

BIOQUÍMICA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA: ENVOLVIMENTO DOS SIDEROSSOMOS NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS HEPÁTICOS

Luiz Erlon Araújo Rodrigues e Pierre Galle

Os processos inflamatórios que se desenvolvem durante as etapas avançadas da esquistossomose mansônica hepática foram relacionados, com o acúmulo de siderossomos, a capacidade dos íons ferrosos/férricos de desencadear a formação de radicais livres e a peroxidação de lipídios membranáceos, assim como à diminuição da estabilidade das membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico hepático. Os lisossomos isolados de fígados de camundongos infectados por 100 cercárias, com 80 e 100 dias de infecção, foram respectivamente, 2,5 e quase 4 vezes mais frágeis que os controles, isolados de fígados de camundongos não infectados. A presença de siderossomos em grande quantidade foi demonstrada por espectrometria aos raios-X.

Palavras-chaves: Esquistossomose mansônica. Metabolismo de ferro. Processo inflamatório. Superóxidos. Radicais livres.

Entre as diversas causas que podem desencadear ou manter os diferentes graus de lesões inflamatórias observadas na hepatopatia esquistossomótica, se destacam: a obliteração de ramos do sistema porta intra-hepáticos por vermes e/ou ovos do *S. mansoni*², o aumento da labilidade das membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico das células hepáticas envolvidas²⁴ e, finalmente, os efeitos de superóxidos e outros radicais livres decorrentes da lise de hemácias comprometidas com as lesões vasculares obstrutivas¹⁹.

Os esquistossômulos do *Schistosoma mansoni* vivem em íntimo contacto com células sangüíneas humanas, principalmente as hemácias, desde o terceiro ou quarto dia após a infecção¹⁴. A superfície desses parasitas é coberta por duas membranas. A externa, rica em lisofosfatilcolina tem a capacidade de aderir a neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e hemácias e lisar as membranas plasmáticas dessas células, com a conseqüente saída dos seus conteúdos citoplasmáti-

cos, permanecendo suas membranas aderidas à superfície dos parasitas⁷. E a membrana interna, muito semelhante à membrana plasmática das demais células de mamíferos⁸.

Rodrigues e Costa²⁴ demonstraram que os diversos componentes do compartimento lisossômico isolados das células hepáticas de camundongos infectados por 100 cercárias eram significativamente mais frágeis que os controles não infectados. A diminuição da estabilidade das membranas desses orgânulos favorece a saída de hidrolases ácidas, proteínas catiônicas e hidrolases neutras capazes de desencadear e/ou manter o processo inflamatório²³.

Radicais livres, principalmente aqueles derivados do oxigênio, como o superóxido (O_2^-), a hidroxila (HO^-) e o ânion hipoclorito (ClO^-), são produzidos durante a reação inflamatória, especialmente pelos leucócitos polimorfonucleares e macrófagos³.

Diante do exposto, resolvemos estudar, através do emprego de técnicas bioquímicas que avaliam as condições físico-químicas das membranas lisossômicas, de microscopia eletrônica e de microanálises por espectrometria aos raios-X (sonda de elétrons), o envolvimento do compartimento lisossômico das células hepáticas com o metabolismo do ferro, relacionando os achados experimentais que se observam na fase avançada da esquistossomose mansônica, em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos albinos, jovens, pesando em média 18 gramas, de ambos os sexos, normalmente

Departamento de Biofunção, Setor de Bioquímica do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

Laboratoire de Biophysique, Faculté de Médecine, Université de Paris, Val de Marne, Créteil, France.

Endereço para correspondência: Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues. Departamento de Biofunção, Setor de Bioquímica/ICS/UFBA.

Caixa Postal 4777, 40140 Salvador, BA, Brasil.

Recebido para publicação em 03/04/90.

alimentados, foram infectados por 100 carcárias, segundo técnica descrita por Standen²⁹ e controlados por exames de fezes após 60 dias do início da citada infecção.

