

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM BIOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA

**PARTICIPAÇÃO E HOMEOSTASE DO FERRO NO DIABETES
TIPO 1 EM MODELOS ANIMAIS**

Autora: Maísa Silva

Orientadora: Maria Lúcia Pedrosa

Co-orientador: Marcelo Eustáquio Silva

Ouro Preto, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM BIOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA

PARTICIPACÃO E HOMEOSTASE DO FERRO NO DIABETES TIPO 1 EM MODELOS ANIMAIS

Autora: Maísa Silva

Orientadora: Maria Lúcia Pedrosa

Co-orientador: Marcelo Eustáquio Silva

*Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
do Núcleo de Pesquisas em Biologia da
Universidade Federal de Ouro Preto, como parte
integrante dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor, em Ciências Biológicas, área de concentração:
Bioquímica Estrutural e Fisiológica.*

Ouro Preto, 2011

S586p

Silva, Maísa.

Participação e homeostase do ferro no diabetes tipo 1 em modelos animais [manuscrito] / Maísa Silva. – 2011.

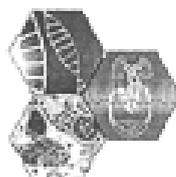
xvii, 109f.: il., color; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Diabetes - Teses. 2. Sobrecarga de ferro - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses. 4. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Universidade Federal

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Participação e Homeostase do Ferro no Diabetes Tipo I em Modelos Animais"

Aos 22 dias do mês de março de 2011, às 09:00h, na Sala de Seminários do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna Maísa Silva. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marialdo Carmo Peluzio
Examinadora (UFV)


Prof. Dr. Miriam Chaves Scholtz
Examinadora (UFMG)


Prof. Dr. Lisandra Brandino de Oliveira
Examinadora (UFOP)


Prof. Dr. Renata Nascimento de Freitas
Examinadora (UFOP)


Prof. Dr. Maria Lúcia Pedrosa
Presidente

DATA DA DEFESA: 22/03/2011

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio financeiro da *CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP*.

Aos Meus pais, **Acrísio e Nini**,
meu porto seguro sempre.

Aos professores **Maria Lúcia Pedrosa e
Marcelo Eustáquio Silva**, meus orientadores,
pela paciência, competência e amizade.
É imensurável a admiração que sinto por vocês.
Obrigada por estes vários anos de agradável convivência.

A **Deus**, pois me reservou uma família, amigos e oportunidades maravilhosas. Não há palavras para descrever sua bondade e amor.

Ao meu irmão, **Bruno de Paulo Silva**, pelo cuidado, preocupação, atenção e amor.

Ao Professor **Wanderson Geraldo de Lima** pela dedicação, carinho e disponibilidade que sempre me atendeu.

As Professoras **Daniela Caldeira Costa e Riva de Paula Oliveira**, por todo o conhecimento compartilhado, sugestões, brincadeiras e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica Metabólica e Laboratório de Nutrição Experimental, **Aline Mayrink, Ana Flávia Santos, Bárbara Quirino, Bianca Figueiredo, Bruno Pádua, Cintia Brito, Danielle Lima, Emerson Oliveira, Fabiano Haraguji, Fernanda Camini, Glaucy Rodrigues, Heberth de Paula, Joamyr Rossoni, Joyce Ferreira, Larissa Bonomo, Lorena Silva, Melina Souza, Poliane Maciel, Rogério Ferreira, Sandra Camilo, Simone Cunha e Waleska Dornas** pela paciência, auxílio, incentivo e amizade. Obrigada pela atenção prestada nos momentos de dificuldades e desabafos.

Ao **Jair Pastor**, pela amizade, descontração e por toda ajuda no laboratório.

À **Maria Aparecida Trópia**, pela atenção e disponibilidade.

À **república Bem-Te-Vi**, moradoras e ex-alunas, pelos momentos de alegria e lições de vida aprendidas.

RESUMO

O ferro está envolvido na formação de espécies reativas de oxigênio e tem sido postulado que o estresse oxidativo decorrente de uma sobrecarga de ferro está relacionado às complicações observadas no diabetes. O papel do ferro nesta patogênese tem sido sugerido principalmente pelo aumento da incidência de diabetes tipo 2 em diversas causas hereditárias de sobrecarga de ferro, como na hemocromatose. Há uma relação bidirecional entre os metabolismos de glicose e ferro, dessa forma a hiperglicemia pode contribuir para intensificar o estresse oxidativo desencadeado pelo ferro. Em alguns trabalhos, mas não em todos, parâmetros do status de ferro, como ferritina e saturação de transferrina, apresentam-se alterados em pacientes com diabetes tipo 2. Não está claro se esta relação também ocorre em pacientes com diabetes tipo 1 ou em indivíduos com uma sobrecarga de ferro adquirida, como por exemplo suplementação indiscriminada de ferro. Este estudo avaliou alterações na homeostase de ferro, carboidratos e lipídios e relacionou mecanismos moleculares envolvidos na inter-relação entre diabetes e ferro em modelos animais distintos. Os resultados mostraram que o hamster foi um melhor modelo experimental. Verificamos neste modelo uma potencialização dos níveis glicêmicos no diabetes causado pela suplementação com ferro, além do efeito do diabetes na homeostase do ferro. Assim, este modelo foi mais sensível em demonstrar a relação bidirecional entre o metabolismo de glicose e ferro. Por outro lado, verificamos que o aumento da expressão do mRNA do gene para PPAR alfa no fígado provocado pelo diabetes, não foi agravado pelo excesso de ferro, corroborando com alguns parâmetros do estresse oxidativo dosados no fígado destes animais. Em ratos observamos alterações no metabolismo de ferro causadas pelo diabetes. A expressão do mRNA hepático do receptor de transferrina foi aumentada pelo diabetes, porém a interação dos dois fatores ocasionou um aumento do mRNA da hepcidina, sugerindo que a homeostase do ferro é alterada pelo diabetes e níveis de ferro no organismo. Este trabalho possibilitou um entendimento maior da relação entre diabetes e excesso

de ferro, revelando a capacidade do ferro em potencializar o diabetes, possivelmente devido sua capacidade pro-oxidante.

ABSTRACT:

Iron is involved in the formation of reactive oxygen species and has been postulated that oxidative stress resulting from iron overload is related to the complications seen in diabetes. The role of iron in this pathogenesis has been suggested mainly by the increased incidence of type 2 diabetes in several hereditary causes of iron overload as in hemochromatosis. There is a bidirectional relationship between the metabolisms of glucose and iron, thereby hyperglycemia may contribute to increase oxidative stress triggered by iron. In some studies, but not all, parameters of iron status such as ferritin and transferrin saturation, are found altered in patients with type 2 diabetes. It is unclear whether this relationship also occurs in patients with type 1 diabetes or in individuals with an iron overload acquired, such as indiscriminate iron supplementation. This study evaluated changes in iron homeostasis, carbohydrates and lipids and related molecular mechanisms involved in the interrelationship between diabetes and iron in distinct animal models. The results showed that the hamster was a better experimental model. We verified in this model a potentiation of glucose levels in diabetes caused by iron supplementation, besides the effect of diabetes on iron homeostasis. Thus, this model was more sensitive in demonstrating the bidirectional relationship between glucose metabolism and iron. Moreover, we found that increased expression of mRNA for PPAR alpha gene in the liver caused by diabetes, was not aggravated by iron excess, corroborating some parameters of oxidative stress measured in the liver of these animals. In rats we observed changes in iron metabolism caused by diabetes. The hepatic mRNA expression of transferrin receptor was increased by diabetes, but the interaction of the two factors led to an increase in hepcidin mRNA, suggesting that iron homeostasis is altered by diabetes and iron levels in the body. This work enabled a greater understanding of the relationship between diabetes and iron excess, revealing the ability of iron in potentiates diabetes, possibly because of its pro-oxidant capacity.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT:	IX
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	3
2-1- Diabetes	3
2.2 - Estresse oxidativo	4
2.3 – Ferro e Diabetes.....	6
2.3.1 – Regulação da Homeostase do Ferro e situações que a comprometem	6
2.3.2 - Ferro e Diabetes.....	10
2.4- Modelos de suplementação de ferro	13
2.5- Modelos de diabetes experimental.....	14
2.6- Distúrbios cardiovasculares e diabetes	17
2.7 - Defesas antioxidantes e produtos do estresse oxidativo num quadro de diabetes.....	21
3 - OBJETIVOS	26
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Animais e divisão dos grupos.....	27
4.1.1 - Desenho experimental do primeiro experimento:	27
4.1.2 - Delineamento experimental do segundo experimento	28
4.2. Dietas	29
4.3- Eutanásia e coleta de tecidos	30
4.4- Dosagens bioquímicas.....	30
4.5 – Análise estatística	47
5 - RESULTADOS	48
EXPERIMENTO 1 – Efeito do diabetes sobre a homeostase do ferro em ratos	48
Perfil Glicêmico e Indicadores Bioquímicos da função pancreática	48
Homeostase do Ferro	50
Enzimas e metabólitos séricos	52
Defesas Antioxidantes	54
Produtos do estresse oxidativo.....	56
Peso corporal e dos órgãos.....	60
Análise da expressão de mRNA	62

6 – DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO EFEITO DO DIABETES SOBRE A HOMEOSTASE DO FERRO EM RATOS:.....	64
7- RESULTADOS	68
EXPERIMENTO 2 – Efeito do diabetes sobre a homeostase do ferro em hamster	68
Curva de Mortalidade	68
Perfil Glicêmico e Indicadores Bioquímicos da função pancreática	68
Teste de tolerância a glicose	71
Enzimas e metabólitos séricos	75
Defesas Antioxidantes	77
Produtos do estresse oxidativo.....	79
Perfil lipídico	81
Peso corporal e dos órgãos.....	83
Análise da expressão de RNAm	84
Análise histológica.....	84
8 - DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO EFEITO DO DIABETES SOBRE A HOMEOSTASE DO FERRO EM HAMSTER:.....	88
9 – CONCLUSÃO GERAL.....	91
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
11 - ANEXOS - PUBLICAÇÕES	106

Tabela 1 - Dieta AIN-93M modificada	29
Tabela 2: Iniciadores utilizados para o qPCR	46
Tabela 3. Peso inicial, peso final e peso dos fígados e rins de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)	61
Tabela 4. Peso do baço, gordura abdominal e coração de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)	61
Tabela 5. Peso inicial, final e dos fígados e rins de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF)	84

Figura 1. Níveis séricos de glicose, frutossamina e atividade de amilase e lipase de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)49

Figura 2. Níveis séricos de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação ao ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (IST), concentração de ferro no fígado e hemoglobina total de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)51

Figura 3. Níveis séricos de albumina, proteínas totais, creatinina e atividade das transaminases pirúvicas (ALT) e oxalacética (AST) de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)53

Figura 4. Níveis de glutathiona no fígado e atividade da catalase no fígado, atividade sérica da superóxido desmutase (SOD), níveis de óxido nítrico (NO) e níveis de grupos sulfidrilas totais no soro de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)55

Figura 5. Níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de proteínas carboniladas no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)57

Figura 6. Níveis séricos de colesterol total, suas frações e triacilgliceróis e atividade de Paraoxonase de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)59

- Figure 7 – Níveis relativos da expressão da hepcidina/GAPDH no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro (CF), ratos diabéticos tratados com dieta padrão (D) e ratos diabéticos tratados com dieta suplementada com ferro (DF).....62
- Figura 8 – Níveis relativos da expressão da ferritina/GAPDH no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro (CF), ratos diabéticos tratados com dieta padrão (D) e ratos diabéticos tratados com dieta suplementada com ferro (DF).....63
- Figure 9 – Níveis relativos da expressão de Trf-1/GAPDH no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro (CF), ratos diabéticos tratados com dieta padrão (D) e ratos diabéticos tratados com dieta suplementada com ferro (DF).63
- Figura 10. Níveis séricos de glicose, frutossamina e hemoglobina e atividade das enzimas amilase e lipase de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF)70
- Figura 11. Teste de tolerância oral a glicose (TTGO) de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF).....72

