



Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Biomarcadores do estado nutricional de ferro e estresse oxidativo em adultos

Juliana Frossard Ribeiro Mendes

Brasília
2008



Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Biomarcadores do estado nutricional de ferro e estresse oxidativo em adultos

Juliana Frossard Ribeiro Mendes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Profa Dra Sandra Fernandes Arruda

Brasília
2008



Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Comunicamos a aprovação da dissertação de mestrado da aluna **Juliana Frossard Ribeiro Mendes**, intitulada “**Biomarcadores do estado nutricional de ferro e estresse oxidativo em adultos**”, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Profa Dra Sandra Fernandes Arruda
Presidente – Universidade de Brasília (UnB)

Prof Dr Gilberto Kac
Membro – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Profa Dra Leonor Maria Pacheco Santos
Membro – Ministério do Desenvolvimento Social e Combate a fome (MDS) e
Universidade de Brasília (UnB)

Profa Dra Egle Machado de Almeida Siqueira
Suplente – Universidade de Brasília (UnB)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e oportunidades de crescimento moral e intelectual.

Aos meus pais, Julio e Margareth, e minhas irmãs, Marina e Laura, pelo amor, companheirismo, apoio e por sonharem comigo.

A minha orientadora, profa Dra Sandra F. Arruda, e minha co-orientadora, profa Dra Egle M. A. Siqueira, pela orientação presente, incentivo e exemplo de profissionalismo.

A todos os envolvidos no projeto VIVA Saúde-DF pela oportunidade e auxílio na coleta dos dados.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Biofísica pela colaboração e convívio.

A Munique pela contribuição nas análises das amostras.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana pela ajuda.

A profa Dra Loreny G. Giugliano e ao prof Dr Marcelo H. Lima pela disponibilização de seus laboratórios.

Ao Prof Dr Gilberto Kac e a profa Dra Leonor M.P. Santos pela análise crítica do trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	6
Lista de tabelas e figuras	8
Resumo	9
Abstract	10
Estrutura da dissertação	11
Introdução	12
Revisão bibliográfica	
Metabolismo do ferro	13
Radicais livres e defesas antioxidantes	19
Ferro, estresse oxidativos e processos patológicos	25
Objetivos	
Objetivo geral	34
Objetivos específicos	34
Materiais e métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas	
Capítulo 1. "Iron status and oxidative stress biomarkers in adults, a preliminary study"	35
Capítulo 2. Contribuição da fortificação das farinhas de trigo e milho no consumo de ferro dietético e avaliação da associação entre o consumo dietético de ferro total, hêmico e inorgânico e estresse oxidativo em adultos	51
Conclusão Geral	68
Anexos	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: adenosina trifosfato

BMI: índice de massa corporal, do inglês, body mass index

BMP: proteína morfogênica dos ossos, do inglês, bone morphogenic protein

CAT: catalase

-CH₂-: grupo metileno

Cp: ceruloplasmina

Cu: cobre

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

Dcytb: citocromo b duodenal ferredutase

DMT1: transportador de metal bivalente 1

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNPH: dinitrofenil-hidrazina

EAR: necessidade média estimada, do inglês, estimated average requirement

EDTA: ethylenediamidine tetracetic acid

EROs: espécies reativas de oxigênio

Fe: ferro

Fe²⁺: ferro na forma ferrosa ou ferro reduzido

Fe³⁺: ferro na forma férrica ou ferro oxidado ou ferro inorgânico

FPN1: ferroportina 1

GSH: glutatona reduzida

GPX: glutatona peroxidase

GR: glutatona redutase

GSSG: glutatona oxidada

GST: glutatona-S-transferase

H: cadeia ou subunidade pesada da ferritina

Hb: hemoglobina

HCl: ácido clorídrico

HCP1: proteína carreadora do grupo heme 1

HFE: proteína da hemocromatose

HJV: hemojuvelina

HNO₃: ácido nítrico

HO₂[•]: forma protonada do oxigênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO-1: heme-oxigenase 1

H₂SO₄: ácido sulfúrico

IMC: índice de massa corporal

IL-6: interleucina-6

IRE: elementos responsivos ao ferro, do inglês, iron responsive elements
IRP: proteínas reguladoras de ferro, do inglês, iron regulatory proteins
L: cadeia ou subunidade leve da ferritina
LD: limite de detecção
LQ: limite de quantificação
MDA: malondialdeído
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
NCD: doenças crônicas não transmissíveis, do inglês, non-communicable chronic diseases
NO^{*}: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintetase
O₂: oxigênio molecular ou dioxigênio
O₂^{*}: radical superóxido
^{*}OH: radical hidroxil
OH⁻: hidroxila
ONOO⁻: peroxinitrito
PC: proteínas carboniladas
PFL: pool de ferro lábil
RL: radicais livres
mRNA: ácido ribonucléico mensageiro
RO^{*}: radical alcoxil
ROO^{*}: radical peroxil
ROS: espécies reativas de oxigênio, do inglês, reactive oxygen species
S: enxofre
SeGPX: glutationa peroxidase dependente de selênio
SOD: superóxido dismutase
TACO: tabela brasileira de composição de alimentos
TBA: ácido tiobarbitúrico
TBARS: substâncias responsivas ao ácido tiobarbitúrico
TCA: ácido tricloroacético
Tf: transferrina
TfR: receptor de transferrina
TfR1: receptor de transferrina 1
TfR2: receptor de transferrina 2
UTR: seqüência de nucleotídeos não traduzidos, do inglês, untranslated region
WHO: World Health Organization

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABLE 1 Characteristics of subject	40
(Características dos indivíduos)	
TABLE 2 Biochemical parameters and iron intake of subjects	42
(Parâmetros bioquímicos e consumo dietético de ferro dos indivíduos)	
TABLE 3 Correlation coefficients (r) between oxidative biomarkers and iron status in subjects (Coeficiente de correlação (r) entre os biomarcadores de estresse oxidativo e do estado nutricional de ferro nos indivíduos)	43
FIGURE 1 Association between malondialdehyde and ferritin status of total population	43
(Associação entre malondialdeído e ferritina da população total)	
FIGURE 2 Association of malondialdehyde and anemia of subjects according to the sex	44
(Associação entre malondialdeído e anemia dos indivíduos de acordo com o sexo)	
FIGURE 3 Correlation of ferritin, malondialdehyde of subjects according to the sex	44
(Correlação da ferritina, malondialdeído dos indivíduos de acordo com o sexo)	
TABELA 1 Concentração de ferro total obtido por dosagem; descrito na tabela TACO e fornecido pela fortificação nos farináceos	58
TABELA 2 Consumo de ferro dietético na amostra populacional estudada	59
TABELA 3 Coeficientes de correlação (r) entre os biomarcadores de estresse oxidativo e o consumo de ferro hêmico, inorgânico e total na amostra populacional estudada	60
TABELA 4 Associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e o consumo de ferro na amostra populacional estudada	61

RESUMO

Objetivo Embora essencial em vários processos vitais no organismo humano, o ferro catalisa reações de geração de espécies reativas de oxigênio, as quais têm sido associadas ao aumento do risco de doenças crônicas não transmissíveis e ao envelhecimento precoce. Este estudo teve por objetivo investigar possíveis correlações e associações entre as concentrações de ferritina e hemoglobina sérica e o consumo dietético de ferro e os biomarcadores de estresse oxidativo em adultos. **Materiais e métodos** Os dados foram coletados de 134 indivíduos supostamente saudáveis, acima dos 18 anos, selecionados aleatoriamente que participavam do estudo piloto do projeto "*Prevalência dos fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis no Distrito Federal – Brasil (VIVA Saúde - DF)*", um estudo transversal. Foram analisadas as concentrações séricas de ferritina, malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (PC), hemoglobina (Hb) e o consumo dietético de ferro. **Resultados** Foi observada uma correlação ($r = 0,189$ e $p = 0,032$) e associação ($p = 0,046$) entre ferritina e MDA séricos. A concentração de Hb foi associada positivamente com o MDA sérico ($p = 0,040$). Para a população total, verificou-se uma associação positiva entre as ingestões dietéticas de ferro total e hêmico e a concentração sérica de MDA ($p = 0,008$ e $p = 0,033$, respectivamente). Entre as mulheres, a ingestão dietética de ferro inorgânico foi positivamente associada a concentração sérica de PC ($p = 0,036$). Menores concentrações séricas de MDA foram encontradas em indivíduos com níveis de ferritina abaixo da referência de normalidade ($p = 0,015$), e em homens anêmicos ($p = 0,011$). **Conclusão** Esse resultados sugerem que altos níveis de ferro podem contribuir para um aumento no estado de estresse oxidativo.

Palavras-chaves: ferro, estresse oxidativo, malondialdeído, proteínas carboniladas, doenças crônicas não-transmissíveis.

ABSTRACT

Objective Although essential in many vital processes in the organism, iron catalyzes reactions of reactive oxygen species generation, which have been associated to an enhanced risk of non-communicable chronic diseases and precocious ageing. This study aimed to investigate whether ferritin and hemoglobin concentration, and dietary iron consumption were related to oxidative stress biomarkers in adults. **Research methods and procedures** Data were collected from 134 supposedly health subjects above 18 years, randomly select, participants of a pilot project "*Risk factors prevalence for non-communicable chronic diseases in Federal District – Brazil* (VIVA Saúde-DF), a transversal study. Serum ferritin, malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins (PC) concentrations; hemoglobin (Hb); and dietary iron consumption were analyzed. **Results** A positive correlation ($r = 0.189$, $p = 0.032$) and association ($p = 0.046$) was observed for serum ferritin and MDA. Hb concentration was positively associated with serum MDA ($p = 0.040$). Total and hemic iron dietary intakes showed a positive association with serum MDA for all subjects ($p = 0.008$ e $p = 0.033$, respectively). Among woman inorganic iron intake was positively associated with serum PC ($p = 0.036$). Lower serum MDA concentration was found in ferritin deficient subjects ($p = 0.015$), and anemic men ($p = 0.011$). **Conclusion** These results suggest that high levels of iron may increase oxidative stress status.

Keywords: iron, oxidative stress, malondialdehyde, protein carbonyls, non-communicable chronic diseases.

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada da seguinte forma: A parte inicial geral composta por introdução, revisão bibliográfica e objetivos. Em seguida, os métodos, os resultados, a discussão e a conclusão no formato de dois artigos originais. O primeiro artigo original intitulado "Iron status and oxidative stress biomarkers in adults, a preliminary study" foi aceito para publicação na revista *Nutrition – The International Journal of Applied and Basic Nutrition Science*, indexada na base de dados ISI (Information Sciences Institute). O segundo artigo original intitulado "Contribuição da fortificação das farinhas de trigo e milho no consumo de ferro dietético e avaliação da associação entre o consumo dietético de ferro total, hêmico e inorgânico e estresse oxidativo em adultos" será encaminhado para publicação e refere-se à avaliação do consumo de ferro dietético, considerando o ferro proveniente da fortificação das farinhas de trigo e milho, e sua relação com o estado nutricional de ferro e estresse oxidativo na amostra estudada. Ao final, a conclusão geral da dissertação.

INTRODUÇÃO

O ferro, elemento essencial à vida, desempenha grande variedade de funções fisiológicas e bioquímicas nos organismos vivos (Levenson et al, 2004; Polla et al, 2003). Sua deficiência compromete o desenvolvimento cognitivo, aumenta a morbimortalidade materna e infantil, reduz a capacidade de trabalho e a resistência imunológica (Levenson et al, 2004; Beard et al, 2003; Bovell et al, 2003). Considerada a carência nutricional de maior magnitude no mundo, a anemia ferropriva atinge aproximadamente 30% da população mundial (Martinez et al, 2002; Brasil, 2007; Assunção et al, 2007). Estudos regionais no Brasil apontam para prevalências de 15 a 50% entre crianças e 30 a 40% entre gestantes, não havendo um estudo nacional (Milman, 2002; Milman, 2003; Milman, 2004; Brasil, 2002; Brasil, 2006). Semelhante a outros países, o Brasil implementou um programa nacional de combate a anemia ferropriva tendo como uma de suas medidas a fortificação com ferro e ácido fólico das farinhas de trigo e milho comercializadas em todo território nacional, por meio da Resolução da Anvisa RDC n^o 344 de 13 de dezembro de 2002.

No Brasil, as doenças carenciais coexistem com as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) que, na maioria dos casos, estão associadas ao excesso de nutrientes. A prevalência das DCNT tem aumentado no mundo e, este cenário tende a se intensificar com o envelhecimento da população (Yach et al, 2004). Atualmente, a população brasileira com 60 anos ou mais representa 8,6% da população total, excedendo os 7% estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como referência para caracterizar uma população idosa. Estima-se que até 2025, o Brasil estará entre as 10 maiores populações de idosos do mundo (Brasil, 2006).

A etiologia de DCNT como o câncer, o diabetes, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e o envelhecimento precoce tem sido associada a danos oxidativos produzidos por espécies reativas de oxigênio (EROs) a biomoléculas como o DNA, as proteínas e os lipídios. O ferro atua como catalisador de reações de formação das EROs, sendo que o excesso desse nutriente pode levar ao estabelecimento de uma condição de estresse oxidativo (Levenson et al, 2004; Buijsse et al, 2007). O aumento da prevalência do excesso de ferro corporal entre homens, mulheres pós-menopausa e em idosos saudáveis tem sido reportado e atribuído a mudanças nos hábitos dietéticos, como o alto consumo de carne, álcool, vitamina C e a suplementação e fortificação de alimentos com ferro (Yuan et al, 2003; Fleming et al, 2002; Lahti-Koski et al, 2003; Milman et al, 2002; Milman et al, 2003; Milman et al, 2004). As recomendações de ingestão de ferro foram revisadas, havendo uma redução para quase todos os grupos populacionais (National Academy of Science, 2001).

Considerando o alto potencial oxidante do ferro e o aumento da expectativa de vida do brasileiro, a fortificação pode representar risco de aumento da prevalência de DCNT entre indivíduos com adequado estado corporal de ferro. O presente projeto teve por objetivo investigar possíveis associações e correlações entre o estado nutricional e/ou a ingestão de ferro e os biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos adultos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Metabolismo do Ferro

O ferro é essencial para diversas funções metabólicas na maioria dos seres vivos, participando no transporte de oxigênio, síntese de DNA, reações redox na cadeia de transporte de elétrons, além de fazer parte da estrutura molecular de diversas proteínas e enzimas (Crichton et al, 2002; Levenson et al, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Oats, 2007).

O estado de ferro corporal está relacionado com o sexo, sendo que a média de ferro corporal total é de cerca de 3,8 g no homem e 2,3 g na mulher. Em ambos os gêneros, as concentrações séricas de ferritina se mantêm estáveis até a adolescência. A partir da adolescência, essas concentrações aumentam nos homens, estabilizando por volta dos 30-35 anos de vida. Nas mulheres, as concentrações de ferritina são estáveis entre a menarca e a menopausa, aumentando após a menopausa (Swanson, 2003; Milman et al, 2004). Maiores concentrações de hemoglobina, ferritina sérica e consumo de ferro dietético são encontrados nos homens em relação às mulheres, provavelmente devido ao maior consumo de energia, carne vermelha e bebidas alcoólicas entre os indivíduos do sexo masculino (Fleming et al, 2002; Milman et al, 2004). Polla et al (2003) sugerem inclusive que o menor status de ferro nas mulheres favorecem a sua longevidade em relação ao homens.

A homeostase do ferro corporal é essencialmente mantida através do controle da sua absorção intestinal e liberação das reservas corporais, que são reguladas conforme as necessidades de ferro do organismo, ou seja, conforme o estado corporal de ferro. A excreção de ferro do organismo humano parece não possuir um mecanismo específico de regulação, o que torna a absorção duodenal um ponto-chave na manutenção da homeostase de ferro no organismo (Frazer and Anderson, 2003; Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Oats, 2007). Em torno de 1 a 2 mg do ferro dietético são absorvidos diariamente pelos enterócitos duodenais para repor o ferro perdido, entretanto, há uma demanda diária de 20 a 25 mg de ferro para a eritropoiese e demais funções, a qual é suprida endogenamente, por meio da reciclagem do ferro, principalmente oriundo das hemoglobinas senis. Os macrófagos fagocitam os eritrócitos velhos e danificados e degradam a hemoglobina, liberando o ferro para a reutilização, sendo esse captado pela medula óssea para ser utilizado na eritropoiese. A síntese de hemoglobina consome cerca de 80% de todo o ferro necessário ao organismo humano. Os hepatócitos possuem uma reserva fisiológica, estratégica, de ferro de aproximadamente 1 g, mobilizada quando há um desequilíbrio na homeostase de ferro (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Oats, 2007; Anderson et al, 2007; Chaston et al, 2008).

O ferro dietético apresenta-se em duas formas hêmico e não-hêmico ou inorgânico. Embora o ferro hêmico seja mais biodisponível, a forma inorgânica (Fe^{+3}) está presente em maior concentração na dieta (Van der A et al, 2005; Martínez-Navarrete et al, 2002). No lúmen intestinal, o ferro dietético encontra-se, predominantemente, na forma férrica (Fe^{3+}), sendo reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}) pela citocromo b duodenal ferredutase (Dcytb), presente na membrana apical em

borda-escova dos enterócitos. Após a redução do ferro dietético à forma ferrosa, o transportador de metal divalente 1 (DMT1), um simporter de membrana dependente de energia que também transporta prótons, facilita o transporte do Fe^{2+} e de outros metais divalentes (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) por meio da membrana apical do enterócito. O DMT1 também está envolvido na reabsorção do Fe^{2+} nos rins e no transporte de ferro no cérebro (Frazer and Anderson, 2003; Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Canonne-Hergaux et al, 2006). O ferro absorvido pelos enterócitos pode sofrer a ação da hefaestina, uma proteína semelhante a ceruloplasmina (cobre dependente) localizada no citoplasma e na membrana basolateral do enterócito, responsável pela oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} . O Fe^{2+} absorvido no enterócito ou é reoxidado no citoplasma e incorporado à molécula de ferritina, forma na qual é armazenado, ou segue para a membrana basolateral externa do enterócito onde é exportado para a circulação sanguínea (Petrac et al, 2005). A proteína ferroportina 1 (FPN1) exporta Fe^{2+} da membrana basolateral do enterócito para a corrente sanguínea. Ao entrar na corrente sanguínea, o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} sendo captado pela proteína transportadora de ferro no plasma, a transferrina (Tf). Por meio de um receptor de transferrina (TfR), todos os demais tecidos corporais captam o ferro da circulação ligado à transferrina (Frazer and Anderson, 2003; Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Canonne-Hergaux et al, 2006). A FPN1 é predominantemente expressa nos enterócitos duodenais, nos macrófagos esplênicos e nas células hepáticas de Kupffer (Canonne-Hergaux et al, 2006). Nas células de órgãos como o cérebro, fígado e o pâncreas, a ceruloplasmina (Cp) converte o Fe^{2+} exportado do citoplasma em Fe^{3+} para ser transportado pela Tf (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Petrac et al, 2005) (Figura 1).