Vinte animais com 80 e outros vinte com 100 dias de infecção, além de mais vinte não infectados, foram sacrificados por traumatismo craniano, sem anestesia. Seus fígados imediatamente retirados e colocados, separadamente, em solução tamponada de manitol $25 \times 10^{-2}M$, contendo TRIS (hidroximetil) aminometano $10^{-2}M$, etileno diamina:traacetato dissódico (EDTA-sódico) $2 \times 10^{-4}M$, cloreto de potássio $10^{-2}M$, fosfato monopotássico $5 \times 10^{-3}M$ e fosfato dissódico $5 \times 10^{-3}M$, pH 7.4 e entre 2° a 4°C. De cada um deles foi retirado um fragmento do lóbulo maior para os estudos microanalíticos e de microscopia eletrônica. O restante, depois de separação da vesícula biliar, foi reduzido a pequenos fragmentos e lavado na mesma solução tamponada até a retirada, ao máximo possível, do sangue. Em seguida, os fragmentos foram homogeneizados em aparelho de Potter-Elvehjem, a 250 rpm, no tempo máximo de 2 minutos, em banho de gelo fundente.

A fração rica em lisossomos e partículas correlatas, correspondente a cada fígado, foi isolada no sedimento de 32.000g, por centrifugação fracionada e refrigerada a 2°C, durante 20 minutos, segundo técnica descrita por Rodrigues e cols²⁵. Este sedimento que concentra a maioria dos componentes do compartimento lisossômico hepático, a saber, vacúolos autofágicos e heterofágicos, autofagolisossomos, grânulos de secreção, lisossomos primários, lisossomos secundários e corpúsculos residuais, foi utilizado como fonte das observações experimentais. Ele foi ressuspenso para um volume igual ao do homogeneizado inicial, usando a solução tamponada de manitol antes descrita e incubado em banho de gelo fundente durante 20 minutos. Após esse tempo, foi submetido a nova centrifugação a 32.000g durante 20 minutos e a 2°C, para a separação, num novo sedimento, dos diversos componentes do compartimento lisossômico ainda intactos. A determinação da atividade fosfatásica ácida (ortofosfórico-monoéster-fosfohidrolase, 3.1.3.2) neste último sobrenadante permite a avaliação das condições físico-químicas relacionadas com a estabilidade das membranas lisossômicas. A atividade enzimática foi medida segundo a técnica proposta por Roy e cols²⁷. As dosagens das proteínas totais foram efetuadas segundo a técnica de Lowry e cols, modificada por Rodrigues e cols²⁶.

As observações por microscopia eletrônica e as microanálises do compartimento lisossômico foram efetuadas a partir de pequenos fragmentos do tecido hepático, previamente identificados e colocados em solução tamponada de fosfato $10^{-1}M$, pH 7.2, em

banho de gelo fundente. Esses fragmentos foram tratados separadamente, por solução tamponada de glutaraldeído a 1,5% v/v em fosfatos $10^{-1}M$, pH 7.2. Neste processo de fixação com o agente redutor, eles permaneceram durante 1h a 4°C. Findo esse tempo, foram lavados duas vezes com a solução tamponada de fosfatos $10^{-1}M$, pH 7.2 e transferidos para serem pós-fixados em solução de ácido ósmico em cacodilato de sódio $10^{-1}M$, por 1h a 4°C. Depois desse tempo de fixação os fragmentos foram lavados duas vezes usando-se solução tamponada de cacodilato de sódio $10^{-3}M$, pH 7.2 e, em seguida, desidratados em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, segundo técnica descrita por Junqueira e cols¹⁷. Depois de pós-fixados foram embebidos em resina epóxi e submetidos a 60°C durante 1 hora para a polimerização do plástico. Fatias ultrafinas foram depositadas em grades de cobre para a microscopia eletrônica (microscópio de transmissão Philips, modelo EM-300) e de titânio para as microanálises (sonda de elétrons CAMECA modelo MBX). Uma vez escolhido o lisossomo secundário (siderossomo) e/ou o corpúsculo residual a ser analisado, ele foi ativado por um feixe de elétrons de 50nm de diâmetro, intensidade de 150nA e submetido a um potencial de ativação de 45KV. A detecção dos espectros de raios-X emitidos a partir das raia K-alfa 1 dos átomos de ferro e enxofre foi efetuada por filtro microanalisador de raios-X, constituído de fluoreto de lítio, segundo técnica descrita por Galle¹³.