Figura 12 - Níveis séricos de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação ao ferro (CTLF), índice de saturação de transferrina e concentração de ferro no fígado de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF) 74

Figura 13 - Atividade das transaminases pirúvica e oxalacéticas (ALT e AST) e níveis séricos de proteínas totais, albumina e creatinina de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF)76

Figura 14. Níveis de glutatona no fígado, atividade de superóxido dismutase sérica, atividade da catalase no fígado e rins e níveis de sulfidrilas totais no soro de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF)78

Figura 15. Níveis de proteínas carboniladas no fígado e rim e concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado, rins e pâncreas de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF) ...80

Figura 16. Níveis séricos de triacilgliceróis e colesterol total e suas frações e atividade de paraoxonase de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF)82

Figura 17 - Níveis de expressão relativa PPAR- α / β -actina no fígado de hamsteres que foram alimentados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro carbonílico (CF), diabetes (D) e Diabetes suplementado com ferro carbonílico (DF).....84

Figura 18 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado 86

Figura 19 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas..... 87

AGE – produtos de glicação avançada
ALT - Alanina aminotransferase
AST - Aspartato aminotransferase
C - Grupo controle
CAT - catalase
CF - Grupo controle tratado com ferro dextran
CLLF - Capacidade Latente de Ligação do Ferro
CTTF - Capacidade Total de Ligação do Ferro
DCV - Doença cardiovascular
EROs - Espécies reativas de oxigênio
GSH - glutathiona reduzida
GSSH - glutathiona oxidada
H - Grupo hipercolesterolêmico
Hb - Hemoglobina
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HF - Grupo hipercolesterolêmico tratado com ferro dextran
IST% - Índice de saturação de transferrina
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
MDA - Malondialdeído
mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro
PON - Paraoxonase
PPAR - Receptores ativadores da proliferação de peroxisomos
RAGE - receptores dos produtos de glicação avançada
SOD - superóxido dismutase
STZ - estreptozotocina
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
Trf1- receptor de transferrina 1
VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa
4-HNE - 4-hidroxinonenal

1- INTRODUÇÃO

O ferro, por si, e por sua capacidade de gerar espécies reativas conhecidas como radicais livres podem interferir em processos fisiológicos afetando a homeostase do organismo. Dados epidemiológicos sugerem que a sobrecarga de ferro contribui para o desenvolvimento de doenças não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, câncer, esteatose hepática, Parkinson, Alzheimer e diabetes. A prevalência destas doenças crônicas no mundo em 2001 foi de 46% e é esperado um aumento para 57% em 2020. No Brasil, de acordo com o Vigitel 2007 (Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2%, o que representa 6.399.187 de pessoas que confirmaram ser portadoras da doença.

Países que adotaram a fortificação com ferro nos alimentos a mais de 20 anos atrás têm índices maiores de sobrecarga de ferro do que de anemia. Nos Estados Unidos, depois da fortificação de ferro nos alimentos, um estudo em 2001 encontrou estoques aumentados de ferro em 13% dos idosos saudáveis, e apenas 2,7% com deficiência de ferro e 1,2% com anemia (Fleming *et al.* 2002).

Um estudo clínico mostrou que a prevalência do diabetes nas hemocromatoses, que são distúrbios genéticos que causam uma sobrecarga de ferro, está na média de 7 a 40% (Moirand *et al.* 1997a). O papel do ferro na patogênese do diabetes é sugerido pelo aumento da incidência de diabetes tipo 2 em diversas causas de sobrecarga de ferro, pela reversão ou melhora na diabetes com a redução da carga de ferro conseguida com doação de sangue ou terapia com quelantes ao ferro (Jiang *et al.* 2004).

Além da maior prevalência de diabetes nas hemocromatoses, há também alterações no metabolismo de ferro em indivíduos com diabetes tipo 2, revelando que relação entre o metabolismo de glicose e ferro é bidirecional.

A ferritina e outros parâmetros do status de ferro podem ser alterados em pacientes com diabetes tipo 2. Lee *et al.* (2006) relataram que os níveis de ferro livre, que aparecem na circulação somente quando a transferrina está saturada, estão aumentados em indivíduos portadores de diabetes tipo 2.

Níveis de ferro corporal podem estar alterados em adultos com diabetes tipo 2, incluindo pessoas com obesidade (Ford & Cogswell 1999), síndrome metabólica (Moirand *et al.* 1997b), diabetes gestacional (Lao & Tam 1997) e em estados pré diabéticos incluindo glicose em jejum e tolerância a glicose desreguladas (Fernandez-Real *et al.* 2007). Porque o ferro é capaz de aumentar as espécies reativas do oxigênio, e estas alteram a sensibilidade da insulina ao seu receptor, gerando uma resistência a mesma.

Não está claro se esta relação também ocorre em pacientes com diabetes tipo 1 ou em indivíduos com uma sobrecarga de ferro adquirida em situações não hereditárias, como por exemplo suplementação indiscriminada de ferro. A relevância deste estudo se dá, então pela grande preocupação em desvendar os mecanismos envolvidos na inter-relação entre diabetes e ferro, para posterior determinação de medidas preventivas em relação à doença e às complicações desencadeadas por ela. Assim, avaliamos em ratos e hamsteres diabéticos e submetidos a uma sobrecarga de ferro, se esta interação ocorre e alterações na expressão de genes que regulam o metabolismo de ferro e glicose.

Neste trabalho, verificamos esta interação entre excesso de ferro e diabetes em dois modelos experimentais, ratos e hamsteres. Os resultados e a discussão de cada experimento serão apresentados separadamente.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2-1- Diabetes

O diabetes melitus (DM), uma desordem crônica metabólica, é um dos mais importantes problemas de saúde mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. É caracterizada pela deficiência de insulina ou em sua ação ou ambos, com alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios e resulta em hiperglicemia crônica (Baynes 1991a). Há mais de 250 milhões de pessoas em todo mundo com diabetes e estima-se que a cada 5 segundos surja um novo caso (International Diabetes Federation, 2009). Essa hiperglicemia promove glicotoxicidade e tem um impacto negativo em vários tecidos como pâncreas, fígado, rins, músculo, etc. A glicotoxicidade eventualmente acarreta em progressiva disfunção nas células beta, desregulação na transcrição do gene da insulina e permanente perda de células beta devido a apoptose (Brownlee 2001).

O DM do tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas e tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida. Estes casos correspondem a 5% a 10% do total. A forma rapidamente progressiva é comumente observada em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer também em adultos (International diabetes Federation).

Os sintomas de hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, algumas vezes com polifagia e visão turva. As conseqüências agudas de um diabetes não controlado são hiperglicemia com cetoacidose ou síndrome hiperosmolar. Complicações em longo prazo do diabetes incluem retinopatia com perda potencial da visão, nefropatia, neuropatia periférica e neuropatia autonômica causando distúrbios gastrointestinais, genitourinária, cardiovascular e disfunção sexual. Hipertensão e anormalidades no metabolismo de lipoproteínas são freqüentemente encontradas em pessoas acometidas de diabetes (Poladia & Bauer 2004).

O tipo 2 inclui a maioria das formas do diabetes, os quais resultam em anormalidades na sensibilidade à insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo, mas raramente em adolescentes. Abrange 85% a 90% do total de casos (Sociedade Brasileira de Diabetes 2003).

2.2 - Estresse oxidativo

De acordo com a definição de Helmut Sies 1985, estresse oxidativo “é um distúrbio do balanço entre prooxidantes e antioxidantes a favor do primeiro”, mas o acúmulo de dados da literatura atual nos indica que esta definição não é adequada e este conceito é limitado. O conceito do balanço implica que sistemas biológicos respondem da mesma forma para uma diminuição de prooxidantes e um aumento de antioxidantes. Se o mecanismo do estresse oxidativo fosse limitado aos danos de radicais livres a macromoléculas este conceito poderia ser adequado. Porém, o estresse oxidativo também está envolvido em efeitos de sinalização redox. Múltiplos sistemas estão envolvidos, e não há razão para assumir que estes sistemas responderiam da mesma forma a oxidantes e antioxidantes. Modelos experimentais têm revelado este problema. Numerosos estudos mostram que antioxidantes tornam-se prooxidantes em algumas condições. Dessa forma, “uma desregulação da sinalização e controle redox”, proposta por Jones (2006) é uma definição alternativa para estresse oxidativo. Evidências consideráveis acumuladas durante os últimos 20 anos mostraram que as espécies reativas do oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio exercem função na sinalização redox. Porém um conceito que abranja completamente o que é estresse oxidativo ainda não é conhecido, e talvez nem possa existir tamanha complexidade envolvida nos processos gerados por estas espécies.

2.2.1- Papel do estresse no diabetes tipo I e II

A participação do estresse oxidativo no desenvolvimento e complicações do diabetes é amplamente aceito (Baynes 1991a; Baynes & Thorpe 1999; Ceriello 2000). O diabetes é usualmente acompanhado de aumentada produção de radicais livres (Baynes 1991a; Baynes & Thorpe 1999; Young *et al.* 1995) ou defesas antioxidantes alteradas (Halliwell & Gutteridge 1990b; Saxena *et al.* 1993). Isto acarreta em danos oxidativos em componentes celulares como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Em ambos, diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2, há um aumento no estresse oxidativo (Naziroglu & Butterworth 2005).

Tem-se observado na patogênese do diabetes a geração de radicais livres de oxigênio devido à auto oxidação da glicose, formação de produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End products- AGEs*), via dos polióis e também mudanças no conteúdo e atividade no sistema de defesas antioxidantes no tecido (Ookawara *et al.* 1992b; Tsai *et al.* 1994). Em adição, aumentada oxidação de lipídios e proteínas está associada com o desenvolvimento das complicações do diabetes.

A oxidação da glicose leva a geração de formas reduzidas de NADH e FADH₂, as quais promovem a produção de ATP através da cadeia transportadora de elétrons. Este transporte acarreta a redução do oxigênio e também a produção intracelular de radicais superóxidos (Nishikawa *et al.* 2000). O efeito tóxico dos AGES é resultado de mudanças estruturais e funcionais em proteínas e interação com seus receptores de superfície celular (RAGEs), esta interação modula funções celulares por ativar certas vias de sinalização que alteram a expressão de genes, como o NFκB e ERK 1/2 quinase, o que acarreta a formação de radicais livres do oxigênio e processo inflamatório, respectivamente (Heidland *et al.* 2001). A produção aumentada de sorbitol, na via dos polióis, na presença de concentrações elevadas de glicose também resulta em depleção intracelular de NADPH, porque este é requerido para a atividade da aldose redutase. Consequentemente, a depleção de NADPH leva a regeneração diminuída da glutatona reduzida e diminuição do óxido nítrico porque o NADPH é co-fator da óxido nítrico sintase.

Estudos em cultura de células têm sugerido que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são responsáveis pela formação de peróxidos lipídicos citotóxicos e danos às células β pancreáticas por uma variedade de mecanismos (Robertson *et al.*

2003). Em células HIT-T15 e em ratos diabéticos Zucker (ZDF) foi delineado um estudo para verificar se o estresse oxidativo poderia ser em parte, o responsável pelos efeitos tóxicos na função das células beta pela exposição prolongada a altas concentrações de glicose. E os resultados confirmaram que a toxicidade da glicose leva a defeitos na expressão do gene da insulina, diminuição da atividade do promotor do gene da insulina e diminuição do conteúdo e secreção de insulina. Foi demonstrado também que o uso de antioxidantes preveniu, pelo menos em parte, estes efeitos. Isto indica que o estresse oxidativo pode ser o responsável pela toxicidade da glicose nas células pancreáticas (Tanaka *et al.* 1999).

EROs causam, *in vitro*, danos à via de sinalização da insulina (Najib & Sanchez-Margalet 2001), diminuição da translocação dos transportadores de glicose (GLUT-4) nos adipócitos (Rudich *et al.* 1998) e redução da internalização da insulina nas células endoteliais (Bertelsen *et al.* 2001). Estudos com antioxidantes demonstraram aumento na sensibilidade à insulina (Maddux *et al.* 2001; Rudich *et al.* 1999; Jacob *et al.* 1996). Foi demonstrado, usando concentrações micromolares de peróxido de hidrogênio em duas linhagens diferentes de células de fibroblastos e em células de adipócitos, que o estresse oxidativo aumentado inibiu a fosforilação da tirosina localizada no receptor de insulina, que é induzida por insulina em 8%, inibiu a fosforilação do receptor de insulina 1, a ativação da fosfotidilinositol 3 quinase em 57%, o transportador de glicose em 36% e a ativação da MAP quinase em 7,2% (Hansen *et al.* 1999).