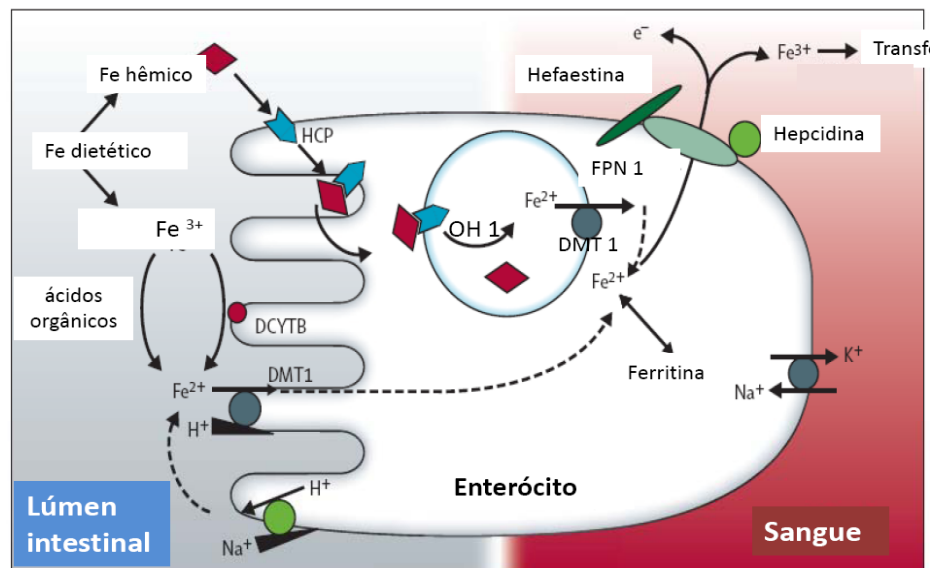


Figura 1. Regulação da absorção intestinal do ferro.

Fonte: adaptado de Zimmermann and Hurrell, 2007.

Ao contrário do ferro inorgânico, o ferro do grupo heme não precisa ser reduzido para ser absorvido. O grupo heme, resultante da quebra da mioglobina ou da hemoglobina, de origem

dietética é internalizado por endocitose pelo receptor denominado proteína carreadora do grupo heme-1 (HCP1), expresso na membrana apical dos enterócitos (Figura 1). O endossomo formado migra até o retículo endoplasmático, onde o ferro é liberado do grupo heme por ação da heme oxigenase-1 (HO-1) presente na superfície do retículo endoplasmático. Estudos sugerem que a proteína HCP1 é regulada pós-transcrição pelos estoques de ferro. Na deficiência, o receptor é expresso na superfície do enterócito e no excesso, o receptor se mantém no meio intracelular no interior do endossomo (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006).

No plasma humano, a Tf encontra-se na concentração de 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ e 1/3 saturada com ferro (Graham et al, 2007), e em três formas distintas de saturação: diférrica, monoférrica e apoférrica. A proporção entre essas formas no soro dependerá da saturação da transferrina, sendo que quanto menor a saturação, maior a proporção da forma monoférrica. Por exemplo, a proporção entre as formas diférrica e monoférrica é de 1:2 e de 1:5, em saturações de Tf de 30% e 15%, respectivamente. As três formas de Tf podem se ligar ao receptor de transferrina 1 (TfR1) na membrana celular, sendo internalizadas por endocitose. No entanto, a Tf diférrica possui afinidade 4 vezes maior pelo TfR1 quando comparada a Tf monoférrica e 24 vezes maior quando comparada a Tf apoférrica. Assim, a Tf diférrica é mais eficiente na entrega do ferro aos tecidos que a Tf monoférrica (Frazer and Anderson, 2003; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006). Após a endocitose do complexo Tf-TfR1, o interior da vesícula endossomal é acidificado por ação da bomba de prótons, promovendo uma mudança na conformação do complexo Tf-TfR1 e conseqüente liberação do ferro (Fe^{+3}). O ferro liberado é então reduzido a Fe^{2+} possibilitando seu transporte através da membrana endossomal para o citoplasma através do DMT1. A apoTf e o TfR1 endossomais migram para a superfície celular sendo devolvida à circulação. (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004).

Em um adulto saudável, 80% do ferro corporal depositados estão na ferritina presente nos hepatócitos e macrófagos. A ferritina é uma apoproteína com 24 subunidades de cadeias leves (L) e pesadas (H) ao redor de um centro, capaz de ligar até 4.500 átomos de ferro. Ao entrar na célula, o ferro excedente é estocado na forma de ferritina. A ferritina seqüestra o ferro do meio intracelular, fixando-o na forma oxidada (Fe^{3+}), quimicamente menos reativa, tanto para armazenamento quanto para desintoxicação. A proporção entre as subunidades L e H na molécula de ferritina é tecido específica, depende do estado fisiológico e da presença ou não de inflamação ou infecção. A subunidade H da ferritina possui capacidade catalítica sendo capaz de converter o Fe^{2+} internalizado a Fe^{3+} para ser armazenado no seu centro. Já a subunidade L parece não ter atividade enzimática, nem estar envolvida na homeostase do ferro. Quando a célula necessita de ferro, a ferritina é degradada através dos sistemas lisossomo e proteossoma liberando esse mineral (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Cozzi et al, 2006; Graham et al, 2007).

Cerca de 3 a 5% do ferro total da célula constituem o denominado "Pool de Ferro Lábil" (PFL). Este PFL possui as duas formas iônicas do ferro (Fe^{+2} , Fe^{+3}), associadas a ligantes de baixa

afinidade. Em condições fisiológicas normais, o PFL é mantido em níveis suficientemente baixos pela ação coordenada das proteínas regulatórias, cuja síntese depende da disponibilidade de ferro. O PFL regula a expressão de proteínas envolvidas no seu próprio metabolismo (Kruszewski, 2003), como a ferritina e o DMT-1, por meio de um eficiente mecanismo de regulação da tradução dos mRNAs dessas proteínas. Seqüências de nucleotídeos não traduzidos (UTR – do inglês Untranslated Region) situadas nas extremidades 5' ou 3' dos mRNAs da ferritina, do receptor de transferrina e do DMT-1, denominadas de elementos responsivos ao ferro (IRE, do inglês Iron Responsive Element), pareiam entre si, formando uma estrutura secundária na molécula do ribonucleotídeo na forma de grampo ou do inglês "loop". Os IRE, quando localizados na extremidade 5', impedem estericamente a tradução dos respectivos mRNAs e, quando presentes na porção 3', promovem a estabilidade das moléculas de mRNA (Crichton, 2002), permitindo a síntese das proteínas.

Em várias células de mamíferos foram identificadas duas proteínas citossólicas, que se ligam a estes IREs, denominadas proteínas reguladoras de ferro, IRP1 e IRP2. Quando o status de ferro celular está adequado, a IRP1 apresenta um núcleo Fe-S com 4 átomos de ferro e 4 átomos de enxofre (4Fe-4S), transformando-se na aconitase citoplasmática, porém, na deficiência de ferro, este núcleo destituído de ferro (3Fe-4S), perde a atividade catalítica e a molécula transforma-se na proteína reguladora de ferro, a IRP2. Na deficiência de ferro, a proteína IRP1 se liga fortemente ao IRE presente na porção 5' do mRNA da ferritina prevenindo a sua tradução, porém se ligado ao IRE localizado na porção 3' do mRNA do receptor de transferrina ou do DMT-1, estabiliza ambas as moléculas de mRNA, tornando-as mais resistentes à degradação por nucleases, favorecendo a síntese do receptor de transferrina e do DMT-1, responsáveis pela captação do ferro intracelular e absorção intestinal, respectivamente. Resultado oposto ocorre quando a disponibilidade de ferro aumenta, ou seja, a IRP1 transforma-se na aconitase, perdendo a capacidade de se ligar ao IRE nas moléculas de mRNAs. Como resultado, ocorre a tradução do mRNA da ferritina e os mRNA do receptor de transferrina e do DMT-1 tornam-se mais vulneráveis à degradação (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004). O mecanismo de regulação da IRP2 é diferente do IRP1. A IRP2 possui uma seqüência denominada, domínio de degradação dependente de ferro, quando os níveis de ferro na célula estão altos a IRP2 é marcada e degradada nos proteossomas, enquanto nas células deficientes em ferro, o IRP2 intacto estabiliza o mRNA do receptor de transferrina e impede a tradução do mRNA da ferritina (Iwai et al, 1998). (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004 Papanikolaou et al, 2005).

Apesar de ser ainda pouco compreendido, recentemente foi sugerido um mecanismo sistêmico que integra a regulação da absorção de ferro nas células intestinais com as necessidades de ferro do organismo. A hepcidina é um peptídeo hormonal cuja estrutura secundária é caracterizada por folhas β -distorcidas com 6 ligações dissulfeto provenientes dos resíduos de cisteína que mantêm a ligação entre as folhas. Esse peptídeo atua como agente antimicrobiano e mediador inato da imunidade, sendo expresso principalmente no fígado. A hepcidina parece ser

responsável por sinalizar aos enterócitos o estado de ferro do organismo (Frazer and Anderson, 2003; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Oats, 2007; Chaston et al, 2008). Assim, quando os estoques corporais de ferro estão repletos observa-se um aumento na expressão de hepcidina que se liga a FPN1 e promove sua internalização e degradação, inibindo a exportação do ferro dos enterócitos. Com o acúmulo de ferro no meio intracelular do enterócito, o DMT1 é inibido, promovendo a redução da absorção de ferro do lúmen intestinal. A hepcidina também inibe a liberação de ferro dos macrófagos (baço) e hepatócitos, agindo também sobre a FPN1 presente nessas células, e nos trofoblastos placentários (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Oats, 2007; Chaston et al, 2008). A ativação da expressão da hepcidina leva a redução dos níveis séricos de ferro em aproximadamente 6 horas (Oates, 2007). Chaston et al (2008) encontraram uma resposta mais rápida a hepcidina nos macrófagos do que em células intestinais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo uma resposta mais aguda das células envolvidas na reciclagem do ferro hêmico em comparação as células envolvidas na absorção do ferro dietético. A flebotomia, a hemólise e o estímulo para a reticulocitose inibem a produção de hepcidina, levando a um aumento na assimilação do ferro proveniente da dieta. Em algumas doenças crônicas e na inflamação, existe um aumento na expressão da hepcidina (Chaston et al, 2008).

A expressão da hepcidina é regulada em parte por outras três proteínas, a hemojuvelina (HJV), o receptor de transferrina 2 (TfR2) e a proteína da hemocromatose (HFE) (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006). Mutações nessas moléculas e na β_2 -microglobulina, que interage com o HFE na superfície da célula, leva ao fenótipo da hemocromatose, na qual a expressão da hepcidina está diminuída ou não responsiva ao excesso de ferro dietético (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006), levando a uma sobrecarga de ferro no organismo.

A HJV, membro da família de co-receptores da proteína morfogênica dos ossos (BMP), parece atuar para regular positivamente a expressão da hepcidina. Estudos realizados em ratos sugerem que a HJV age como um co-receptor que se liga a BMP 1 ou 2 e aos receptores BMP tipo 1 ou tipo 2 na superfície celular. O complexo HJV-BMP-receptor/BMP induz uma cascata de sinalização que aumenta diretamente a expressão da hepcidina. A HJV é ligada à membrana celular pela glicosilfosfatidilinositol, embora sua forma solúvel também já tenha sido identificada (HJVs). Existe a hipótese de que a HJVs compete com a HJV ligada à membrana celular, inibindo a cascata de sinalizações que induz a expressão da hepcidina (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006).

O principal mecanismo de controle da produção de hepcidina parece acontecer através da competição das proteínas transferrina e HFE pela ligação ao receptor de transferrina 1 (TfR1) no fígado. Em uma condição normal ou de sobrecarga de ferro, a transferrina diférrica liga-se preferencialmente ao TfR1, impedindo a ligação HFE/TfR1. O HFE não ligado ao TfR1, presente na superfície das células, transmite um sinal ao núcleo dos hepatócitos, estimulando a produção de hepcidina. Quando o HFE está ligado ao TfR1, a transmissão desse sinal ao núcleo é interrompida.

Nos indivíduos saudáveis, aproximadamente 30% dos sítios de ligação de ferro na Tf estão ocupados e nesse nível de saturação, a maioria dos TfR1 estarão ligados a Tf diférrica, deixando o HFE livre na superfície dos hepatócitos para estimular a produção de hepcidina. Com a redução das reservas corporais de ferro, e conseqüente declínio da saturação da transferrina, há um favorecimento da ligação do HFE ao TfR1, e aumento da expressão do TfR1 na superfície do hepatócito. Assim, aumentam as ligações entre o HFE e o TfR1 e o sinal para a síntese de hepcidina diminui, levando a uma redução dos níveis de hepcidina sanguíneos e aumento da absorção intestinal de ferro. Mecanismo contrário ocorre na sobrecarga de ferro (Frazer and Anderson, 2003; Anderson et al, 2007).

Homólogo do TfR1, o TfR2 está restrito aos hepatócitos, a cripta das células intestinais e aos eritrócitos (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004). A ligação da Tf diférrica ao TfR2 produz um sinal no núcleo do hepatócito, aumentando a expressão da hepcidina similar ao efeito causado pela HFE livre. Com a queda dos níveis de Tf diférrica, ou seja, na deficiência de ferro, os receptores TfR1 e TfR2 competem pela Tf diférrica, que se liga preferencialmente ao TfR1 que possui 25 a 30 vezes maior afinidade à Tf diférrica que o TfR2. Isso reduz o sinal para a síntese da hepcidina, mediado pelo complexo Tf diférrica/TfR2, resultando no aumento da absorção intestinal de ferro. Com a queda dos níveis de ferro, a regulação negativa na expressão do TfR1 muda a competição em favor do TfR2, causando um aumento na expressão da hepcidina e redução na absorção intestinal do ferro. A Tf diférrica regula positivamente a expressão do TfR2 e provoca a sua redistribuição na superfície celular, aumentando a produção de hepcidina, quando os níveis de ferro estão altos (Frazer and Anderson, 2003; Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Papanikolaou et al, 2005).

Sugere-se que a eritropoiese seja o mediador da expressão da hepcidina, sendo que o aumento da primeira inibiria a expressão da segunda, o que facilita a exportação do ferro do sistema reticuloendotelial e dos enterócitos para a medula óssea, aumentando a disponibilidade de ferro para a eritropoese. A anemia e a hipóxia também suprimem a expressão da hepcidina (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006).

A modulação da expressão de hepcidina pelo estado corporal de ferro parece ser a via predominante na regulação da homeostase do ferro, entretanto o processo inflamatório também é capaz de induzir a produção de hepcidina e, portanto, modificar o status de ferro. Em situações de infecção e inflamação, as citocinas, como a interleucina-6 (IL-6), podem induzir a expressão da hepcidina nos macrófagos e neutrófilos, provocando a retenção de ferro nos tecidos e inibição da absorção (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006). As citocinas estimulam a retenção de ferro pelos macrófagos, reduzindo a disponibilidade de ferro no sistema circulatório, desfavorecendo o crescimento de microrganismos, entretanto, esta estratégia fisiológica pode provocar a anemia observada nos estados inflamatórios (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004).

Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas, com existência independente, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, o que os torna instáveis e altamente reativos (Ramos et al, 2000; Halliwell and Gutteridge, 2001a). A formação de radicais livres acontece a partir da perda ou ganho de um elétron por uma espécie não radicalar ou pela quebra da ligação covalente de forma homogênea, onde os elétrons do par compartilhado se separam, ficando um elétron com cada átomo (fissão homolítica) (Halliwell and Gutteridge, 2001a). No organismo humano são produzidos não só os radicais livres, mas as espécies reativas de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio (EROs), sendo esse último o mais reativo. As espécies reativas embora não apresentem elétrons desemparelhados podem participar de reações catalisadas por metais de transição, gerando radicais livres. A geração de RL pode ocorrer em qualquer compartimento celular, porém a mitocôndria é o principal sítio. Mais de 90% do oxigênio consumido no organismo humano é utilizado pela mitocôndria na cadeia de transporte de elétrons para redução completa do oxigênio molecular (O_2) a duas moléculas de água através da adição de 4 elétrons. Porém, estima-se que 1 a 4% do O_2 pode ser reduzido de forma incompleta originando as EROs. A geração de RL também ocorre no organismo humano durante a diferenciação, proliferação (induzindo a mitose celular em baixas concentrações) e em sistemas de sinalização celular. Fatores de crescimento e citocinas são capazes de desencadear em células não fagocitárias a produção de EROs para controle do processo inflamatório. Observa-se um aumento dessas espécies reativas na presença de alguns fatores como atividade física extenuante, o envelhecimento natural, o fumo, o consumo de bebidas alcoólicas, o estresse, a poluição, a radiação, a infecção e nas doenças crônicas não transmissíveis como o câncer, o diabetes, a hipertensão arterial, as doenças cardiovasculares, renais, hepáticas, degenerativas, entre outras (Ramos et al, 2000; Polla et al, 2003; Valko, 2006; Genestra, 2007).