Os resultados bioquímicos que avaliam a estabilidade das membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico isolados dos fígados de animais-controles e daqueles em fase adiantada de esquistossomose mansônica, foram expressos em milhuidades de atividade fosfatásica ácida por miligrama de proteínas totais. Eles foram comparados entre si através do teste "t" de Student⁶ e considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

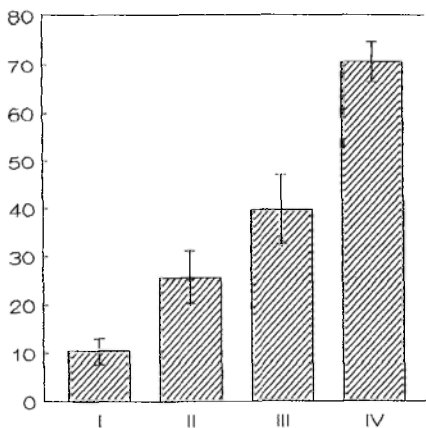
As condições experimentais de isolamento dos lisossomos foram controladas pela prova de digitonina, segundo metodologia descrita por Rodrigues e cols²⁵.

RESULTADOS

A integridade funcional das membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico, isolados no sedimento de 32.000g, pode ser avaliada indiretamente, através da medida da atividade fosfatásica ácida no sobrenadante, resultante da última centrifugação. A saída de enzimas marcadoras dos lisossomos para o meio externo a essas partículas, tem sido empregada como um método bioquímico indicador, dos mais seguros, no que se refere à estabilidade desses corpúsculos⁴.

Deste modo, pode-se notar na Figura 1 que a atividade fosfatásica ácida correspondente aos 80 dias de infecção ($25,7 \pm 5,5$ mU/mg) foi 2,5 vezes maior que nos controles não infectados, ($10,5 \pm 2,7$ mU/mg) e que com 100 dias, ($39,8 \pm 7,2$ mU/mg), esta mesma atividade foi quase 4 vezes maior. Estes dados foram bastante significativos quando comparados com os controles, $p < 0,02$ e entre si, $p < 0,05$. Eles confirmaram resultados anteriormente obtidos onde lisossomos isolados das células hepáticas de animais parasitados pelo *S. mansoni*, nas fases adiantadas de infecção, são bem mais lábeis que os controles²⁴.

Os testes que usaram a digitonina, substância que quebra todos os corpúsculos lisossômicos, mostraram que a atividade enzimática total é quase 7 vezes maior que aquela encontrada nos controles. Este dado permite extrapolar que mais da metade dos lisossomos hepáticos nos animais com 100 dias de infecção estão labilizados e, por tanto, bem mais frágeis, mais susceptíveis à lise e extravasamento dos seus conteúdos hidrolíticos.



- I - Controles, 20 animais.
- II - Com 80 dias de infecção, 20 animais.
- III - Com 100 dias de infecção, 20 animais.
- IV - Controles lisados pela digitonina - 10 mM, 20 animais.

Figura 1 - Variações das atividades lisossômicas em fígados de camundongos-controles e infectados por 100 cercárias do *Schistosoma mansoni*.

Os fígados-controles estão representados pela Figura 2. A Figura 3 representa os 80 dias de infecção e pode-se notar a grande quantidade de componentes do compartimento lisossômico, com membranas bem delimitadas, cheias de material, provavelmente lipoprotéico eletrodense, alguns em fase de fusão e outros já transformados em corpúsculos residuais, bem mais eletro-

denso. Microanálises efetuadas nesses orgânulos indicaram a presença de grandes concentrações de ferro e enxofre. Pode-se considerá-los como siderossomos em diversas fases de formação.

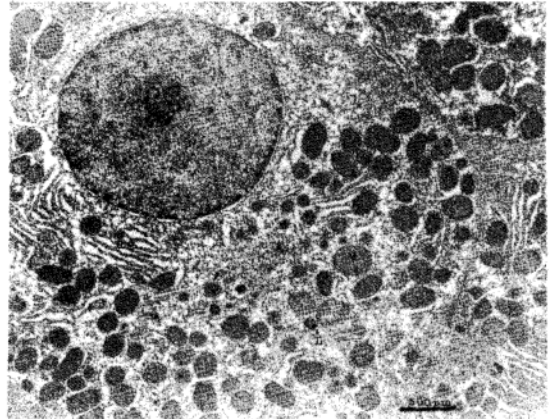


Figura 2 - Fotomicrografia de hepatócito normal. Nota-se o núcleo (N) com cromatina frouxa e nucléolo evidente, além do retículo endoplasmático rugoso (RE) bem desenvolvido, muitas mitocôndrias (M) e alguns lisossomos (L). No quadrante inferior direito da foto, observa-se canaliculo biliar entre dois hepatócitos.

