma considerável redistribuição de ferro dos eritrócitos catabolisados para as reservas de ferro. Este novo aporte do metal cobrirá as necessidades do RN durante os primeiros 4-6 meses de vida, explicando assim porque somente o leite materno pode suprir suficientemente a criança neste período. No feto, o último trimestre de gravidez é responsável por grande parte das reservas naturais do RN após nascer, portanto, crianças prematuras e de baixo peso têm

desvantagens em relação aos bebês a termo e com peso adequado para idade gestacional (FAO/WHO, 2002).

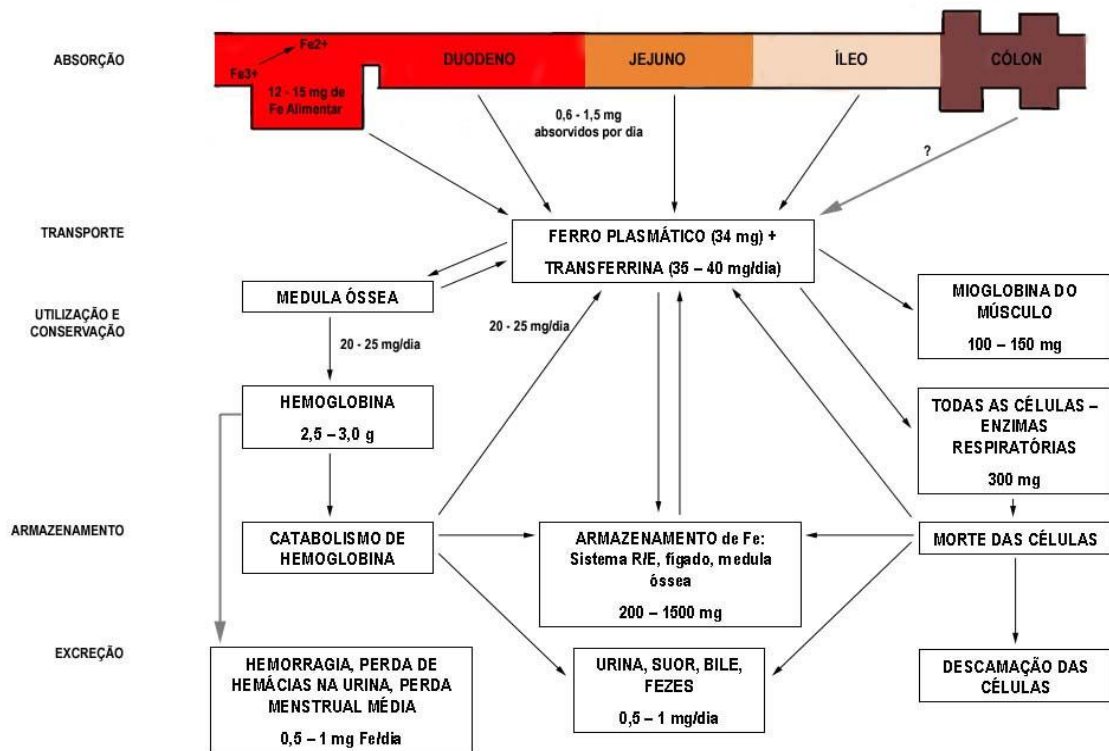


FIGURA 3 - Diagrama esquemático do metabolismo de ferro em adultos. Sistema R/E = sistema retículo-endotelial (Adaptada de MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998)

No primeiro ano de vida, o bebê a termo quase dobra suas reservas totais de ferro e triplica seu peso. A mudança na quantidade de ferro corporal durante este período ocorre principalmente durante os primeiros 6 a 12 meses de vida, e entre 1 a 6 anos, a quantidade de ferro corporal novamente dobra (FAO/WHO, 2002).

No período de desmame (após o 6^o mês), as necessidades de ferro em relação à ingesta calórica são as mais altas de todas as fases da vida, exceto pelo 3^o trimestre da gestação. A criança nesta fase de rápido crescimento não tem reservas de ferro, e seu aporte é totalmente baseado na ingesta da dieta. Por isso, alimentos enriquecidos com ferro, com altas

concentrações e biodisponibilidade, são indicados para a criança nesta fase (FAO/WHO, 2002).

Em prematuros, a ausência do desenvolvimento intrauterino do 3º trimestre da gestação gera alterações típicas dessa condição em relação ao ferro. Esta última fase da gestação é responsável pelo aumento nos níveis de proteínas que se ligam ao ferro, impedindo que ele provoque estresse oxidativo. Portanto, o RN pré-termo possui menos transferrina e ferritina, aumentando as chances de formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, algumas condições podem aumentar o aporte de ferro neste organismo em desenvolvimento (hemólise por doença hemolítica e transfusões sanguíneas). Mesmo assim, ainda não se comprovou a relação direta entre o RN prematuro e maiores taxas de estresse oxidativo (RAO e GEORGIEFF, 2001).

De acordo com os padrões demonstrados de distribuição do metal no organismo, foram especificadas concentrações adequadas para as necessidades humanas de acordo com idade e condições fisiológicas. O “Food and Nutrition Board” estabeleceu, em 1989, as recomendações nutricionais para o ferro que valem até hoje (RDA – *Recommended Dietary Allowances*). O quadro abaixo mostra os valores.

QUADRO 1 – Necessidades nutricionais diárias para crianças de até 24 meses

	0 - 5 m	6 - 8 m			9 - 11 m			12 - 23 m		
	IOM DRI ¹	WHO ²	IOM DRI	FAO/WHO ³	WHO	IOM DRI	FAO/WHO	WHO	IOM/DRI	FAO/WHO
Proteínas (g)	peso (kg) x 2.2	9.1	9.9	ND	9.6	9.9	ND	10.9	13	ND
Vitamina A (µg)	375	350	500	400	350	500	400	400	300	400
Folato (µg)	56	32	80	80	32	80	80	50	150	160
Niacina (mg)	2	4	4	1.5	5	4	4	8	6	6
Ácido Pantotênico (mg)	1.7	1.7	1.8	1.8	1.7	1.8	1.8	1.7	2	2
Riboflavina (mg)	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.5	0.5
Tiamina (mg)	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.5	0.5
Vitamina B6 (mg)	0.1	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.7	0.5	0.5
Vitamina B12 (µg)	0.4	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.9	0.9
Vitamina C (mg)	30	25	50	30	25	50	30	30	15	30
Vitamina D (µg)	5	7	5	5	7	5	5	7	5	5
Vitamina K (µg)	5	10	2.5	10	10	10	2.5	10	30	15
Cálcio (mg)	210	525	270	400	525	270	400	350	500	500
Cloro (mg)	ND	500	ND	ND	500	ND	ND	800	ND	ND
Cobre (mg)	ND	0.3	0.2	ND	0.3	0.2	ND	0.4	0.3	ND
Flúor (µg)	0.01	0.05	0.5	ND	0.05	0.5	ND	0.05	0.7	ND
Iodo (µg)	40	21	130	ND	21	130	90	12	90	90
Ferro (mg)	6	11	11	9.3	11	11	9.3	6	7	5.8
Magnésio (mg)	30	75	75	54	80	75	54	85	80	60
Manganês (mg)	ND	0.02	0.6	ND	0.2	0.6	ND	0.02	1.2	ND
Fósforo (mg)	100	400	275	ND	80	75	54	270	460	ND
Potássio (mg)	ND	700	ND	ND	400	275	ND	800	ND	ND
Selênio (µg)	10	10	20	10	10	20	10	15	20	17
Sódio (mg)	ND	350	ND	ND	320	ND	ND	500	ND	ND
Zinco (mg)	5	2.8	3	4.1	2.8	3	4.1	3	0.7	1.1

Obs: ¹ Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes

² World Health Organization

³ Food and Agriculture Organization / World Health Organization

Fonte: DEWEY e LUTTER, 2003; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998.

2.4.2 – Ferro no Leite e em Fórmulas Lácteas:

a) Leite Humano e de Vaca:

No leite humano, é dito amplamente que as concentrações de ferro são baixas, porém sua biodisponibilidade é alta, compensando o balanço do metal em crianças com aleitamento materno exclusivo. Certa fonte mostra que a concentração de ferro no leite humano é de 0,3 mg/L e sua taxa de absorção de 49% (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998), enquanto uma revisão (DOREA, 2000) mostra que a concentração de ferro no leite humano se mostra altamente variável, e de acordo com trabalhos anteriores abordando esta quantificação, a média da concentração de ferro é de 0,47 mg/L.

Quanto à absorção do ferro no leite humano, o valor de 49% surgiu a partir de um trabalho de 1977, freqüentemente citado (SAARINEN e cols., 1977, apud DOMMELÖF e cols., 2002), enquanto que medidas feitas na década de 1990 evidenciaram uma absorção ainda menor, com valores de 16 a 25% (DAVIDSSON e cols., 1994; ABRAMS e cols., 1997, apud DOMMELÖF e cols., 2002). Fomon e cols. (2000) revisaram vários trabalhos de absorção de ferro em bebês humanos, com taxas de 51,1% (SCHULZ-LELL e cols., 1991, apud FOMON e cols., 2000) e 54% em RN's pequenos para idade gestacional (DAUNCEY e cols., 1978, apud FOMON e cols., 2000).

Em trabalho recente, Dommelöf e cols. (2002) mostraram que a absorção é dependente do tempo de maturação do sistema gastrointestinal, não havendo regulação da entrada de ferro no organismo mesmo em situações de suplementação extra com o metal, onde não existe diferença significativa de absorção entre bebês previamente suplementados com ferro e não-suplementados aos 6 meses de vida, enquanto que, aos 9 meses, as crianças que receberam suplemento férrico absorveram $16,9 \pm 9,3\%$ e as não-suplementadas, $36,7 \pm 18,9\%$.

O leite de vaca, por ser um produto destinado às proles de bovinos, não é um bom recurso para nutrição humana, principalmente na alimentação de RN's e crianças menores que 1 anos de idade. Esta diferença provém de vários elementos dos leites, como proporção entre soro e caseína, concentrações diferentes de taurina e cisteína, formação de coágulos, fontes nutrientes de energia, concentrações de vitaminas e minerais. A quantidade de ferro é semelhante no leite humano e no de vaca, porém a biodisponibilidade no de vaca é menor que 1% (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

b) Fórmulas Lácteas:

Em situações em que a criança não pode ingerir o leite materno, ou pelas mães não desejarem ou não poderem amamentar, utilizam-se as fórmulas artificiais derivadas do leite de vaca ou de soja, que se aproximam da composição do leite humano, e têm a vantagem de poderem ser manipuladas no sentido de regular as concentrações de seus elementos, as fórmulas lácteas.

