

13^{er} Congreso Internacional en Ciencia y Tecnología de Metalurgia y Materiales 2013

SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS

BIOMATERIALES DEGRADABLES A BASE DE HIERRO: INFLUENCIA DE LA LIBERACIÓN DE IONES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Natalia S. Fagali^{(1)*}, Claudia A. Grillo⁽¹⁾, Elizabeth Robello⁽²⁾, Susana Puntarulo⁽²⁾, Mónica A. Fernández Lorenzo⁽¹⁾⁽³⁾

⁽¹⁾Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT La Plata - CONICET, Dpto. de Química, Fac. de Cs. Exactas, UNLP, CC 16, Suc.4, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

⁽²⁾Físicoquímica - Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, Buenos Aires, Argentina.

⁽³⁾Facultad de Ingeniería, UNLP, Calle 47 y 1, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina
Correo Electrónico (autor de contacto): nfagali@inifta.unlp.edu.ar nfagali@gmail.com

Palabras claves: Biomateriales, Hierro, Degradable, Stent

RESUMEN

El Fe y algunas de sus aleaciones han sido propuestos para la manufactura de stents temporales por ser susceptibles a la corrosión en medios biológicos. Su degradabilidad podría evitar los problemas asociados al uso de stents permanentes, aunque la liberación de iones y partículas durante su disolución pueden ocasionar estrés oxidativo e inflamación en los tejidos adyacentes. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} y los cambios de pH sobre cultivos de células CHO-K1. Para ello se expusieron las células a distintas concentraciones de iones Fe (1 - 5 mM) y se analizaron la actividad mitocondrial y la generación de productos de estrés oxidativo. Los resultados indican que el aumento en la concentración de iones Fe (y los cambios de pH asociados) en la interfase Fe/medio biológico, podrían afectar marcadamente la viabilidad de células adyacentes.

Keywords: Biomaterials, Iron, Degradable, Stent.

ABSTRACT

Fe and some of its alloys have been proposed for the manufacture of temporary stents because they are susceptible to corrosion in biological media. Due to their degradability some problems associated to the permanent stents may be avoided. However, the release of ions and particles during dissolution may cause oxidative stress and inflammation in the tissues in contact with the implant. In this paper, the effects of the release of Fe^{2+} and Fe^{3+} and pH changes on cultures of CHO-K1 cells are evaluated. For this purpose the cells were exposed to various concentrations of Fe ions (1- 5 mM) and mitochondrial activity and generation of oxidative stress products were assessed. Results indicate that changes in the concentration of ions (including pH changes) occurring at the interface of Fe/ biological medium during the degradation of Fe may markedly affect the viability of neighboring cells.

1. INTRODUCCIÓN

En la última década, el estudio de biomateriales degradables se ha vuelto uno de los tópicos más revolucionarios en el área de los biomateriales. Los denominados *stents* biodegradables proporcionarían un soporte para la apertura temporal de la luz del vaso arterial hasta la remodelación del tejido con la posterior desaparición gradual del *stent*. La degradabilidad evitaría los problemas que presentan los *stents* permanentes tradicionales: la restenosis [1, 2], la trombosis [3,4] y la necesidad de terapia antiplaquetaria prolongada [5].

Un *stent* biodegradable ideal debería iniciar su degradación a baja velocidad a fin de mantener la integridad mecánica necesaria durante el proceso de remodelación tisular. La remodelación del tejido necesita un período estimado de 6 a 12 meses [6,7]. Mientras la integridad mecánica disminuye, el proceso de degradación debería producirse a una velocidad suficiente sin causar excesiva acumulación de productos de degradación en la zona aledaña al sitio de implantación. Se considera que un período de 12 a 24 meses luego de la implantación es razonable para lograr la degradación total del *stent*. Ambos efectos (degradación y mantenimiento de integridad mecánica) dependen de las características del biomaterial y de las condiciones del sitio de implantación. Consecuentemente, es necesario estudiar en profundidad la interacción de los tejidos aledaños al implante con los productos de degradación del mismo [8]. Debe tenerse en cuenta que la concentración de los iones y partículas generados durante la degradación y el pH pueden variar con la distancia y con el tiempo de exposición.