O O_2 no estado basal apresenta 2 elétrons desemparelhados com spins paralelos em dois orbitais atômicos distintos, localizados na última camada eletrônica, sendo este o estado mais estável do O_2 . O O_2 se encaixa na definição de radical livre, agindo como agente oxidante. No entanto, para se estabilizar o O_2 no estado basal precisa receber 2 elétrons com spins de mesma direção entre si e antiparalelos aos spins já presentes em seus orbitais. Esta restrição ao recebimento de elétrons pelo O_2 no estado basal faz com que o mesmo reaja de forma lenta com espécies não radicalares. Formas mais reativas do O_2 , como os oxigênios singleto, podem ser formadas com o fornecimento de energia. De acordo com a quantidade de energia absorvida, um dos elétrons do O_2 pode ter a direção de seu spin invertida, pareando com o elétron de spin antiparalelo presente no outro orbital atômico, ou o elétron pode manter-se no mesmo orbital atômico, porém ocorre a inversão do spin, tornando a molécula mais reativa e conseqüentemente tendo uma meia-vida curta (Halliwell and Gutteridge, 2001a).

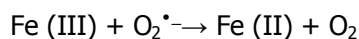
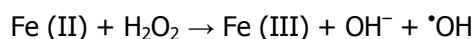
Na redução incompleta do O_2 , quando esse recebe um a dois elétrons ocorre a geração do radical livre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e da ERO peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente,

compreendendo juntamente com o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) as principais espécies reativas de oxigênio.

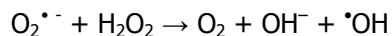
O radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ é considerado uma ERO primária, apresenta-se no estado de redução de 1 elétron do O_2 e pode ser formado em reações de autooxidação e na cadeia de transporte de elétrons. O $\text{O}_2^{\cdot-}$ possui uma menor reatividade se comparado ao radical hidroxil, podendo se difundir a maiores distâncias. Este RL é capaz de provocar ainda a liberação de ferro de proteínas sulfuradas, como as enzimas que contém o grupamento [4Fe-4S] e da ferritina (Ramos et al, 2000; Halliwell and Gutteridge, 2001b; Valko, 2006; Genestra, 2007).

O radical $\cdot\text{OH}$ encontra-se no estado de redução de 3 elétrons, pode ser gerado a partir do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 (Reação 2 – reação de Haber-Weiss), pela ação da radiação, decomposição do peroxinitrito (ONOO^-), entre outros. É uma das espécies de maior reatividade e conseqüente meia-vida curta, cerca de 10^{-9} segundos *in vivo*, e uma pequena difusão, reagindo com todas as biomoléculas. (Ramos et al, 2000; Halliwell and Gutteridge, 2001a; Halliwell and Gutteridge, 2001b; Valko, 2006; Genestra, 2007).

Reação 1. Reação de Fenton



Reação 2. Reação de Haber-Weiss



O H_2O_2 não é um radical livre, mas está entre as EROs de maior reatividade, podendo promover a oxidação de biomoléculas. Apresenta-se no estado de redução de 2 elétrons, sua formação pode acontecer a partir da dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, da redução incompleta do O_2 ou como subproduto das enzimas oxidase, xantina e urato, sendo a mitocôndria responsável por gerar quantidades significativas de H_2O_2 . Em condições fisiológicas, cerca de 2% do O_2 captado pelo organismo dá origem ao H_2O_2 . Apesar de ser pouco reativo o H_2O_2 pode interagir com metais de transição como o Fe e o Cu, originando o radical livre $\cdot\text{OH}$ (Reações 1 e 2). Em altas concentrações tem ação desinfetante. O H_2O_2 pode degradar heme-proteínas como a mioglobina, hemoglobina e citocromo c, liberando o ferro. É hidrossolúvel podendo se difundir no meio intracelular e através das membranas celulares, possivelmente pelos canais de água presentes nas mesmas (Ramos et al, 2000; Halliwell and Gutteridge, 2001a; Halliwell and Gutteridge, 2001b; Valko, 2006; Genestra, 2007).

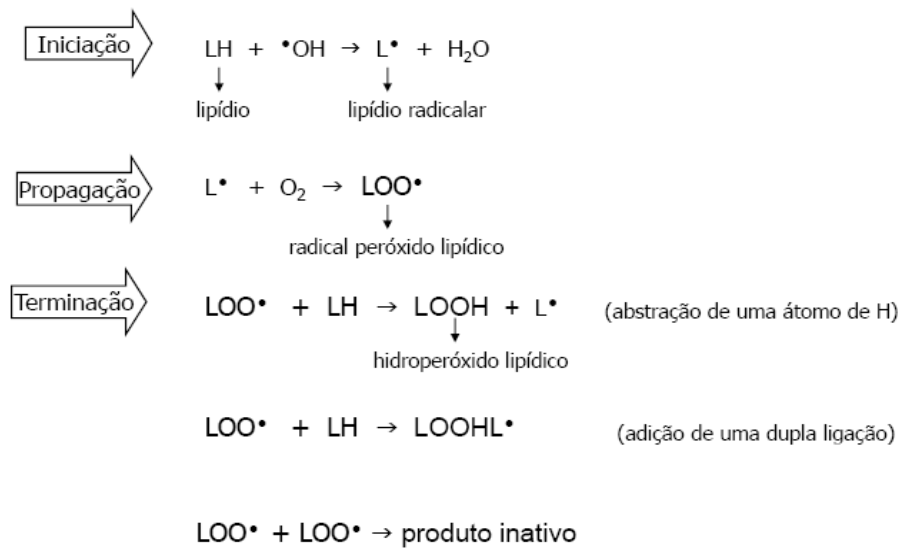
Os radicais alcóxil ($\text{RO}\cdot$) e peróxil ($\text{ROO}\cdot$) possuem poder oxidante, sendo formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e de reações de radicais de carbono com o O_2 (Halliwell and Gutteridge, 2001b). A química do radical peróxil varia de acordo com a natureza do radical R, o meio e a concentração de O_2 e outros reagentes. Os radicais peróxil estão envolvidos na clivagem do DNA e na modificação do esqueleto carbônico da proteína. (Halliwell and Gutteridge, 2001b; Valko, 2006).

O principal radical livre de nitrogênio, o óxido nítrico (NO^{\bullet}) é um radical alcoxil, gerado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) durante a conversão da arginina a citrulina. O NO^{\bullet} tem uma meia-vida de segundos em ambiente aquoso e maior estabilidade em meios com baixa concentração de O_2 . Por ser solúvel em meio aquoso e lipídico, o NO^{\bullet} difunde-se pelo citoplasma e atravessa a membrana plasmática. O NO^{\bullet} atua como importante sinalizador biológico em diversos processos como a neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento dos músculos lisos e na regulação do sistema imune. No meio extracelular, o NO^{\bullet} reage com H_2O e O_2 para formar nitrato e nitrito (Valko, 2006). Durante os processos inflamatórios as células do sistema imune produzem $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO^{\bullet} , que reagem entre si formando uma espécie reativa com maior potencial oxidativo, o ânion peroxinitrito (ONOO^{\bullet}) que pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica (Valko, 2006).

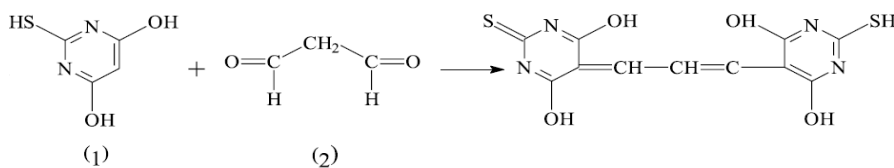
De forma geral as EROs podem reagir com biomoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos presentes no organismo humano roubando elétrons na tentativa de estabilizar-se, e assim promovendo modificações estruturais e funcionais nessas biomoléculas, que podem se tornar radicalares propagando as reações de geração de RL além de perderem suas funções biológicas, causando danos celulares (Ramos et al, 2000).

A oxidação de lipídios insaturados constituintes das membranas celulares por ação dos RL é denominada peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é constituída de 3 fases: iniciação, propagação e terminação (Reações 3) e ocorre através do ataque sucessivo de espécies radicalares a lipídios, que removem átomos de H do grupamento metileno ($-\text{CH}_2-$), gerando um lipídio radicalar que ao reagir com O_2 resulta em um radical peróxido. Esse radical peróxido lipídico pode então: 1) reagir com outra molécula de lipídio subtraindo desse um hidrogênio que o estabiliza na forma de hidroperóxido lipídico enquanto a outra molécula torna-se então radicalar ou 2) reagir com outro lipídio formando um aduto radicalar ou 3) reagir com outro radical, estabilizando-se. A formação do hidroperóxido lipídico pode alterar a fluidez da membrana celular, levando ao seu rompimento e conseqüente liberação de proteases e íons de cálcio, induzindo a morte celular. Os lipídios oxidados podem ser degradados em aldeídos (como o malondialdeído) que são tóxicos à célula, cetonas ou hidrocarbonetos (como os dienos conjugados). O malondialdeído (MDA) é um aldeído, produto da peroxidação de lipídios insaturados e tem sido largamente utilizado como biomarcador do dano oxidativo a lipídios celulares através de reações com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Reação 4). O MDA ainda é capaz de reagir com proteínas e bases nitrogenadas, sendo, portanto um produto tóxico (Ramos et al, 2000; Halliwell and Gutteridge, 2001c; Griffiths et al, 2002; Valko, 2006).

Reação 3. Peroxidação lipídica



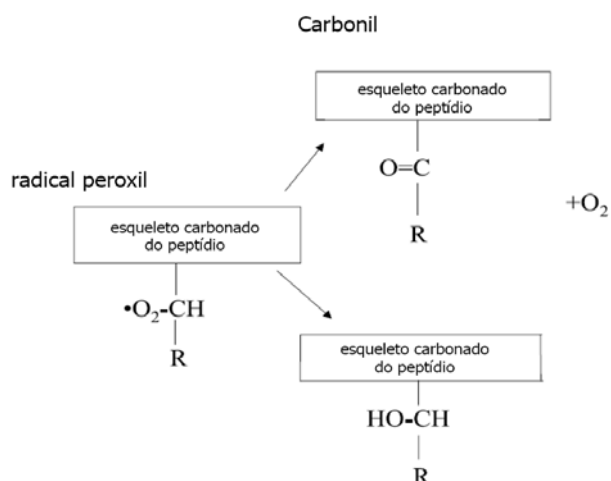
Reação 4. Reação do TBA (1) e MDA (2) resultando no complexo TBA-MDA



Fonte: Griffiths et al, 2002.

Na oxidação protéica pode ocorrer a introdução de um novo grupo funcional, como o hidroxil e o carbonil, que contribuem para uma alteração da função e do turnover protéico (Griffiths et al, 2002). O radical $\cdot\text{OH}$ promove a abstração de um átomo de hidrogênio da cadeia polipeptídica da proteína resultando na formação de um radical de carbono central, que reage com O_2 formando o radical peróxido que reage com a forma protonada do $\text{O}_2^{\cdot -}$ ($\text{HO}_2\cdot$) originando o alcóxido peróxido. Na ausência de metais de transição, as proteínas são resistentes à ação do H_2O_2 , mas os radicais hidroxil e alcóxido podem provocar a clivagem das ligações peptídicas (Valko, 2006). A oxidação de proteínas por ação das espécies reativas pode promover alterações conformacionais, alterações da atividade de enzimas e quebra das ligações peptídicas (Ramos et al, 2000). O grupamento carbonil é um produto ubíquo da oxidação que surge nas cadeias laterais dos aminoácidos, bem como nos carboidratos e lipídios (reação 5). A proteína carbonilada é um biomarcador genérico, pois é produto da oxidação de diferentes aminoácidos (Griffiths et al, 2002).

Reação 5. Formação do grupamento carbonil.

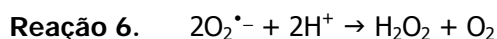


Fonte: Griffiths et al, 2002.

Para evitar a geração de danos oxidativos catalisados por EROs os organismos aeróbios desenvolveram sistemas de defesas antioxidantes, e o equilíbrio entre a geração das espécies reativas e as defesas antioxidantes determina o estado de saúde ou doença. Antioxidante é qualquer substância que presente em baixa concentração (comparada com uma substância oxidável) retarda ou inibe a velocidade de oxidação do substrato. O sistema de defesa antioxidante se divide em enzimático e não-enzimático (Ramos et al, 2000).

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem as vitaminas C, E (α -tocoferol), β -caroteno e a glutatona reduzida (GSH), polifenóis com os flavonóides, entre outros. A atuação desses antioxidantes ocorre por interrupção da cadeia de reações oxidativas. A vitamina C pode agir como agente redutor, doando elétrons aos radicais livres, e consequentemente tornando-se radicalar. A vitamina E por ser lipossolúvel, é capaz de inibir as reações de propagação da peroxidação lipídica. A glutatona é um tripeptídeo (Glu-Cys-Gly) que atua como co-substrato de enzimas antioxidantes e como seqüestrador do radical $\cdot\text{OH}$. As defesas não-enzimáticas compreendem ainda as proteínas que se ligam aos metais de transição, como a transferrina, a ferritina e a ceruloplasmina não deixando esses metais disponíveis para catalisarem reações, como a reação de Fenton (reação 1) (Ramos et al, 2000).

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona-peroxidase dependente de selênio (SeGPX ou GPX), glutatona-S-transferase (GST) e glutatona-redutase (GR). A enzima SOD catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (reação 6) e apresenta diferentes isoformas de acordo com o metal a qual está associada (cobre, zinco, manganês, ferro).



A CAT é responsável pela degradação do H_2O_2 a H_2O e O_2 , enquanto a SeGPx, catalisa reações de degradação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, através da oxidação da glutatona. A redução da glutatona-oxidada (GSSG) a glutatona reduzida (GSH) é catalisada pela enzima GR, utilizando como co-fator a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). A SeGPx e a GR são encontradas no citoplasma e na mitocôndria. A enzima GST possui atividade de glutatona-peroxidase independente de selênio, reduzindo peróxidos orgânicos (Ramos et al, 2000; Valko, 2006). Por ser o maior sítio de geração de radicais livres, a mitocôndria possui altas concentração de antioxidantes como GR, SOD e GPX, em ambos os lados das suas membranas, em relação aos demais compartimentos celulares, para minimizar o estresse oxidativo (Valko, 2006) (Figura 2).

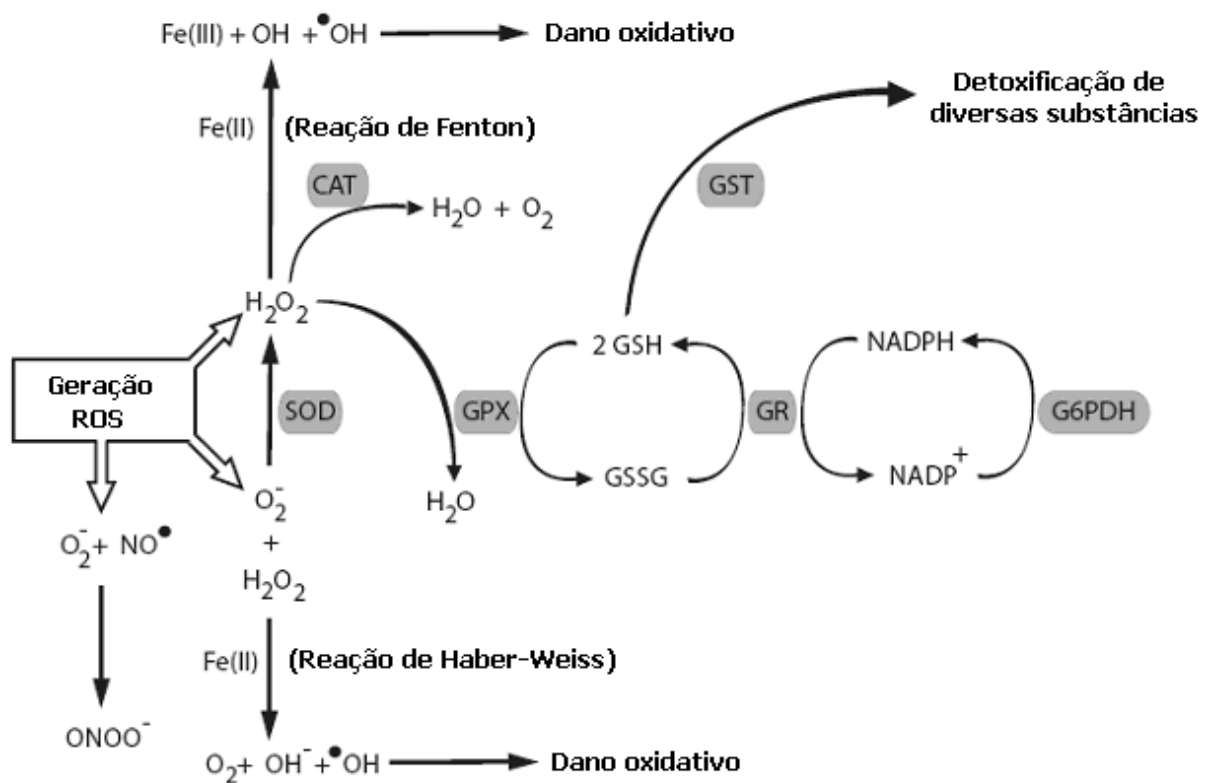


Figura 2. Defesas antioxidantes enzimáticas.

Fonte: Halliwell and Gutteridge, 2001.