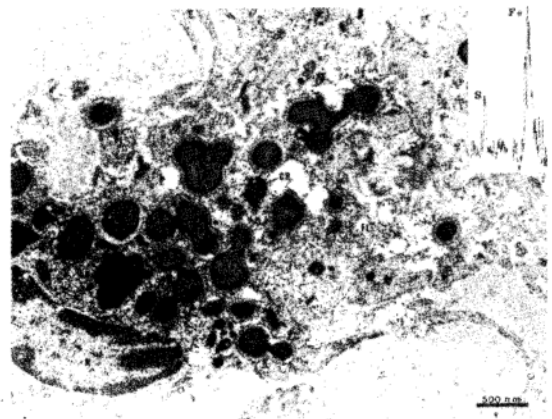


Figura 3 - Fotomicrografia de fígado de camundongo infectado por 100 cercárias e com 80 dias de infecção. Parte de célula, provavelmente fagocitária, em franco processo de desorganização, mostrando vários lisossomos secundários (LS), cheios de material eletrodense, muitos deles em processo de fusão. São vistos também, além de mitocôndrias (M) e do Núcleo (N), alguns fagolisossomos e muitos corpúsculos residuais (CR) ou siderossomos. Os espectros de raios-X, situados na parte superior direita da foto, indicam as presenças de ferro e enxofre.

A Figura 4 que representa os 100 dias de infecção mostra uma célula provavelmente fagocitá-

ria, extremamente rica em corpúsculos residuais bastante eletrodensos, praticamente sem membranas e compostos quase exclusivamente de ferro e enxofre, portanto, siderossomos já bem definidos.

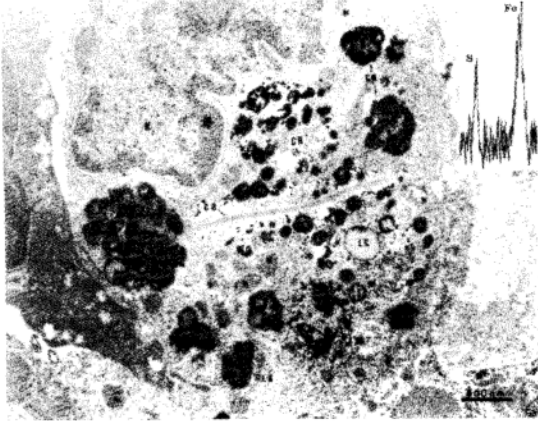


Figura 4 - Fotomicrografia de fígado de camundongo infectado por 100 cercárias e com 100 dias de infecção. Célula, provavelmente fagocitária, mostrando em seu citoplasma grande quantidade de corpúsculos residuais (CR), alguns bastante eletrodensos ou siderossomos, outros de aspecto lamelar. Nota-se, além do núcleo (N) apresentando finas inclusões eletrodensas, algumas mitocôndrias (M) com alterações de cristas e pequenas inclusões. Os espectros de raios-X, situados na parte superior direita da foto, indicam as presenças de ferro e enxofre.

DISCUSSÃO

A saída de enzimas lisossômicas para o citoplasma pode iniciar alterações degenerativas e até mesmo a lise das células, levando ao desencadeamento do processo inflamatório. Este fenômeno tem sido exaustivamente comprovado experimentalmente desde a descoberta dos lisossomos por Duve e cols¹⁰ em 1955, até atualmente²⁰.

Entre inúmeros fatores que causam a lesão das membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico, podem ser destacados três deles, intimamente relacionados e, seguramente presentes na fase adiantada da esquistossomose mansônica hepática: a diminuição da oxigenação *in situ*¹¹, o acúmulo de ferritina e hemossiderina nos componentes lisossômicos²¹ e a produção de radicais livres, além do peróxido de hidrogênio¹⁹.

A ferritina desempenha importante papel no metabolismo do ferro, nos tecidos animais, porque se constitui na primeira proteína de estoque deste material principalmente no fígado, baço e medula óssea³⁰. Ela é constituída de um núcleo contendo óxido férrico hidratado e alguns resíduos de fosfato, circundado por

uma camada protéica. Chega a ser o maior componente de metabolismo de ferro não hemínico, possui até 4.500 átomos de ferro trivalentes ligados a cada molécula de apoferritina e chega a constituir 25% de ferro total do organismo⁹.

Segundo Weir e cols³¹, quando a presença citoplasmática de ferritina alcança uma concentração máxima que varia com o tipo de célula, ela é autofagocitada pelos lisossomos que a concentram em forma de agregados protéicos, insolúveis em água, bem mais ricos em ferro e conhecidos como hemossiderinas.