2.3 – Ferro e Diabetes

2.3.1 – Regulação da Homeostase do Ferro e situações que a comprometem

O ferro exerce função essencial no metabolismo de mamíferos possuindo a capacidade de ganhar e perder elétrons. Esta propriedade faz com que o ferro seja componente essencial da hemoglobina, mioglobina, citocromos e várias enzimas. Apesar disso o ferro pode ser tóxico. A mesma propriedade que permite que o ferro ganhe e perca elétrons pode resultar em doação de elétrons ao oxigênio, gerando

EROs. Conseqüentemente, todos os mamíferos necessitam de uma regulação da concentração de ferro em seus fluidos biológicos.

Por não haver um mecanismo de excreção de ferro do organismo, o controle destes níveis ocorre no momento da aquisição desse metal. Perda de ferro normal ocorre através da esfoliação da mucosa intestinal e células da pele, menstruação e parto, todavia, esses processos ocorrem independentes do status de ferro corporal.

Assim, a homeostase do ferro é mantida pela aquisição, a qual pode ser aumentada dependendo da necessidade. A absorção de ferro da dieta é regulada e envolve transportadores na membrana apical de células absorptivas no intestino e através da membrana basolateral no plasma.

O ferro é absorvido no duodeno e porção superior do jejuno. O ferro da dieta é solubilizado no meio ácido do lúmen gástrico e duodenal. Na superfície apical das células do duodeno, uma enzima conhecida por ferredutase (DCYTB), converte o ferro III em ferro II. O transportador de metal divalente (DMT1) transporta o ferro e outros metais divalentes para o interior do enterócito. No citosol da célula pode ser estocado na ferritina ou exportado para o plasma por meio da ferroportina. A ferroportina é conhecida por transportar o ferro em todas as células que captam o metal, células da mucosa duodenal, macrófagos e placenta. Deleção do gene da ferroportina em tecidos específicos causa acúmulo de ferro em macrófagos e hepatócitos. Nos macrófagos, a ferroportina é requerida para uma eficiente reciclagem do ferro de eritrócitos fagocitados. O ferro que é transportado pela ferroportina está no estado ferroso e existe uma relação desta proteína com uma família de enzimas que convertem o ferro para o estado férrico. Essas enzimas são oxidases que incluem a ceruloplasmina e a hefaestina (Fleming & Bacon 2005).

O ferro que é exportado para o plasma se liga à transferrina, que no pH neutro do sangue pode se ligar a dois átomos de ferro (III) que se dissociam constantemente. A ligação do ferro à transferrina limita a habilidade do ferro em gerar radicais tóxicos. Em condições fisiológicas normais, em humanos, aproximadamente 20 a 30% da transferrina se encontra ligada ao ferro, indicando que existe grande concentração de apotransferrina disponível para a ligação do ferro que entra no plasma.

O complexo transferrina - ferro é transportado para as células através de um dos dois receptores de transferrina. O receptor de transferrina 1 é expresso em todas as células e o receptor de transferrina 2 é expresso no fígado e possui menor afinidade que o receptor 1 (Aisen 2004).

A aquisição e estoque de ferro são regulados por mecanismos transcricional e pós-transcricional. O mecanismo de controle pós-transcricional da ferritina e do receptor de transferrina 1 envolve proteínas reguladoras do ferro (IRPs). Dependendo da concentração de ferro no organismo, essas proteínas se ligam aos elementos reguladores do ferro (IREs), os quais são encontrados em mRNA que codificam proteínas envolvidas no metabolismo do ferro.

O ferro regula a síntese de ferritina e do receptor de transferrina através da interação IRP/mRNA (Theil 1990). Quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos, as IRPs ligam-se aos elementos responsivos ao ferro, presentes na região flanqueadora 5' do mRNA da ferritina e na região flanqueadora 3' do mRNA do receptor de transferrina, bloqueando a tradução do mRNA da ferritina e estabilizando o mRNA do receptor de transferrina, prevenindo sua clivagem por uma endonuclease, favorecendo sua tradução (Kaur & Andersen 2004). A presença de elementos responsivos ao ferro em regiões que codificam os mRNA da DMT-1 e ferroportina também sugere que a expressão dessas proteínas podem ser susceptíveis a regulação pós-transcricional pelos elementos responsivos ao ferro (Gunshin *et al.* 2001). Este sistema de regulação do metabolismo de ferro converge com a via de regulação feita pela hepcidina para absorção do ferro (Galy *et al.* 2008).

A absorção de ferro intestinal é regulada pela expressão de hepcidina pelo fígado, a absorção do ferro varia inversamente com a expressão desse hormônio. Hepcidina diminui a atividade funcional da ferroportina ligando-se diretamente a ela o que provoca sua internalização na célula e degradação. E esta ação, no enterócito, diminui a transferência de ferro para a célula, diminuindo assim a absorção de ferro da dieta (Fleming & Bacon 2005). Em indivíduos sem problemas na regulação da hepcidina, esta se encontra aumentada durante a infecção, inflamação e sobrecarga de ferro (Nicolas *et al.* 2002). E sua expressão está diminuída em situações de hipóxia, anemia, deficiência de ferro e estímulo eritropoiético a fim de restaurar os níveis

adequados de ferro (Vokurka *et al.* 2006). Anormalidades na regulação da hepcidina têm sido relacionadas com duas importantes condições clínicas, hemocromatose hereditária e anemia de inflamação. A hepcidina encontra-se diminuída em pacientes com hemocromatose, distúrbios genéticos que causam uma sobrecarga de ferro, e aumentada em anemia da inflamação. Na hemocromatose a absorção de ferro e a saturação de ferro na transferrina circulante estão aumentadas assim, os hepatócitos tornam-se sobrecarregados de ferro. Ao contrário, na anemia da inflamação o ferro fica retido nos enterócitos e diminui a saturação de transferrina (Fleming & Bacon 2005). Evidências sugerem que uma desregulação da hepcidina é uma das primeiras causas de sobrecarga de ferro (Fujita *et al.* 2007). A hepcidina pode estar alterada também em hepatites (Nishina *et al.* 2008), deficiência de vitamina A (Arruda *et al.* 2009), esteatose hepática alcoólica (Harrison-Findik *et al.* 2007), obesidade (Bekri *et al.* 2006), diabetes tipo 2 (Fernandez-Real *et al.* 2009).

Além da hemocromatose e apesar dos mecanismos de regulação da absorção do ferro, uma sobrecarga de ferro pode ser encontrada quando uma grande quantidade de ferro é ingerida na dieta, o que foi visto na Suécia onde o enriquecimento de alimentos com ferro foi feito por 50 anos, 5% dos homens tiveram elevações dos níveis séricos de ferro e 2% apresentaram níveis consoantes com estágios iniciais de hemocromatose (Olsson *et al.* 1995). Também Fleming (2002) observou que o consumo de ferro acima de 30mg/dia, que é relativo à ingestão acima de 21 porções de fruta por semana e acima de 7 porções de carne vermelha por semana aumentam os estoques de ferro. O consumo crônico de suplementos contendo altas quantidades de ferro também tem sido descrito como causa de sobrecarga de ferro (Green *et al.*, 1989).

O acúmulo de ferro pode ocorrer também por transfusões de sangue múltiplas (Schafer *et al.* 1981), inalação de ferro como em minerações e soldagem de aço (Crawford 1995). A elevação ocorre também em mulheres que entraram na menopausa (Sullivan 1981) e na ausência de transferrina (Weinberg 1990).

O Brasil, como outros países da América Latina, tem, desde 2004, um programa de combate à deficiência de ferro pela fortificação de todas as farinhas com ferro e ácido fólico. Considerando o potencial oxidante do ferro e o aumento da expectativa

de vida do brasileiro, há um risco que esta fortificação indiscriminada possa aumentar a prevalência de doenças não transmissíveis em indivíduos com adequado status nutricional de ferro. Uma pesquisa realizada em 2008, não encontrou estoques elevados de ferro na população brasileira, mas sugeriu que com o passar do tempo este excesso pode ocorrer (Mendes *et al.* 2009).

2.3.2 - Ferro e Diabetes

Componentes da dieta podem modificar o estado redox do organismo e ser um importante fator no controle do diabetes e suas complicações. Nutrientes como o ferro tem um papel duplo, eles tem a habilidade de aumentar ou diminuir a capacidade redox do organismo. O ferro age como cofator de muitas proteínas, inclusive enzimas antioxidantes, essenciais no metabolismo e respiração aeróbica. Todavia, altas concentrações podem levar a formação de toxicidade celular e danos oxidativos de componentes celulares, devido seu potencial em formar radicais livres (Dunford 1987; Leonarduzzi *et al.* 1997).

A associação entre ferro sistêmico excessivo e diabetes é sugerida pela observação que a incidência do diabetes é aumentada na hemocromatose (McClain *et al.* 2006). Dados epidemiológicos mostraram uma correlação positiva entre estoques de ferro corporais e desenvolvimento de intolerância a glicose em diabetes tipo 2 (Barbieri *et al.* 2001; Ford & Cogswell 1999; Salonen *et al.* 1998) e diabetes gestacional (Lao & Tam 1997). Recentemente, foi demonstrado, em um modelo de camundongo com hemocromatose, que o consumo de glicose é aumentado no músculo esquelético, mas a oxidação de glicose é diminuída e a razão de ácidos graxos por oxidação de glicose é aumentada, o que pode contribuir para o risco de diabetes (Huang *et al.* 2010).

Para pacientes com hemocromatose os mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento de diabetes e hiperglicemia são sobrecarga de ferro no fígado, levando a resistência à insulina; acúmulo de ferro nas células beta do pâncreas, resultando em danos nessas células e conseqüente redução na secreção de insulina (Mendler *et al.* 1999; McClain *et al.* 2006).

Os efeitos do excesso de ferro no diabetes podem ser agravados desde que a relação entre o metabolismo de ferro e diabetes é bidirecional, assim como o ferro afeta o metabolismo de glicose, o metabolismo de glicose também pode influenciar o metabolismo de ferro. Indivíduos diabéticos apresentam níveis de ferro na transferrina e ferritina aumentados. A diabetes promove alterações na disponibilidade do estado redox ativo do ferro (forma Fe^{2+}) que pode ser resultado de excesso de estoques de ferro ou de alterações em mecanismos de proteção designados para prevenir esta liberação descontrolada. No plasma, a proteção é realizada pelo seqüestro do ferro no estado redox inativo (forma Fe^{3+}) pela ceruloplasmina ou ligação com a transferrina. Desta forma, em indivíduos saudáveis, o ferro no plasma é mantido em níveis muito abaixo da capacidade total de ligação do ferro na transferrina e geralmente pequenas quantidades de ferro não ligados a transferrina são observadas.

No meio intracelular a concentração de ferritina, que está intimamente relacionada aos estoques de ferro corporal em indivíduos saudáveis, é elevada em indivíduos diabéticos (Salonen *et al.* 1998; Ford & Cogswell 1999). Este excesso de ferro livre ou estocado observado em indivíduos diabéticos pode gerar um aumento no estresse oxidativo e potencializar os danos causados pelo diabetes. E ainda, se um indivíduo diabético receber uma sobrecarga de ferro pode complicar mais esta situação.

O ferro, devido seu potencial redox, é mantido no organismo ligado a proteínas a fim de evitar danos oxidativos. Essa proteção, no plasma, é realizada pela ação combinada da oxidação do ferro pela ceruloplasmina e a ligação do ferro pela transferrina. Desta forma, em indivíduos saudáveis, o ferro no plasma é mantido em níveis muito abaixo da capacidade total de ligação do ferro na transferrina e geralmente são observadas pequenas quantidades de ferro não ligados à mesma (Breuer *et al.* 2000). O diabetes promove alterações na disponibilidade do estado redox ativo do ferro (forma Fe^{2+}) que pode ser resultado de excesso de estoques de ferro ou de alterações em mecanismos de proteção designados para prevenir esta liberação descontrolada.