O sistema de defesa antioxidante também pode ser dividido em dois grupos. Um grupo que atua na cadeia do radical, inibindo os mecanismos de ativação do mesmo e prevenindo o início das reações de oxidação, como as proteínas que se ligam aos metais de transição (ferritina, transferrina, ceruloplasmina) e a citocromo-oxidase (enzima do complexo IV da cadeia respiratória). Enquanto o outro grupo de antioxidantes atua neutralizando o radical já formado interrompendo a cadeia de propagação, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e

as moléculas chamadas "antioxidantes suicidas" como o tocoferol, os carotenóides e as ubiquinonas atuando em meio lipossolúvel e ácido ascórbico e ácido úrico em meio hidrossolúvel (Genestra, 2007).

Ferro, estresse oxidativo e processos patológicos

O estresse oxidativo ocorre quando há uma produção excessiva de oxidantes ou uma redução na concentração de antioxidantes. Esse desequilíbrio resultará em danos a biomoléculas como os lipídios, proteínas e DNA (Ramos et al, 2000; Junqueira et al, 2004; Genestra, 2007).

O processo oxidativo é acelerado pela presença de metais de transição como o ferro e o cobre (Genestra, 2007). As propriedades químicas do ferro como metal de transição podem explicar sua toxicidade, uma vez que o ferro livre na forma Fe^{2+} pode apresentar nenhum ou 4 elétrons desemparelhados e na forma Fe^{3+} pode apresentar 1 ou 5 elétrons desemparelhados no último orbital (Halliwell and Gutteridge, 2001b), o que lhe confere a capacidade de receber e transferir elétrons, participando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células. O pool de ferro lábil, composto por ambas as formas Fe^{2+} e Fe^{3+} , queladas fracamente por compostos de baixa massa molecular como o citrato, fosfato, carboxilatos, nucleotídeos, rapidamente podem atravessar a membrana celular. No citoplasma, uma fração significativa do Fe^{3+} é reduzida a Fe^{2+} podendo participar da reação de Fenton (reação 1), na qual o Fe^{2+} reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou lipídios peroxidados, gerando Fe^{3+} , o íon OH^- , o radical hidroxil ($\cdot OH$) ou radicais de lipídios ($\cdot LO$ e $\cdot LOO$). Esses radicais causam danos a membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucléicos, podendo resultar em estados patológicos (Levenson and Tassabehji, 2004; Polla et al, 2003; Armutcu et al, 2004; Gardi et al, 2002; Swanson, 2003; Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Valko, 2006).

O ferro pode agir como agente carcinogênico ou co-carcinogênico através da indução do estresse oxidativo, facilitação do crescimento tumoral e modificação do sistema imune (Deugnier, 2003). Estudos *in vivo*, *in vitro* e achados clínicos suportam a evidência de que o ferro, por meio da catalise de reações de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres (RL), tem participação na iniciação (dano ao DNA, como a oxidação de bases nitrogenadas e/ou a quebra de fitas simples ou dupla, e falha em repará-lo), promoção de alteração fenotípica, onde a anomalia em uma célula leva a desorganização do tecido ou progressão (desenvolvimento do câncer) da carcinogênese (Ramos et al, 2000; Deugnier, 2003; Huang, 2003; Valko, 2006). O ferro é necessário ao crescimento celular em baixas concentrações, no entanto pode promover a geração de EROs quando em excesso (Deugnier, 2003; Knobel et al, 2006). Muitos dos carcinogênicos são RL, podem ser convertidos em RL, podem estimular a produção de RL ou são produtos de reações com RL (Ramos et al, 2000). O radical $\cdot OH$ pode reagir com todos os componentes do DNA, danificando as bases nitrogenadas purinas e pirimidinas e a deoxirribose. O dano ao DNA pode resultar em interrupção ou indução da transcrição, indução de sinais para a transdução, erros de replicação e instabilidade genômica. Esse dano é o primeiro passo envolvido

na mutagênese, carcinogênese e no envelhecimento. O MDA assim como outros produtos da peroxidação lipídica também possuem efeito mutagênico e carcinogênico (Valko, 2006).

O fígado é um dos órgãos mais afetado pelos altos níveis de ferro no organismo, pois as células hepáticas constituem o principal sítio de armazenamento deste elemento, assim, a ingestão em excesso pode induzir a um acúmulo de ferro hepático. Esse excesso de ferro parece estimular a síntese de colágeno, iniciando a fibrogênese, e conseqüentemente, a necrose hepatocelular (Garde et al, 2002; Trinder et al, 2002; Huang, 2003). Além disso, danos ao DNA podem induzir uma proliferação e diferenciação desordenada das células tronco-hepáticas, resultando em carcinoma hepático (Trinder et al, 2002).

Um estudo realizado com 80 homens suplementados com sulfato ferroso (19 mg de ferro/dia) demonstrou um aumento nas concentrações de ferro de 60 para 300 $\mu\text{mol/L}$ e de 40% em radicais livres nas fezes destes indivíduos, aumentando o risco de desencadeamento do câncer de intestino (Lund et al, 1999). Knobel et al (2006) demonstraram *in vitro*, usando células humanas de tumores de cólon (HT28 clone 19A), que o dano ao DNA, o crescimento celular e a geração EROS são aumentados na presença de Fe^{3+} .

Wu et al (2004) realizaram um estudo de coorte prospectivo com 3000 homens e 3244 mulheres entre 35 e 74 anos, não portadoras de câncer no início do estudo, acompanhados durante 18 anos e verificaram um aumento do risco de morte por câncer entre os indivíduos com altos níveis séricos de ferro (com risco relativo de 1,66 e intervalo de confiança de 1,03 – 2,68 por 100 $\mu\text{g/dL}$ de ferro aumentado), saturação de transferrina (com risco relativo de 1,17 e intervalo de confiança de 1,01 – 1,368 por 10% de saturação de Tf) ou cobre (com risco relativo de 1,986 e intervalo de confiança de 1,12 – 3,50 por 100 $\mu\text{g/dL}$ de cobre aumentado), sendo a associação com a saturação de transferrina mais forte entre as mulheres e com o cobre entre os homens (Wu et al, 2004).

Doenças relacionadas à aterosclerose, como infarto do miocárdio, estão entre as maiores causas de morte, em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Como os fatores de risco explicam somente em parte estas mortes, têm sido desenvolvidos estudos com objetivo de investigar a relação entre ferro e doenças cardiovasculares. Estudos histopatológicos demonstram que o ferro em excesso é incorporado por macrófagos que aderem as placas ateroscleróticas, tornando-as mais instáveis. Esse excesso de ferro também aumenta a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Tuomainen et al, 1998; Salonen et al, 1992; Polla et al, 2003; Yuan et al, 2003). A obstrução de uma artéria provoca a interrupção do suprimento de sangue (isquemia) e conseqüentemente o aporte de O_2 para os tecidos é comprometido. Assim, a mitocôndria não produz ATP e os íons e as enzimas são liberadas degradando a célula. Com o retorno do suprimento sanguíneo ao tecido (reperfusão) e conseqüente reoxigenação, a mitocôndria volta a produzir ATP, mas ocorre nesse momento um aumento da geração de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ possivelmente devido ao vazamento de elétrons na mitocôndria; migração das células do sistema imune ao tecido ou pela ação da xantina-oxidase (enzima do catabolismo dos nucleotídeos que catalisa a

degradação da hipoxantina na presença de O_2 a xantina, H_2O_2 e $O_2^{\cdot -}$). A hipoxantina é formada durante a isquemia como resultado da degradação do ATP (Ramos et al, 2000). Durante a isquemia, a redução do pH facilita a liberação do ferro da ferritina e transferrina (Selim and Ratan, 2004)

O cérebro é um órgão metabolicamente muito ativo, chegando a consumir $\frac{1}{4}$ do O_2 corporal. E o ferro é o metal de transição mais abundante no cérebro, sendo essencial para o adequado funcionamento neuronal. A síntese de vários neurotransmissores, a formação da bainha de mielina e o desenvolvimento das conexões dendríticas dependem de ferro (Selim, 2004). O envolvimento do ferro em processos neurodegenerativos, como o Mal de Alzheimer, tem sido sugerido (Smith, 1997). Nessa patologia, as alterações na homeostase do ferro foram evidenciadas por meio do aumento das concentrações séricas de uma proteína que se liga ao ferro, denominada p97. O acúmulo de ferro está relacionado com o aparecimento das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares, típicos dessa enfermidade (Kennard et al, 1996; Polla et al, 2003). Acredita-se que o acúmulo de ferro nos neurônios provoque a peroxidação lipídica das membranas destas células, tornando-as mais susceptíveis a toxinas, que causam disfunção celular (Selim and Ratan, 2004; Keller et al, 1997; Polla et al, 2003; Quintana et al, 2006).

A teoria do envelhecimento, como um todo e da pele, pela oxidação é fundamentada na perda do equilíbrio entre agressores oxidantes e defensas antioxidantes, e na evidência de que muitas doenças associadas à idade são causadas pelo aumento da produção ou exposição a oxidantes e subsequentes doenças oxidativas (Polla et al, 2003). Com o envelhecimento, ocorre redução das reservas de compostos antioxidantes, o que torna importante o consumo dessas substâncias na dieta habitual e observam-se maiores níveis séricos de biomarcadores de estresse oxidativo (Ramos et al, 2000; Levenson and Tassabehji, 2004; Junqueira et al, 2004). Além disso, há um maior escape de elétrons da mitocôndria devido à alteração da composição de lipídios da membrana mitocondrial, e conseqüentemente o O_2 é reduzido de forma incompleta, aumentando a geração do radical superóxido (Ramos et al, 2000). Junqueira et al (2004) observaram uma correlação positiva e significativa entre a idade e os níveis séricos de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) ao estudarem 503 indivíduos saudáveis.

Devido ao envolvimento do ferro na produção de EROs, o uso de compostos quelantes de ferro ou a sua privação controlada tem sido apontada como uma terapia alternativa para as patologias associadas ao estresse oxidativo e envelhecimento (Levenson and Tassabehji, 2004; Yuan and Li, 2003; Tuomainen et al, 1998; Salonen et al, 1992).

Com base no exposto acima, foi proposto o presente projeto com o objetivo de investigar possíveis associações e correlações entre o estado nutricional, a ingestão de ferro e os biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos adultos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*, 2007 DOI 10.107/s10534-006-9030-2.

Armutcu F, Gurel A, Aker A. Serum iron concentrations, lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in Turkish iron miners. *Environmental Geochemistry and health* 2004; 26: 1 - 4.

Assunção MCF, Santos IS, Barros AJD, Gigante DP, Victora CG. Efeito da fortificação de farinhas com ferro sobre anemia em pré-escolares, Pelotas, RS. *Rev Saúde Pública* 2007; 41 (4): 539 - 48.

Beard JL & Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr* 2003; 23: 4158.

Bovell-Benjamin AC, Ginard JX. Novel approaches and application of contemporary sensory evaluation practices in iron fortification programs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2003; 43(4): 379 - 400.

Brasil. Ministério da Saúde e Unicef, Cadernos de atenção básica: Carências de micronutrientes, Bethsáida de Abreu Soares Schmitz. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de atenção à saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Brasil. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. [acesso 2006 out]. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public>>.

Buijsse B, Feskens EJ, Moschandreas J, Jansen EH, Jacobs Jr DR, Kafatos A et al. Oxidative stress, and iron and antioxidant status in elderly men: differences between the Mediterranean south (Crete) and northern Europe (Zutphen). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007, 14: 495 - 500.

Canonne-Hergaux F, Donavan A, Delaby C, Wang H-J, Gros P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G156 - G163.

Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srani SK, Sharp P. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 2008; 57: 374 - 382.

Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. Inorganic Biochemistry* 2002; 91: 9 - 18.

Cozzi A, Santambrogio P, Corsi B, Campanella A, Arosio P, Levi S. Characterization of the I-ferritin variant 460InsA responsible of a hereditary ferritinopathy disorder. *Neurobiology of Disease* 2006; 23: 644 - 652.

Deugnier Y. Iron and liver cancer. *Alcohol* 2003; 30: 145 - 150.

Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 2006; 17(2): 93 - 100.

Fleming DL, Tucker KL, Jacques PF, Dallal GE, Wilson PWF, Wood RJ. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort 2002; 76: 1375 - 1384.

Gardi C, Arezzini B, Fortino V, Comporti M. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2002 Oct 1; 64(7): 1139 - 45.

Frazer DM, Anderson GJ. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2003; 30: 288 - 297.

Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. *Cellular signaling* 2007; 19: 1807 - 1819.

Graham RS, Chua ACG, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 2007; 13 (35): 4725 - 4736.

Griffiths HR, Moler L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke Mi, Coolen S, Haenen G,
Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella Al, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB. Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*, 2002; 23: 101 - 208.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press 2001. p. 1 -35. (a)

Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related reactive species. In: Free radicals in biology and medicine. 3^a ed. Oxford University Press 2001. p. 36 - 104. (b)

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004; 117: 285 - 297.

Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutation Research* 2003; 533: 153 - 171.

Junqueira VBC, Barros SMB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 2004; 25: 5 - 16.

Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid β -peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 1997; 69: 273 - 284.

Kennard ML, Feldman H, Yamada T, Jefferies WA. Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996; 2: 1230 - 1235.

Knobel Y, Gleit M, Osswald K, Pool-Zobel BL. Ferric iron increases ROS formation, modulates cell growth and enhances genotoxic damage by 4-hydroxynonenal in human colon tumor cells. *Toxicology in vitro* 2006; 20(6): 793 - 800.

Lahti-Koski M, Valsta LM, Alfthan G, Tapanainen H, Aro A. Iron status of adults in the capital area of Finland. *Eur J Nutr* 2003; 42: 287 - 92.

Levenson CW, Tassabehji NM. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Research Reviews* 2004; 3: 251 - 263.

Lund EK, Wharf SG, Fairweather-Tait S, Johnson IT. Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 250 - 255.

Martínez-Navarrete N, Camacho MM, Martínez-Lahuerta J, Martínez-Monzó J, Fito P. Iron deficiency and iron fortified food – a review. *Food Research International* 2002; 35: 225 - 231.

Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jürgensen KSL. Iron status in Danish men, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2002; 68: 332 - 40.

Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jürgensen KSL. Iron status in Danish women, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2003; 71: 51 - 61.

Milman N, Pedersen AN, Ovesen L, Schroll M. Iron status in 358 apparently healthy 80 years old danish men and women: relation to food composition and dietary and supplemental iron intake. *Ann Hematol* 2004; 83: 423 - 29.

National Academy of Science, Dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc 2001. [Acessado em 2008 junho]. Disponível em www.nap.edu

Oats PS. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. *Histology and Histopathology* 2007; 22: 791 - 804.

Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 202: 199 - 211.

Petrak J, Vyoral D. Hephaestin – a ferroxidase of cellular iron export. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37: 1173 - 1178.

Polla AS, Polla LL, Polla B. Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Research Review* 2003; 2: 25 - 37.

Quintana C, Bellefqih S, Laval JY, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Ávila J, Ferrer I, Arranz R, Patino C. Study of the localization of iron, ferritin and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *Journal of Structural Biology* 2006; 153: 42 - 54.

Ramos GR, Alves ALH, Hermes-Lima M. Radicais livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal. In: El-Hani CN; Videira AAP. (Org.). *O Que é Vida? Para Entender a Biologia do Século XXI*. Rio de Janeiro: Editora Relume Dumará, 2000, p. 209 - 231.

Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992; 86: 803 - 811.

Selim MH, Ratan RR. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing research reviews* 2004; 3: 345 - 353.

Smith MA, Harris PLR, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9866 - 9868.

Swanson CA. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. *Alcohol*, 2003; 30: 99 - 102.

Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 2002; 51: 290 - 295.

Tuomainen TP, Punnonen K, Nyysönen K, Salonen J. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation* 1998; 97: 1461 - 1466.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1 - 40.

Van der A DL, Peeters PHM, Grobbee DE, Marx JJM, Van der Schouw YT. Dietary haem iron and coronary heart disease in women. *European Heart Journal* 2005; 26: 257 - 262.

Yuan XM, Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* 2003; 35: 578 - 591.

Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet* 2007; 370: 511 - 20.

Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ. The global burden of chronic diseases. Overcoming impediments of prevention and control. *JAMA* 2004; 291: 2616 - 22.

Yuan XM, Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* 2003; 35: 578 - 91.

WHO/FAO. Technical report series 916. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, Switzerland, 28 January - 1 February, 2002.

Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smit E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann Epidemiol*, 2004; 14: 195 - 201.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar possíveis associações e correlações entre o estado nutricional e a ingestão de ferro e os biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos adultos.

Objetivos específicos

- Verificar possíveis correlações e associações entre os níveis séricos de lipídios peroxidados e a concentração de ferritina e hemoglobina sérica e o consumo de ferro dietético total, hêmico e inorgânico;
- Verificar possíveis correlações e associações entre os níveis séricos de proteína oxidada e a concentração de ferritina e hemoglobina sérica e o consumo de ferro dietético total hêmico e inorgânico;
- Estimar a prevalência de sobrecarga de ferro e anemia na população estudada;
- Estimar a prevalência de inadequação do consumo habitual de ferro dietético total na população estudada;
- Avaliar a contribuição das farinhas fortificadas no consumo de ferro dietético.

Artigo original 1

**Estado nutricional de ferro e estresse oxidativo
em adultos, um estudo preliminar.**

Manuscrito aceito para publicação na revista
Nutrition – The International Journal of Applied and Basic Nutrition Science

Iron status and oxidative stress biomarkers in adults, a preliminary study.

Association between iron status and oxidative stress.

Juliana Frossard Ribeiro Mendes, MSc^{a*}, Sandra Fernandes Arruda, PhD^{a,b}, Egle Machado de Almeida Siqueira PhD^{a,c}, Marina Kiyomi Ito PhD^{a,b} and Eduardo Freitas da Silva PhD^d.