Quanto à taxa de absorção do ferro na ingesta de fórmulas lácteas, Fomon e cols. (2000) em sua revisão, descreveram significativas variações, indo de valores em 46% para fórmulas com lactoferrina bovina (FAIRWEATHER-TAIT e cols., 1987, apud FOMON e cols., 2000) a 6,7% (SAARINEN e SIIMES, 1977, apud FOMON e cols., 2000). No Brasil, várias destas fórmulas são comercializadas normalmente. De acordo com o Codex Alimentarius, o órgão regulador destas medidas em alimentos, as fórmulas devem respeitar teores mínimos e máximos de nutrientes, além de ser obrigatória a especificação no rótulo do produto que a fórmula é enriquecido com ferro. No caso do ferro, as fórmulas convencionais devem ter no mínimo 0,15 mg/kcal, e as enriquecidas 1 mg/kcal da solução, contudo, os valores máximos não são pré-determinados, não havendo qualquer controle sobre a sobredose do metal (CRESPIN, 1996). O próximo quadro mostra a concentração de ferro nas fórmulas lácteas comercializadas no Brasil:

QUADRO 2 – Concentração de ferro em fórmulas lácteas comercializadas no Brasil

Tipo de Fórmulas Lácteas	mg Fe/100 ml de fórmula	Fabricante
Nan I	0.8	Nestlé
Nan II	1.1	Nestlé
Nestogeno I	0.8	Nestlé
Nestogeno II	1.1	Nestlé
Aptamil 1	0.67	Support
Aptamil 2	1.3	Support
Bebelac I	0.8	Support
Bebelac II	1.2	Support
Enfamil I	1.2	Mead-Johnson
Enfamil II	1.2	Mead-Johnson
Similac Advance I	1.2	Abbott
Pré-Nan	1	Nestlé
Pré-Nan Líquido	1	Nestlé
Enfamil Prematuro	0.15	Mead-Johnson
Enfalac Prematuro	1.5	Mead-Johnson
Enfalac Prem. (Conc.)	1.8	Mead-Johnson
Aptamil Pré	0.9	Support
Nan H.A.	0.8	Nestlé
Nan Sem Lactose	0.4	Nestlé
Nan Soy	0.8	Nestlé
Aptamil Soja 1	0.8	Support
Alsoy	0.8	Nestlé
Prosobee	1.2	Mead-Johnson
Sobee	1.2	Bristol
Isolac	0.72	Nutricia
Cerelac	1.9	Nestlé
Ninho Crescimento	1.2	Nestlé
Alfaré	0.9	Nestlé
Progestimil	1.2	Mead-Johnson
Neocate	1	Support
Pregomin	1.8	Support

Fonte: CRESPI, 1996

c) Outras Fontes:

Como profilaxia ou terapêutica contra a deficiência de ferro em RN's, o uso de sais de ferro é amplamente usado no Brasil e em vários países. A principal droga utilizada é o sulfato ferroso, que possui ~ 20% de ferro elementar em sua fórmula, é bem tolerado em crianças e, pelo baixo custo, é mais usado na clínica da anemia ferropriva. Outros agentes, como o ferriproteinato (5% de ferro elementar), ferro polimaltosado (30%), gluconato ferroso (12%), ferro quelado glicinado (18%), citrato ferroso (12%) e fumarato ferroso (33%) também podem ser usados, com diferenças entre tolerância, taxa de absorção e preço (OLIVEIRA, 2005).

2.4.3 – Considerações sobre o Aleitamento Artificial e o Ferro:

É consenso entre todos os pediatras que o leite materno seja fonte alimentar suficiente para os 6 primeiros meses de vida em RN's, e é também incontestável a campanha atualmente empreendida pela Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) no sentido de conscientizar as atuais e futuras mães de necessidade com aleitamento materno exclusivo.

Contudo, ainda existem muitas mulheres que não seguem este planejamento, seja por motivos médicos (pacientes portadoras de HIV, mães em uso de drogas anti-tireodianas etc.), culturais, sociais ou estéticos. Nestes casos, o aleitamento artificial é a opção natural destas mães (leite de vaca integral ou fórmulas lácteas), que nem sempre podem ter a orientação de um pediatra, médico ou profissional de saúde capacitado nesta área.

Seguindo as recomendações alimentares feitas por Murahovschi (1994) na dieta de crianças abaixo de 6 meses que não possam fazer aleitamento materno exclusivo devem tomar o leite artificial de 3 em 3 (menores de 3 meses) a 4 em 4 horas (até 6 meses), numa quantidade que também varia com a capacidade gástrica da idade (Peso x 25 para menores de 3 meses e Peso x 30 para maiores de 3 meses; valores em ml). No segundo mês de vida, deve ser acrescentado suco de fruta e, aos 4 meses, papa de fruta à dieta diária do neonato.

Usando exemplo, um bebê de 2 meses, de peso 5 kg (de acordo com P50 da idade, NCHS), deveria tomar leite artificial (p. ex., NAN 1) de 3/3 horas (8 vezes/dia), num volume de 125 ml por tomada, resultando em uma ingesta de 1000 ml ao final do dia. De acordo com a tabela acima mostrada, o NAN 1 possui 0,8 mg de ferro por 100 ml de fórmula reconstituída. Neste exemplo, a ingesta de ferro diária proveniente do aleitamento artificial seria de 8 mg, com evidentes 2 mg acima das RDA para a idade (6 mg). Além disso, é recomendada a complementação da dieta com suco de frutas nesta idade, aumentando mais ainda o aporte de ferro para o organismo neonato. Se os cálculos forem feitos para outra

fórmula (p.ex., Ninho Crescimento), a ingesta diária de ferro oriunda do leite sobe para 12 mg, o dobro do recomendado pelas RDA.

Mesmo com o caráter hipotético e informal destas exemplificações, é inegável a possibilidade de que as dietas com aleitamento por fórmulas lácteas enriquecidas com ferro estejam causando excessos dos níveis deste metal em um organismo ainda em desenvolvimento, com uma deficiente regulação de sua absorção pelo sistema digestório, uma barreira hematoencefálica não totalmente funcional e sistemas anti-oxidantes insuficientes, provocando uma suposta morte celular apoptótica em neurônios dopaminérgicos naturalmente propensos ao estresse oxidativo, que no futuro, pode aumentar de modo considerável a predisposição destes indivíduos a doenças neurodegenerativas, como é o caso da doença de Parkinson. Há algum tempo, esta hipótese já é veiculada na literatura, com vários artigos tentando mostrar o vínculo entre a sobrecarga de ferro na infância e o surgimento da doença de Parkinson no futuro, o que embasa mais ainda esta possível via patogênica “silenciosa” da DP, inferindo que várias gerações de seres humanos expostos ao excesso deste metal já podem estar com a homeostasia do sistema nervoso central comprometida para o futuro.

2.5 - MODELOS EXPERIMENTAIS: INTOXICAÇÃO POR FERRO E INDUÇÃO DE APOPTOSE NA SUBSTÂNCIA NEGRA NO PERÍODO NEONATAL

Nos últimos anos, diversas evidências experimentais e epidemiológicas tem mostrado o vínculo entre a patogenia da doença de Parkinson (DP) e fatores ambientais, tais como metais, solventes, monóxido de carbono, as neurotoxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), assim como os agrotóxicos rotenona, maneb e paraquat (UVERSKY, 2004). Dentre as ramificações desta linha de pesquisa, existem modelos que tentam gerar a patologia a partir de lesões tóxicas no sistema

nervoso em desenvolvimento, o que reduziria o número de neurônios dopaminérgicos na SN e assim predispondo ao surgimento da síndrome parkinsoniana no futuro. Além disso, é importante que se compreenda amplamente os padrões e mecanismos de morte neuronal na SN de animais neonatos, tanto por mecanismos fisiológicos quanto por vias patológicas.

2.5.1 – Ferro e Neurodegeneração: Evidências Experimentais

Um possível envolvimento do ferro (Fe) no mecanismo de neurodegeneração da doença de Parkinson começou a ser cogitado a partir das descrições de diversos autores sobre a presença de altas concentrações de Fe na SN de pacientes com doença de Parkinson (DP), especialmente nos casos mais graves (revisto por GÖTZ e cols., 2004). Esse acúmulo de ferro seria um fator predisponente ao estresse oxidativo, visto que o Fe^{2+} reage com H_2O_2 , gerando um íon hidroxila (OH^\cdot) e perigoso radical hidroxila (OH^\cdot), além de Fe^{3+} , sendo também capaz de provocar a liberação de íons ferro de proteínas heme em níveis milimolares (PUPPO e HALLIWELL, 1988; HAREL e cols., 1988, apud HALLIWELL, 2001). Tem sido sugerido que as reações oxidativas catalizadas pelo ferro propiciam a conformação beta-pregueada da α -sinucleína, uma das proteínas componentes dos corpos de Lewy, comumente encontrados na DP (ZECCA e cols., 2004).

Sengstock e cols. (1994) testaram o modelo de infusão estereotáxica de ferro intranigral em ratos de 2 a 3 meses e avaliaram o volume de SN, concentração de marcadores dopaminérgicos no neostriado, como dopamina (DA), ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o teste de comportamento rotacional induzido por apomorfina após 2, 4 e 6 meses. Houve lesão histológica não-progressiva na SN, diminuição dos marcadores dopaminérgicos ao longo dos 6 meses e aumento do comportamento rotacional progressivamente, indicando que o depósito experimental de ferro na SN tem

efeitos seletivos e podem gerar injúrias persistentes e progressivas nos neurônios dopaminérgicos.

Em um dos primeiros trabalhos experimentais com intoxicação por ferro a partir de ingesta oral através de ração enriquecida com altos níveis de ferro carbonil (350 a 20000 ppm) em ratos jovens por 12 semanas, Sobotka e cols. (1996) analisaram massa ponderal, comportamento (atividade motora geral, reflexo de susto, esquiva ativa condicionada) e concentrações de ferro tecidual. O peso dos animais tratados teve uma queda, com déficit comportamental em todos os testes e aumento da quantidade de ferro nas doses mais altas em fígado e encéfalo.

Lan e Jiang (1997) empregaram um modelo de administração de ferro carbonil VO crônico em camundongos jovens por 30 dias, associado a uma injeção intraperitoneal de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) após o tratamento com ferro. Para análise, foi determinada a concentração de ferro no estriado, atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), níveis de glutathiona total e glutathiona oxidada (GSSG), marcadores dopaminérgicos (DA e DOPAC), radical hidroxil (OH[·]) e de peroxidação lipídica. Além do nível de ferro no estriado estar significativamente aumentado nos tratados (com e sem MPTP), houve aumento na GSSG e na concentração de OH[·] tanto no estriado quanto no tronco encefálico (incluindo SN) e redução dos níveis de DA e DOPAC no tronco encefálico. A administração de MPTP nos tratados provocou redução adicional nos níveis de DA e DOPAC, inclusive no estriado, e aumento significativo dos índices de peroxidação lipídica. Isto indica que, o ferro *per se* apenas induz o estresse oxidativo, mas não causa diretamente lesão neuronal, sendo necessário outro agente tóxico (como o MPTP) para promover a morte celular.