Assim o excesso de ferro livre ou estocado observado em indivíduos diabéticos pode gerar um aumento no estresse oxidativo e potencializar os danos causados pelo diabetes.

Existem várias explicações possíveis para as alterações no metabolismo de ferro vistas no diabetes, uma delas é a capacidade da insulina em redistribuir os receptores de transferrina na superfície das células levando a um aumento da internalização do ferro no tecido adiposo e fígado (Clairmont & Czech 1990); a um aumento da inflamação sistêmica que ocorre no diabetes e pode modificar o metabolismo de ferro. Por exemplo, dados indicam que citocinas inflamatórias podem induzir a síntese de ferritina (Torti & Torti 2002). Mais recentemente foi demonstrado que o diabetes tipo 2 altera a expressão da hepcidina. Uma diminuição em sua expressão ocasiona estoques aumentados de ferro. (Fleming & Bacon 2005).

Fernandez-Real *et al.*, (2009) verificaram que a sensibilidade à insulina foi associada negativamente às mudanças no conteúdo de ferro no fígado e a concentração de prohepcidina sérica.

Ward *et al.* (2005) verificaram que o diabetes induzido por STZ em ratos alterou a expressão de proteínas do metabolismo de ferro nos rins, o transportador de metal divalente 1 e o receptor de transferrina, proteínas responsáveis para a manutenção de níveis adequados de ferro na circulação e tecidos, assim estas alterações podem potencialmente afetar a geração de EROs e contribuir para a nefropatia diabética.

Le *et al.*, (2007) usando ratos Wistar que recebiam uma dieta rica em gorduras para produzir a resistência a insulina verificaram que o mRNA da hepcidina estava 3,5 vezes diminuído nesses animais em relação aos seus controles. E isso pode justificar os estoques aumentados de ferro no diabetes tipo 2.

Além da importância do fígado no metabolismo do ferro, a insulina promove aumento do estoque de glicose no fígado e a depleção de glicose sanguínea promove a secreção de glucagon das células alfa, o que estimula a glicogenólise e a gliconeogênese no fígado, resultando em liberação da glicose no sangue. Desta maneira, o fígado tem um importante papel na manutenção da homeostase metabólica e danos neste órgão podem estar relacionados ao diabetes. Porém, como a

hepcidina, a ferritina e o receptor de transferrina 1 são modulados no diabetes não é conhecido.

O esclarecimento dos mecanismos que envolvem esta relação bi-direcional entre ferro e diabetes é importante para prevenirmos as complicações vistas no diabetes e em pacientes com hemocromatose ou excesso de ferro. Modelos animais de sobrecarga de ferro e diabetes serão úteis para verificarmos esta interação e analisarmos possíveis mecanismos que estejam envolvidos nela.

2.4- Modelos de suplementação de ferro

O ferro pode ser suplementado usando várias formas farmacológicas, como sulfato ferroso e em complexos com gluconato, dextran e ferro carbonílico e outros sais. Algumas vezes o ácido ascórbico é adicionado para uma melhor absorção. Geralmente a terapia de suplementação com ferro é via oral, e a terapia parenteral (intravenosa ou intramuscular) é usada quando a oral não é satisfatória, talvez por uma absorção comprometida. A terapia parenteral é mais cara e pode causar uma maior mortalidade.

O ferro carbonílico é altamente puro, ele é preparado pela decomposição química do ferro pentacarbonílico purificado. Usualmente possui aparência de um pó cinzento, composto de micropartículas esféricas. As impurezas mais comuns são carbono, oxigênio e nitrogênio. Foi desenvolvido por uma empresa química alemã, BASF, em 1925. O ferro pentacarbonílico, $\text{Fe}(\text{CO})_5$, é precursor de diversos compostos de ferro, incluindo muitos compostos úteis na síntese orgânica. Ele é preparado pela reação de partículas finas de ferro com monóxido de carbono.

A suplementação de ferro carbonílico na dieta para ratos é bem estabelecida como modelo de sobrecarga de ferro, a qual resulta em uma deposição predominantemente hepatocelular, semelhante à observada na hemocromatose hereditária e na sobrecarga de ferro em indivíduos africanos. Dabbagh et al. (1994), trabalhando com ratos submetidos a sobrecarga de ferro pentacarbonílico 3%, conseguiram um aumento de 10 vezes no conteúdo de ferro no fígado em comparação com ratos controles. Estes níveis são compatíveis aos reportados em pacientes com hemocromatoses (10 a 40 vezes). A suplementação da dieta com ferro carbonílico

induz uma sobrecarga que ocorre mesmo com os mecanismos de proteção da absorção de ferro presentes, resultando em uma deposição predominantemente hepatocelular, semelhante à observada na hemocromatose hereditária e na sobrecarga de ferro em indivíduos africanos. Assim esta via é maior interesse quando se quer avaliar interferências sobre o metabolismo do ferro.

Em um trabalho anterior realizado em nosso laboratório verificamos que a quantidade de ferro no fígado de ratos que receberam 50mg de ferro dextran foi 6,4 vezes maior que nos animais controles (Silva *et al.* 2008b). Knutson *et al.* (2000), trabalhando com ratos recebendo dieta com suplementação de ferro durante 21 dias, observaram um aumento de 2,8 vezes de ferro nos tecidos. Kirk *et al.* (2001) verificaram, em camundongos deficientes em apo E que receberam ferro carbonílico, um aumento de 13 vezes de ferro no fígado. Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) observaram um aumento de 2,3 vezes de ferro no fígado no grupo tratado com ferro dextran. Cornejo *et al.* (2007) trabalharam com ratos suplementados com ferro carbonílico 3% por 8 semanas e observaram um aumento de 14 vezes no conteúdo de ferro hepático em comparação com os animais que não receberam essa sobrecarga de ferro. Thompson *et al.* (2006) utilizaram para induzir uma sobrecarga de ferro 1% de ferro carbonílico e verificaram que os níveis de ferro não heme estavam aumentados 3,4 vezes no fígado e 5.5 vezes no baço destes animais. A sobrecarga de ferro encontrada nestes trabalhos podem ser considerada moderada quando comparados aos encontrados em pacientes com hemocromatose sintomática, os quais tem entre 16 e 30 vezes os níveis de ferro aumentados (Tavill *et al.*, 1990). A concentração de ferro no fígado também abaixo do limiar crítico (22 vezes aumentado), no qual danos hepatocelulares são observados (Park *et al.*, 1987). Observando estes valores percebemos que com uma suplementação de ferro carbonílico na dieta dos animais conseguiríamos simular um aumento dos estoques de ferro conseguido pela sua suplementação indiscriminada, obtendo valores bem inferiores aos encontrados para indivíduos com sobrecarga hereditária de ferro.

2.5- Modelos de diabetes experimental

Diabetes pode ser induzida por fármacos, manipulação cirúrgica ou genética em várias espécies de animais. A maioria dos experimentos é realizada em roedores, embora alguns estudos sejam realizados em animais maiores. O modelo murino é o mais usado devido a avaliabilidade de mais de 200 linhagens bem caracterizadas e a habilidade de deletar ou superexpressar genes específicos através da tecnologia dos nocaute e transgênicos (Rees & Alcolado 2005; Masiello 2006; Rees & Alcolado 2005).

A estreptozotocina (69%) e a aloxana (31%) são as drogas mais freqüentemente usadas para produzir o diabetes e este modelo tem sido útil para estudar múltiplos aspectos dessa doença. Ambas as drogas possuem ação diabetogênica quando administrada parentalmente: intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose necessária desses agentes depende da espécie animal, da rota de administração e estado nutricional. De acordo com a dose administrada, síndromes similares ao diabetes tipo 1 ou tipo 2 são produzidas (Mythili *et al.* 2004). O pH e o tipo de tampão usado para dissolver a droga devem ser rigorosamente seguidos e preparados no dia do experimento (Lei *et al.* 2005).

A ação citotóxica desses agentes diabetogênicos é mediada por espécies reativas do oxigênio, mas essas drogas se diferem no mecanismo de ação (Lei *et al.* 2005). A aloxana e o produto de sua redução, o ácido dialúrico, estabelecem um ciclo redox com a formação de radicais superóxidos. Esses radicais sofrem redução para peróxido de hidrogênio com um simultâneo aumento na concentração de cálcio citosólico, que causa rápida destruição das células β pancreáticas. A quantidade da dose de aloxana é muito sensível e uma superdosagem pode gerar efeitos tóxicos e causar a morte dos animais. Essa perda pode ser provavelmente por danos nos túbulos renais. A mais freqüente dose usada em ratos é de 65mg/kg, mas quando administrada intraperitonealmente ou subcutaneamente a dose para ser efetiva deve ser maior (Federiuk *et al.* 2004). Em camundongos, doses variadas entre 100-200mg/kg pela via intravenosa tem sido usadas (Machado *et al.* 2001).

A estreptozotocina é captada pelas células pancreáticas pelo transportador de glicose GLUT-2, então, como células produtoras de insulina que não expressam esse transportador são resistentes à STZ (Elsner *et al.* 2000b), A importância do GLUT 2 no processo é confirmado pela observação que STZ causa danos em outros órgãos que

expressam esse receptor, especialmente fígado e rim, o que torna importante a avaliação da função hepática e renal dos animais que recebem esse tratamento. Considera-se que a toxicidade da STZ é dependente da atividade de alcalinizar o DNA (Murata *et al.* 1999). A transferência de um grupo metil da STZ para a molécula de DNA causa danos, como eventos em cadeia, resultantes da fragmentação do DNA (Pieper *et al.* 1999). A glicosilação das proteínas pode ser um evento adicional a esse fator (Konrad & Kudlow 2002). O sistema de reparo do DNA, poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) é super estimulado e isto diminui a concentração de NAD⁺ e subsequente estoque de ATP. A diminuição da energia celular resulta em necrose das células beta. Embora a STZ também produza metilação em proteínas, a metilação produzida em DNA é responsável pela morte das células beta, mas provavelmente essa metilação das proteínas também contribua para defeitos funcionais das células.

O problema da STZ é que seus efeitos tóxicos não são restritos às células pancreáticas, podendo causar danos renais (Valentovic *et al.* 2006), estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial (Lei *et al.* 2005).

A destruição das células pancreáticas por ambas as drogas são associadas com uma enorme liberação de insulina a qual torna os animais mais susceptíveis a uma hipoglicemia severa que pode ser letal. Então seguido do tratamento com STZ ou aloxana, os animais recebem uma solução de glicose a 5% por 12-24h. Posteriormente um aumento nos níveis de glicose é observado em comparação com animais controle devido à deficiência de insulina. Em geral, protocolos experimentais recomendam que a administração das drogas deve ser feita em períodos de 8-12h de jejum. Além de ratos e camundongos, outras espécies animais, como coelhos e macacos, são usadas para induzir diabetes com esse protocolo, mas porcos são mais resistentes a STZ (Rees & Alcolado 2005).

Diabetes induzida por STZ em ratos Wistar é geralmente do tipo 2 quando a dose de streptozotocina aplicada é menor que 50mg/Kg de peso corporal e do tipo 1 quando essa dose é maior que 50mg/Kg de peso corporal (Junod *et al.* 1969). Alguns estudos mostram que com uma injeção de 35mg/kg é produzida, em ratos, diabetes tipo 2 (Striffler & Nadler 2004). E com uma injeção de 65mg/kg é conseguida o diabetes tipo 1 (Mihm *et al.* 2001).

O hamster tem apresentado sucesso em desenvolver diabetes induzido por injeções de estreptozotocina (STZ). O hamster pode retornar a normoglicêmica depois de doses diabetogênicas de aloxana, mas isso não ocorre com injeções de estreptozotocina (Phares 1980).