El conocimiento de los mecanismos de transporte, absorción y almacenamiento de Fe hace que este metal y sus aleaciones sean buenos candidatos para su aplicación como biomateriales degradables, especialmente en niños en etapa de crecimiento. La cantidad de Fe implantado en un *stent* (41 mg, 99,8 %) iguala la cantidad de Fe ingerida oralmente en un mes: esto es menos que la dosis diaria recomendada de Fe-dextrán intravenoso y mucho menos que la cantidad de Fe transfundido con una unidad de sangre (200-250 mg). Por lo tanto, en principio, la biocompatibilidad del Fe puede asumirse como buena y, por otra parte, sus propiedades mecánicas son comparables a las aleaciones metálicas utilizadas en implantes cardiovasculares permanentes [9].

El Fe es un componente importante de proteínas tales como hemoglobina, mioglobina, citocromo, participa del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono y promueve el transporte de lípidos en la sangre [10, 11]. Sin embargo, el exceso de iones Fe libres implica efectos tóxicos como catálisis de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) [12] y también constituye un nutriente necesario para microorganismos patógenos y células tumorales [13]. Los ROS pueden causar peroxidación lipídica, cambios en la composición y fluidez de membrana celular y alteración en proteínas y ADN [14]. Un aumento en los niveles intracelulares de Fe libre afecta el balance normal entre ROS-antioxidantes. Por este motivo y, dado a que la concentración de iones Fe puede alcanzar altos valores en la interfaz biomaterial-tejidos aledaños, es importante estudiar los posibles efectos citotóxicos de los productos de degradación de los biomateriales a base de Fe, particularmente el de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} . El objetivo de este trabajo es evaluar los posibles efectos citotóxico y de inducción de daño oxidativo producidos por estos iones y por el cambio del pH sobre la línea celular CHO-K1.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL / METODOLOGÍA

2.1. Cultivos celulares

Las células de línea CHO-K1 se cultivaron en monocapa a 37°C con 5% de CO_2 utilizando medio de cultivo completo constituido por Ham F12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos (Penicilina 50 UI/ml, Estreptomicina 50 μ g/ml).

Para el análisis del *efecto de los iones Fe + pH*, el medio de cultivo fue reemplazado por medio suplementado con los iones (Fe^{2+} o Fe^{3+}). Estas soluciones se prepararon en medio de cultivo a partir de sales ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y $FeCl_3$, respectivamente en concentraciones que fueron de 1 a 5 mM). Para promover la disolución de la sal de Fe^{2+} se utilizó medio de cultivo a pH < 7 con el que se preparó una solución concentrada [2X]. La dilución de trabajo [X] se preparó adicionando a la solución de Fe^{2+} igual volumen de medio de cultivo con pH \approx 9 antes de su incorporación al cultivo celular. El pH de cada solución se determinó previamente a la incubación de las células. En el caso de las soluciones de Fe^{3+} , las mismas se prepararon con medio de cultivo normal (pH \approx 8,4) y también se determinó el pH de cada solución antes de la incubación.

Para el análisis del *efecto exclusivo del pH*, se reemplazó el medio de cultivo por uno similar con pH modificado. Para ello, se ajustó el pH de los medios de cultivo (con NaOH o H_2SO_4 0,5 M) a los pHs correspondientes a las soluciones de los iones Fe.

2.2. Ensayo de citotoxicidad (MTT).

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto

coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas [15].

Para este ensayo se sembraron $1,5 \cdot 10^3$ células CHO-K1/pozo en una placa de 96 pocillos por 24 h. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó por medio completo conteniendo ya sea las diferentes concentraciones de Fe o el pH modificado y en estas condiciones las células se cultivaron por otras 24 h.

Transcurrido el tiempo de exposición, el medio de cultivo fue removido para adicionar medio completo conteniendo MTT (1 mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Después de 3 h de incubación, las células fueron lavadas con PBS. Seguidamente, se adicionaron 100 μ L dimetilsulfóxido (Merck, Química Argentina SAIC, Argentina) a cada pozo para lisar las células y solubilizar los cristales de formazán. La absorbancia se midió a $\lambda=540$ nm en un lector automático de placas (BioTek Instrument, Inc. USA).

2.3. Determinación del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como consecuencia del estrés oxidativo se generan sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) como productos de la peroxidación lipídica. Las mismas se determinan por reacción con el TBA con el que se forma un complejo coloreado con un máximo de absorción a $\lambda=532$ nm, ensayo conocido como TBARS [16].