A captação do ferro extracelular se faz principalmente sob a forma de transferrina por endocitose, diretamente ligada aos microtúbulos e ao compartimento lisossômico. Esta captação pode ser inibida por grupamentos tiólicos livres e por 2,4 dinitrofenol²⁸.

Os siderossomos que são lisossomos carregados de ferritina e hemossiderina, se apresentaram muito numerosos e localizados predominantemente nos hepatócitos e macrófagos, em áreas de fibrose ou granulomatosa. Concordantes com os achados de Anderson e Rao¹, os siderossomos estavam em menor número nas células de Kupffer e raros nas células epiteliais dos ductos biliares.

Tem sido amplamente demonstrado que o ferro e/ou qualquer de suas formas de reserva aumentam em muito a toxicidade e a síntese dos radicais livres derivados do oxigênio, nos tecidos inflamados^{3 16 19}. Entre os diversos efeitos nocivos destes radicais destaca-se a peroxidação dos lipídios, dos diversos sistemas membranáceos celulares, principalmente dos lisossomos, levando à desestabilização de suas membranas com a conseqüente saída de enzimas hidrolíticas para o citoplasma²¹.

De acordo com Brunk e Cadenas⁵, a produção de superóxido, peróxido de hidrogênio, além de outros componentes tóxicos para os lisossomos, fabricados durante a fagocitose, são considerados de grande importância para os mecanismos de defesa do hospedeiro durante o processo inflamatório.

Até pouco tempo, os íons hidroxilas eram considerados como os mais importantes agentes oxidantes dos lipídios insaturados, componentes das membranas. Bem recentemente foi demonstrado que a relação Fe^{2+}/Fe^{3+} está muito implicada nessa peroxidação⁴. Além da formação dos radicais livres citados, Halliwell e Gutteridge¹⁵ demonstraram que interações do radical superóxido (O_2^-) com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ferro são capazes de formar os radicais ferril e perferril, ambos de alta reatividade química.

Finalmente o ferro ionizado, originado de importantes fontes celulares, a exemplo dos depósitos lisossômicos de ferritina e hemossiderina^{12 21} além da isquemia¹⁸, provocada pela obliteração dos ramos

intra-hepáticos do sistema porta pelos ovos e/ou vermes *S. mansoni*, talvez possa ser incluído como um dos responsáveis pela reação inflamatória característica desta parasitose.

SUMMARY

The inflammatory processes that develop during the advanced stages of hepatic schistosomiasis mansoni have been related in this study to: (a) accumulation of siderosomes; (b) capacity of the ferrous/ferric ions to unleash the formation of free radicals; (c) peroxidation of membranaceous lipids and; (d) reduction of stability of the membranes of several components of the hepatic lysosomal compartment. The lysosomes isolated from the livers of infected mice by 100 cercariae, with 80 and 100 days of infection, were respectively 2.5 and almost 4 times weaker than the control ones isolated from livers of non-infected mice. The presence of a great quantity of siderosomes has been demonstrated by transmission electronic microscopy and X-ray spectrometry microanalysis.