^aPost-graduate Program in Human Nutrition at the University of Brasília - Brazil

^bDepartment of Nutrition, University of Brasília - Brazil

^cDepartment of Cellular Biology, University of Brasília - Brazil

^dDepartment of Statistics, University of Brasília – Brazil

J.F.R. Mendes responsible for: data collection, data analysis, writing the manuscript; S.F.ARRUDA responsible for: project design, guided data collection and analysis, writing the manuscript. E.M.A.Siqueira responsible for: project design, guided data collection and analysis, writing the article; M.K.Ito responsible for: project design; E.F.Silva responsible for: statistical analysis.

*Corresponding author: e-mail: jufrossard@gmail.com , Tel: + 55 61 33072042, Fax: + 55 61 32733676, Address: Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, ICC sul, subsolo, Módulo 3, Laboratório de Biofísica – Asa Norte, Brasília, Brazil – CEP:70910900.

Word count for the entire manuscript (including references, figures and tables): 4,530.

Number of figures and tables: 6 (3 tables and 3 figures)

ABSTRACT

Objective Although essential to many vital processes, iron catalyzes reactions that produce reactive oxygen species, which have been associated to the increased risk of non-communicable chronic diseases and precocious ageing. This study aims to investigate whether ferritin, hemoglobin concentration and dietary iron consumption are related to oxidative stress biomarkers in adults. **Research methods and procedures** Data were collected from 134 allegedly healthy subjects over 18 who were randomly selected to participate in a transversal study as part of a pilot project on the *Prevalence of risk factors for non-communicable chronic diseases in the Federal District – Brazil (VIVA Saúde-DF)*. Serum ferritin, malondialdehyde (MDA) and carbonylated protein (PC) concentrations, hemoglobin (Hb) and dietary iron consumption were analyzed. **Results** A weak positive correlation ($r = 0.189$, $p = 0.032$) and association ($p = 0.046$) was observed for serum ferritin and MDA. Hemoglobin concentrations were positively associated with serum MDA ($p = 0.040$, respectively). Dietary iron intake and serum protein carbonyl concentrations showed a weak positive correlation ($r = 0.173$, $p = 0.046$) for all subjects. Iron intake by women was positively associated with serum protein carbonyls ($p = 0.03$). A lower serum MDA concentration was found in ferritin deficient subjects ($p = 0.015$) and anemic men ($p = 0.011$). **Conclusion** These results suggest that low levels of iron may reduce oxidative stress.

Keywords: iron, oxidative stress, malondialdehyde, protein carbonyls, non-communicable chronic diseases.

INTRODUCTION

The prevalence of non-communicable chronic diseases (NCD) is increasing and tends to intensify with the ageing of populations [1]. The worldwide prevalence of chronic disease mortality in 2001 was 46% and is expected to rise to 57% by 2020 [2]. In Brazil, this figure increased from 34% in 1979 to 48% in 2003. Currently, Brazil's elderly population accounts for 8.6% of the total population, exceeding the 7% benchmark established by the World Health Organization (WHO) to characterize an ageing population. It is estimated that by 2025, Brazil will have one of the ten largest elderly populations in the world [3].

The etiology of cancer, diabetes, cardiovascular and neurodegenerative diseases and aging has been linked to oxidative damage to DNA, protein and lipid, which is catalyzed by reactive oxygen species (ROS) [4-8]. Though iron is essential to vital biochemical processes, it also catalyzes the production of ROS [4,8], which means that iron overload may increase oxidative cellular stress. An increased prevalence of iron overload, especially amongst healthy men, postmenopausal women and elderly individuals, has been widely described and attributed to changes in dietary habits, such as the consumption of more meat, alcohol, vitamin C and iron supplements or fortification [9-14].

Like other Latin American countries, Brazil has a national program to combat iron deficiency by fortifying all wheat and corn flour with iron and folic acid [15]. Considering the high iron oxidant potential and the rise in Brazilian life expectancy, there is the risk that the

indiscriminate fortification of flour with iron could also increase the prevalence of non-communicable diseases (NCD) in individuals with an adequate iron nutritional status.

In the present study, we investigate whether iron status and/or iron intake are related to oxidative stress biomarkers in adult individuals.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Data were collected from supposedly healthy subjects aged 18 to 86 who were taking part in the pilot project entitled *Prevalence of risk factors for non-communicable chronic diseases in the Federal District – Brazil* (VIVA Saúde-DF) conducted by the University of Brasília and the Federal District Department of Health. Households from two administrative areas of the Federal District were randomly selected from the Brazilian Institute of Geography and Statistics database from 2002. 120 households were selected from each administrative area, making a total of 240 in all. A draw was made of the residents aged 18 or over from each selected household to choose one individual from each as the sample subject. When a subject refused to participate in the study, a new draw was made. If the selected subject was absent on the first visit, more two visits were made before the household was replaced by the next-door household on the right hand side. Written informed consent was obtained from all the participants. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Health Science College at the University of Brasília.

All the subjects answered a questionnaire that provided socioeconomic information (education and income group), demographic information (age, sex, ethnic group), health information (drinking habits, smoking history, drug consumption, diseases) and nutritional status (body mass index calculated by dividing the weight in kg by the square of their height in m²).

Laboratory methods

Blood samples were collected following a 12h fast period, and the serum was obtained by centrifugation at 700 x g for 10 min at 4°C. Serum samples were stored in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and reduced glutathione (GSH) to a final concentration of 1.34 and 0.65 mmol/L, respectively, at -70°C [16].

Serum malondialdehyde (MDA) was measured by a fluorimetric method based on the reaction between MDA and thiobarbituric acid (TBA). 50 µL serum, 1 mL deionized water and 1 mL TBA 29 mmol/L in acetic acid was added to each tube, agitated and heated in a water bath at 100°C for 1 hour. After heating, 25 µL HCl 5 mol/L and 3.5 mL n-butanol was added and the tubes were agitated for 5 seconds. The alcoholic phase was separated by centrifugation at 900 x g for 10 minutes. The sample fluorescence at 547 nm was determined with excitation at 525 nm, in a spectrofluorometer (FP-777 JAS.CO). A standard curve was prepared using a 1,1,3,3-

tetraethoxypropane standard solution (Sigma, Germany) in the concentration range of 0-0.150 $\mu\text{mol/L}$, linearity of 0.98 [16].

The concentration of the protein carbonyl groups in the serum was determined spectrophotometrically based on the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine with protein carbonyls. Serum samples containing 500 μg protein (10 μL serum) were homogenized in 25 mmol/L Tris, pH 9.0, 6 mol/L urea to a final volume of 200 μL . Then, an equal volume of 20% trichloroacetic acid was added and centrifuged at 9,000 x g for 1 minute to precipitate the proteins, and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 200 μL 25 mmol/L Tris, pH 9.0, 6 mol/L urea using a brush tip and by vortexing. 700 μL 0.2% 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) in 2 mol/L HCl was added to the sample and 700 μL 2 mol/L HCl in the blank tube, respectively. Samples were agitated at 4°C for 15 minutes in a shaker (TE-420, Tecnal) at maximum speed, then 700 μL 20% trichloroacetic acid (TCA) was added to precipitate the proteins, followed by centrifugation at 9,000 x g for 1 minute, then the supernatant was discarded. The pellet was washed three times at room temperature with 1 mL ethyl acetate:ethanol, 1:1, vortexed and centrifuged at 9,000 x g for 1 minute, air dried and resuspended in 500 μL 500 mol/L potassium phosphate, pH 2.5, containing 6 mol/L guanidine HCl. This mixture was vortexed and agitated at 4°C for 30 minutes in a shaker. The absorbance was measured at 376 nm [17]. The total protein concentration was determined by the method described by Lowry et al [18]. The carbonyl content was expressed as nmol carbonyl groups/mg total protein with an extinction coefficient of 22,000 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

The serum ferritin was determined using an immunoassay ELISA kit (Katal biotecnologic, MG, Brazil). The detection limit of the method was 7.5 $\mu\text{g/L}$. The absorbance was measured at 450 nm wavelength and with a secondary filter at 630 nm in an absorbance microplate reader (ELX 800, Bio-tek, Winooski, Vermont, USA). The calibration curve was prepared with ferritin standards in a concentration range of 0-200 $\mu\text{g/L}$, linearity of 0.99. The serum ferritin cut-off points used to define iron depletion for adult women and men were < 10 $\mu\text{g/L}$ and < 20 $\mu\text{g/L}$, respectively, while the cut-off points to define high iron stores were serum ferritin > 120 $\mu\text{g/L}$ and > 250 $\mu\text{g/L}$, respectively.

Serum lipids (total cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol) and glycemia were determined using an automatic analyzer Konelab 60i (Thermo electron corporation, Wiener lab group, Rosario, Argentina) and hemoglobin was measured in Cell-Dyn 1800 (Abbott laboratories, Abbott Park, USA) at the laboratory of Brasilia University Hospital and regional hospitals run by the Federal District Department of Health. The serum hemoglobin cut-off points used to define anemia were values below 14 and 12 g/dL for men and women, respectively.

Dietary data

Dietary intake was assessed using four 24-hour dietary intake recalls, comprising one weekend day and three non-consecutive weekdays over a period of one year with intervals of

three months, carried out by trained dieticians and nutrition students. The quantities of foods consumed were reported in terms of normal servings. Nutrient intake was calculated using the NUTWIN software package (version 1.5, Federal University of São Paulo – Paulista Medical School, São Paulo, Brazil, 2002).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software (version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The normality of data distribution was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. The Mann-Whitney test was used to evaluate association and statistical significance for parameters which were not normally distributed. The participants were divided into categories (percentiles 25 and 75) according to their ferritin, hemoglobin and iron intake to assess associations between iron status and oxidative stress biomarkers. Data were expressed as median (range), mean \pm standard deviation and percentage. Spearman's correlation coefficient (r_s) was used to investigate the correlations between iron status, iron intake and oxidative stress biomarkers. Potential confounding factors (age, sex, ethnicity, education level, BMI, current smoking status, alcohol consumption, presence of diabetes and hypertension, serum cholesterol, serum triglyceride and HDL-cholesterol and glycemia) were tested by multivariate analysis using SAS software (version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). A $p < 0.05$ was considered as statistically significant and $p < 0.1$ was considered marginally significant.

RESULTS

After sorting, 135 individuals agreed to participate in the study and one subject was excluded because they had chronic kidney disease, bringing the total to 134 participants. The sample's median age was 37, and predominantly comprised woman of a low income and low educational level. The majority of the individuals reported no clinical complications, had never consumed alcohol or smoked and had a normal weight (Table 1).

TABLE 1 Characteristics of subjects.

	Values ($n = 134$)
Age (y)	37.0 (18.0 – 86.0)*
Sex (%)	
Men ($n = 50$)	37
Women ($n = 84$)	63
Ethnicity (%)	
Black ($n = 25$)	19
White ($n = 27$)	20

Medium brown (<i>n</i> = 51)	38
Other (<i>n</i> = 31)	23
Education (%)	
Illiterate (<i>n</i> = 10)	08
Basic education incomplet (<i>n</i> = 55)	41
Basic education (<i>n</i> = 36)	27
High school (<i>n</i> = 30)	22
College (<i>n</i> = 03)	02
Income level (\$/head/month) (%)	
≥ 190.00 [#] (<i>n</i> = 91)	68
190.01 – 570.00 (<i>n</i> = 32)	24
570.01 – 950.00 (<i>n</i> = 04)	03
> 950.00 (<i>n</i> = 01)	01
no answer (<i>n</i> = 06)	04
BMI (kg/m²)	24.5 (14.0 – 52.0) [*]
(%)	
Underweight (<i>n</i> = 07)	5
Normal weight (<i>n</i> = 58)	45
Overweight (<i>n</i> = 45)	35
Obesity (<i>n</i> = 20)	15
Smoking status (%)	
Smoker (<i>n</i> = 25)	19
Former-smoker (<i>n</i> = 34)	25
Nonsmoker (<i>n</i> = 75)	56
Alcohol consumption (%)	
Never (<i>n</i> = 68)	51
< 1 drinks/wk (<i>n</i> = 14)	10
1 – 6 drinks/wk (<i>n</i> = 23)	17
1 – 3 drinks/d (<i>n</i> = 19)	14
> 3 drinks/d (<i>n</i> = 10)	7
Clinical condition (%)	
Hypertension (<i>n</i> = 20)	15
Diabetes (<i>n</i> = 6)	4
Health (<i>n</i> = 108)	81

^{*} median (range)

[#] \$190,00/month correspond to a minimum wage in Brazil.

Serum MDA and PC concentrations were not significantly different between the sexes ($p = 0.246$ and $p = 0.291$, respectively). However, as expected, hemoglobin ($p < 0.0001$), serum

ferritin ($p < 0.0001$) and iron intake ($p < 0.0001$) values were higher in the male group (Table 2). According to ferritin and hemoglobin reference values, the prevalence of high iron stores was 0.07% and 0.1%, while the prevalence of anemia was 11.7% and 18.7% for women and men, respectively.

TABLE 2 Biochemical parameters and iron intake of subjects.

	Values	p
Glycemia (mg/dL) ($n = 127$)	84.9 (60.9 – 365.0)*	-
Lipid profile		
Total cholesterol (mg/dL) ($n = 127$)	178.2 ± 41.6 (87.0 – 339.0)**	-
HDL-cholesterol (mg/dL) ($n = 119$)	50.0 (29.0 – 126.0)*	-
Triglycerides (mg/dL) ($n = 127$)	111.0 (12.6 – 553.0)*	-
Oxidative status/profile		
Serum MDA (μmol/L) ($n = 131$)	1.0 (0.5 – 4.4)*	
Men	1.0 (0.6 – 4.1)*	
Women	0.9 (0.5 – 4.4)*	0.246#
Serum protein carbonyl (nmol/mg total protein) ($n = 132$)	1.2 (0.2 – 7.7)*	
Men	1.1 (0.2 – 0.7)*	
Women	1.2 (0.2 – 5.7)*	0.291#
Iron status/profile		
Serum ferritin (μg/L) ($n = 131$)	46.0 (1.3 – 355.9)*	
Men	95.0 (27.7 – 355.9)*	
Women	30.8 (1.3 – 183.0)*	0.0001#
Hb (g/dL) ($n = 126$)	13.8 ± 1.6 (8.3 – 17.7)**	
Men	15.0±1.2 (12.5 – 17.7)**	
Women	13.0±1.3 (8.3 – 16.6)**	0.0001#
Iron intake		
Iron (mg/dia) ($n = 107$)	13.2±5.9 (2.4 – 29.5)**	
Men	17.8±6.0 (2.4 – 24.8)**	
Women	10.9±4.3 (7.5 – 29.5)**	0.0001#

* median (range)

** mean ± DP (range)

men X women

A weak positive correlation was observed between serum ferritin and MDA values ($r = 0.189$, $p = 0.032$) and between iron intake and the concentration of serum carbonyl proteins ($r = 0.173$, $p = 0.046$) for all subjects (Table 3).

TABLE 3 Correlation coefficients (r) between oxidative biomarkers and iron status in subjects.

	Serum MDA ($\mu\text{mol/L}$)		Serum protein carbonyl (nmol/mg total protein)	
	r	p	r	p
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	0.189	0.032	- 0.052	0.555
Hb (g/dL)	0.147	0.105	- 0.030	0.740
Fe intake (mg/d)	0.084	0.338	0.173	0.046

Spearman's correlations

Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

When the studied population was divided into two groups according to the 25 and 75 percentiles for their ferritin, hemoglobin and iron intake, the serum ferritin and hemoglobin were positively associated with MDA ($p = 0.046$ and $p = 0.04$, respectively). Iron intake was positively associated with serum protein carbonyl in women ($p = 0.03$) (data not shown). The multivariate analysis shows that none of the potential confounding variables tested (age, sex, ethnicity, education level, BMI, current smoking status, alcohol consumption, presence of diabetes and hypertension, serum cholesterol, serum triglyceride and HDL-cholesterol and glycemia) influenced the MDA and PC biomarkers. Serum MDA concentrations were significantly lower in ferritin deficient subjects when compared to normal individuals ($p = 0.015$) (Figure 1) and were also lower in the anemic men than in the non-anemic men ($p = 0.011$) (Figure 2).

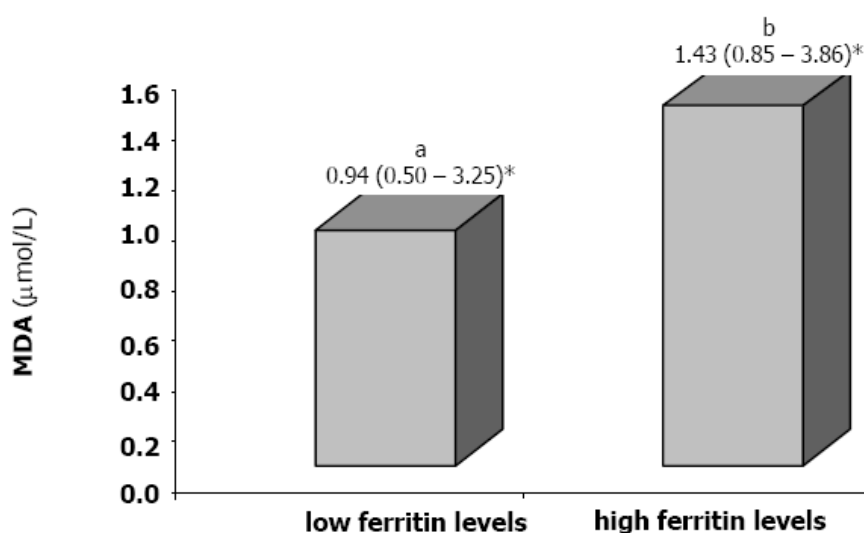


Figure 1 Association between MDA and ferritin status in the total population.

Low ferritin level reference for adult women $< 10 \mu\text{g/L}$ and men $< 20 \mu\text{g/L}$

High ferritin level reference for adult women $> 120 \mu\text{g/L}$ and men $> 250 \mu\text{g/L}$

*Median (range)

Different letters between the columns represent a significant difference, $p = 0.015$.