Para la determinación de TBARS en células expuestas a los iones Fe y a los diferentes pHs se incubaron $4 \cdot 10^6$ células en cajas de Petri de 10 cm de diámetro durante 24 h. Transcurrido este tiempo, los cultivos celulares se incubaron durante 24 h con medio completo suplementado con los iones Fe o con medio con el pH modificado. Una vez concluido el período de incubación se descartó el medio sobrenadante y seguidamente se lavaron las células con PBS y con tripsina. La suspensión celular se transfirió a tubos Eppendorf para centrifugar. Se descartó el sobrenadante y se le adicionó Tritón al 10 %. Las muestras se dejaron 24 h a 4°C, tras lo cual se sonicaron para favorecer la disgregación celular. Alícuotas de 150 μ L de estos homogenatos se mezclaron con 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA, 15%) y 1000 μ L de TBA (0,67%) y se incubaron a 80 °C durante una hora. El complejo coloreado se extrajo con 500 μ L de butanol y se midió la absorbancia de esta fase a $\lambda=532$ nm en un lector de placas (BioTek Instrument, Inc. USA). Como sustancia patrón para confeccionar la curva de calibración se utilizó tetrametoxipropano. Para fines comparativos se normalizó la producción de TBARS dividiendo la concentración obtenida por el contenido total de proteínas.

2.4. Determinación del contenido de proteínas totales

Para determinar la concentración de proteínas totales se empleó, según el método de Bradford, un colorante hidrofóbico (Azul de Coomassie) cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir a $\lambda=595$ nm [17].

Del homogeneizado de células obtenido en el paso anterior se preparó una dilución 1/10. 25 μ L de esta dilución se mezclaron con 25 μ L de agua y 950 μ L de reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a $\lambda=595$ nm en lector de placas (BioTek Instrument, Inc. USA). Para construir la curva de calibración se utilizó una solución de albúmina bovina (1 mg/ml).

3. RESULTADOS

Al preparar los medios de cultivo suplementados con sales de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} , el pH de los mismos disminuyó conforme aumentó la concentración de iones Fe (Fig. 1). A cada concentración, ambas sales produjeron pHs similares al momento de la incubación, excepto a la máxima concentración (5 mM), en la que la sal de Fe^{3+} produjo una caída del pH significativamente más abrupta que el Fe^{2+} . Se debe tener en cuenta que para la preparación de los medios de cultivo suplementados con Fe^{2+} fue necesario disolver la sal ferrosa ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) en medio de cultivo con $pH < 7$, es decir, más bajo que el pH del medio control ($pH=8,4$) para asegurar su disolución. Por esta razón, inmediatamente antes de ser agregado a las células, se le adicionó un volumen igual de medio de cultivo alcalinizado a fin de que el pH final sea comparable al obtenido en el caso del ión Fe^{3+} . En los medios suplementados con Fe^{3+} se observó la aparición de precipitados presuntamente correspondientes a $Fe(OH)_3$ ausentes en el caso de Fe^{2+} .

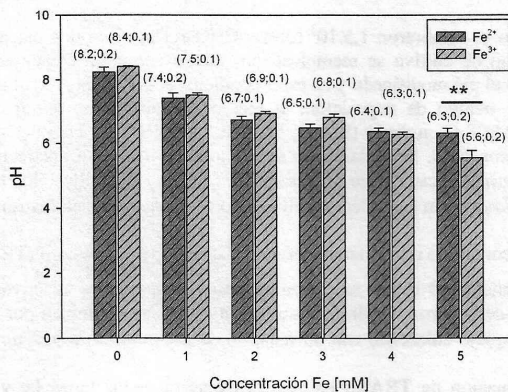


Figura 1. pHs de las soluciones de iones Fe al momento de la incubación. Cada barra representa el promedio de al menos 3 ensayos \pm EEM, cuyos valores se indican entre paréntesis (\bar{x} ; EEM). (***) indica diferencias estadísticamente significativas entre pares cuando las diferencias entre medias se analizaron con el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni con 99% de confianza.