Key-words: *Schistosomiasis mansoni*. Iron metabolism. Inflammatory process. Superoxide. Free radicals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson WR, Rao KV. Hepatic iron overload in renal transplant recipients: Ultrastructural observations. *Ultrastructural Pathology* 10:227-234, 1986.
2. Andrade ZA, Bina JC. A patologia da forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica em sua forma avançada (Estudo de 232 necrópsias completas). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 78:285-305, 1983.
3. Biemond P, Swaak AJG, Van Eijk HG, Koster JF. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 4:185-198, 1988.
4. Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *The Journal of Biological Chemistry* 261:10282-10289, 1986.
5. Brunk U, Cadenas E. The potential intermediate role of lysosomes in oxygen free radical pathology. *Review Article. APMS* 96:3-13, 1988.
6. Buttner H, Hanset E, Stamm D. Statistical analysis control and assessment of experimental results. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. 2nd edition, Verlag Chemie, New York, p. 318-393, 1974.
7. Caulfield JP, Cianci CML. Human erythrocytes adhering to Schistosomula of *Schistosoma mansoni* lyse and fail to transfer membranes components to the parasite. *The Journal of Cell Biology* 101:158-166, 1985.
8. Caulfield JP, Korman G, Butterworth AE, Hogan M, David JR. The adherence of human neutrophils and eosinophils to schistosomula: evidence for membrane fusion between cells and parasites. *The Journal of Cell Biology* 86:46-63, 1980.
9. Cleton MI, de Bruijn WC, Van Blokland WTM, Marx JJM, Roelofs JM, Rademakers LHPM. Iron content and acid phosphatase activity in hepatic parenchymal lysosomes of patients with hemochromatosis before and after phlebotomy treatment. *Ultrastructural Pathology* 12:161-174, 1988.
10. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Intracellular distribution on patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal* 60:604-617, 1980.
11. Decker RS, Poole AR, Crie JS, Dingle JT, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. II Immunohistochemical and biochemical changes in cathepsin D. *American Journal of Pathology* 98:445-456, 1980.
12. Dickens BF, Mak IT, Weglicki WB. Lysosomal lipolytic enzymes lipid peroxidation and injury. *Molecular and Cellular Biochemistry* 82:119-123, 1988.
13. Galle P. The role of lysosomes in the renal concentration of mineral elements. *Advances in Nephrology from the Necker Hospital* 12:85-99, 1983.
14. Golan DE, Brown CS, Cianci CML, Furlong ST, Caulfield JP. Schistosomula of *Schistosoma mansoni* use lysophosphatidylcholine to lyse adherent human red blood cells and immobilise red cell membrane components. *The Journal of Cell Biology* 103:819-828, 1986.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219:1-14, 1984.
16. Jamieson D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Radical Biology and Medicine* 7:87-108, 1989.
17. Junqueira LC, Carneiro J, Contopoulos AN. Blood cells. In: *Basic Histology* 2nd edition. Lange Medical Publications, Los Altos CA p. 1-16, 1977.
18. Kalra J, Lautner D, Massey KL, Prasad K. Oxygen free radicals induced release of lysosomal enzymes *in vitro*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 84:233-238, 1988.
19. Monteiro HP, Winterbourn CC. The superoxide dependent transfer of iron from ferritin to transferrin and lactoferrin. *Biochemical Journal* 256:923-928, 1988.
20. Olsson GM, Svensson I, Zdolsek JM, Brunk UT. Lysosomal enzyme leakage during the hypoxanthine/xanthine oxidase reaction. *Virchows Archiv B Cell Pathology, Including Molecular Pathology* 56:385-391, 1989.
21. Richter GW. Studies of iron overload. Lysosomal proteolysis of rat liver ferritin. *Pathology Research and Practice* 181:159-167, 1986.
22. Rocha H. Glomerulopatia da esquistossomose mansônica. In: Azevedo ES, Rebouças G, Rocha H, Lyra LGC, Teixeira RS, Andrade SG, Andrade ZA (eds) *Aspectos peculiares da infecção por Schistosoma mansoni*. Centro Editorial da Universidade Federal da Bahia p. 133-160, 1984.
23. Rodrigues LEA. Alterações bioquímicas lisossômicas na esquistossomose mansônica hepática experimental. Te-

- se para Professor Titular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1984.
24. Rodrigues LEA, Costa MFD. Bioquímica da esquistossomose mansônica VI – Alterações do compartimento lisossômico hepático relacionadas ao tempo de infecção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 20:169-174, 1987.
 25. Rodrigues LEA, Costa MFD, Batista P. Biochemistry of Schistosomiasis mansoni. IV. Effects of oxamniquine on the hepatic lysosomal activity. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 25:223-228, 1983.
 26. Rodrigues LEA, Mathias CMC, Amorim MSP. Modificação do método de Lowry para a quantificação de proteínas. *Revista Brasileira de Patologia Clínica* 25:35, 1989.
 27. Roy AV, Brower ME, Hayden JE. Determination of acid phosphatase using thymolphthalein monophosphate. In: Tietz N (ed) *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 2nd edition, WB Saunders Company Philadelphia, p. 617-618, 1971.
 28. Sorokim LM, Morgan EH, Yeoh GCT. Transferrin endocytosis and iron uptake in developing myogenic cell in culture: Effects of microtubular and metabolic inhibitors, sulphhydryl reagents and lysosomotropic agents. *Journal of Cellular Physiology* 137:483-489, 1988.
 29. Standen OD. The penetration of cercariae of *Schistosoma mansoni* into the skin and lymphatics of mouse. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 42:292-298, 1953.
 30. Topham R, Goger M, Pearce K, Schultz P. The mobilization of ferritin iron by liver cytosol. A comparison of xanthine and NADH as reducing substrates. *Biochemical Journal* 261:137-143, 1989.
 31. Weir MF, Gibson JF, Peters TJ. Haemosiderin and tissue damage. *Cell biochemistry and Function* 2:186-194, 1984.