Mann-Whitney test

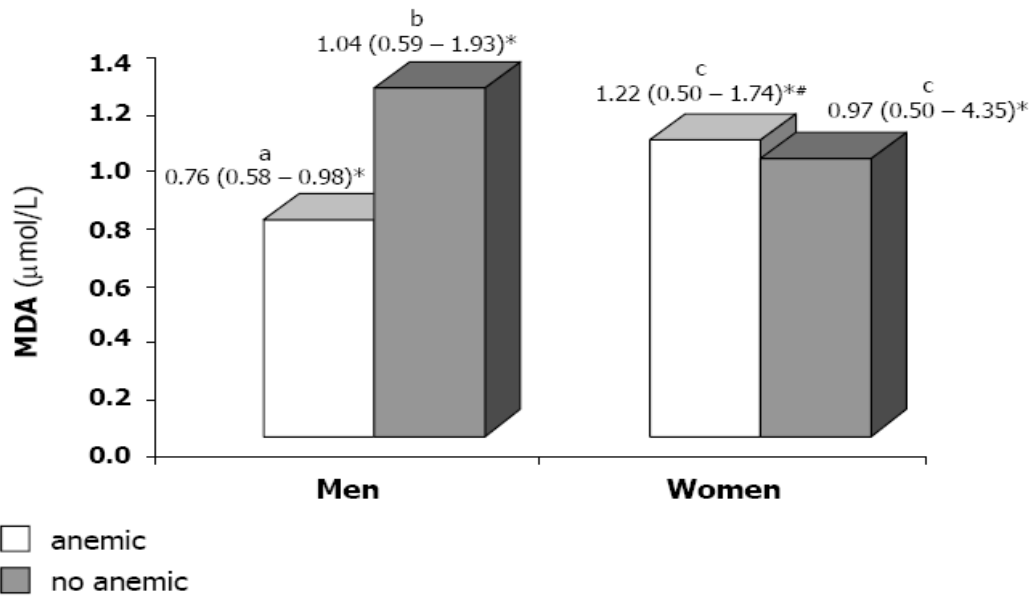


Figure 2 Association of MDA and anemia in subjects separated by sex.

Men and women individuals with Hb values below 14 and 12 g/dL, respectively, were considered anemic.

*Median (range)

points out of the interval was removed (boxplot)

Different letters between columns of the same sex represent a significant difference, $p = 0.011$.

Mann-Whitney test

The results of the multivariate analysis showed that the men with a low serum ferritin range (0 to 20 $\mu\text{g/L}$) had higher serum MDA values than the women. However, as women's serum ferritin levels increased, the serum MDA also increased, reaching higher values than for men ($p = 0.014$) (Figure 3).

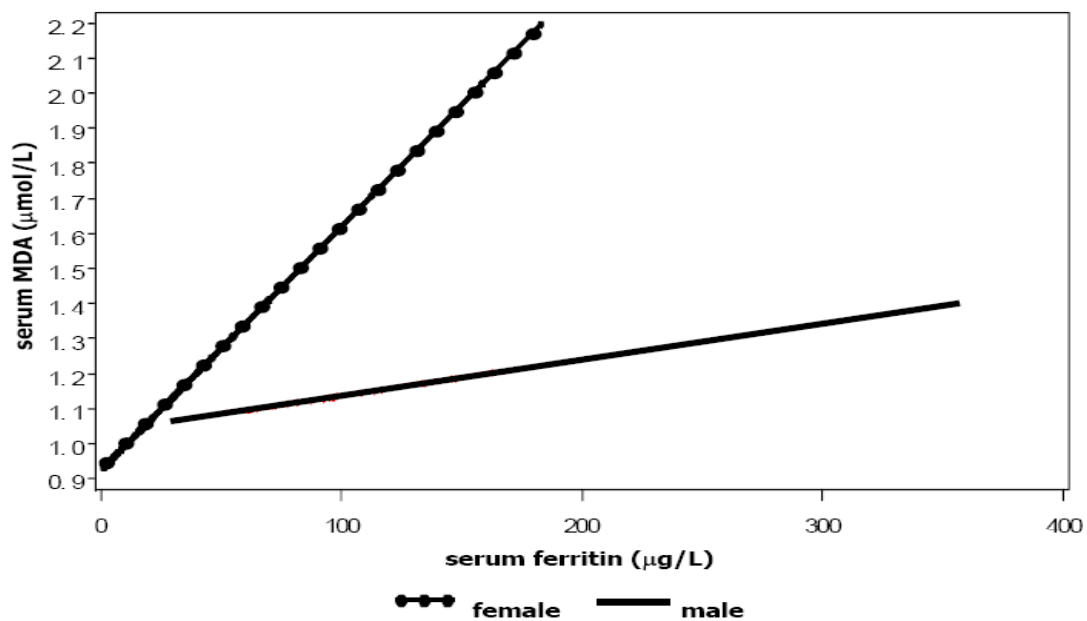


Figure 3 Correlation of ferritin and MDA according to the sex of the subjects.

Multivariate analysis, $p = 0.014$

DISCUSSION

Several factors, such as ageing, sex, iron overload, low antioxidant capacity, smoking, environmental radiation and alcohol consumption, have been suggested as factors that may boost the generation of free radicals and consequently raise oxidative stress [8,19]. Oxidative stress is detectable through the products of oxidative reactions with biomolecules, such as MDA and carbonyl protein, which cause cell damage. The capacity of iron to produce free radicals by the Fenton reaction has been widely reported [7,8].

Countries that have adopted iron fortification in foods for approximately 20 years currently have higher rates of iron overload than of anemia. In the USA, after the adoption of food iron fortification, the Framingham heart study (2001) found a prevalence of high iron store in healthy elderly American subjects (13%), which exceeded the degree of iron deficiency (2.7%) and anemia (1.2%) [10]. Milman et al (2004) found an 8.8% prevalence of iron overload in men and 2.7% in women among a group of healthy elderly Danish subjects, and a prevalence of 1.7% in the entire study population [14]. In spite of the mandatory fortification of wheat and corn flour with iron since 2004 (as determined by the Brazilian Ministry of Health) designed to combat iron deficiency [15], the prevalence of iron overload in the population under study was not as high as in others studies [8,12-14].

In the present study, the low income of the population, which is associated with a lower consumption of iron-rich foods with high bioavailability such as red meat, may explain the limited prevalence of high iron stores identified. Their high iron intake mean, which was above the iron recommendation, strengthens the hypothesis that the iron food sources consumed by this population have low iron bioavailability. In addition, the time that has elapsed since the introduction of iron fortification in food in Brazil (3.5 years) might be not enough to have an impact on iron stores. The low prevalence of high iron stores observed in this population may explain the absence of any difference in the oxidative stress status in men and women.

In our study, ferritin was positively correlated and hemoglobin was positively associated with MDA. Additionally, serum MDA levels were significantly lower in ferritin deficient individuals and anemic men. These results are in agreement with earlier studies. Armutcu et al (2004) observed significantly higher serum iron and malondialdehyde levels in iron miners and office workers from a mining area than those of healthy adults [7]. Buijsse et al (2007) observed that elderly Cretan men had a lower iron status (serum iron, ferritin and transferrin saturation), a higher antioxidant status and lower levels of serum hydroperoxides and gamma-glutamyl transferase than Dutch men, although levels of malondialdehyde did not differ [8]. Krajcovicová-Kudlacková et al (2004) found a significant, positive linear correlation between plasma conjugated dienes (first lipid peroxidation product) and serum iron levels in healthy adults. They also showed that conjugated iron and plasma dienes levels were significantly lower in vegetarian individuals than in individuals who consumed a traditional mixed diet [20]. The authors suggested that a low iron status can contribute to a lower increase in oxidative stress. The present study showed a weak

positive correlation between iron intake and serum protein carbonyls. The female population's iron intake was positively associated with serum protein carbonyls, supporting the hypothesis that high iron consumption may promote oxidative damage *in vivo*. Some studies have suggested that vegetarian subjects have lower levels of oxidative stress biomarkers than omnivores due to the lower iron content and iron bioavailability of vegetarian diets. Krajcovicová-Kudlacková et al (2007) found no difference in plasma protein carbonyl levels between vegetarian and non-vegetarian women, but they observed significantly lower levels of plasma conjugated dienes and DNA breaks, and higher levels of plasma vitamin C and β -carotene in vegetarian women [21]. The authors concluded that increases in oxidative stress with aging may be prevented by a vegetarian diet. Some population studies support the hypothesis that high iron intake and high iron stores [10] may be strongly related to the risk of developing chronic diseases, such as breast cancer and coronary heart disease [22,23].

The different associations and correlations between the biomolecule oxidation products and iron status biomarkers observed in the present study could be explained by their distinct oxidation pathways, and also by the different MDA and carbonyl molecular stability [24,25]. As there is no single biomarker that reflects systemic oxidative stress, it is recommended that markers of different types and origins should be measured to draw a profile [26].

In contrast with other findings [27, 7, 8, 19, 28], the multivariate analysis in the present study did not show any relationship between oxidative stress biomarker levels and potential confounding factors such as age, sex, ethnicity, education level, BMI, current smoking status, alcohol consumption, presence of diabetes and hypertension, serum cholesterol, serum triglyceride and HDL-cholesterol and glycemia. However, the association reported between oxidative stress and smoking habits or alcohol consumption is controversial and dose dependent [27, 29-32]. The discrepancy of these results could also be explained by the small number of subjects who had hypertension, smoked or had high alcohol consumption among the study group.

In Figure 3, it is interesting to observe that the ferritin and MDA correlation was stronger in women than in men. This result suggests that men have a higher iron store tolerance, i.e. higher biochemical adaptability to the oxidative stress produced by iron due to their higher iron stores.

CONCLUSION

These results suggest that low levels of iron can promote a lower state of oxidative stress and that iron fortification during the period when Brazil's life expectancy is rising may induce high iron stores in subjects who currently have a normal iron status. This could raise the risk of developing chronic diseases associated with oxidative stress.

Future studies to assess the impact of iron fortification on the oxidative stress status of high income populations should be encouraged to verify whether this group shows any signs of iron overload.

FUNDING

Funding for this work was provided by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Graduate Program in Human Nutrition, University of Brasília, Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

Staff of the project *Prevalence of risk factors for non-communicable chronic diseases in the Federal District – Brazil* (VIVA Saúde-DF).

REFERENCES

[1] Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ. The global burden of chronic diseases. Overcoming impediments of prevention and control. *JAMA* 2004; 291: 2616-22.

[2] WHO/FAO. Technical report series 916. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, Switzerland, 28 January - 1 February, 2002.

[3] Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de atenção à saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

[4] Levenson CW, Tassabehji NM. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 251-63.

[5] Polla AS, Polla LL, Polla B. Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 25-37.

[6] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.

[7] Armutcu F, Gurel A, Aker A. Serum iron concentrations, lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in Turkish iron miners. *Environ Geochem Health* 2004; 26: 1-4.

[8] Buijsse B, Feskens EJ, Moschandreas J, Jansen EH, Jacobs Jr DR, Kafatos A et al. Oxidative stress, and iron and antioxidant status in elderly men: differences between the Mediterranean south (Crete) and northern Europe (Zutphen). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007, 14: 495-500.

- [9] Yuan XM, Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* 2003; 35: 578-91.
- [10] Fleming DL, Tucker KL, Jacques PF, Dallal GE, Wilson PWF, Wood RJ. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 1375-84.
- [11] Lahti-Koski M, Valsta LM, Alfthan G, Tapanainen H, Aro A. Iron status of adults in the capital area of Finland. *Eur J Nutr* 2003; 42: 287-92.
- [12] Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jørgensen KSL. Iron status in Danish men, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2002; 68: 332-40.
- [13] Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jørgensen KSL. Iron status in Danish women, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2003; 71: 51-61.
- [14] Milman N, Pedersen AN, Ovesen L, Schroll M. Iron status in 358 apparently healthy 80 years old danish men and women: relation to food composition and dietary and supplemental iron intake. *Ann Hematol* 2004; 83: 423-29.
- [15] Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolution RDC no. 344, December 13, 2002.
- [16] Wasowick W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993; 39: 2522-26.
- [17] Richert S, Wehr NB, Stadtman ER, Levine RL. Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397:430-2.
- [18] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- [19] Knight JA, Smith SE, Kinder VE, Anstall HB. Reference intervals of plasma lipoperoxides: age-, sex-, and specimen-related variations. *Clin Chem* 1987; 33: 2289-91.

- [20] Krajcovicová-Kudlacková M, Spustová V, Pauková V. Lipid peroxidation and nutrition. *Physiol Res* 2004; 53:219-24.
- [21] Krajcovicová-Kudlacková M, Valachovicová M, Pauková V, Dusinnská M. Effects of diet and age on oxidative damage products in health subjects. *Physiol Res* 2007; Epub ahead of print.
- [22] Cho E, Chen WY, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Hankinson SE et al. Red meat intake and risk of breast cancer among premenopausal women. *Arch Intern Med* 2006; 166: 2253-9.
- [23] Van der A DL, Peeters PHM, Grobbee DE, Marx JJM, Van der Schouw YT. Dietary haem iron and coronary heart disease in women. *Eur Heart J* 2005; 26: 257-62.
- [24] Hu Y, Block G, Norkus EP, Morrow JD, Dietrich M and Hudes M. Relations of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 70-6.
- [25] Mutlu-Turkoglu U, Akalin Z, Ilhan E, Yilmaz E, Bilge A, Nisanci Y et al. Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2005; 38: 1059-65.
- [26] Argüelles S, Garcia S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta* 2004; 1674: 251-9.
- [27] Yeh C, Barr RG, Powell CA, Mesia-Vela S, Wang Y, Hamade NK et al. No effect of cigarette smoking dose on oxidized plasma proteins. *Environ Res* 2008; 106: 219-25.
- [28] Yamamoto M, Suzuki A, Jokura H, Yamamoto N, Hase T. Glucosyl hesperidin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 2008; 24: 470-6
- [29] Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 2001; 380: 50-8.
- [30] Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, Kjølrsrud-Bøhn S, Sandvik L, Blomhoff R. Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidant status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. *e-SPEN* 2007; 2: e127-33.

[31] Castro GD, Castro CR, Maciel ME, Fanelli SL, Ferreyra EC, Gómez MID et al. Ethanol-induced oxidative stress and acetaldehyde formation in rat mammary tissue: Potential factors involved in alcohol drinking promotion of breast cancer. *Toxicology* 2006; 219: 208–19.

[32] Marangon K, Herbeth B, Lecomte E, Paul-Dauphin A, Grolier P, Chancerelle Y et al. Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 231–9.

Artigo original 2

Contribuição da fortificação das farinhas de trigo e milho no consumo de ferro dietético e avaliação da associação entre o consumo dietético de ferro total, hêmico e inorgânico e estresse oxidativo em adultos.

Juliana Frossard Ribeiro Mendes, Sandra Fernandes Arruda, Egle Machado de Almeida e Siqueira, Munique Barros Carvalho.

RESUMO

Objetivo O excesso de ferro corporal tem sido associado a fatores dietéticos, aumentando a preocupação que o impacto da fortificação universal com ferro das farinhas de trigo e milho, adotada no Brasil, possa ter entre indivíduos com estado corporal de ferro adequado. Por catalisar reações de geração de espécies reativas de oxigênio, o ferro tem sido associado ao aumento do risco de doenças crônicas não transmissíveis e ao envelhecimento precoce. Este estudo teve por objetivos investigar possíveis associações e correlações entre a ingestão dietética de ferro total, hêmico e inorgânico e os biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos adultos e avaliar a contribuição das farinhas fortificadas no consumo de ferro dietético da amostra estudada.

Materiais e métodos Os dados foram coletados de 134 indivíduos supostamente saudáveis, acima dos 18 anos, selecionados aleatoriamente que participaram do estudo piloto do projeto "Prevalência dos fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis no Distrito Federal – Brasil (VIVA saúde - DF)", um estudo transversal. Foram analisadas as concentrações séricas de malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (PC) e ferritina e o consumo dietético de ferro total, hêmico, inorgânico e proveniente da fortificação. Foram dosados os teores de ferro total dos farináceos mais consumidos pela amostra estudada e avaliada a prevalência de inadequação aparente do consumo dietético de ferro total. **Resultados** Todas as marcas dos produtos analisados estavam fortificadas com ferro. As farinhas de trigo e milho apresentaram concentração de ferro proveniente da fortificação superior ao estabelecido na legislação. A prevalência de inadequação aparente do consumo dietético de ferro total foi de 21%, 23% e 12% entre mulheres de 19 a 50 anos, mulheres maiores de 50 anos e homens, respectivamente. O ferro proveniente da fortificação representou 22% (16 - 49%) do consumo de ferro dietético total. Para a população total, verificou-se uma associação positiva entre as ingestões dietéticas de ferro total e hêmico e a concentração sérica de MDA ($p = 0,008$ e $p = 0,033$, respectivamente). Entre as mulheres, a ingestão dietética de ferro inorgânico foi positivamente associada a concentração sérica de PC ($p = 0,036$). **Conclusão** Os resultados evidenciam que o maior consumo dietético de ferro, principalmente o ferro hêmico, pode representar um maior risco de doenças associadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chaves: ferro, estresse oxidativo, malondialdeído, proteínas carboniladas, fortificação, doenças crônicas não-transmissíveis.

INTRODUÇÃO

Considerada a carência nutricional de maior magnitude no mundo, a anemia ferropriva atinge aproximadamente 30% da população mundial (Martinez et al, 2002; Brasil, 2007; Assunção et al, 2007a). Estudos regionais no Brasil apontam para prevalências de 15 a 50% entre crianças e 30 a 40% entre gestantes, não havendo um estudo nacional (Milman, 2002; Milman, 2003; Milman, 2004; Brasil, 2002; Brasil, 2006). Semelhante a outros países, o Brasil implementou um programa nacional de combate a anemia ferropriva tendo como uma de suas medidas a

fortificação universal ou em massa (Assunção, 2007b) com ferro e ácido fólico das farinhas de trigo e milho comercializadas em todo território nacional, através da Resolução da Anvisa RDC n^o 344 de 13 de dezembro de 2002.