2.5.2 – Ferro e Neurodegeneração: Exposição Durante o Período Neonatal

Uma via mais fisiológica de exposição ao ferro é a via oral. Vários trabalhos revistos abaixo utilizaram essa via de administração e o fizeram durante o período neonatal. A idéia de se induzir a exposição ao ferro durante o período neonatal justifica-se no fato de que o transporte de ferro para o encéfalo ocorre durante os primeiros anos de vida, período no qual há a maior taxa de crescimento encefálico (DWORK, 1995). Devido às concentrações elevadas de ferro em formulações de leite enriquecido (cerca de até 100 vezes a do leite materno), infantes que fazem uso desse tipo de leite ingerem uma quantidade elevada de ferro, em período de grande captação pelo encéfalo, com possíveis efeitos deletérios tardios que merecem ser melhor estudados. Para reproduzir esse padrão de exposição ao ferro em modelos experimentais que utilizam roedores, a administração é realizada nas 3 primeiras semanas de vida pós-natal, período que coincide com a fase de maior crescimento encefálico nesses animais.

Dal-Pizzol e cols. (2001), seguindo um modelo de intoxicação por via oral, usaram ratos neonatos para administrar succinato ferroso entre os dias P10 e P12 e analisar os mesmos animais já na fase adulta (com 3 meses), através de medidas de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e oxidação protéica) e atividade anti-oxidante da CAT e superóxido dismutase (SOD). A peroxidação lipídica aumentou na SN e diminuiu no estriado e a atividade da SOD teve decréscimo na SN, indicando a ação lesiva da sobrecarga de ferro na SN, além de uma falha no sistema anti-oxidante pela SOD.

Em protocolo de tratamento semelhante ao do trabalho acima, Schröder e cols. (2001) intoxicaram os ratos nos dias P10 a P12 com várias doses de ferro e realizaram testes comportamentais e de aprendizagem com 3 meses de idade. No teste do campo aberto, houve déficit apenas nos tratados com 30 mg Fe/kg; o labirinto radial demonstrou aprendizado

diminuído em todos os grupos tratados com ferro (de 2,5 a 30 mg/kg); na esquiiva inibitória, a retenção do condicionamento foi bloqueada nos tratados com 7,5 e 22,5 mg Fe/kg nos animais não-adaptados à câmara de teste. Estes resultados indicam que os animais já têm perdas comportamentais importantes (principalmente em comportamentos essenciais para um roedor, como a exploração espacial) no uso de ferro neonatal, mesmo que por períodos curtos. Além disso, foi realizada medida das concentrações do metal na SN, com aumentos significantes a partir das doses de 7,5 mg/kg.

O mesmo grupo publicou 2 trabalhos em 2005, ampliando os dados relativos à interferência do ferro no período neonatal em ratos. O primeiro artigo (DE LIMA e cols., 2005a) testou o efeito da dose de 10 mg Fe/kg em vários períodos de tratamento (P5-7, P12-14, P19-21 e P30-32), medindo a atividade de estresse oxidativo e anti-oxidante em SN, hipocampo, córtex e estriado, e a memória de reconhecimento, que avalia o nível de retenção da informação dos animais. É interessante como alguns trabalhos comparam a avaliação da memória de reconhecimento em animais com testes usados em humanos para diagnose de síndromes amnésicas, como o Mini-Mental Test (REED E SQUIRE, 1997; DIX E AGGLETON, 1999, apud DE LIMA e cols., 2005b). Houve aumento do estresse oxidativo em todas as regiões analisadas, sobretudo nos grupos tratados nos dias P5-7 e P12-14 (com destaque no último), e a atividade antioxidante foi também mais intensa nos 2 grupos supracitados, principalmente na SN (onde houve aumento tanto da catalase quanto da superóxido dismutase). A única exceção do experimento foi o estriado, onde se percebeu que o tratamento com ferro reduziu o estresse oxidativo e a atividade anti-oxidante. Hipotetiza-se que a degeneração da via nigro-estriatal com o ferro cause uma espécie de “disjunção” entre a SN e o estriado, poupando este último das ações deletérias oxidantes do metabolismo da dopamina. No teste de retenção de memória, foi visto que as alterações ocorreram principalmente na memória de longo prazo, e de modo mais significativo nos tratados em P5-

7, P12-14 e P19-21, sendo que o único grupo que mostrou bloqueio completo na capacidade de retenção foi o tratado em P12-14, provavelmente o período mais suscetível à intoxicação com ferro.

No segundo artigo (DE LIMA e cols, 2005b), que usou a mesma dose de ferro do primeiro entre P12-14, foi testado o efeito da selegilina, inibidor da monoamina-oxidase com propriedades neuroprotetoras, sobre as alterações da memória de reconhecimento já descritas acima provocadas pelo ferro. O uso de selegilina conseguiu evitar a perda da memória de longo prazo em todos os grupos testados, de modo que só houve déficit na retenção de memória no grupo tratado com ferro sem uso de selegilina. Os resultados conseguidos nestes 2 trabalhos consolidam mais ainda a ação que a disfunção da via nigro-estriatal no período neonatal pode ter sobre as funções cognitivas do encéfalo (como a memória) na fase adulta da vida, e não restritas apenas à SN, mas também afetando estruturas como o hipocampo e o córtex. Além disso, colocam o ferro como um relevante fator de neurotoxicidade, inclusive passível de reversão, no caso do uso da selegilina.

Em artigo publicado este ano, Kaur e cols. (2006) utilizaram várias ferramentas bioquímicas e morfológicas para investigar, em várias fases da vida, a interferência do uso de ferro em doses similares às das fórmulas lácteas no período neonatal, associado ao MPTP IP dias antes do sacrifício, algo ainda não descrito na literatura. Na medida da concentração de ferro tanto pela espectrofotometria quanto por ressonância magnética, há aumento dos depósitos de ferro na SN aos 2 meses de idade, assim como aumento na proteína carbonil nos animais de 12 meses. Houve queda nas taxas de dopamina estriatal nos tratados somente com ferro quando analisados aos 12, 16 e 24 meses, e nos grupos Fe-MPTP com diferenças significativas aos 16 e 24 meses. Na análise do número de células TH-positivas, o tratamento somente com ferro provocou redução celular nos animais avaliados com 24 meses, e no grupo Fe-MPTP aos 16 e 24 meses de vida. Todos os achados analisados contribuem para a

caracterização do ferro como possível fator de risco para as patologias da via nigroestriatal, principalmente quando associadas a outros agentes neurotóxicos (como o MPTP).

2.5.3 – Apoptose na SN no Período Neonatal:

A apoptose, também chamada de morte celular “programada”, consiste em um processo caracterizado pela desintegração do núcleo em partículas chamadas “corpos cromatóides”, preservando as estruturas citoplasmáticas até a fagocitose pelas células do sistema retículo-endotelial, sem a reação inflamatória própria da necrose. Desde Hamburger e Levi-Montalcini (1949, apud JANEK e BURKE, 1993), quando este fenômeno foi pioneiramente estudado, além da contribuição de Kerr em 1972, quando cunhou o nome “apoptose”, muito vem se pesquisando sobre esse tema, principalmente com relação a seus mecanismos moleculares e peculiaridades nos diversos tecidos orgânicos.

Janec e Burke (1993), ao analisar o padrão de desenvolvimento dos neurônios dopaminérgicos na SN de ratos neonatos a partir de padrões apoptóticos, perceberam que tais células supostamente apoptóticas eram muito numerosas no segundo dia pós-natal (P2), declinavam progressivamente em número até o décimo segundo dia pós-natal (P12), e em P14 havia um novo pico de padrões apoptóticos, os quais diminuía rapidamente até P28. Este resultado mostra que, naturalmente, a apoptose dopaminérgica na SN ocorre com grande velocidade nos primeiros dias após o parto, reduzindo suas taxas com o tempo, e aumentando novamente no início do período pós-natal tardio, sem um motivo evidente, talvez por competição entre neurônios da SN para fazerem sinapse com o estriado, resultando em apoptose dos menos aptos.

Vários trabalhos posteriores trouxeram mais contribuições sobre este assunto, principalmente o de Tinmarlar e Burke (1996), com a mesma metodologia do estudo citado acima e usando imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH), analisaram os padrões apoptóticos desde a gestação até o final do período pós-natal, e viram as células TH-positivas (neurônios dopaminérgicos) com padrões apoptóticos fazendo picos no dia embrionário 20 (E20), em P2 e em P14, em concordância com o trabalho anterior.

Estes trabalhos, além de estabelecer protocolos para estudo da SN neonatal e métodos de análise morfológica para os padrões apoptóticos, evidenciam também uma “janela” temporal natural em relação ao mecanismo de apoptose na SN, nos dias pós-natais 2 e 14. Questiona-se se, nestes dias, há uma maior suscetibilidade por parte da SN em sofrer acréscimos nas taxas de apoptose se alguma agressão externa ocorrer concomitantemente, com perdas celulares além das previstas pelo processo natural e possíveis repercussões patológicas para o indivíduo no futuro.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS:

Ratas grávidas da linhagem Lewis foram obtidas do Biotério do Centro de Ciências Biológicas (UFPA, Belém, Pará). As gaiolas das gestantes foram inspecionadas na tarde de cada dia. Após o nascimento, cada ninhada foi ajustada para conter prole de ambos os sexos em proporção equivalente. Este dia foi definido como dia pós-natal 1 (P1). Cada filhote foi mantido com sua respectiva mãe em gaiola de plástico com forro de serragem, numa sala com temperatura ambiente e ciclo dia/noite de 12/12 horas. Na fase do tratamento, receberam dieta por amamentação.

3.2 – TRATAMENTO COM FERRO:

No primeiro dia de vida e até P14, os filhotes foram separados em 6 grupos, de acordo com o tratamento recebido por via oral e o período de sobrevivência, como mostrado no quadro 3.

O tratamento com ferro consistiu em 30 mg de ferro elementar/kg de peso corporal (na forma de sulfato ferroso), via oral com o auxílio de uma pipeta. A solução de sulfato ferroso (Ferro Sulfato OSO Heptahidratado, NUCLEAR; osmolaridade 364 mmol/kg; pH 3,4) foi preparada com solução glicosada a 5%, na concentração inicial de 0,015 g/ml, em um volume de 10 ml/kg de peso. Posteriormente, para menor estresse dos neonatos, o volume da dose foi reduzido à metade (5ml/kg) e a concentração dobrada (0,03 g/ml). Os animais foram sacrificados um dia após término do tratamento.

QUADRO 3 – Distribuição dos grupos

Grupo	Tratamento	Número	Período	Sacrifício
CtP1-14	Solução glicosada 5% VO	5	P1 a P14	P15
FeP1-14	Sulfato de ferro VO	5	P1 a P14	P15
CtP1-7	Solução glicosada 5% VO	5	P1 a P7	P8
FeP1-7	Sulfato de ferro VO	4	P1 a P7	P8
CtP8-14	Solução glicosada 5% VO	5	P8 a P14	P15
FeP8-14	Sulfato de ferro VO	5	P8 a P14	P15

Neste período, a barreira hematoencefálica ainda não está desenvolvida, e o ferro pode passar para os tecidos encefálicos (MOOS e MORGAN, 2000). Não houve alterações nas quantidades absolutas de ferro elementar no decorrer do tratamento.