A utilização do hamster como modelo animal apresenta algumas vantagens em relação a ratos. Por exemplo, eles apresentam a lipoproteína LDL como principal carreadora de colesterol no plasma, similar a humanos, o seu gene para o receptor LDL foi isolado e caracterizado e mostra grande similaridade na seqüência e estrutura ao gene humano, desenvolve placas ateroscleróticas em animais hiperlipêmicos que são similares às encontradas em humanos. Além de se tornar hiperglicêmico com injeções de estreptozotocina (Povoski *et al.* 1993).

Hamsteres diabéticos são caracterizados por elevada concentração de glicose sérica e triglicérides e redução de insulina sérica. Eles apresentam hiperfagia, comendo aproximadamente 60% a mais que os controles. O consumo é normalizado quando a dieta é rica em gorduras. Exercício não tem aparente efeito nos metabólitos séricos de hamsteres diabéticos (Rowland & Caputo 1985).

A concentração de lipídios plasmáticos é aproximadamente 2,5 vezes maior em hamsteres diabéticos do que em ratos diabéticos. O diabetes aumenta mais as concentrações de triglicérides, colesterol e fosfolipídios em hamsteres do que em ratos. Hamsteres diabéticos possuem um perfil de lipoproteínas similar ao homem diabético uma vez que lipoproteínas ricas em triglicérides são aumentadas e o HDL é diminuído. A combinação desses eventos não ocorre em ratos (Ebara *et al.* 1994). Além disso, o metabolismo das lipoproteínas do hamster apresenta vantagens em relação ao rato, por possuir a lipoproteína LDL como a principal carreadora de colesterol no plasma, similar a humanos. O seu gene para o receptor LDL foi isolado e caracterizado e mostra grande similaridade na seqüência e estrutura ao gene humano e desenvolve placas ateroscleróticas em animais hiperlipêmicos que são similares às encontradas em humanos (Povoski *et al.* 1993).

2.6- Distúrbios cardiovasculares e diabetes

A intensa produção de radicais livres têm sido relacionada às complicações vistas no diabetes (Sundaram *et al.* 1996). Essas espécies reativas estão aumentadas no diabetes, principalmente no diabetes não controlado, o que pode levar a autooxidação de proteínas glicosiladas, ativação da via do sorbitol, indução de danos nas membranas e oxidação de lipídios e proteínas. Dados sugerem uma forte associação entre um controle glicêmico pobre e radicais livres elevados em pacientes com diabetes mellitus (Sozmen *et al.* 1999). Tem sido proposto que uma glicemia não controlada está associada com uma depleção das atividades das enzimas antioxidantes séricas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em pacientes com diabetes tipo 2 (Maxwell *et al.* 1997).

A maior complicação diabética é o distúrbio cardiovascular. Sua incidência em pessoas diabéticas é três a quatro vezes maior que em pessoas não diabéticas. Apesar dos avanços na prevenção e cuidados de distúrbios cardiovasculares (CHD), pessoas com diabetes mellitus continuam a ter alarmante mortalidade e morbidade devida secundariamente a distúrbios cardiovasculares (Mooradian 2003). O risco aumentado de aterosclerose em diabetes mellitus consiste de múltiplos fatores, que incluem obesidade, hipertensão e dislipidemia com modificações de lipoproteínas e outras proteínas chaves decorrentes da glicação e oxidação, e possivelmente o estado de resistência à insulina (Mooradian 2003).

Um mecanismo potencial que pode mediar a aterosclerose prematura no diabetes é o estresse oxidativo. Ele tem papel crucial na aterogênese e causa a oxidação da LDL. Enquanto alguns estudos não encontraram susceptibilidade aumentada do LDL para a oxidação em indivíduos diabéticos, evidências de aumento da oxidabilidade do LDL em sujeitos diabéticos foi mostrado em pelo menos 5 estudos. Concentrações aumentadas de autoanticorpos de LDL oxidados e glicosilados foram documentadas no diabetes sugerindo que aumento do estresse oxidativo ocorre em vivo e que o LDL glicosilado representa um evento que facilita a subsequente modificação oxidativa. Várias linhas de evidências mostram o papel proaterogênico do LDL oxidado e sua existência em vivo. O LDL oxidado não é reconhecido pelo receptor de LDL, mas por receptores *scavengers* de macrófagos, os quais acumulam colesterol, levando a formação de células em espuma (Jialal *et al.* 2002).

Mudanças relacionadas aos níveis de lipídios podem ser fatores chaves para uma melhora desta complicação, visto que o controle de lipídeos são mais susceptíveis à intervenção. A dislipidemia diabética é caracterizada por níveis elevados de triacilgliceróis, baixos níveis de HDL e altos de LDL.

A alteração da expressão de receptores ativados pela proliferação peroxissomal (PPARs) no diabetes tem sido apontada como importante fator que altera o metabolismo de lipídios no diabetes. Tem-se observado que no diabetes ocorre alteração da expressão de PPAR alfa e seus agonistas, como fibratos, podem ter efeitos benéficos na prevenção de complicações diabéticas como distúrbios cardiovasculares e também da retinopatia e nefropatia.

PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes, eles catalisam e coordenam diferentes eventos bioquímicos a fim de se obter a homeostase celular de lipídios e açúcares (Perrone *et al.* 2005; Chinetti-Gbaguidi *et al.* 2005). Depois da ativação pelos ligantes, os PPARs formam heterodímeros com o receptor retinóide do fígado (RXR); esses heterodímeros tornam-se ativados, e se ligam aos elementos de resposta a proliferação de peroxissomos (PPRE) localizados nas regiões promotoras dos genes alvo, causando aumento ou diminuição da transcrição de muitos genes.

Entre os PPARs três isotipos têm sido identificados: PPAR α , PPAR δ , e PPAR γ . O PPAR α é altamente expresso em hepatócitos, córtex renal, músculo esquelético, que são tecidos com alta capacidade de oxidação de ácidos graxos e também em enterócitos. O PPAR α está envolvido na homeostase de lipoproteínas, colesterol e na oxidação de ácidos graxos. No fígado a ativação do PPAR α induz a expressão de proteínas transportadoras de ácidos graxos e a acil CoA sintetase de cadeia longa. Algumas enzimas chaves envolvidas na β oxidação peroxissomal e mitocondrial também são alvos diretos do PPAR α (Chinetti-Gbaguidi *et al.* 2005), diminuindo assim a concentração de triacilgliceróis e colesterol plasmático.

Alguns trabalhos têm mostrado que o nível de mRNA, a capacidade de ligação no elemento responsivo do DNA e a expressão do PPAR pode ser influenciada por vários fatores. Iemitsu *et al.* (2002) e Sanguino *et al.* (2004) verificaram que a idade diminui a expressão hepática e atividade de PPAR α , o que explicaria uma capacidade reduzida de oxidação de ácidos graxos também, observada nos fígados destes ratos.

Além disso, Iemitsu *et al.* (2002) mostraram que o exercício físico melhora a atividade do PPAR α em ratos que tiveram essa atividade diminuída pela idade.

Sung *et al.* (2004) estudando o efeito da idade e restrição calórica em ratos Fischer, mostraram que o nível de mRNA, a capacidade de ligação ao DNA e a concentração de PPAR foi diminuída com a idade, enquanto a restrição calórica reduziu tal efeito. Estes autores sugeriram que a expressão de PPAR é alterada pela idade devido ao aumento do estresse oxidativo, e que a restrição calórica previne essa diminuição devido ao efeito antioxidante. Outro achado que reforça a teoria que o estresse oxidativo afeta PPAR provém do trabalho de Kaul *et al.* (2004), os autores demonstraram que os polifenóis, com conhecidos efeitos antioxidantes, encontrados no chá verde, causam uma *up*-regulação do gene do PPAR α .

Wang *et al.* (2008) investigaram a expressão de PPAR α na aorta, córtex renal e retina de ratos diabéticos, verificando que a expressão do mRNA do PPAR α foi diminuída nos 3 tecidos estudados. Sabe-se que PPAR α inibe a proliferação de células endoteliais e células do músculo liso e a diminuição de sua expressão em células endoteliais aórticas humanas expostas a grande quantidade de glicose (Srinivasan *et al.* 2004) e em ratos diabéticos (Kanie *et al.* 2003) resulta em adesão de monócitos aumentada e disfunção endotelial. Esses resultados mostram a importância do PPAR α como molécula antiinflamatória na aorta, relevante para a diabetes e outros distúrbios vasculares. Foi verificado também que agonistas de PPAR α podem ter um efeito benéfico na prevenção da nefropatia diabética (Calkin *et al.* 2006) e em estágios iniciais de retinopatia diabética (Chen *et al.* 2005). E estes agonistas também são usados no tratamento da dislipidemia diabética.

A ativação do PPAR α apresenta efeitos benéficos nas células pancreáticas por promover a oxidação de ácidos graxos, o que reduz a lipotoxicidade pancreática e melhora potencialmente a secreção de insulina (Ravnskjaer *et al.* 2005).

Observamos anteriormente em nosso laboratório que a sobrecarga de ferro, em ratos e hamsteres, aumenta os níveis de triacilgliceróis. Foi verificado também que o tratamento com um agonista de PPAR alfa, o bezafibrato, reverte o efeito. Supomos então que o ferro possa estar alterando o metabolismo de lipídios por influenciar esses receptores nucleares (Silva *et al.* 2008b).

Verificamos nos experimentos anteriores que o excesso de ferro associado com o diabetes promoveu algumas diferenças como nos triacilgliceróis, HDL, creatinina e proteínas carboniladas, porém esta sobrecarga de ferro não afetou o perfil glicêmico em ratos, visto que o hamster diabético apresenta todas as vantagens citadas acima em relação ao rato, este trabalho tem como principal objetivo verificar a interação ferro - diabetes neste modelo este modelo.

Estes observações sugerem uma relação entre ferro e diabetes, mas não há muitos dados com modelos experimentais. Assim para expandir o conhecimento desta relação, nós investigamos a interação do excesso de ferro com o diabetes sobre o estresse oxidativo, histologia do fígado e pâncreas e homeostase de lipídios pelo estudo da expressão do mRNA de PPAR alfa em hamsteres. Devido à maior similaridade do perfil lipídico de hamsteres e humanos (Merzouk *et al.* 2000; Simionescu *et al.* 1996; Verges 1991), este estudo nos permite fazer um paralelo entre alterações vistas nos dois modelos, apresentando o hamster como bom modelo para desvendar mecanismos desta relação.

2.7 - Defesas antioxidantes e produtos do estresse oxidativo num quadro de diabetes

Aumento do estresse oxidativo e mudanças na capacidade antioxidante são observados em diabetes melittus clínico e experimental e podem contribuir para complicações dessa doença (Baynes 1991b). Várias implicações do estresse oxidativo têm sugeridas influenciar a patogêneses do diabetes e a geração de radicais livres tem está aumentada devido à glicosilação de proteínas auto-oxidação da glicose, e também pelas mudanças no conteúdo e atividade das defesas antioxidantes nos tecidos (Ookawara *et al.* 1992a; Tsai *et al.* 1994). Em adição, o aumento da oxidação de lipídios e proteínas está associado ao desenvolvimento das complicações do diabetes. Há evidências sugerindo que a diabetes induz mudanças nas atividades das enzimas antioxidantes em vários tecidos (Oberley 1988) e que sua viabilidade influencia a suscetibilidade de vários tecidos ao stress oxidativo. (Kakkar *et al.* 1998).

O radical superóxido, o primeiro produto da redução da molécula de oxigênio, tem um elétron desemparelhado em sua órbita externa e isso resulta em uma fonte importante de hidroperóxidos e radicais livres tóxicos. Uma célula normal tem a habilidade de detoxificar radicais superóxido através de enzimas como a superóxido

desmutase. A SOD, junto com outras enzimas como a catalase, glutathione redutase, ajuda a manter a concentração de glutathione e NADPH necessário para a ótima função dos mecanismos de defesas antioxidantes (Jain 1989a). Hiperglicemia aumenta a quantidade de superóxido mitocondrial na retina e células retiniais (Du *et al.* 2003). Vários trabalhos com animais tratados com STZ mostram uma diminuição da atividade de SOD causada pelo diabetes. Rauscher *et al.* (2001) e Sanders *et al.* (2001) mostram uma diminuição da atividade de SOD nos rins de ratos diabéticos. Amagno *et al.* (1999b) observaram uma atividade menor de SOD nos hepatócitos de ratos diabéticos em relação a ratos controle. E Mohan and Das (1998) demonstraram uma diminuição da atividade de SOD no plasma de ratos diabéticos.