Embora a anemia ferropriva seja um problema de saúde pública no Brasil, o aumento da prevalência do excesso de ferro corporal entre homens, mulheres pós-menopausa e em idosos saudáveis tem sido reportado e atribuído a mudanças nos hábitos dietéticos, como o alto consumo de carne, álcool, vitamina C e a suplementação e fortificação de alimentos com ferro (Yuan et al, 2003; Fleming et al, 2002; Lahti-Koski et al, 2003; Milman et al, 2002; Milman et al, 2003; Milman et al, 2004). A absorção do ferro dependerá da composição da dieta, da forma em que ele se apresenta e do estado corporal de ferro do indivíduo (Van der A et al, 2005). Sendo assim, as recomendações de ingestão de ferro foram revisadas, havendo uma redução para quase todos os grupos populacionais (National Academy of Science, 2001).

O ferro atua como catalisador de reações de formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo que o excesso desse nutriente pode levar ao estabelecimento de uma condição de estresse oxidativo (Levenson et al, 2004; Buijsse et al, 2007). A etiologia das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como o câncer, o diabetes, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e o envelhecimento precoce tem sido associada a danos oxidativos produzidos por EROs a biomoléculas como o DNA, as proteínas e os lipídios. No Brasil, as doenças carenciais coexistem com as DCNT que, na maioria dos casos, estão associadas ao excesso de nutrientes. A prevalência das DCNT tem aumentado no mundo e, este cenário tende a se intensificar com o envelhecimento da população (Yach et al, 2004). Mundialmente, a mortalidade por doenças crônicas em 2001 foi de 46% e estima-se que atinja 57% em 2020 (WHO/FAO, 2002). No Brasil, houve um aumento de 34% para 48% de 1979 a 2003 (Brasil, 2006).

Considerando o alto potencial oxidante do ferro e o aumento da expectativa de vida do brasileiro, a fortificação pode representar risco de aumento da prevalência de DCNT entre indivíduos com adequado estado corporal de ferro. O presente trabalho teve por objetivo investigar possíveis associações e correlações entre a ingestão dietética de ferro total, hêmico e inorgânico e os biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos adultos e avaliar a contribuição das farinhas fortificadas no consumo de ferro dietético da amostra estudada.

AMOSTRA ESTUDADA E MÉTODOS

Amostra estudada

Os dados foram coletados de indivíduos supostamente saudáveis, com idade igual ou superior a 18 anos, participantes do estudo piloto do projeto "Prevalência dos fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis no Distrito Federal (VIVA saúde-DF)", realizado pela Universidade de Brasília (UnB) e Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF). Duas regiões administrativas (RA) do DF foram selecionadas aleatoriamente. A partir do banco de dados domiciliares de 2002 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foram selecionadas

aleatoriamente 60 domicílios de quatro unidades probabilísticas de amostragem (UPA) de cada RA, totalizando 240 domicílios. Em cada residência selecionada foi realizado um sorteio entre os indivíduos com idade ≥ 18 anos para a escolha de um morador para constituir a amostra. Em caso de ausência do sorteado, mais duas visitas eram realizadas na tentativa de encontrá-lo. Em caso de recusa, mais dois sorteios entre os moradores restantes poderia ser realizado antes da substituição do domicílio pelo próximo número. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O protocolo do projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Métodos laboratoriais

A coleta de sangue foi realizada após 12 horas de jejum. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, para obtenção do soro. Às amostras de soro foram adicionados ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e glutatona reduzida (GSH) a uma concentração final de 1,34 e 0,65 mmol/L, respectivamente, e armazenadas a - 70°C.

A concentração de malondialdeído (MDA) sérico foi determinada por método fluorimétrico baseado na reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Wasowick, Neve and Peretz, 1993). Em um tubo de ensaio foram adicionados 50 μ L de soro, 1 mL de água deionizada e 1 mL de TBA 29 mmol/L em ácido acético 8,75 mol/L, em seguida agitados e incubados em banho-maria a 100°C por 1 hora. Após atingirem temperatura ambiente, 25 μ L de ácido clorídrico 5 mol/L e 3,5 mL de n-butanol foram adicionados e os tubos foram agitados por 5 segundos no vortex. A fase alcoólica foi então separada por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. A leitura da fluorescência da amostra foi realizada nos comprimentos de onda de 547 nm de excitação e 525 nm de emissão em fluorímetro (FP-777 JAS.CO). A curva padrão foi preparada usando uma solução padrão de 1,1,3,3-tetraetoxi-propano (Sigma, Alemanha) no intervalo de concentração de 0 a 0,15 μ mol/L, linearidade de 0,98.

A concentração de proteína carbonilada sérica foi determinada por espectrofotometria baseada na reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonil. Uma amostra de soro contendo 500 μ g de proteína (10 μ L de soro) foi homogenizada em TrisHCl 25 mmol/L, uréia 6 mol/L em pH 9, completando um volume final de 200 μ L. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de ácido tricloroacético 20% e as amostras centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi solubilizado em 200 μ L de TrisHCl 25 mmol/L, uréia 6 mol/L pH 9 e agitado em vortex. Então, foram adicionados 700 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina 0,2% em HCl 2 mol/L as amostras e 700 μ L de HCl 2 mol/L no branco. Os eppendorfs foram agitadas no shaker (TE-420, Tecnal) a velocidade máxima por 15 minutos a 4°C. Em seguida, foram adicionados 700 μ L de ácido tricloroacético 20% para precipitar as proteínas, seguido de centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto e descarte do sobrenadante. O pellet foi lavado 3 vezes a temperatura ambiente com 1 mL de acetato de etila:etanol 1:1, agitado no vortex e cetrifugado a 1300 rpm por 1 minuto. Após seco a temperatura ambiente, o pellet foi resuspendido em 500 μ L

de guanidina 6 mol/L em fosfato de potássio 500 mol/L em pH 2,5, agitado no vortex e em seguida, no shaker a 4°C por 30 minutos. A leitura foi realizada a 376 nm (Richert et al, 2002). A determinação de proteína total no soro foi realizada pelo método de Lowry et al (1951). A concentração de proteína carbonilada foi expressa por mg de proteína total, utilizando um coeficiente de extinção molar de 22.000 mM⁻¹cm⁻¹.

A ferritina sérica foi determinada utilizando kit de imunoenensaio ELISA (Katal biotecnologic, MG, Brasil), sendo o limite de detecção do método de 7,5 µg/L. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm com filtro secundário em 630 nm em leitora de placas com microcavidades (ELX 800, Bio-tek, Winooski, Vermont, USA). A curva calibração foi preparada com padrões de ferritina no intervalo de 0 a 200 µg/L, linearidade de 0,99. Os pontos de corte utilizados para determinar depleção das reservas corporais de ferro em mulheres e homens adultos foram ferritina < 10 µg/L e < 20 µg/L, respectivamente, e para determinar excesso das reservas corporais de ferro > 120 µg/L e > 250 µg/L, respectivamente.

Determinação do teor de ferro total de farináceos

Foi determinado o teor de ferro total das farinhas de trigo, fubá, flocos de milho pré-cozido, mistura especial para pães ou farinha para panificação, macarrão, biscoito maisena e biscoito recheado sabor chocolate, por representarem os alimentos de maior consumo na amostra estudada, conforme análise dos inquéritos alimentares ou por falta de informação com as indústrias a respeito do teor de farinha utilizado para a preparação dos últimos dois alimentos.

A coleta das amostras foi aleatória, utilizando-se o método de sorteio de seis estabelecimentos, entre todos os hipermercados do DF. Em cada hipermercado sorteado, foram coletados três pacotes de 1 kg de mesma marca e lote. As três marcas escolhidas foram as mais comercializadas do produto. Foram observadas as embalagens, evitando que as mesmas estivessem abertas ou danificadas, e o prazo de validade ultrapassado.

Os 18 kg de uma marca de cada produto, obtidos nos seis hipermercados, foram homogeneizados, e para obtenção da amostra, foram coletados, sucessivamente, 20% do peso inicial do homogeneizado, três vezes, até a redução a 144 g, do qual foram coletadas três amostras de 0,5g do produto. A exceção da mistura para pão, da qual foi analisada uma única marca e as bolachas cujas três marcas foram homogeneizadas.

Para a determinação do teor de ferro foi utilizado o protocolo de abertura e digestão de amostra em microondas descrito por Baranowska et al, 1995. Brevemente, a cerca de 0,5 g de alimento foram adicionados 5 mL de HNO₃ e 2,5 mL de H₂SO₄, para digestão em biodigestor de microondas (DGT 100 plus), utilizando o seguinte programa: etapa 1 - 5 minutos a 330 W; etapa 2 - 6 minutos a 700 W; etapa 3 - 1 minuto a 800 W; etapa 4 - 20 minutos a 00 W. Após a digestão a amostra foi solubilizada em HNO₃ 0,1 mol/L, para volume final de 50 mL. Todo o material utilizado foi lavado em HCl 10% e água deionizada. O teor de ferro foi determinado por espectrofotometria de emissão atômica (ICP – AES, Spectro, Kleve, Germany), linha 238 nm, utilizando-se uma curva

de calibração de solução padrão de Fe (Titrisol-Merck), linear no intervalo de 0 a 10 ppm. Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram de 0,0064 e 0,032, respectivamente.

Consumo de ferro dietético total, hêmico, inorgânico e proveniente da fortificação

A ingestão dietética de ferro foi avaliada através de 4 recordatórios 24 horas, sendo 3 referentes a dias úteis e 1 a dia de final de semana, realizados em intervalos de 3 meses durante o período de 1 ano. Os recordatórios foram aplicados por nutricionistas e alunas do curso de nutrição treinadas. As quantidades dos alimentos foram referidas pelos indivíduos em medidas caseiras e convertidas em g ou mL, utilizando a tabela de Pinheiro et al (1998). Os dados de consumo alimentar foram inseridos em planilha do programa Excel para cálculo da composição nutricional, com base nas tabelas de composição de alimentos da United States Department of Agriculture (2006) e Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO (2006).

O teor de ferro proveniente da fortificação foi obtido através da diferença entre os valores apresentados na TACO (antes da fortificação) e os valores de ferro total obtidos através da dosagem de ferro dos alimentos (após a fortificação) mais consumidos pela população. As quantidades de farinha de trigo e milho contidas em cada preparação foram obtidas em Pinheiro et al (1998) e Araújo e Guerra (1995).

O consumo de ferro hêmico foi estimado a partir da porcentagem desse elemento em relação ao ferro total de acordo com o tipo de carne, considerando-se valores de 65% para as carnes bovinas, 39% para as carnes de porco, bacon, presunto e veado, 26% para aves e peixes e 21% para o fígado (Carpenter et al, 1995; Clark et al, 1997; Kalpalathika et al, 1991; Kongkachuichai et al, 2002; Lombardi-Boccia et al, 2002). O consumo de ferro inorgânico foi obtido por meio da diferença entre o consumo de ferro total e ferro hêmico.

Prevalência de inadequação aparente do consumo dietético de ferro total

A estimativa da prevalência de inadequação aparente do consumo dietético de ferro total foi realizada de acordo com Slater et al, 2004. A amostra foi dividida em três grupos (homens acima de 19 anos, mulheres entre 19 e 50 anos e mulheres acima de 50 anos) em razão da diferença da Necessidade Média Estimada (EAR). De acordo com a National Academy of Science (2001), a EAR é de 6,0 mg/d, 8,1 mg/d e 5,0 mg/d, para homens acima de 19 anos, mulheres entre 19 e 50 anos e mulheres acima de 50 anos, respectivamente. A distribuição da ingestão de ferro de cada grupo foi ajustada, de modo a remover a variabilidade intrapessoal e interpessoal, utilizando-se a análise de variância (Anova). A normalidade da distribuição dos dados de consumo de ferro dos três grupos foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov no software SPSS (versão 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Foi aplicada a transformação logarítmica para remover a assimetria da distribuição do consumo de ferro total na população feminina com 19 a 50 anos de idade. Em seguida, foi calculado o Z-escore utilizando a equação 6 e consultada a tabela Z para verificar a inadequação aparente do consumo dietético de ferro total (Zar, 1999).

Equação 6. Equação para cálculo do z-escore.

$$Z = (EAR - média) / dp$$

Onde:

Média: média ajustado do grupo.

dp: desvio-padrão da distribuição ajustada.

EAR: Necessidade média estimada do nutriente.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS (versão 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A normalidade da distribuição dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Mann-Whitney foi usado para avaliar a associação e significância estatística das variáveis com distribuição assimétrica. Os valores dos biomarcadores de estresse oxidativo foram comparados entre si após a categorização (percentis 25 e 75) baseada no consumo de ferro total, hêmico e inorgânico. Os pontos externos e soltos a distribuição ("outliers") segundo o gráfico em caixas ("boxplot") foram removidos para nova análise na tentativa de eliminar os indivíduos com valores de biomarcadores de estresse oxidativo aumentados ou diminuídos por erro na análise, presença de processo inflamatório, etc. Os dados foram expressos em mediana (intervalo). O coeficiente de correlação de Spearman (r) foi utilizado na investigação de correlação entre o consumo de ferro total, hêmico e não hêmico e os biomarcadores de estresse oxidativo. Os potenciais fatores de confusão (idade, sexo, etnia, nível educacional, IMC, fumo, consumo de bebida alcoólica, presença de diabetes e hipertensão, colesterol, triglicérides sérico e HDL-colesterol e glicemia séricos) foram testados pela análise multivariada através do software SAS (versão 9.1, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo e $< 0,1$ marginalmente significativo.

RESULTADOS

Os teores obtidos em mg de ferro/100g de produto e a estimativa do teor de ferro proveniente da fortificação encontram-se na tabela 1. Todas as marcas dos produtos analisadas estavam fortificadas com ferro e as farinhas apresentaram concentração de ferro originária da fortificação superior ao estabelecido na legislação. A exceção de uma das marcas de fubá, que apresentou teor de ferro 1,5 vezes superior ao estabelecido na legislação, não foi observada diferença significativa entre as três marcas dos demais produtos estudados.

TABELA 1. Concentração de ferro total obtido por dosagem, descrito na tabela TACO e fornecido pela fortificação nos farináceos

Alimento	Dosagem	Fe total (mg/100)	
		TACO	Estimativa fortificação
Fubá	8,62 ± 2,32	0,90	7,72
Farinha de trigo	6,96 ± 1,04	1,00	5,96
Farinha de panificação	6,09 ± 0,25	1,00	5,09
Flocos de milho pré-cozido	5,96 ± 0,73	0,50	5,46
Biscoito maisena	5,03 ± 0,66	1,80	3,23
Macarrão	4,72 ± 0,47	0,90	3,82
Biscoito recheado sabor chocolate	4,48 ± 0,13	2,30	2,18

A prevalência de inadequação aparente (média ajustada ± desvio-padrão ajustado) do consumo dietético de ferro total foi de 21% (13,79±8,06), 23% (8,93±5,19) e 12% (17,47±9,77) entre mulheres de 19 a 50 anos, mulheres maiores de 50 anos e homens, respectivamente.

O consumo de ferro dietético constituiu-se predominantemente da forma inorgânica representando 67% do consumo de ferro da amostra total, 66% para os homens e 76% para as mulheres. Com base na mediana e intervalo, o ferro proveniente da fortificação representou 22% (16 - 49%) do consumo de ferro dietético total. O consumo de ferro dietético total e hêmico foi maior entre os homens quando comparado as mulheres ($p = 0,001$ e $p = 0,006$, respectivamente), não tendo sido observada diferença significativa entre os gêneros em relação ao consumo de ferro inorgânico e do ferro proveniente da fortificação (Tabela 2). Nenhum dos indivíduos da população estudada fazia uso declarado de suplementação de ferro ou de qualquer outro micronutriente.

TABELA 2 Consumo de ferro dietético na amostra estudada.

	n = 108	P
Ferro total (mg/d)	14,04 (0,95 – 43,49)	
Homem	16,66 ± 7,87	
Mulher	10,14 (0,95 – 43,49)	0,001*
Ferro hêmico (mg/d)	2,11 (0,01 – 27,42)	
Homem	6,58 ± 6,74	
Mulher	1,77 (0,01 – 21,94)	0,006*
Ferro inorgânico (mg/d)	8,37 (0,73 – 32,99)	
Homem	9,44 (1,63 – 32,99)	
Mulher	7,71 (0,73 – 27,86)	0,157*
Ferro da fortificação (mg/d)	2,76 (0,16 – 21,48)	
Homem	3,52 (0,26 – 12,33)	
Mulher	2,67 (0,16 – 21,48)	0,118*

Media ± desvio padrão

Mediana (intervalo)

*Homem X Mulher,

Teste de Mann-Whitney

p < 0,05, considerado como significativo

O consumo de ferro dietético total na amostra estudada apresentou correlação positiva com os níveis séricos de ferritina ($r = 0,210$ e $p = 0,030$). Embora não tendo sido encontrada correlação significativa entre o consumo de ferro total, hêmico e inorgânico e os biomarcadores de estresse oxidativo na amostra total, pode ser observada uma tendência de correlação positiva entre o consumo de ferro total e o MDA sérico ($p = 0,058$) e o consumo de ferro hêmico e PC séricas entre as mulheres ($p = 0,054$) (Tabela 3).

TABELA 3 Coeficientes de correlação (r) entre os biomarcadores de estresse oxidativo, ferritina sérica e o consumo de ferro hêmico, inorgânico e total na amostra estudada.