3.3 - COLETA DE MATERIAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO:

Os animais tratados e controle foram profundamente anestesiados com mistura de cetamina e xilazina em proporção de 3:1 por via SC. Foi feita abertura da caixa torácica para exposição do coração. Em seguida, foi feita a perfusão intracardíaca do animal com volume médio de 100 ml de solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1M por 3 minutos. Em seguida, o animal foi perfundido com solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,4 por 10 minutos (volume médio de ~ 100ml). Terminada a perfusão, foi realizada a craniotomia e o cérebro foi coletado e transferido para solução crioprotetora a 30% (15 gramas de sacarose em 50ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) por um tempo variável (tempo

médio 18,9 dias \pm 9,46). Após a crioproteção, o pólo frontal do encéfalo foi armazenado para mensuração das taxas teciduais de ferro, sendo o restante congelado rapidamente em meio de corte e cortado em secções de 40 μ m de espessura utilizando-se um criostato, no nível da substância negra (em sentido caudo-rostral, do início do colículo inferior até início do núcleo subtalâmico); as secções foram coletadas inicialmente em série única, de 2 em 2 cortes, montadas imediatamente em lâminas e armazenadas em freezer a 20°C negativos.

As séries foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica pela tirosina hidroxilase (TH), para marcação dos neurônios dopaminérgicos. As lâminas foram incubadas *overnight*, dentro de câmara úmida, em solução contendo anticorpo primário anti-TH feito em camundongos (Sigma®) diluído em PBS a 1:1000, soro normal de jumento, Triton 10% e PBS. Após esta etapa, os cortes foram lavados em PBS e em seguida incubados em solução de anticorpo secundário anti-camundongo feito em jumento (JacksonImmunoResearch®) diluído em PBS a 1:200, Triton 10% e PBS, durante um período variável (inicialmente 2 horas, posteriormente ~ 6 horas). Após nova lavagem em PBS, foi feita incubação em solução ABC (Vector®) a 1:100 + PBS por período variável (tempo inicial de 30 minutos, substituído por tempo de ~ 20 horas), seguida de reação em diaminobenzidina (DAB) na presença de H₂O₂, que são cromógenos reveladores da marcação imunohistoquímica específica, por 10 minutos. Após a reação, os cortes foram contracorados pelo método de Nissl. Por fim, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico dotado de sistema de captura de imagem.

Outro experimento com 3 grupos de animais tratados e controle foram testados (2 grupos tratados de P8-14 e P1-14 e um controle de P1-14). A metodologia destes dois grupos adicionais se diferencia do resto. Nestes animais, após terem sido cortados, cada encéfalo foi coletado em 4 séries de 8 secções. A imunohistoquímica foi feita no método *free floating*, diferente das outras secções realizadas na própria lâmina.

3.4 - ANÁLISE MORFOLÓGICA QUANTITATIVA:

Para análise dos padrões picnóticos na SN, utilizamos o critério descrito por Macaya e cols. (1994) e Marti e cols. (1997): (1) dois ou mais corpos cromatóides intensamente basofílicos, arredondados e distintos definidos pela coloração de Nissl e (2) presença de um citoplasma picnótico discernível.

Previamente, as lâminas foram observadas em objetiva de 2x para escolha das secções que realmente apresentavam a SN (aproximadamente 7 secções/animal). Em seguida, foi feita busca por varredura metódica de toda SNpc, em ambos os lados, com objetiva de 40x para localização e contagem dos padrões picnóticos. A varredura foi feita no sentido ventral-dorsal e medial-lateral, com ajuda de gradícula (ver Fig. 4).

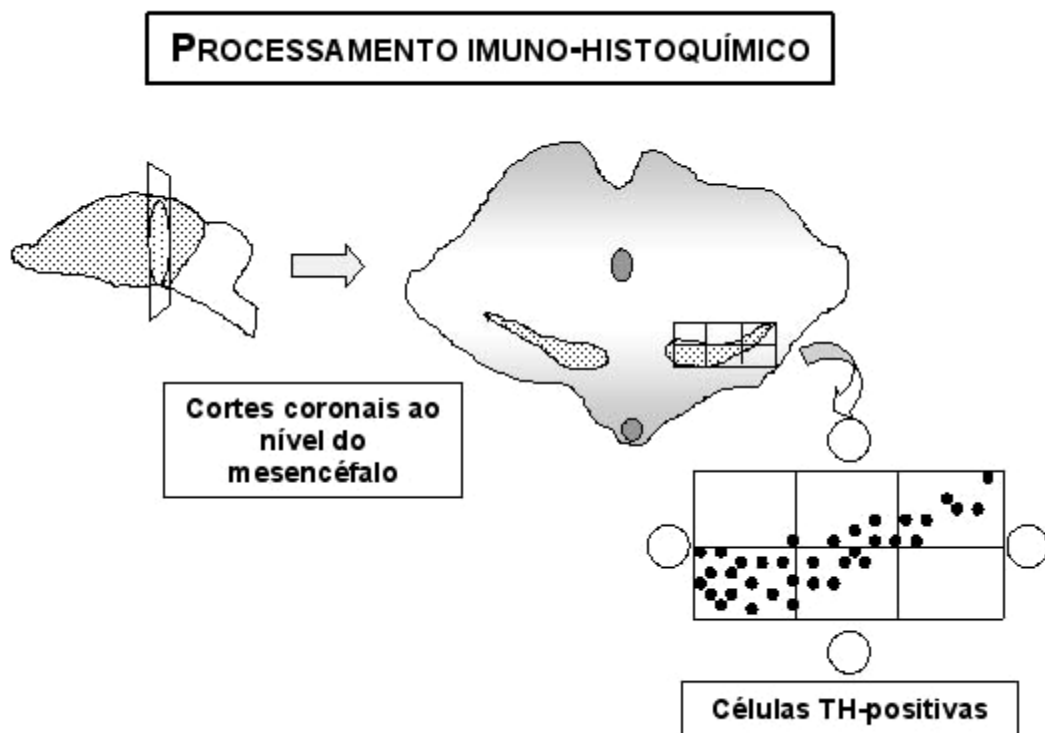


FIGURA 4 - Processamento Imuno-Histoquímico e Método de Análise

No decorrer da análise, percebeu-se que muitos dos padrões picnóticos vistos nas lâminas não preenchiam exatamente os 2 critérios supracitados ou então tinham aspecto menos característico. Foi decidido que tais padrões seriam também contabilizados sob o título de “atípicos”, enquanto os que estavam conforme os critérios foram analisados como “típicos”. Em outra análise, somou-se os padrões típicos e atípicos e nomeou-se de “total”.

Como variáveis da análise, usamos (1) a média de padrões picnóticos encontrados ao longo de toda SN de um hemisfério e (2) o número total de padrões picnóticos encontrados nas secções centrais da SN de um hemisfério.

3.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Para comparação entre grupos tratados e controle, utilizou-se o teste T. Na análise entre os diferentes períodos de tratamento, foi feita a Análise de Variância (ANOVA), com teste de Bonferroni para conclusão das diferenças significativas. Em ambos, a significância estatística ocorreu em $p < 0,05$, na curva bicaudal. As barras verticais nos gráficos indicam o erro padrão da média.

4 - RESULTADOS

4.1 – ANÁLISE DOS PESOS:

Na comparação dos pesos entre animais tratados e controle, o peso médio dos animais tratados dos grupos P1-7 e P1-14 foi significativamente menor do que seus respectivos controles em alguns dias. Não houve diferenças de peso médio entre o grupo tratado de P8-14 e seu controle. No grupo P1-7, o peso dos animais tratados com ferro elementar foi significativamente menor nos dias P3, P4, P5, P6 e P7. No grupo P1-14, os animais tratados tiveram peso significativamente menor nos dias P6, P7, P13 e P14 (Fig. 5):

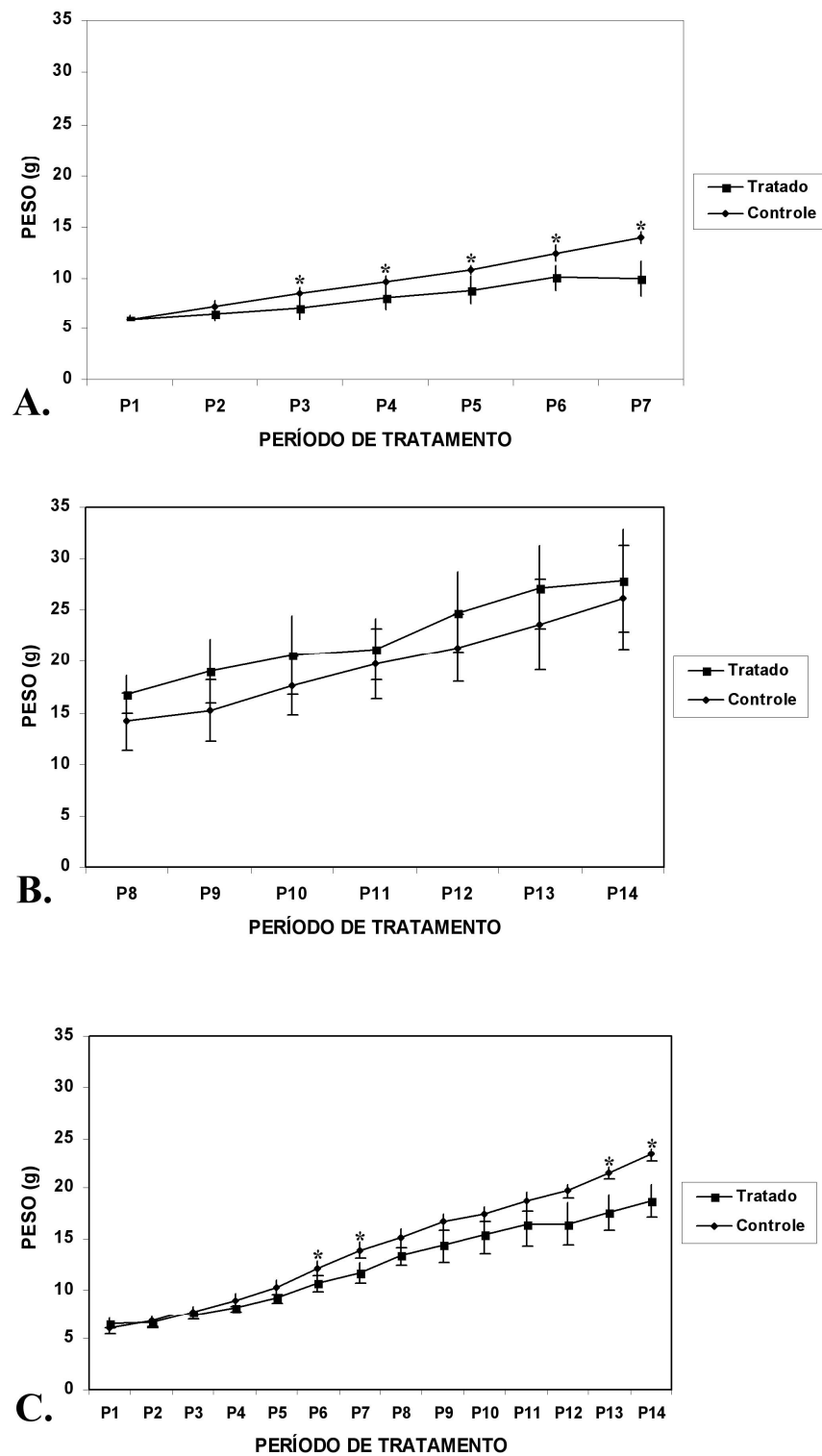


FIGURA 5 - Comparação entre o peso médio de animais tratados e controle nos diferentes dias de tratamento. A: período de P1-7. B: período de P8-14. C: período de 1-14. * - $p < 0,05$. Teste T.