3.1 Citotoxicidad de sales de Fe²⁺ y Fe³⁺

Dado los cambios de pH producidos por las diferentes concentraciones de sales de Fe, fue necesario estudiar paralelamente la influencia que el pH posee por sí mismo sobre la funcionalidad mitocondrial. Para ello, se prepararon medios de cultivo con diferentes concentraciones de sales de Fe (Fig. 2, barras lisas) y también, medios con el pH ajustado a los valores obtenidos a cada concentración de sales de Fe (Fig. 2, barras rayadas). El efecto de estos medios sobre las células se evaluó mediante la técnica de MTT. En este ensayo se observa que en todos los casos (pH y pH+Fe²⁺) (Fig 2A) hay disminución de la actividad mitocondrial respecto del control. En el caso de la sal de Fe²⁺ a concentraciones 4 y 5 mM, el efecto deletéreo sobre la función mitocondrial es mayor en presencia de Fe que el correspondiente al pH. Esto no se verifica a concentraciones 1 y 3 mM, por lo que, en estos casos, la disminución de la actividad mitocondrial sería exclusivamente atribuida a la disminución del pH.

En la Fig. 2B se observa que el efecto de pH+Fe³⁺ es mayor que el efecto causado sólo por el pH, para las concentraciones 3 y 4 mM. A menores concentraciones de Fe (1 y 2 mM) no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto a la respuesta debida sólo al pH.

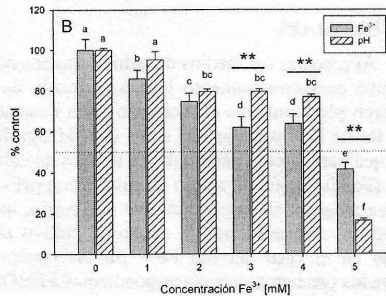
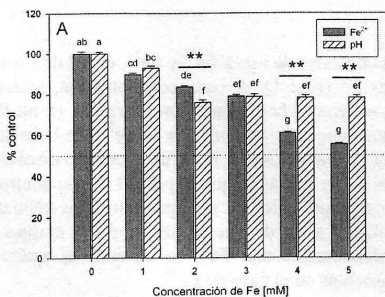


Figura 2. Funcionalidad mitocondrial en función de la concentración de Fe y del pH. A) Fe^{2+} B) Fe^{3+} . Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control (0 mM). Barras lisas corresponden a la respuesta a distintas concentraciones de sales de Fe. Las barras rayadas corresponden a la respuesta al medio cuyo pH fue ajustado al obtenido a las correspondientes concentraciones de Fe. Cada barra representa el promedio de al menos 3 ensayos \pm EEM. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas columnas que comparten letras idénticas. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni con 99% de confianza. (**) indica diferencias estadísticamente significativas entre pares.

Al compararse la función mitocondrial en presencia de sales de Fe^{2+} con la obtenida en presencia de sales de Fe^{3+} (Fig. 3), se observa que a la menor concentración (1 mM) no existen diferencias significativas entre las respuestas a ambos iones. Es importante notar que a concentraciones más altas, el Fe^{3+} presenta un efecto significativamente ($p < 0.01$) más deletéreo sobre la funcionalidad mitocondrial que el Fe^{2+} en la mayoría de los casos (2, 3 y 5 mM) (Fig. 3).

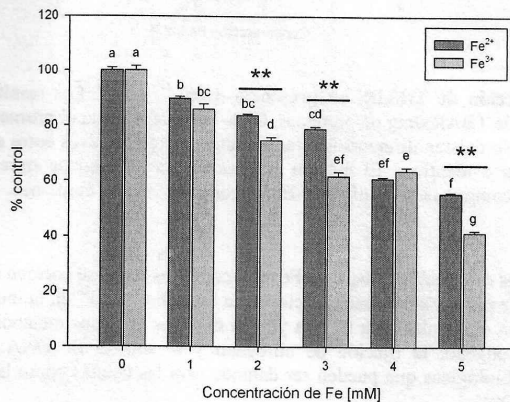


Figura 3. Comparación de la funcionalidad mitocondrial en presencia de Fe^{2+} o Fe^{3+} . Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control (0 mM). Cada barra representa el promedio de al menos 3 ensayos \pm EEM. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas columnas que comparten letras. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni con 99% de confianza. (**) indica diferencias estadísticamente significativas entre pares

3.2 Estrés oxidativo generado por las sales de Fe^{2+} y Fe^{3+}

En la Fig. 4 se esquematiza la producción de TBARS en presencia de diferentes concentraciones de sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} . Se observa que a todas las concentraciones analizadas se produjo aumento en la producción de TBARS con respecto al control (0 mM).