A Glutathione, gama-glutamyl-cysteinyl-glycine, é sintetizada a partir do glutamate, cysteine e glycine. A glutathione reduzida (GSH) pode ser parcialmente absorvida no intestino e pode ser sintetizada *de novo*, então a GSH é um antioxidante exógeno e endógeno (Fang *et al.* 2002; Fang *et al.* 2002). A glutathione reduzida destrói eficientemente os radicais livres de oxigênio (ROS) diretamente ou indiretamente através de reações enzimáticas (Fang *et al.* 2002). A concentração de glutathione redutase parece diminuída em vários tecidos de animais diabéticos, porém existem alguns trabalhos onde já foi visto o aumento de sua concentração (Mekinova *et al.* 1995).

Glicação de proteínas e produção de radicais livres são considerados dois possíveis mecanismos de inativação de enzimas antioxidantes como CAT e SOD em condições diabéticas. Diminuição da atividade dessas enzimas pode levar a altos níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio em sistemas biológicos, os quais geram radicais hidroxil que estão envolvidos na iniciação e propagação de peroxidação lipídica.

Paraoxonase (PON) é um componente do HDL e explicar, em parte, sua habilidade em metabolizar peróxidos de lipídeos, proteger contra o acúmulo de LDL e migração de monócitos (Durrington *et al.*, 2001). Ela é uma fosfodiesterase secretada pelo fígado associada à HDL. Esta enzima possui propriedades antioxidantes e se encontra distribuída em vários tecidos. Mudanças ocorridas na HDL, como na forma e no tamanho, podem fortemente afetar a afinidade de ligação e estabilidade da PON e

resultar em capacidade antioxidante diminuída. PON exerce atividade paraoxonásica e arilesterásica desde que hidroliza compostos organofosforados como o paraoxon e ácidos carboxílicos aromáticos como o fenilacetato (Dirican *et al.*, 2004). A atividade de PON paroxonase é mais sensível a fatores externos como a dieta, fumo e *status* hormonal (Durrington *et al.*, 2001). E essa atividade foi encontrada diminuída em inúmeras condições patológicas incluindo infarto do miocárdio, diabetes e hipercolesterolemia (McEveven *et al.*, 1986, Mackness *et al.*, 1991).

Os radicais sulfidrila representam todos os grupos tióis encontrados na glutatona, em proteínas e compostos de baixo peso molecular no plasma. Tióis podem ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado, assim o nível de tióis no plasma diminui (Wisdom *et al.*, 1991). A albumina é a principal fonte de grupos tióis no plasma e é quantitativamente o mais importante componente extracelular de defesa antioxidante. Outras fontes de grupos tióis apresentam baixo peso molecular constituindo as sulfidrila livres que são representadas por compostos como a glutatona, cisteína, homocisteína e cisteinil-glicina (Mircescu *et al.*, 2005).

Vários trabalhos utilizando ratos tratados com STZ observaram uma diminuição dos grupos tióis causada pelo diabetes (Barbosa *et al.* 2008; Cumaoglu *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008). E vários genes relacionados com os grupos tióis são diferentemente expressos em indivíduos com diabetes e indivíduos controle (Ceriello *et al.* 2000; Hodgkinson *et al.* 2003). Todavia, o papel específico desses genes nas complicações diabéticas permanece desconhecido.

O impacto que os radicais livres causam nos lipídios é conhecido por peroxidação lipídica. A hiperglicemia no diabetes produz radicais livres e o sistema antioxidante se torna insuficiente, aumentando o estresse oxidativo (Kakkar *et al.* 1997). Plasma e tecidos de pessoas com diabetes possuem maior concentração de produtos da peroxidação lipídica que pessoas saudáveis da mesma idade. E também pacientes com retinopatia e angiopatia apresentam mais peroxidação lipídica que pacientes que não apresentam essas complicações. Essa situação mostra a importância da peroxidação lipídica para o desenvolvimento das complicações diabéticas. Achados similares são obtidos em modelos animais diabéticos. Radicais peróxil podem remover o hidrogênio de lipídeos, produzindo hidroperóxidos que propagam a via de radicais

livres (Halliwell & Gutteridge 1990a). Estes hidroperóxidos também podem reagir com metais de transição e formar aldeídos, como o malondialdeído, que causa danos às membranas celulares. O aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, que é uma evidência indireta da intensa produção de radicais livres, é visto em vários trabalhos com ratos tratados com streptozotocina e aloxana, onde analisaram essa concentração também em homogenatos de fígado e rins (Aragno *et al.* 1999a; Jain 1989b). Em hamsteres, Takatori *et al.* (2003) analisaram a concentração de malondialdeído e 4- HNE, outro aldeído formado da peroxidação lipídica, e verificaram também um aumento nas suas concentrações em animais que receberam uma dose de STZ.

Níveis de proteínas carboniladas aumentam no diabetes melitus dependentemente da hiperglicemia, hipelipidemia, estresse oxidativo e/ou detoxificação de derivados carbonílicos reativos. Alta concentração de glicose, induz formação de proteínas glicadas que doam um elétron para o oxigênio molecular e aumentam a formação de radicais livres. Níveis de proteína carbonilada aumentados são vistos em ambos os diabetes tipo 1 e tipo 2. Dominguez *et al.* (1998) em uma pesquisa com crianças com diabéticas tipo 1 que possuem complicações diabéticas foram determinados os níveis de proteínas carboniladas no plasma com significativo aumento em relação a crianças controles. Este caso mostrou que o dano oxidativo de proteínas ocorre em estágios iniciais da diabetes e continua aumentando durante a vida. O uso de proteínas oxidadas como marcador de estresse oxidativo pode apresentar algumas vantagens em comparação com outros marcadores, porque sua velocidade de formação ocorre relativamente em estágios iniciais da patologia, possui grande estabilidade e longo tempo de vida. A dosagem de proteína carbonilada é uma medida sensível para medir o conteúdo de proteína oxidada (Reznick & Packer 1994).

Eritrócitos são altamente susceptíveis a condições de estresse oxidativo e este é um fator que pode estar levando à diminuição da concentração de hemoglobina. A oxidação da membrana dos eritrócitos afeta suas propriedades intrínsecas pela alteração da fluidez, transporte de íons e perda da atividade de enzimas da célula. Alta concentração de produtos da peroxidação lipídica têm sido reportada nos eritrócitos

de pacientes que sofreram derrame esses produtos acumulam-se nos eritrócitos e podem causar modificações em proteínas e lise nas células vermelhas.

A lipase é a enzima digestiva produzida principalmente pelas células acinares do pâncreas exócrino. Tem o papel fisiológico de hidrolisar as longas cadeias de triglicerídeos no intestino delgado (lipólise). Duan et al. (1992) encontraram em ratos induzidos por STZ um aumento da lipase pancreática e uma diminuição da amilase.

A secreção da amilase pancreática é medida para avaliar a secreção pancreática. Trabalhos têm investigado as mudanças na secreção pancreática usando modelos diabéticos induzidos por STZ e tem encontrado atividade diminuída em ratos tratados com STZ (Duan *et al.* 1989; Hirotsani *et al.* 2007; Okabayashi *et al.* 1985). Além disso, muitos estudos documentam que a insulina estimula a transcrição e tradução do mRNA da amilase, assim a insulina estimula a secreção da amilase (Patel *et al.* 2004).

3 - OBJETIVOS

Avaliar alterações na homeostase de carboidratos, lipídios, ferro e relacionar mecanismos moleculares envolvidos na relação entre diabetes e a suplementação de ferro em diferentes modelos experimentais

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Induzir diabetes experimental em ratos e em hamsteres utilizando STZ e promover sobrecarga de ferro utilizando suplementação da dieta com ferro carbonílico. Nos diferentes modelos avaliar:
 - a) Alterações status de ferro;
 - b) Perfil glicêmico e produtos de glicação;
 - c) Perfil sérico de lipídios;
 - d) Balanço oxidantes/ antioxidantes;
 - e) Aspectos histológicos no fígado, rins e pâncreas;
 - f) Expressão de mRNA de PPAR α no fígado;
 - g) Expressão de de mRNA de proteínas do metabolismo de ferro: hepcidina, ferritina e receptor de transferrina no fígado;

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e divisão dos grupos

Utilizaram-se ratos Fisher albinos machos e Hamsteres Syrian Golden albinos machos e fêmeas, ambos com cerca de 2 meses de idade, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, divididos em dois experimentos:

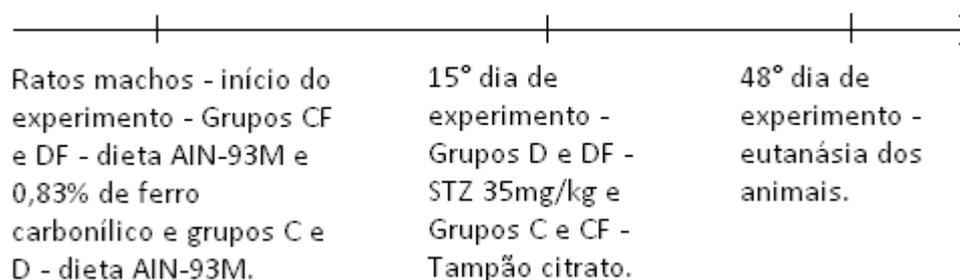
- Experimento 1: 48 ratos Fisher albinos machos, divididos em 4 grupos, Controle (dieta AIN-93M), Controle e ferro (dieta AIN-93M acrescida de 0,83% de ferro carbonílico), Diabético (dieta AIN-93M e STZ – 35mg/kg) e Diabético e ferro (STZ – 35mg/kg e dieta AIN-93M acrescida de 0,83% de ferro carbonílico, com duração de 48 dias;
- Experimento 2: 44 Hamsteres Syrian Golden albinos fêmeas, divididos em 4 grupos, Controle (dieta AIN-93M), Controle e ferro (dieta AIN-93M acrescida de 0,83% de ferro carbonílico), Diabético (dieta AIN-93M e STZ – 50mg/kg) e Diabético e ferro (STZ – 50mg/kg e dieta AIN-93M acrescida de 0,83% de ferro carbonílico, com duração de 45 dias;

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em ambiente arejado, com controle de temperatura, umidade e ventilação. Durante o experimento o manejo dos mesmos foi feito de acordo com os princípios e diretrizes descritas no Canadian Council on Animal Care (1984) e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto, protocolo número 2009/4.

4.1.1 - Desenho experimental do primeiro experimento:

Foram usados 48 ratos Fisher, machos, com cerca de 2 meses de idade, pesando aproximadamente 180g, foram distribuídos em 4 grupos, sendo que os

grupos C e CF possuíam 8 ratos e os grupos D e DF possuíam 16 ratos em cada grupo. Os ratos dos grupos C e D receberam dieta padrão AIN-93M durante todo o experimento e os ratos dos grupos CF e DF receberam dieta padrão AIN-93M acrescida de 0,83% de ferro carbonílico. Os ratos dos grupos D e DF receberam injeção de STZ (35mg/kg) no 15° dia de experimento, e os grupos C e CF receberam uma injeção de tampão citrato. Após 7 dias da aplicação da droga, medimos a concentração de glicose e apenas os animais que apresentavam esta acima de 250mg/dL continuaram no experimento. No 48° dia de experimento os ratos foram anestesiados e sofreram eutanásia.