4.2 – ANÁLISE MORFOLÓGICA QUANTITATIVA:

A análise quantitativa dos padrões picnóticos na substância negra (Fig. 6) foi separada em: (1) análise da média de padrões por hemisfério e (2) número total de padrões picnóticos nas secções medianas por hemisfério.

4.2.1 - Média de Padrões Picnóticos:

A média de padrões picnóticos na SN foi significativamente maior nos animais tratados com ferro em comparação aos controles no grupo tratado no período de P1 a P7, tanto em relação aos padrões típicos, atípicos e na média total ($p \leq 0,01$). Não se observou diferença nos outros grupos (Fig. 7).

Na comparação do efeito do ferro entre os períodos de tratamento, os grupos expostos tiveram significativamente maior número de padrões picnóticos (padrões típicos, atípicos e total) no período de P1-7 em relação aos outros dois grupos expostos de P1-14 e P8-14 ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos tratados de P1-14 e P8-14. Quanto aos grupos controles, o grupo P1-7 teve maior número de padrões típicos, enquanto que o grupo P1-14 teve menor número de padrões atípicos e total, em relação aos outros grupos de tratamento (Fig. 8).

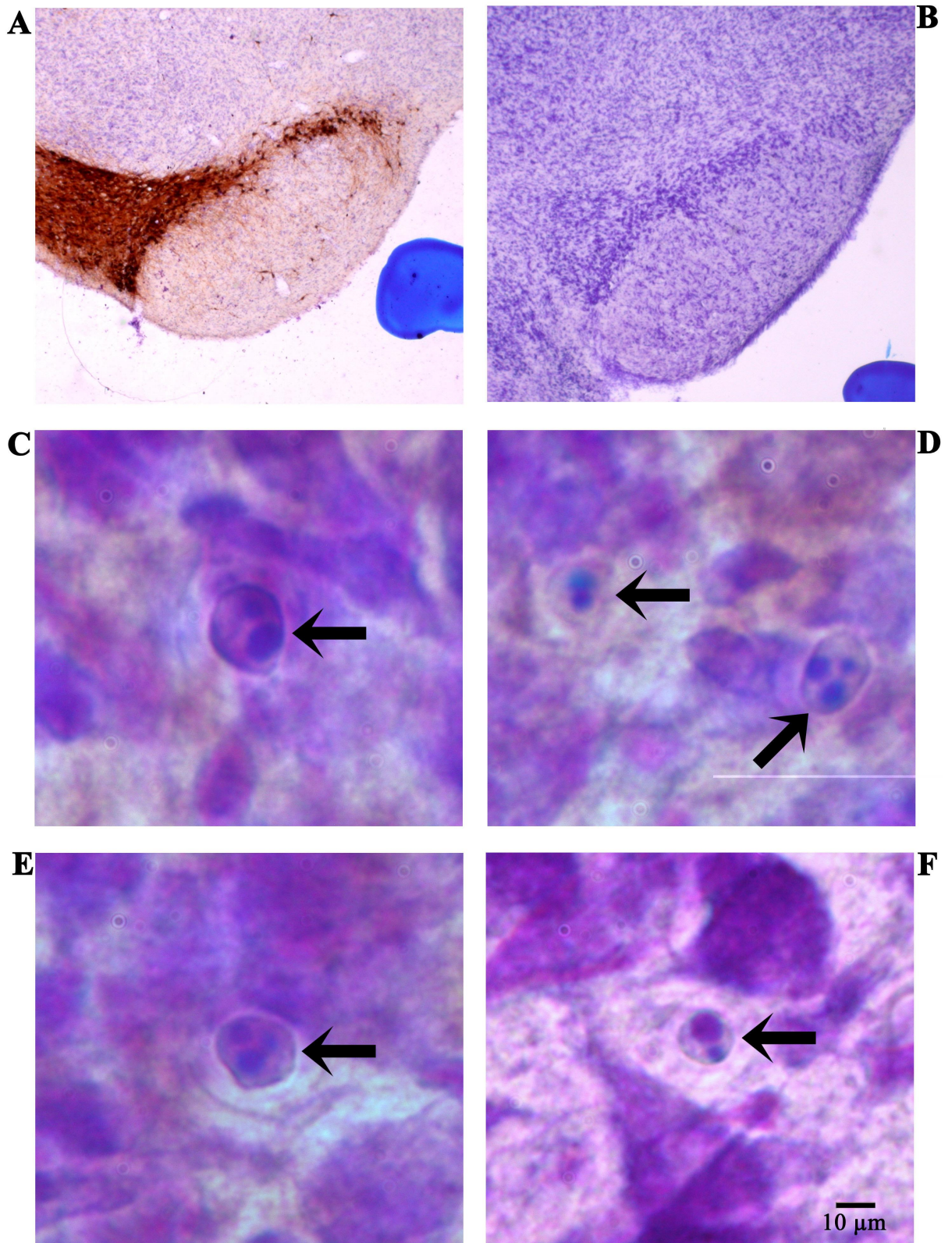


FIGURA 6 - Fotomicrografia da morfologia de células picnóticas. *A e B*: Secções com aumento de 30x mostrando a SN através da imunohistoquímica por TH contracorada com Nissl (*A*) e somente corada pelo método de Nissl (*B*). *C, D, E e F*: Aumento de 600x; exemplos de padrões picnóticos individuais revelados pelo método de Nissl. As setas evidenciam os corpos cromatídeos típicos da morte celular por apoptose, além da picnose celular.

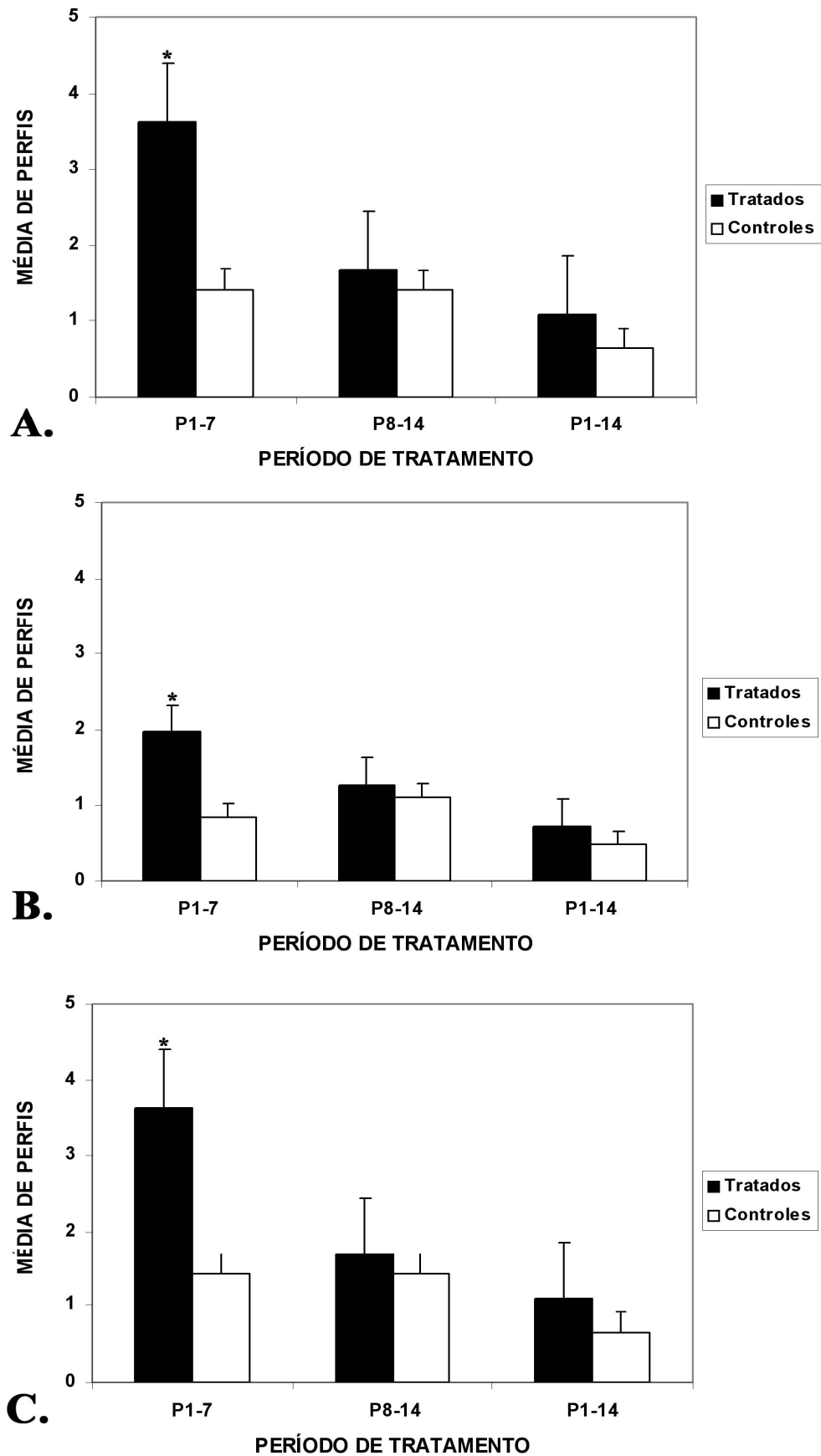
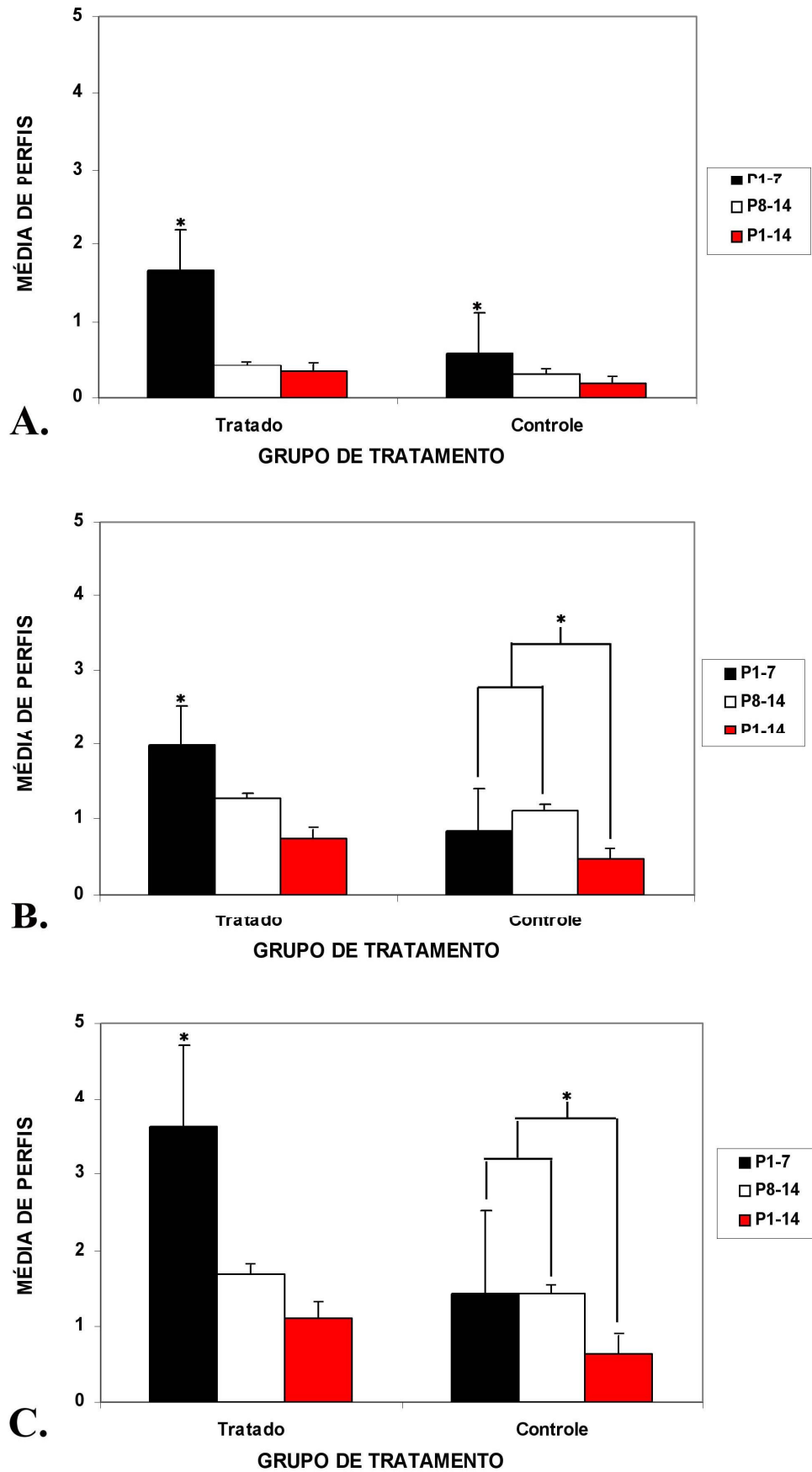