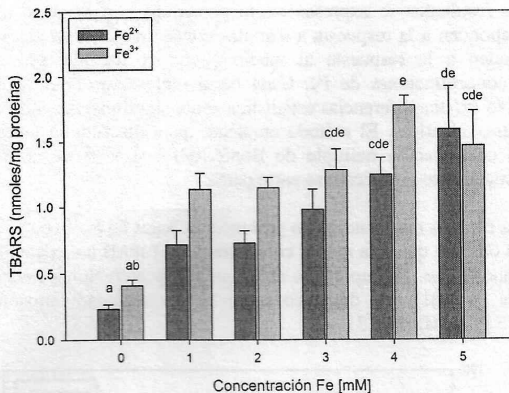
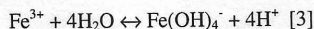
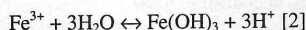
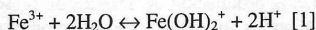


Figura 4. Producción de TBARS en presencia de Fe²⁺ y Fe³⁺ Los resultados se expresan como nanomoles de TBARS/mg de proteínas. Cada barra representa el promedio de al menos 3 ensayos \pm EEM. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas columnas que compartan letras idénticas. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni con 99% de confianza.

4. DISCUSIÓN

Los biomateriales degradables a base de Fe tales como los *stents* se corroen en los fluidos biológicos dando lugar a cambios de pH y a altas concentraciones de iones Fe²⁺ y Fe³⁺ en la interfaz biomaterial/células aledañas. Estos iones son esenciales para la vida ya que diversos procesos metabólicos requieren Fe, entre ellos el transporte de oxígeno, la fijación de nitrógeno y la síntesis de DNA. Sin embargo, también desencadenan procesos biológicos que pueden ser dañinos para las células como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Sunda y Huntsman señalaron que el Fe exhibe un comportamiento químico extremadamente complejo que influye en su solubilidad y disponibilidad biológica. Este comportamiento incluye la quelación de iones férricos por ligandos orgánicos; la hidrólisis de iones férricos disueltos y de complejos de Fe; la foto y bio reducción de quelatos férricos con la subsecuente disociación y reoxidación de Fe²⁺, lo que aumenta la concentración de especies inorgánicas reactivas de Fe²⁺ y Fe³⁺; la absorción de iones férricos sobre la superficie de partículas; y la precipitación de hidróxidos de Fe, seguida de deshidratación progresiva y cristalización para formar óxidos-hidróxidos menos solubles y más estables. Debido a estas dificultades, la solubilidad de especies de Fe inorgánicas es incierta como así también la composición exacta de las especies solubles de hidrólisis de Fe³⁺ (Fe(OH)₂⁺, Fe(OH)₃ y Fe(OH)₄⁻) [18] probablemente producidas a través de las reacciones siguientes:

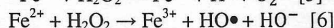
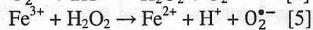
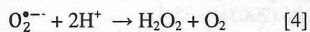


Los niveles de Fe dentro de la célula se encuentran estrechamente regulados para asegurar un adecuado nivel de micronutrientes y, a la vez, prevenir su acumulación y toxicidad. [19]. El Fe es transportado y almacenado en proteínas específicas (transferrina, lactoferrina y ferritina). La transferrina se une a dos iones Fe³⁺ con gran afinidad. Las células incorporan el Fe a través del receptor de transferrina y el Fe³⁺ se reduce entonces a Fe²⁺ y es liberado en el citosol por los endosomas. Una porción del Fe liberado permanece unida a quelatos de bajo peso molecular como citratos, ATP, ácido ascórbico, constituyendo el

estado lábil del Fe [20]. El exceso de Fe es secuestrado por la ferritina que es la forma más importante de almacenamiento del Fe dentro de la célula, desempeñando un rol clave en la prevención de la toxicidad del Fe libre. La ferritina es capaz de almacenar cerca de 4000 átomos de Fe que, de otra manera, podrían agregarse y precipitar. Esta proteína limita la química del Fe, evitando su oxidación no específica y las reacciones de hidrólisis que ocurrirían en el citosol. Sin embargo, algunos estudios *in vitro* indican que proteínas cargadas con Fe pueden liberarlo y así promover la formación de HO• en presencia de H₂O₂ y la peroxidación lipídica en liposomas [21,22] como así también recientes estudios empleando microsomas de hígado de rata han demostrado que la adición de ferritina lleva a la producción de radicales ascorbilo y .OH• [19]. El aumento de la concentración del Fe libre ha sido asociado al incremento de estrés oxidativo. Estudios realizados con células neuronales, astrocitos y oligodendrocitos en cultivos sugieren que el Fe es tóxico únicamente cuando aumenta el nivel dentro de la célula (Kress et al, 2002). Los efectos mencionados desaparecen cuando se utilizan quelatos para complejar los iones Fe intracelulares. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la estabilidad de la unión entre Fe y proteínas es afectada por disminución de pH, lo que podría explicar el aumento en la disponibilidad de Fe libre y el consecuente incremento de la peroxidación lipídica.