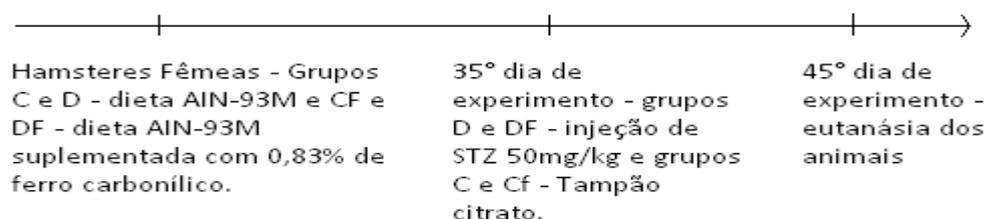


4.1.2 - Delineamento experimental do segundo experimento

Nesse experimento, os hamsteres receberam uma suplementação de ferro carbonílico de 0,83%, de acordo com o trabalho de Dabbagh *et al.* (1994). O período que os hamsteres permaneceram diabéticos foi decidido no experimento anterior, sendo que, 10 dias após a aplicação da STZ, os hamsteres apresentaram mudanças satisfatórias para os parâmetros do estresse oxidativo.

Foram usados 44 Hamsteres Syrian Golden, fêmeas, de 90 dias de idade, divididas em 4 grupos. Os grupos Controle (C) e Diabético (D) receberam dieta controle AIN-93M, conforme descrito na Tabela 4, enquanto os grupos Controle e Ferro (CF) e Diabético e Ferro (DF) receberam dieta controle acrescida de 0,83% de ferro carbonílico (Tabela 4) durante 4 semanas. Os grupos D e DF receberam uma injeção de estreptozotocina (50mg/kg) no 35° dia, após 3 dias foi medida a glicose

sérica dos hamsteres e apenas os que estavam com a glicose sérica acima de 250mg/dL permaneceram no experimento, e os grupos C e CF receberam uma injeção de tampão citrato com o objetivo de produzir o mesmo estresse. Após 7 dias da aplicação da STZ foi realizado um teste de tolerância a glicose. No 45° dia os hamsteres foram anestesiados e sofreram eutanásia.



4.2. Dietas

As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. As dietas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -20°C. As dietas e a água foram oferecidas “ad libitum”.

Tabela 1 - Dieta utilizada (g/1000g de dieta).

Ingredientes	Dieta Padrão AIN-93M	Dieta Padrão E Ferro carbonílico
Caseína	167	167
Amido de Milho	595,5	587,2
Óleo de Soja	40	40
Sacarose	100	100
Colina	2,5	2,5
Mistura de Minerais	35	35
Mistura de Vitaminas	10	10
Celulose	50	50
Ferro carbonílico	-	8,3

Para preparar as dietas utilizaram-se mistura de sais e de vitaminas preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental, a partir dos compostos descritos a seguir:

- **Mistura de sais** (expresso por g/kg da mistura): NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 57,3 / CaCO_3 – 381,4 / $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 4,01 / $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,548 / $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,477 / $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,023 / KH_2PO_4 – 389,0. Os sais foram adquiridos do Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.
- **Mistura de vitaminas** (expresso por em mg/kg da mistura): Acetato de retinol – 690; colecalciferol – 5; ácido *p*-amino benzóico – 10 000; inositol – 10 000; niacina – 4000; riboflavina – 800; tiamina HCL – 500; ácido fólico – 200; biotina – 40; cianocobalamina – 3; *dl*- α - tocoferol – 6 700; sacarose – q.s.p. 1000. As vitaminas foram adquiridas da Merk, Darmstadt, Alemanha.

4.3- Eutanásia e coleta de tecidos

Ao fim de cada experimento os animais foram deixados oito horas em jejum e anestesiados, o sangue foi coletado através do plexo braquial até sangria total. O sangue foi colhido em tubos de polipropileno com ou sem 15 μ L de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) para obtenção do plasma ou soro, respectivamente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 10000g por 15 minutos e o plasma ou soro guardados sob refrigeração (-4°C). Os órgãos fígado, baço, coração e rins, bem como a gordura abdominal foram extraídos e posteriormente pesados. Fragmentos de fígado, rins ou pâncreas (100 ou 200mg) foram imediatamente homogeneizados com tampões específicos ou ácido sulfosalicílico de acordo com a análise prevista posteriormente. Após homogeneização eles foram mantidos à -80°C até análise. O restante do fígado foi congelado para posterior dosagem de ferro nos tecidos.

4.4- Dosagens bioquímicas

Foram feitas as seguintes dosagens bioquímicas utilizando-se kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A.: Alanina Aminotransferase, Albumina, Amilase, Aspartato Aminotransferase, Capacidade de ligação do ferro, Colesterol Total, Colesterol-HDL, Creatinina, Ferro sérico, Frutosamina, Glicose, Hemoglobina, Lipase, Proteínas Totais e Triacilgliceróis.

Para determinação da concentração do colesterol não – HDL foi feita a subtração da concentração do colesterol total pela concentração do colesterol HDL. Os resultados obtidos para a concentração do colesterol não -HDL foram expressos em mmol/L.

4.4.1 – Determinação da Concentração de Grupos Sulfidrilas no soro

Princípio da técnica

Determinação de grupos sulfidrilas totais em amostras biológicas, usando o reagente de Ellman (DNTB), conforme proposto por Sedlak e Lindsay (1968). Os grupos tióis reagem com DNTB formando um composto colorido, que absorve luz à 412nm.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Tampão Tris-HCl, pH = 8,2: Foram dissolvidos 24,22g de Trizma Base (121,1Da) e 8,32g de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA; 416,21Da; 99%*m/m*) em 800mL de água destilada. O pH foi ajustado em 8,2 usando HCl 3 mol/L. Quantidade suficiente de água destilada foi utilizada para completar o volume final de 1.000mL. A solução final continha 30mmol/L de Trizma Base e 3mmol/L de EDTA. Armazenou-se em temperatura ambiente.

Cloreto de Trietanolamina (TEA): Foram dissolvidos 1,33mL de cloreto de trietanolamina (TEA; 185,7Da) e quantidade suficiente de água destilada foi utilizada para completar o volume final de 500mL.

Ácido Tricloroacético (TCA): Foram dissolvidos 10g de ácido tricloroacético (TCA; 163,4Da; 70%*m/v*; 1,63g/mL) em 70mL de água destilada. Agitou-se e água destilada foi adicionada para completar o volume para 100mL.

Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB): Foram dissolvidos 10mg de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB; Reagente de Ellman; 396,3Da) em 14,71mL de metanol (32,04Da; 0,79g/mL). Este reagente foi preparado no dia da dosagem e é mantido no gelo enquanto usado.

Cisteína estoque: Foram dissolvidos 12mg de cisteína (121,16Da) em volume de TEA suficiente para 5mL. A solução final continha 20mmol/L de cisteína. Este reagente foi preparado no dia da dosagem e mantido no gelo enquanto usado.

Curva padrão para sulfidrilas totais

Para determinar a concentração de sulfidrilas foi feito um padrão dissolvendo-se 49,5µL de cisteína estoque em 949,5µL de TEA. Identificou-se 6 tubos de polipropileno e obteve-se o seguinte procedimento:

CONC (µMOL/L)	0	50	100	250	500	1000
Padrão Cisteína (µL)	0	25	50	125	250	500
TEA (µL)	500	475	450	375	250	0

Procedimento de dosagem de sulfidrilas totais:

Para cada amostra, adicionaram-se 800µL de metanol, 150µL de Tris-HCl, pH = 8,2, 50µL de DTNB e 40µL de amostra (ou da série de padrões). Foi centrifugado à 10000g durante 15 minutos à temperatura ambiente. O ponto de concentração “zero” da curva padrão foi utilizado para zerar o espectrofotômetro e as absorbâncias das amostras foram lidas em 412nm, à 25°C.

Cálculos

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorbância do padrão (Eixo X). Após uma regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de sulfidrilas totais. Todas as concentrações foram obtidas em µmol/L.

4.4.2. Paraoxonase – Atividade Arilesterase em soro

Princípio da técnica

Determinação da atividade arilesterásica da enzima paraoxonase, usando fenilacetato como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato, conforme descrito por Eckerson *et al.* (1983) em humanos e também por Beltowski *et al.* (2002) em ratos.

Procedimento de dosagem

Em tubo de ensaio adicionaram-se 2mL de tampão Tris-HCl, 9mmol/L, pH = 8,0 contendo 0,9mmol/L de cloreto de cálcio e 5µL de soro. Foi misturado no vórtex e adicionado 0,5mL da solução Tris- fenilacetato (1 µL de fenilacetato para cada 1500 µL de TrisHCL 9mM; pH=8,0). Após exatamente 3 minutos, a absorbância foi lida em 270nm. O espectrofotômetro foi zerado com o branco que contém todos os reagentes acima, exceto o soro.

Cálculo

Utilizamos a definição para atividade enzimática de acordo com Beltowski *et al.*(2002). Segundo a qual 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1µmol de fenilacetato ($\epsilon = 1310 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade dessa enzima é representada por 1mL de soro). A atividade arilesterásica da enzima foi calculada utilizando a lei de Lambert Beer:

$$A = C.b.\epsilon$$

Onde:

ϵ – Coeficiente de extinção molar;

b – caminho óptico, igual a 10 mm.

A= absorbância

C= concentração ou atividade enzimática

4.4.3. Paraoxonase – Atividade Paraoxonase no soro

Princípio da técnica

Determinação da atividade paraoxonásica, usando paraoxon como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise deste, com a liberação do para-nitrofenol por minuto, conforme descrito por Beltowski *et al* (2002).

Procedimento de dosagem

Inicialmente preparou-se uma solução contendo 9 mL de tampão glicina/NaOH 50mM pH10,5, contendo CaCl_2 0,9 mM e 2 μL de paraoxon. Em um tubo de polipropileno adicionaram 780 μL dessa solução e 20 μL de soro. A solução foi homogeneizada e lida a absorbância das amostras no espectrofotômetro em 412nm, exatamente à cada minuto, por 3 minutos. O branco (tubo com 780 μL da solução preparada inicialmente e 20 μL de água) foi utilizado para zerar o aparelho.

Cálculo da atividade de enzima

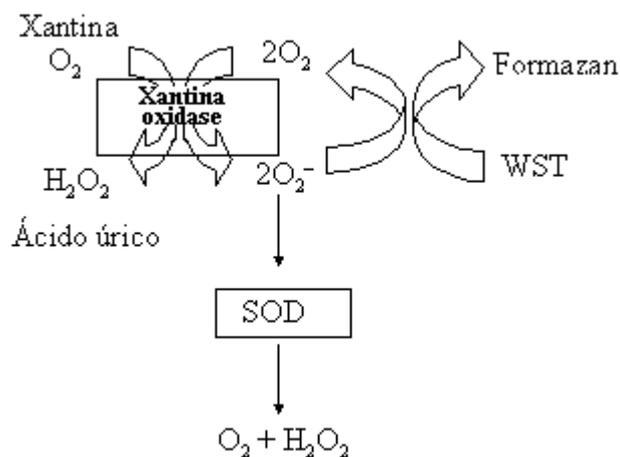
Segundo Beltowski *et al* (2002) 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1nmol de paraoxon ($\epsilon = 18290 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade desta enzima é representada por 1mL de soro). A atividade paraoxonásica da enzima paraoxonase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer.

A absorbância utilizada nessa expressão é o delta (absorbância por minuto) obtido das absorbâncias lidas no 1° e 3° minuto, subtraindo a absorbância do terceiro minuto pela absorbância do primeiro minuto, e dividindo por 2, visto que são 2 minutos entre as duas absorbâncias.

4.4.4. Superóxido Dismutase no soro

Princípio da técnica

Utilizou-se o kit Fluka # 19160 (USA), utilizando-se um sistema de geração de ânions superóxido, xantina e xantina oxidase, e avaliando-se a capacidade da solução teste, sob condições padrões, em inibir a reação do ânion superóxido com o WST (2-(4 iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio). Esta reação quando ocorrida forma um composto denominado formazan, o qual absorve luz à 450nm (conforme mostra o esquema abaixo).



Preparo dos reagentes

WST – solução de trabalho: Foi diluído 1mL de WST em 19mL de solução tampão.

Solução de enzima de trabalho: Foram diluídos 15 μ L da solução de enzima com 2,5mL do tampão diluído.