FIGURA 7 - Comparação entre animais tratados e controle da média de padrões picnóticos por hemisseção de SNpc nos grupos de tratamento. *A*: padrões picnóticos típicos, *B*: padrões picnóticos atípicos, *C*: total de padrões picnóticos. * - $p < 0,05$. Teste T.



4.2.2 - Número Total de Perfis Picnóticos na Porção Central da Substância Negra:

Quando computamos o número total de perfis picnóticos na porção central da substância negra, os animais expostos ao ferro, em pelo menos um dos períodos de tratamento, apresentaram maior número em relação aos controles nos 3 padrões ($p < 0,05$).

Comparando-se os grupos de acordo com os períodos de tratamento, o período de P1-7 teve maior quantidade de padrões picnóticos típicos em relação aos outros tratados (Fig. 9). Em relação aos grupos controles, houve diferença significativa apenas entre o grupo P8-14 e os outros períodos de tratamento, nos padrões picnóticos totais (Fig. 10).

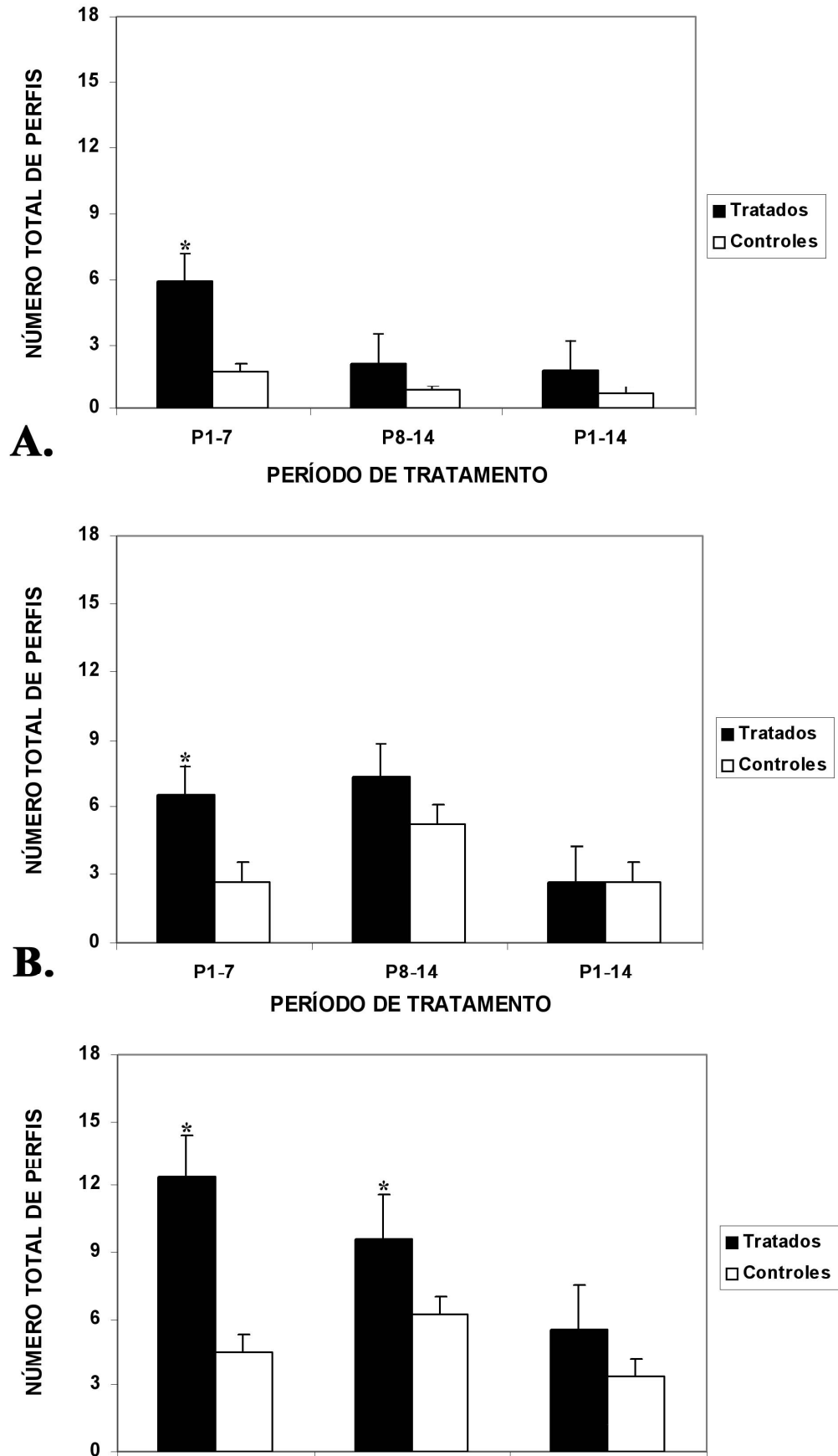


FIGURA 9 - Comparação entre animais tratados e controle do número total de padrões picnóticos em secções medianas por hemisseção de SNpc nos grupos de tratamento. A: padrões picnóticos típicos, B: padrões picnóticos atípicos, C: total de padrões picnóticos. * - $p < 0,05$. Teste T.

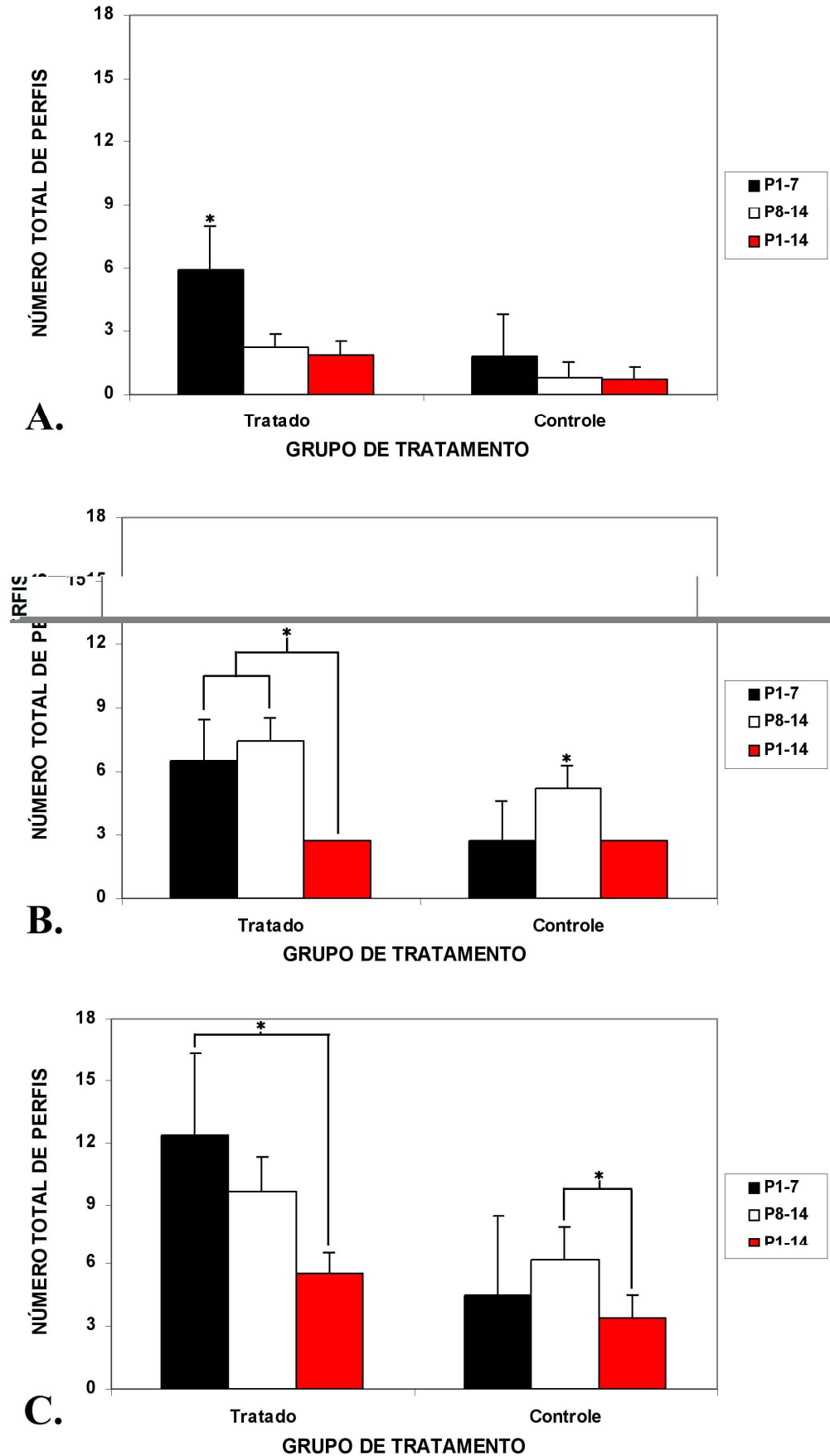


FIGURA 10 - Comparação entre os grupos de tratamento do número total de padrões picnóticos em secções medianas por hemisseção de SNpc nos animais tratados e controle. *A*: padrões picnóticos típicos, *B*: padrões picnóticos atípicos, *C*: total de padrões picnóticos. * - $p < 0,05$. Teste ANOVA.