	MDA sérico ($\mu\text{mol/L}$)		Proteína carbonilada sérica (nmol/mg proteína total)		Ferritina sérica $\mu\text{g/L}$	
	r	p	r	p	r	p
Ferro total (mg /d)	0,193	0,058 [#]	0,056	0,562	0,210	0,030
Homem	- 0,090	0,598	- 0,100	0,559	0,028	0,870
Mulher	0,106	0,379	0,153	0,198	0,075	0,529
Ferro hêmico (mg/d)	0,157	0,129 [#]	0,137	0,166	0,177	0,075
Homem	0,087	0,621	- 0,099	0,575	0,073	0,685
Mulher	0,066	0,590	0,231	0,054	0,049	0,686
Ferro inorgânico (mg/d)	0,055	0,576	0,045	0,643	0,062	0,528
Homem	- 0,070	0,651	0,012	0,943	-0,018	0,916
Mulher	0,084	0,486	0,167	0,178 [#]	-0,027	0,818

n = 108 indivíduos

Correlação de Spearman (bicaudal).

[#] com remoção dos pontos externos e/ou soltos a distribuição.

p < 0,05, considerado como significativo

Separando a amostra estudada em dois grupos, segundo os percentis P25 e P75 referente ao consumo de ferro dietético total e hêmico, foi observada uma associação positiva entre essas duas variáveis e os valores de MDA (p = 0,008 e p = 0,033, respectivamente). Também foi observada uma associação positiva entre o consumo de ferro não hêmico e PC sérica entre as mulheres (p = 0,036) (Tabela 4).

TABELA 4 Associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e o consumo de ferro na amostra estudada.

	MDA sérico ($\mu\text{mol/L}$)			Proteína carbonilada sérica (nmol/mg proteína total)		
	P25	P75	p	P25	P75	p
Ferro total (mg/d)	0,80 (0,55 – 1,37)	0,95 (0,69 – 1,79)	0,008 [#]	1,20 (0,16 – 2,55)	1,24 (0,55 – 2,89)	0,431 [#]
Homem	0,99 (0,74 – 4,11)	0,91 (0,71 – 1,79)	0,274	1,29 (0,77 – 4,10)	1,17 (0,60 – 2,13)	0,719
Mulher	0,88 (0,66 – 1,78)	0,98 (0,69 – 1,54)	0,212 [#]	1,19 (0,16 – 2,55)	1,43 (0,55 – 5,69)	0,133
Ferro hêmico (mg/d)	0,79 (0,55 – 1,74)	1,05 (0,71 – 1,99)	0,033 [#]	1,21 (0,16 – 2,81)	1,41 (0,48 – 5,69)	0,258
Homem	1,20 (0,60 – 1,84)	1,10 (0,75 – 1,79)	0,842	1,26 (0,16 – 1,49)	0,98 (0,48 – 2,13)	0,492 [#]
Mulher	0,79 (0,63 – 1,74)	0,97 (0,71 – 1,99)	0,245 [#]	1,13 (0,16 – 1,57)	1,49 (0,48 – 5,69)	0,036 [#]
Fe não hêmico (mg/d)	0,93 (0,70 – 1,99)	1,01 (0,60 – 1,74)	0,463 [#]	1,07 (0,48 – 2,55)	1,15 (0,41 – 2,03)	0,652
Homem	0,85 (0,75 – 1,79)	0,90 (0,60 – 1,43)	0,812 [#]	0,97 (0,48 – 1,61)	1,05 (0,41 – 1,39)	0,796 [#]
Mulher	0,95 (0,70 – 1,99)	1,18 (0,69 – 1,74)	0,307 [#]	1,07 (0,48 – 2,55)	1,37 (0,55 – 3,49)	0,186 [#]

n = 108 indivíduos

Teste de Mann-Whitney

Mediana (intervalo)

[#] com remoção dos pontos externos e/ou soltos a distribuição.

p < 0,05, considerado como significativo

DISCUSSÃO

Semelhante ao observado em populações de países em desenvolvimento (Assunção, 2007), a forma predominante de ferro dietético consumido na amostra estudada foi a inorgânica. O baixo poder aquisitivo (68% com renda per capita mensal abaixo de 1 salário mínimo) associado ao maior custo dos alimentos fontes de ferro hêmico, as carnes, são alguns dos fatores que justificam o maior consumo de ferro na forma inorgânica nessa população.

O consumo de ferro proveniente da fortificação correspondeu a 22% (16 a 49%) do consumo de ferro total na amostra estudada, mostrando que a fortificação pode ter uma contribuição relevante no consumo dietético de ferro total nos indivíduos estudados. Essa contribuição do ferro originário da fortificação é, indubitavelmente, positiva, para indivíduos com anemia ferropriva e as análises de teores de ferro nas farinhas comercializadas no Distrito Federal evidencia que a legislação brasileira está sendo cumprida. Entretanto, a efetividade da fortificação das farinhas em todo o território nacional, após quatro anos da obrigatoriedade, é questionável, primeiro por que, no presente estudo, foi observada uma alta prevalência de anemia tanto em mulheres (11,7%) quanto em homens (18,7%) e, ainda, uma alta prevalência de deficiência em ferro (18%) foi observada nas mulheres, evidencia pouca efetividade da fortificação no combate à anemia nesse grupo. Em um recente estudo realizado com crianças antes e após a fortificação das farinhas com ferro no Brasil, não foi observada diferença significativa nos valores de hemoglobina séricos (Assunção et al, 2007). Os autores sugeriram como possíveis causas do insucesso da fortificação, o consumo ou a fortificação insuficiente das farinhas, a baixa disponibilidade do ferro

empregado na fortificação e a falha em identificar outras causas de anemia (Assunção et al, 2007a).

A prevalência de inadequação do consumo dietético de ferro total entre homens e mulheres dos dois grupos (abaixo e acima dos 50 anos), na amostra populacional estudada corrobora para a hipótese de que a anemia remanescente possa ser devido ao baixo consumo de ferro nesses três grupos. Porém, a ausência de deficiência de ferro (ferritina < 20 µg/mL) coexistente com uma alta prevalência de anemia (Hb < 14 g/dL) observado no grupo de homens, característico da anemia não nutricional, sugere a influência de outros fatores na eritropoiese, além do consumo de ferro nessa população. Outro achado importante no presente estudo, refere-se ao amplo intervalo de contribuição relativo a fortificação das farinhas no consumo total de ferro (entre 16 a 46%) na amostra populacional, uma vez que no Brasil, coexistem os dois quadros: doenças carências e aquelas associadas ao consumo excessivo de nutrientes (Brasil, 2006). Esse resultado alerta para o risco de uma sobrecarga de ferro nos indivíduos que apresentam maior consumo de ferro hêmico na dieta habitual, como os homens ou aqueles indivíduos que consomem dietas com níveis adequados de alimentos que contêm compostos com potencial redutor, capazes de aumentar a biodisponibilidade do ferro inorgânico. A prevalência de 14% de anêmicos, e 11% de deficientes em ferro na amostra total estudada evidencia que a maioria desses indivíduos, mesmo de baixo poder aquisitivo, apresentavam-se adequados em relação ao estado corporal de ferro. Esse resultado sugere que a maioria dos indivíduos possa estar sendo expostos a uma sobrecarga de ferro a longo prazo.

Fleming et al (2002) em um estudo longitudinal com 614 idosos norte-americanos encontrou um aumento de quase 3 vezes do risco de alta reserva corporal de ferro (ferritina sérica) em indivíduos com alto consumo de carne vermelha (acima de 4 porções por semana) e de frutas (acima de 21 porções por semana), e uma redução desse risco em aproximadamente 4 vezes entre aqueles que consumiam mais de 7 porções de grãos integrais por semana. Os autores concluem que a alta biodisponibilidade do ferro hêmico presente nas carnes, o papel como agentes redutores do Fe³⁺ em Fe²⁺ dos ácidos orgânicos como a vitamina C, o ácido cítrico, málico e tartárico presentes nas frutas e a ação de quelante como o fitato presente nos grãos integrais, possam ser os responsáveis pelos resultados obtidos e acrescentam ainda que a sobrecarga de ferro dietético possa levar ao acúmulo de ferro corporal em indivíduos idosos.

A maioria dos estudos epidemiológicos utiliza biomarcadores de ferro que refletem o estado corporal de ferro na forma ligada (como a ferritina, transferrina e a hemoglobina) e sugerem que o ferro livre exista predominantemente em indivíduos com as reservas de ferro corporal repletas e transferrina saturada, como os homens adultos e mulheres após a menopausa (Lee, 2004; Fleming, 2002, Polla, 2003, Milman, 2004).

No presente estudo, o nível de ferritina sérica apresentou uma correlação positiva com o consumo de ferro total e MDA sérico, e ainda, os níveis de MDA sérico apresentaram associação positiva com o consumo de ferro dietético total e hêmico. Esses dados mostram que o consumo de

ferro dietético influência nas reservas corporais, e que ambos influenciam os danos a lipídios no organismo, suportando a hipótese de que um alto consumo de ferro em especial a forma hêmica é capaz de potencializar o estresse oxidativo *in vivo*. Esses resultados vão de encontro a outros estudos populacionais que demonstram uma relação positiva entre o consumo de ferro dietético total e hêmico com o estado nutricional de ferro, e estudos que demonstram essa mesma relação entre o consumo ou o estado nutricional de ferro e o estresse oxidativo e/ou a ocorrência de DCNT. O grupo heme é um pró-oxidante e também têm sido relacionado ao dano oxidativo e a doenças como o câncer e as doenças cardiovasculares. Balder et al (2006), em um estudo de caso-coorte com 1505 indivíduos acharam um maior risco de ocorrência de câncer colorretal entre homens com aumentado consumo de ferro hêmico. Lee et al (2004) em um estudo de coorte, acompanhou 34 mil mulheres na pós-menopausa durante 15 anos e observaram um aumento do risco relativo de câncer de cólon com o aumento do consumo de ferro hêmico, sendo que esse aumento foi ainda maior entre mulheres que consomem bebidas alcoólicas. O consumo de bebidas alcoólicas é um dos fatores que podem levar a distúrbios na homeostase do ferro. Van de A et al (2005) em uma coorte com 16 mil mulheres de meia idade verificaram que o consumo de ferro hêmico apresentou uma associação com o aumento do risco para doenças cardiovasculares, o mesmo não foi obtido com o consumo de ferro total e inorgânico.

Alguns estudos epidemiológicos não evidenciaram qualquer relação entre consumo de ferro total e incidência de DCNT e/ou estresse oxidativo. Esses resultados parecem ser justificados pelo fato do consumo total de ferro ser constituído predominantemente pela forma inorgânica, como observado nos países ocidentalizados. Assim, a relação entre consumo de ferro total e estresse oxidativo ou DCNT pode não ser observada quando não se distingue as formas em que o ferro se apresenta, uma vez que as reservas corporais de ferro provêm predominantemente do ferro hêmico, mais biodisponível. Ainda, o teor de ferro hêmico difere substancialmente entre as carnes e seus derivados de diferentes origens, sendo que a utilização de porcentagens diferenciadas no lugar das médias do teor de ferro hêmico permite uma análise mais acurada do consumo deste micronutriente em populações, nas quais o consumo de seus alimentos fonte não é proporcional (Balder, 2006).

Uma das limitações deste estudo é o número pequeno de indivíduos do sexo masculino, uma vez que estes apresentam maior estado nutricional e consumo dietético de ferro e não apresentam grandes perdas corporais de ferro, sendo um grupo mais adequado para se verificar a relação entre o ferro e estresse oxidativo no organismo humano. Outras limitações do nosso estudo foram a ausência de avaliação de marcadores que reflitam as defesas antioxidantes e a presença de inflamação.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciam que apesar das farinhas de trigo e milho, comercializadas no Distrito Federal apresentarem o valor mínimo de ferro previsto na legislação

(4,2 mg de ferro/100 g de farinha), a anemia e a deficiência de ferro permanecem em grupos populacionais de reduzido poder aquisitivo. A presença de anemia não nutricional observada no grupo de homens sugere a influência de outros fatores na determinação do estado corporal de ferro. Os resultados evidenciam que devido ao maior consumo de ferro hêmico, os homens podem apresentar maior risco de sobrecarga de ferro devido à fortificação das farinhas e, conseqüentemente, maior risco de doenças associadas ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo MOD, Guerra TMM. Alimentos per capita. 2ª edição. Editora Universitária: Natal-RN, 1995.

Assunção MCF, Santos IS, Barros AJD, Gigante DP, Victora CG. Efeito da fortificação de farinhas com ferro sobre anemia em pré-escolares, Pelotas, RS. Rev Saúde Pública 2007; 41 (4): 539 - 48. (a)

Assunção MCF. Efeito da fortificação de alimentos com ferro sobre anemia em crianças: um estudo de revisão. Cad Saúde Pública 2007; 23 (2): 269 - 281. (b)

Balder HF, Vogel J, Jansen MCJF, Weijenberg MP, Brandt PA, Westenbrink S, Meer R, Goldbohm A. Heme and Chlorophyll Intake and Risk of Colorectal Cancer in the Netherlands Cohort Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15 (4): 717 - 725.

Baranowska I, Czernicki K, Aleksandrowicz R The analysis of lead, cadmium, zinc, copper, and nickel content in human bones from the Upper Silesian industrial district The Science Total Environment 1995; 159: 155 - 162.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de atenção à saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde e Unicef, Cadernos de atenção básica: Carências de micronutrientes, Bethsáida de Abreu Soares Schmitz. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Brasil. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. [acesso 2006 out]. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public>>.

Buijsse B, Feskens EJ, Moschandreas J, Jansen EH, Jacobs Jr DR, Kafatos A et al. Oxidative stress, and iron and antioxidant status in elderly men: differences between the Mediterranean south (Crete) and northern Europe (Zutphen). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007, 14: 495 - 500.

Carpenter CE, Mahoney AW. Evaluation of methods used in meat iron analysis and iron content of raw and cooked meats. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 1824 - 7.

Clark EM, Mahoney AW, Carpenter CE. Heme and total iron in ready-to-eat chicken. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 124 - 6.

Fleming DL, Tucker KL, Jacques PF, Dallal GE, Wilson PWF, Wood RJ. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 1375 - 84.

Kalpalathika PVM, Clark EM, Mahoney AW. Heme iron content in selected ready-to-serve beef products. *J Agric Food Chem* 1991; 39: 1091 - 3.

Kongkachuichai R, Napatthalung P, Charoensiri R. Heme and nonheme iron content of animal products commonly consumed in Thailand. *J Food Composition Anal* 2002; 15: 389 - 98.

Lahti-Koski M, Valsta LM, Alfthan G, Tapanainen H, Aro A. Iron status of adults in the capital area of Finland. *Eur J Nutr* 2003; 42: 287 - 92.

Lee DH, Anderson KE, Harnack LJ, Folsom AR, Jacobs DR. Heme iron, zinc, alcohol consumption and colon cancer: Iowa women's health study. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96 (5): 403 - 407.

Levenson CW, Tassabehji NM. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Research Reviews* 2004; 3: 251 - 263.

Lombardi-Boccia G, Martinez-Dominguez B, Aguzzi A, Rincon-Leon F. Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. *Food Chem* 2002; 78: 505 - 10.

Martínez-Navarrete N, Camacho MM, Martínez-Lahuerta J, Martínez-Monzó J, Fito P. Iron deficiency and iron fortified food – a review. *Food Research International* 2002; 35: 225 - 231.

Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jürgensen KSL. Iron status in Danish men, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2002; 68: 332 - 40.

Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jürgensen KSL. Iron status in Danish women, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol* 2003; 71: 51 - 61.

Milman N, Pedersen AN, Ovesen L, Schroll M. Iron status in 358 apparently healthy 80 years old danish men and women: relation to food composition and dietary and supplemental iron intake. *Ann Hematol* 2004; 83: 423 - 29.

National Academy of Science, Dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc 2001. [Acessado em 2008 junho]. Disponível em www.nap.edu

Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). UNICAMP, 2006. Tabela brasileira de composição de alimentos. 2ª edição. 42p. [Acessado em 2008 janeiro-março]. Disponível em: http://dtr2004.saude.gov.br/nutricao/documentos/tab_bras_de_comp_de_alim_doc.pdf

Polla AS, Polla LL, Polla B. Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 25 - 37.

Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 4ª edição. Editora Metha: Rio de Janeiro, 1998.

Slater B, Marchioni DL, Fisberg RM. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes. *Rev Saúde Pública* 2004; 38 (4): 599 - 605.

United States Department of Agriculture. Food and Nutrition Information Center. Food Composition: Nutrient Data Laboratory. [Acessado em 2007 abril]. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.

Van der A DL, Peeters PHM, Grobbee DE, Marx JJM, Van der Schouw YT. Dietary haem iron and coronary heart disease in women. *Eur Heart J* 2005; 26: 257 - 62.

Zar JH. *Biostatistical analysis*. 4ª edição. Editora Prentice Hall: New Jersey - USA, 1999.

Yokota RTC, Vasconcelos TF, Ito MK, Dutra ES, Baiocchi KC, Merchán- Hamann E, Lopes EB, Barbosa RB. Prevalência de fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis em duas regiões do Distrito Federal. *Com Ciências Saúde* 2007; 18 (4): 289 - 296.

Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ. The global burden of chronic diseases. Overcoming impediments of prevention and control. JAMA 2004; 291: 2616 - 22.

Yuan XM, Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. Ann Med 2003; 35: 578 - 91.

WHO/FAO. Technical report series 916. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, Switzerland, 28 January - 1 February, 2002.

CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo pôde concluir que existe 1) correlação e associação positiva entre ferritina e MDA séricos, assim como 2) associação positiva entre a concentração de hemoglobina e MDA séricos, 3) que indivíduos com níveis de ferritina sérica abaixo da normalidade e homens anêmicos apresentam menores níveis de MDA sérico e 4) há uma associação positiva entre as ingestões dietéticas de ferro total e hêmico e a concentração sérica de MDA. Esses resultados sugerem que um maior estado nutricional e o consumo dietético de ferro podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo em adultos.

Estudos futuros são necessários para avaliar o impacto do ferro proveniente da fortificação em populações de bom nível sócio-econômico, principalmente entre homens, mulheres pós-menopausa e idosos.

ANEXOS