Nuestros resultados muestran, para la línea celular CHO-K1, una estrecha dependencia de la disminución de la actividad mitocondrial producida por las sales de Fe²⁺ y Fe³⁺ con la concentración de Fe y la acidez del medio. Asimismo también se observó un incremento del daño oxidativo a mayor concentración de Fe y menor pH. En concordancia, se encontraron efectos similares del pH sobre la acción de los iones Fe con homogeneizados de cerebro. Se ha reportado que cuando los preparados eran expuestos a soluciones ácidas en presencia de Fe²⁺ aumentaba la producción de TBARS por lo que los autores concluyeron que el pH ácido parece proveer un excelente ambiente para que el Fe desarrolle su mayor actividad catalítica, no sólo porque lo libera de los sitios seguros de la transferrina sino porque el pH modula y amplifica la participación del Fe en la peroxidación lipídica [23].

Los resultados de los ensayos realizados con sales de Fe³⁺ (Figs. 2, 3, 4) a distintos pHs están de acuerdo con los obtenidos por Ohyashiki y Nunomura [24] a partir de experiencias en las que empleaban liposomas. Estos autores encontraron que la peroxidación lipídica inducida por Fe³⁺ puede ser promovida al disminuir el pH de la solución de incubación desde 7,4 a 5,5. Investigando las especies involucradas en la peroxidación lipídica ellos encontraron que en presencia de la enzima SOD catalasa o de los secuestradores de HO• la reacción se vio inhibida. Por otra parte, en el caso de las reacciones con Fe²⁺ en las mismas condiciones, los autores no observaron la acción de la enzima ni de los secuestradores, lo que sugeriría que en el caso del Fe²⁺ las especies O₂^{•-}, HO• y H₂O₂ no estarían involucradas pero sí lo estarían en el caso del Fe³⁺ (ver ecuaciones [4-6]). Por otra parte, en presencia de O₂^{•-} y de liposomas, el Fe³⁺ pasa a Fe²⁺, pero esta reacción no ocurre en ausencia de estos últimos. Esto permitiría inferir que tal vez en medio ácido se facilite la generación de HO• a partir de O₂^{•-} y en esas condiciones la reacción de reducción se ve estimulada por la interacción del hidropéroxido lipídico (LOOH) con el Fe³⁺.



Quando se comparan los efectos producidos por ambas sales de Fe se observa que el impacto es significativamente mayor en el caso de Fe³⁺ para ciertas concentraciones. El estado de oxidación del Fe dentro de la células parece ser un parámetro importante en la evaluación de la toxicidad ya que la catálisis de la reacción de H₂O₂ para dar radical hidroxilo requiere de la presencia de Fe³⁺ [25]. Sin embargo, debe considerarse que el análisis de los mecanismos es complejo ya que la especiación del Fe en soluciones oxigenadas es compleja e incluye compuestos metaestables, parcialmente oxidados cuya distribución de concentraciones depende del pH [26].

5. CONCLUSIONES

Nuestros resultados permitirían concluir que la presencia de altas concentraciones (1mM-5mM) de sales de Fe²⁺ y Fe³⁺ en los medios de cultivo produce efectos citotóxicos y aumento de daño oxidativo que aumentan con la concentración de iones Fe y con la acidez del medio.