4.2.3 - Número Total de Neurônios TH-positivos na Substância Negra :

Secções marcadas com imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) e contracoradas pelo método de Nissl foram analisadas quantitativamente sob microscópio óptico para um grupo de animais tratado no período de P1-P14 e respectivos controles. A média de neurônios TH-positivos por hemisfério no grupo tratado com ferro foi menor do que nos animais controles ($p < 0,01$) (Fig. 11).

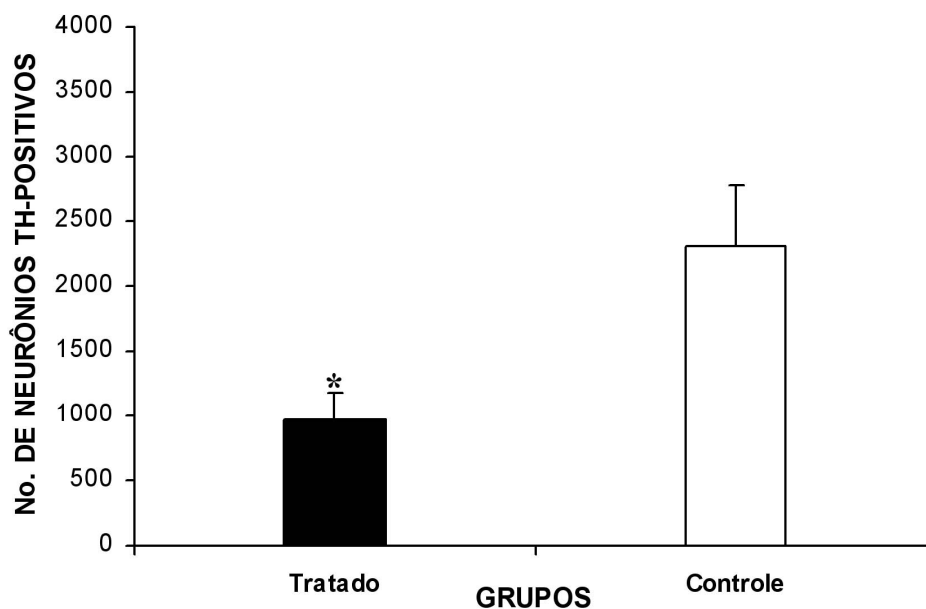


FIGURA 11 - Comparação entre animais tratados e controle do número total de neurônios TH-positivos na substância negra por hemisseção de SNpc no período de P1-14. * - $p < 0,05$. Teste ANOVA.

5 - DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou a influência da exposição neonatal ao metal ferro no número de padrões picnóticos e de neurônios marcados para TH na substância negra de ratos. Nossos resultados mostraram que o tratamento provocou, de modo consistente, um aumento no número de perfis picnóticos no período de tratamento P1-7.

Segundo Oo e Burke (1996), a morte celular apoptótica natural em ratos ocorre em um padrão bifásico, iniciando o primeiro pico no dia embrionário 20 (E20), alcançando taxa máxima em P2 e terminando em P8. O segundo pico de apoptose ocorre em P14. Por outro lado, Marti e cols (1997), ao provocar lesão estriatal por injeção de 6-OHDA, encontra o primeiro pico de morte apoptótica em P7. O mecanismo para este fenômeno não está bem explicado, mas talvez esteja relacionado a um período crítico de formação de contatos e competição por sinapses, que ocorre principalmente nos dias P13 a P17 (CLARKE e OPPENHEIM, 1995; HATTORI e McGEER, 1973, apud OO e BURKE, 1997).

Os padrões picnóticos analisados representam células picnóticas, com corpos cromatídeos, sugestivas de processo de degeneração por apoptose. Os padrões picnóticos observados em nosso material não eram numerosos e não estavam localizados em neurônios marcados para TH. A respeito destas questões, Oo e Burke (1997) hipotetizaram que, sendo a apoptose um processo rápido, com duração de horas, as poucas células em degeneração vistas à microscopia seriam apenas uma pequena amostragem da maciça morte celular em curso. Além disso, eles também observaram que apenas uma fração dos padrões apoptóticos contabilizados estavam dentro de neurônios TH-positivos, sendo possível que grande parte destas células sejam derivadas de neurônios dopaminérgicos, mesmo não estando em uma

célula TH-positiva. Atribuem este fenômeno aos seguintes fatores: (1) perda da expressão de TH pelo processo de morte celular; (2) separação física entre o núcleo e o citoplasma pela fragmentação apoptótica; (3) penetração prejudicada dos imunorreagentes nestas células, gerando resultados falso-negativos. É válido ressaltar que existem outros métodos mais específicos para avaliação de células apoptóticas, como a coloração por prata, microscopia eletrônica, técnica TUNEL e imunohistoquímica para caspase-3.

A nossa análise de padrões picnóticos foi realizada de duas formas. Uma através da média de padrões picnóticos por hemisseção, semelhante às contagens usadas na literatura (JANEC e BURKE, 1993; MACAYA e cols., 1994; OO e BURKE, 1997; MARTI e cols., 1997), e também se contando o número total de padrões na seções centrais da substância negra em um hemisfério. Comparando os resultados, houve concordância entre os resultados das 2 variáveis.

Além disso, pela diversidade de aspectos dos perfis picnóticos, dividimos a contagem destes em típicos (que preenchem os 2 critérios) e atípicos (com apenas um dos critérios). Segundo Marti e cols. (1997), há uma distinção entre padrões apoptóticos maiores e menores que 5µm, sendo os primeiros derivados principalmente de células dopaminérgicas, e os últimos de outro fenótipo celular ou restos de padrões apoptóticos maiores.

Nossos achados são discordantes no número de padrões picnóticos relatados por Oo e Burke (1997) em P8 e P15 que mostram uma maior quantidade de perfis em P14, comparados a P8, e nossa análise indica maior morte apoptótica em P8 comparada a P15, tanto em tratados quanto em controles. É possível que a maior morte apoptótica em animais tratados seja significativa em P8 pela maior permeabilidade da BHE ao ferro e pela maior absorção intestinal do metal (MOOS e MORGAN, 2000; PÁCHA, 2000; NAYLOR e HARRISON, 1995).

Um fato que nos chamou atenção foi a maior morte celular em um grupo tratado por apenas 7 dias (P1-7), comparado ao grupo que recebeu ferro por 14 dias (P1-14). Esse resultado indica que a janela temporal de maior suscetibilidade à exposição ao ferro é P1-P7, com conseqüências para o número de neurônios TH-positivos após exposição de P1-P14. Esse último resultado necessita de melhor verificação, visto que o número de animais foi reduzido (apenas 3 tratados, e 2 controles) e não foi feita a análise de grupos tratados nos outros dois regimes de exposição (P1-P7 e P8-P14).

Os trabalhos com modelos de intoxicação por ferro via oral em ratos utilizaram doses bem distintas de ferro elementar nos tratamentos. Sobotka e cols. (1996) utilizaram rações enriquecidas com ferro até 20000 ppm, Lan e Jiang (1997) utilizaram ferro carbonil na dose de 25 mg de ferro/kg e Schröder e cols. (2001) fizeram tratamentos com doses que variavam de 2,5 a 30 mg Fe/kg, porém nenhum destes trabalhos iniciou a administração de ferro desde o primeiro dia de vida. Para obtermos resultados consideráveis, utilizamos a dose máxima já feita na literatura (30 mg Fe/kg). Nestas dosagens e até menores (3 mg Fe/kg), feita em apenas 3 dias (P10 a P12), ratos tiveram déficit na realização do teste do labirinto radial e do campo aberto com 3 meses de vida, mostrando já um comprometimento na memória e no aprendizado a longo prazo, oriundo do tratamento neonatal com ferro (SCHRÖDER e cols., 2001).

Como contribuição à literatura, nossos resultados sugerem que a exposição ao ferro no período neonatal pode ocasionar alterações morfológicas precoces na substância negra. Este efeito pode estar relacionado ao aumento do estresse oxidativo e à cascata de apoptose. A perda neuronal nesta fase pode contribuir para aumentar a susceptibilidade individual ao desenvolvimento futuro de síndromes ligadas ao sistema dopaminérgico, como é o caso da DP.

Em comparação, o trabalho de Kaur e cols. (2006) mostrou redução na contagem de neurônios TH-positivos apenas com 24 meses após intoxicação com ferro no período neonatal em camundongos. Esses autores usaram uma dosagem de ferro (120 mg/kg) que é 4 vezes maior do que aquela que utilizamos no presente trabalho (30 mg/kg), e mesmo utilizando uma concentração menor já foi possível observar efeitos degenerativos na substância negra. A aparente discrepância entre estes resultados pode ser devido: 1) à diferença no período de tratamento que naquele estudo foi de P10 a P17, diferente dos utilizados em nosso trabalho; 2) à utilização de espécies diferentes. De qualquer modo, esses resultados em conjunto, sugerem que dependendo do período de vida em que o indivíduo é exposto, os efeitos para a substância negra podem ser precoces ou tardios. Os resultados desse artigo também fortalecem o papel do ferro como um elemento “sensibilizador” da SN, aumentando a sua suscetibilidade à exposição a outras toxinas em etapas posteriores da vida.

Atualmente, entende-se que a patogenia da DP esteja relacionada à hipótese dos “múltiplos insultos”. Em humanos, a SN possui aproximadamente 400.000 neurônios, e para que os sintomas de DP iniciem, é preciso que haja uma perda de 80% das células nervosas dopaminérgicas. Partindo do princípio de que há uma perda natural de 2.500 neurônios por ano, naturalmente um indivíduo teria a doença apenas se alcançasse idade acima de 130 anos. Caso este mesmo indivíduo entre em contato com algum dos vários fatores de risco da doença (processos inflamatórios, neurotóxicos, isquemia) já na fase adulta, esta perda de neurônios dopaminérgicos é acelerada e a síndrome surge após os 60 anos. Entretanto, se a injúria ocorrer no início da vida, na fase de desenvolvimento (incluindo período gestacional), haverá perdas neuronais e, sobretudo, os neurônios “sobreviventes” terão sofrido lesões sutis, que não provocaram sintomas clínicos. A este estado, chama-se “toxicidade silente”. Quando, na fase adulta, o organismo que já teve o dano neonatal sofrer uma nova agressão, o processo de neurodegeneração será potencializado, cursando com a doença em um período mais precoce

que o comum (THIRUCHELVAM e cols., 2002; UVERSKY, 2004; BARLOW e cols., 2004).

Esta nova fase do conhecimento em DP nos obriga a direcionar nossas atenções para a prevenção da doença, sendo mais importante ainda o reconhecimento de todos os fatores relacionados e em que situações eles podem ser evitados. Neste contexto, nosso trabalho evidencia a sobrecarga de ferro no período neonatal como um potencial fator de agressão à SN, e principalmente seu uso indiscriminado na forma de fórmulas lácteas enriquecidas para RN menores de 6 meses, como um futuro (ou presente mesmo) problema de saúde pública, dada a prevalência crescente nos últimos anos das doenças neurodegenerativas.

6 – CONCLUSÕES

O tratamento com ferro via oral em ratos neonatos produziu redução no peso corporal na maioria dos animais, aumento de padrões picnóticos sugestivos de morte celular por apoptose, e diminuição de neurônios dopaminérgicos na substância negra. Esses resultados sugerem que a sobrecarga de ferro no período neonatal pode ser um fator potencial de agressão à substância negra, que poderia gerar uma predisposição futura ao surgimento da síndrome parkinsoniana.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, N.C. Medical Progress: Disorders of iron metabolism. **N Engl J Med**, v.341, n. 26, p. 1986-1995, 1999.

BARLOW, B.K., RICHFIELD, E.K., CORY-SLECHTA, D.A., THIRUCHELVAM, M. A Fetal Risk for Parkinson's Disease. **Dev Neurosci**, v. 26, p. 11-23, 2004.

CONRAD, M.E. et al. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.279, p. 767-774, 2000.

CRESPIN, J. **Puericultura Ciencia, Arte e Amor**. São Paulo: Ed. Fundação BYK, 1996.

CRICHTON, R.R., PIERRE, J.L. Old iron, young copper: from Mars to Venus. **BioMetals**, v. 14, p. 99-112, 2001.

DAL-PIZZOL, F., KLAMT, F., FROTA Jr, M.L.C., ANDRADES, M.E., CAREGNATO, F.F., VIANNA, M.M.R., SCHRÖDER, N., QUEVEDO, J., IZQUIERDO, I., ARCHER, T., MOREIRA, J.C.F. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. **Dev Brain Res**, v. 130, p. 109–114, 2001.

DE LIMA, M.N.M., LARANJA, D.C., CALDANA, F., GRAZZIOTIN, M.M., GARCIA, V.A., DAL-PIZZOL, F., BROMBERG, E., SCHRÖDER, N. Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. **Exp Neurol**, v. 196, p. 177–183, 2005.

DE LIMA, M.N.M., POLYDORO, M., LARANJA, D.C., BONATTO, F., BROMBERG, E., MOREIRA, J.C.F., DAL-PIZZOL, F., SCHRÖDER, N. Recognition memory impairment and

brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2521–2528, 2005.

DOMMELÖF, M., LÖNNERDAL, B., ABRAMS, S.A., HERNELL, O. Iron absorption in breast-fed infants: effects of age, iron status, iron supplements and complementary foods. **Am J Clin Nutr**, v. 76, p. 198-204, 2002.

DOREA, J.G. Iron and copper in human milk. **Nutrition**, v. 16, p. 209-220, 2000.

DWORK, A.J. Effects of diet and development upon the uptake and distribution of cerebral iron. **J Neurol Sci**, v. 134, p. 45-51, 1995.

EISENSTEIN, R.S. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 20, p. 627-662, 2000.

ENVIRONMENTAL Chemistry – Periodic Table of Elements: Element Iron – Fe.

Disponível em: <<http://www.environmentalchemistry.com/yogi/periodic/Fe>>. Acesso em: 07 Outubro 2005.

FOMON, S.J., NELSON, S.E., ZIEGLER, E.E. Retention of iron by infants. **Annu Rev Nutr**, v. 1, p. 273-290.

GOMES-LEAL, W., MARTINS, L.C., DINIZ, J.A., DOS SANTOS, Z.A., BORGES J.A., MACEDO, C.A., MEDEIROS, A.C., DE PAULA, L.S., GUIMARÃES, J.S., FREIRE M.A., VASCONCELOS, P.F., PICANÇO-DINIZ, C.W. Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally-infected newborn mice. **Acta Tropica** 2005 [sob revisão].

GÖTZ, M.E., DOUBLE, K., GERLACH, M., YODIM, M.B.H., RIEDERER, P. The Relevance of Iron in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1012, p. 193-208, 2004.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs and Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

JANEC, E., BURKE, R.E. Naturally Occurring Cell Death during Postnatal Development of the Substantia Nigra Pars Compacta of Rat. **Mol Cell Neurosci**, v. 4, p. 30-35, 1993.

Joint FAO/WHO Expert Consultation. **Human vitamin and mineral requirements**. Bangkok, Thailand: FAO/WHO, 2002.

KAUR, D., PENG, J., CHINTA, S.J., RAJAGOPALAN, S., DI MONTE, D.A., CHERNY, R.A., ANDERSEN, J.K. Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. **Neurobiology of Aging** 2006 [sob revisão].

KEEN, C.L., LÖNNERDAL, B., CLEGG, M., HURLEY, L.S. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, proteins, carbohydrate and fat. **J Nutr**, v. 111, p. 226-230, 1981.

LAN, J., JIANG, D.H. Excessive iron accumulation in the brain: a possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 104, p. 649-660, 1997.

LEVENSON, C.W., TASSABEHJI, N.M. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 3, p. 251-263, 2004.

LUTTER, C.K., DEWEY, K.G. Nutrient composition for fortified complementary foods. **J Nutr**, v. 133, p. 3011-3020, 2003.

MACAYA, A., MUNELL, F., GUBITS, R.M., BURKE, R.E. Apoptosis in Substantia Nigra Following Development Striatal Excitotoxic Injury. **PNAS**, v. 91, n. 17, p. 8117-8121, 1994.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Ed. Roca, 1998.

MARTI, M.J., JAMES, C.J., OO, T.F., KELLY, W.J., BURKE, R.E. Early development destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. **J Neurosci**; v. 17, n. 6, p. 2030-2039, 1997.

MOOS, T., MORGAN, E.H. Transferrin and transferring receptor function in brain barrier systems. **Cell Mol Neurobiol**, v. 20, n. 1, p. 77-95, 2000.

MURAHOVSKI, J. **Pediatria: Diagnóstico + Tratamento**. 5. ed. São Paulo: Ed. Servier, 1994.

NAYLOR, G.P., HARRISON, J.D. Gastrointestinal iron and cobalt absorption and iron status in young rats and guinea pigs. **Hum Exp Toxicol**, v. 14, n. 12, p. 949-954, 1995.

OLIVEIRA, R.G. **Blackbook – Pediatria**. 3. ed. Belo Horizonte: Blackbook Editora, 2005.

OO, T.F., BURKE, R.E. The time course of developmental cell death in phenotypically defined dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Dev Brain Res**, v. 98, p. 191-196, 1997.

ORGEL, L.E. **Introdução à Química dos Metais de Transição**. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 3-4, 1970.

PÁCHA, J. Development of intestinal transport function in mammals. **Physiol Rev**, v. 80, p. 1633-1667, 2000.

RAO, R., GEORGIEFF, M.K. Neonatal iron nutrition. **Semin Neonatol**, v. 6, p. 425-435, 2001.

ROY, C.N., ENNS, A.A. Iron homeostasis: new tales from the crypt. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4020-4027, 2000.

SARDELLA, A. **Curso Completo de Química – Volume Único**. 2. ed. São Paulo: Editora Ática, p. 127 e 187, 1999.

SCHRÖDER, N., FREDRIKSSON, A., VIANNA, M.R.M., ROESLER, R., IZQUIERDO, I., ARCHER, T. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. **Behav Brain Res**, v. 124, p. 77-85, 2001.

SENGSTOCK, G.J., OLANOW, C.W., DUNN, A.J., BARONE Jr, S., ARENDASH, G.W. Progressive Changes in Striatal Dopaminergic Markers, Nigral Volume, and Rotational Behavior Following Iron Infusion into the Rat Substantia Nigra. **Exp Neurol**, v. 130, p. 82-64, 1994.

SOBOTKA, T.J., WHITTAKER, P., SOBOTKA, J.M., BRODIE, R.E., QUANDER, D.Y., ROBL, M., BRYANT, M., BARTON, C.N. Neurobehavioral Dysfunctions Associated With Dietary Iron Overload. **Physiology & Behavior**, v. 59, n. 2, p. 213-219, 1996.

THIRUCHELVAM, M., RICHFIELD, E.K., GOODMAN, B.M., BAGGS, R.B., CORY-SLECHTA, D.A. Developmental Exposure to the Pesticides Paraquat and Maneb and the Parkinson's Disease Phenotype. **NeuroToxicology**, v. 23, p. 621–633, 2002.

UVERSKY, V.N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell Tissue Res**, v. 318, p. 225–241, 2004.

WESSLING-RESNICK, M. Iron transport. **Annu Rev Nutr**, v. 20, p. 129-151, 2000.

ZECCA, L., STROPPOLO, G., GATTI, A., TAMPELLINI, D., TOSCANI, M.,
GALLORINI, M., GIAVERI, G., AROSIO, P., SANTAMBROGLIO, P., FARIELLO, R.G.,
KARATEKIN, E., KLEINMAN, M.H., TURRO, N., HORNYKIEWICZ, O., ZUCCA, F.A.
The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and
substantia nigra during aging. **PNAS**, v. 101, n. 26, p. 9843-9848, 2004.

8 – ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COORDENADORIA DE ATIVIDADES ACADÊMICAS
DIVISÃO DE PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 08.06.2004, o projeto de pesquisa intitulado "***Efeitos da exposição ao Ferro sobre a Morte Neuronal na substância negra de ratos durante o período neonatal***", desenvolvido por Bruno Lopes dos Santos , sob a Orientação da Prof. Dra. Elizabeth Sumi Yamada, obtendo **APROVAÇÃO** para desenvolvê-lo nesta instituição.

Belém, 08 de Junho de 2004


DR. EDUARDO LEITÃO MAIA

CRM 1997

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa/ HUIBB