6. REFERENCIAS

- 1 R Virmani, A Farb, G Guagliumi, FD Kolodgie, "Drug-eluting stents: caution and concerns for long-term outcome" *Coron Artery Dis*, Vol 15 (2004), p 313-318
- 2 AK Mitra, DK, Agrawal, "In stent restenosis: bane of the stent era", *J Clin Pathol*, Vol 59 (2006), p 232-239
- 3 R Hoffmann, GS Mintz, GR Dussailant, JJ Popma, AD Pichard, LF Satler, et al, "Patterns and mechanism of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study", *Circulation*, Vol 94 (1996) 1247-1254.,
- 4 AT Ong, EP Mc Fadden, E Regar, PP de Jaegere, RT van Domburg, PW Serruys, "Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents", *J Am Coll Cardiol*, Vol 45 (2005) 2088-2092.
- 5 R Waksman, "Update on bioabsorbable stents: from bench to clinical", *J Interview Cardiol*, Vol 19 (2006), p 414-421
- 6 MM El-Omar, G Dangas, I Iakovou, R Mehran, "Update on in-stent restenosis", *Curr Interv Cardiol Rep*, Vol 3 (2001), p 296-305
- 7 A Shomig, A Kastrati, H Mudra, R Blasini, H Schuhlen, V Klauss, et al, "Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure", *Circulation*, Vol 90 (1994), p 2716-2724.
- 8 H Hermawan, D Dubé, D Mantovani, "Developments in metallic biodegradable stents", *Acta Biomaterialia*, Vol 6 (2010), p 1693-1697.
- 9 M Peuster, P Wohlsein, M Brüggmann, M Ehlerding, K Seidler, C Fink, H Brauer, A Fischer, G Hausdorf, "A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits", *Heart*, Vol 86 (2001), p 563-569
- 10 GJ Anderson, DM Frazer, GD McLaren, "Iron absorption and metabolism". *Curr Opin Gastroenterol*, Vol 25 (2) : (2009), p 129-135
- 11 GI Stangl, M Kirchgessner M, "Different degrees of moderate iron deficiency modulate lipid metabolism of rats", *Lipids*, Vol 33 (9) (1998): p 889-895.
- 12 D Galaris, M Mantzaris, C Amorgianiotis, "Oxidative stress and aging: the potential role of iron", *Hormones (Athens)*, Vol 7(2) (2008), p:114-122
- 13 ED Weinberg, "Iron availability and infection", *Biochim Biophys Acta*, Vol 1790(7) (2009), p:600-605
- 14 K Jomova, M Valko M "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease". *Toxicology*, Vol 283(2-3) (2011), p 65-87.
- 15 T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays", *J Immunol. Meth.*, Vol. 65 (1983), p. 55-63.
- 16 JA Buege SD Aust. "Microsomal lipid peroxidation". *Methods Enzymol*. Vol 52 (1978), p 302-310
- 17 MM Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*. Vol 7 (1976) , p 48-54
- 18 W Sunda, S Huntsman, "Effect of pH, light and temperatura on Fe-EDTA chelation and Fe hydrolysis in seawater", *Marine Chemistry*, Vol 84 (2003), p 35-47.
- 19 I Rousseau, S Puntarulo, "Ferritin-dependent radical generation in rat liver homogenates", *Toxicology*, Vol 264 (2009), p 155-161
- 20 K Pantopoulos, MW Hentze, "Nitric oxide, oxygen radicals and iron metabolism", *Nitric oxide*, Vol 19 (2000), p 293-313
- 21 OI Aruoma, B Halliwell, "Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoter of hydroxyl radical generation?", *Biochem J*, Vol 241, p 273-278
- 22 MJ O'Connell TJ Peters, "Ferritin and haemosiderin in free radical generation, lipid peroxidation and protein damage", *Chem Phys Lipids*. Vol 45(2-4) (1987), p 241-9.
- 23 W Hassan, M Ibrahim, CW Nogueira, AL Braga, IU Mohammadzai, PS Taube, JB Rocha, "Enhancement of iron-catalyzed lipid peroxidation by acidosis in brain homogenate: comparative effect of diphenyl diselenide and ebselen", *Brain Res.*, Vol 1258 (2009), p 71-7.
- 24 T Ohyashiki, M Numomura. "A marked stimulation of Fe(3+)-dependent lipid peroxidation in phospholipid liposomes under acidic conditions", *Biochim Biophys Acta*. Vol 1484 (2000), p 241-50.
- 25 GJ Kress, KE Dineley , IJ Reynolds , "The relationship between intracellular free iron and cell injury in cultured neurons, astrocytes, and oligodendrocytes", *J Neurosci*. (2002), Vol 22(14), p 5848-55.

26 B Morgan, O Lahav, "The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution--basic principles and a simple heuristic description", *Chemosphere*. Vol 68 (11) (2007), p 2080-4.