Procedimento de dosagem

Em uma placa de ELISA, procedeu-se a dosagem conforme o quadro abaixo:

	Amostra	Branco 1	Branco 2	Branco 3
1- Amostra	20 μ L	-	20 μ L	
2- H ₂ O destilada	-	20 μ L	-	20 μ L
3- WST de trabalho	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
4- Enzima de trabalho	20 μ L	20 μ L	20 μ L	-
5- Tampão diluído	-	-	-	20 μ L

Esta placa de ELISA foi incubada por 20 minutos à 37°C e em seguida as absorbâncias das amostras foram lidas à 450nm no leitor de ELISA.

Cálculo

Atividade de SOD (velocidade de inibição) =

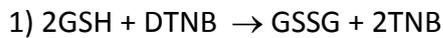
$$\left[\frac{(A_{\text{branco 1}} - A_{\text{branco 3}}) - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco 2}})}{(A_{\text{branco 1}} - A_{\text{branco 3}})} \right] \times 100.$$

Portanto a atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada através da habilidade da SOD contida no soro em inibir a reação do ânion superóxido com o WST.

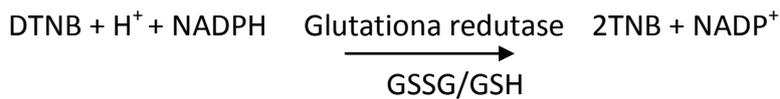
4.4.5. Concentração de Glutaciona Total em tecidos

Princípio da técnica

Utilizou-se o kit Sigma # CS0260. A glutaciona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutaciona oxidada (GSSG). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutaciona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.



A combinação das duas reações:



Preparo dos reagentes de estoque

Solução de ácido sulfosalicílico (SSA) 5%.

Tampão fosfato 5X (500mM), contendo 5mM EDTA.

Solução padrão estoque de glutaciona: 0,3mg de glutaciona reduzida em 0,1mL de água destilada.

Solução de estoque de DTNB: 8mg de DTNB foram diluídos em 5,33mL de dimetil sulfosalicílico (DMSO), resultando em uma solução com 1,5mg/mL de concentração.

Estoque de NADPH (solução de 40mg/mL).

Preparação da amostra biológica

100mg de tecido foi homogeneizado com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA), e em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Preparo dos reagentes de trabalho

Solução de enzimas diluída: Diluir 15,2µL de glutaciona redutase (100unidades/mL) em 250µL de tampão fosfato 1x.

Solução de NADPH de trabalho: Da solução de estoque de NADPH preparada são retirados 30 μ L para 7,5mL de tampão fosfato 1x.

Mistura de trabalho: 8mL de tampão 1x, 228 μ L da solução de enzimas diluída e 228 μ L de DNPH solução de estoque.

Solução padrão de glutatona – preparar para a curva padrão: Diluir 10 μ L de solução estoque de glutatona padrão com 2mL de ácido SSA 5%.

Procedimento para dosagem

A confecção da curva padrão e as dosagens nas amostras foram feitas em placas de Elisa. Os reagentes e a seqüência de adições estão descritas nas tabelas abaixo.

Procedimento para curva padrão

Poço	1	2	3	4	5
[GSH] μ M	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (μ L)	50	25(tubo 1)	25(tubo 2)	25(tubo 3)	25(tubo 4)
SSA 5% (μ L)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 μ L de amostra	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Procedimento para o teste

	Amostra	SSA 5%	Mistura de trabalho
Branco	-	10 (μ L)	150 (μ L)
Padrão (tubos preparados para a curva)	10 (μ L)	-	150 (μ L)
Amostra	10 (μ L)	-	150 (μ L)

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μ L de NADPH foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorvâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos, no leitor de ELISA à 412 nm.

Cálculo

Foi feito um gráfico utilizando os pontos obtidos na curva padrão (estes pontos obtidos foram o delta das absorbâncias). Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutatona total em 10 μ L de amostra, e este valor convertido para 1mL de amostra.

4.4.6. Catalase

Princípio da técnica

Determinação da atividade da enzima catalase, baseado na sua capacidade de converter o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi, (1984).

Preparação da amostra biológica

100mg do fígado foi homogeneizado com 1mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Procedimento de dosagem

Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50 μ L de tampão fosfato pH 7,2; (0,1mM) e 40 μ L de água destilada, o qual foi mantido em banho maria 30°C por 1 minuto. Em seguida adicionaram-se 10 μ L da amostra e 900 μ L de H₂O₂ (10mM). Homogeneizou-se a solução, o espectrofotômetro foi zerado com H₂O₂ (10mM) em 240nm e determinaram-se as absorbâncias das amostras exatamente a cada minuto, durante cinco minutos.

Cálculo

1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μ mol de H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto (Aebi, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em Unidade por mL de amostra. Calculamos a atividade da catalase segundo a lei de Lambert Beer.

A absorvância utilizada nessa expressão é o delta obtido das cinco absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial / 4).

4.4.7. Proteína Carbonilada

Princípio da técnica

A oxidação de proteína por EROs leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). O DNP reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada foi realizada conforme descrito por Levine *et al.* (1994).

Preparação da amostra biológica

200mg do fígado ou rim foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato 50mM, pH: 6,7 contendo EDTA 1mM. Em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Ácido Clorídrico 2,5M.

DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina): 0,01g de DNPH foi diluído em 10mL de HCL 2,5M (preparado anteriormente). Obtendo uma solução com 0,1% de DNPH. Esta solução foi estocada no escuro à 4°C. Estável por uma semana.

Solução de TCA (ácido tricloroacético) 10%

SDS 6% - Dodecil Sulfato de Sódio.

Mistura de etanol e acetato de etila: Em um frasco foi misturado 30mL de etanol e 30mL de acetato de etila. Esta mistura deve ser mantida em geladeira.

Procedimento de dosagem

Para cada amostra utilizou-se dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Controle (C). Transferiu-se 500µL de homogeneizado de

fígado ou rim para cada tudo (amostra (A) / controle (C)). Em seguida foi adicionado aos tubos 500µL de TCA 10% e misturado no vórtex, logo após, foram centrifugados (tubo A e C) à 5000g por 10 minutos à 4°C. O próximo passo foi adicionar ao tubo A 500µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e no tubo C 500µL de HCL à 2,5M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, e a cada 15 minutos eram misturados no vórtex. Em seguida foi adicionado 500µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% em cada tubo, misturado no vórtex e centrifugados à 5000g por 10 minutos à 4°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante dos tubos foi descartado e 1mL de mistura de etanol com acetato de etila foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida o sobrenadante dos tubos A e C foram descartados e à estes foram adicionados mais 1mL da mistura etanol e acetato de etila, foram misturados no vórtex e novamente centrifugados. No final das centrifugações, o sobrenadante dos tubos A e C foram novamente descartados e adicionado em ambos 1mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10000g por 10 minutos à 4°C. Finalmente o sobrenadante dos tubos foram retirados e transferidos para cubeta, onde foram lidos no espectrofotômetro à 370nm.

Cálculos

A concentração de proteína carbonilada foi determinada utilizando a seguinte equação de Lambert Berr:

$$A = C.b.\varepsilon$$

Onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ε é o coeficiente de extinção molar. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de 22 000 M⁻¹ cm⁻¹ e expresso por nmol de proteína carbonilada formada por mg de proteína.

Para se obter a concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais no fígado ou rim, este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry (descrito a seguir).

4.4.8 – Proteínas totais em tecidos – método de Lowry

Princípio da técnica

O método de dosar proteína Lowry é um ensaio muito confiável e amplamente usado. Este método foi descrito a primeira vez por Lowry *et al.* (1951). O método de Lowry é baseado nas ligações das proteínas, que em meio alcalino, com os íons cobre (Cu^{2+}) formando uma cor azul que é dependente em partes, do índice de tirosina e triptofano da amostra, já que os íons cobre catalisam a oxidação de aminoácidos aromáticos.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Reagente A: Foi dissolvido 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução foi armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

Reagente B: Foi dissolvido 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Foi armazenado a temperatura ambiente.

Reagente C: Foi adicionado 1mL do reagente A em 50mL do reagente B. Preparado na hora do teste.

Reagente D: Foi dissolvido um 1mL de Folin-Ciocateau em 1mL de água destilada. Preparado na hora do teste.

Curva padrão para proteínas totais:

Foram realizados quatro pontos para a curva, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,15mg/mL.

P3- 715 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,35mg/mL.

P4- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,5mg/mL.

Procedimento de dosagem de proteínas totais:

Em um tubo de polipropileno, foram pipetados 10µL de amostra ou padrão e completados para 100µL com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100µL de água destilada. Posteriormente foi adicionado 1mL do reagente C em todos os tubos. A mistura foi levada ao vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo, 100µL do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm.

Cálculos

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorvância do padrão (Eixo X). Após regressão linear, foi determinada a equação da reta com a seguinte característica: Concentração = a X Absorvância + b. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

4.4.9 – TBARS

Princípio da técnica

Determinação da concentração de TBARS foi baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados, esta dosagem foi realizada conforme descrito por Buege and Aust, (1978).

Preparação da amostra biológica

100mg do fígado ou rim foi homogeneizado com 1mL de tampão fosfato, pH 7,4 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Procedimento de dosagem

Em um tubo foi colocado 500µL de homogeneizado, 250µL de ácido tricloroacético (TCA) 28% dissolvido em HCl 0,25N, 250µL de ácido tiobarbitúrico 1%

dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 μ L de BHT 5mM dissolvido em etanol. Este tubo foi levado ao vórtex e colocado em um banho maria a 95°C por 15 minutos. Após esse período, este tubo foi centrifugado por 10 minutos a 10000g. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro a 535nm, que foi zerado com água destilada.

Cálculo

A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, segundo a lei de Lambert Beer. Usualmente essa concentração é representada em nmoles por mg de proteína.

4.4.10- Digestão e dosagem de ferro nos tecidos

Princípio da técnica

Usando o método de orto-fenantrolina, de acordo com a AOAC (1980), foi dosado o ferro nos tecidos, ele se baseia na redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} pela hidroxilamina, o qual é associado com orto-fenantrolina que dá cor a amostra correspondente a concentração de ferro.

Digestão do tecido

Amostras de 100mg de tecido foi colocada em tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL de ácido nítrico concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados no digestor Kieldahl a 110°C de modo que ocorresse a digestão dos tecidos e a evaporação total do ácido. Posteriormente o resíduo foi ressuscitado com 2 mL de ácido clorídrico concentrado e transferido esse material para um balão volumétrico, com capacidade para 10 mL e o volume foi completado com água deionizada.

Procedimento de dosagem

A 0,5 mL da solução obtida foram adicionados 0,2 de solução de hidroxilamina 10%, 4,1 mL de tampão acetato 4M pH 3,5 e 0,2 mL de orto-fenantrolina 0,1%. Foi feito um branco para leitura no espectrofotômetro contendo 0,5 mL de água deionizada, 0,2 de hidroxilamina, 4,1 mL de tampão acetato pH 3,5 e 0,2 mL de orto-fenantrolina. A leitura foi feita a 510nm. O padrão foi obtido a partir de uma curva feita com uma solução padrão de ferro 500 $\mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos em unidades convencionais ($\mu\text{g/dL}$) foram transformados em unidades internacionais ($\mu\text{mol/l}$), pela multiplicação por 0,179.

4.4.11- Teste de tolerância à glicose

Os animais permaneceram 12 horas em jejum antes de receberem uma solução de 2,5g de glicose por kg, em 1mL, por gavagem. Amostras de sangue foram coletadas nos momentos 0, 30, 60 e 120 minutos depois da administração de glicose. Os níveis de glicose foram determinados usando o aparelho Accu- Chek® Active da Roche.

4.4.12- Análise da expressão de RNAm

4.4.12.1- Coleta do material

Após o sacrifício dos animais, os tecidos hepáticos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a uma temperatura de – 80°C até serem processados.

4.4.12.2- Extração de RNA total

A extração do RNA total foi feita de acordo com as recomendações do kit RNAgents® Promega-Total RNA Isolation System- (Madison, USA). Resumidamente, cada 50 mg de fígado foi homogeneizada com 600 µl de solução desnaturante. A separação da fase aquosa desta mistura foi obtida adicionando 60µl de 2M acetato de sódio e 600µl fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugando a 10.000 RPM por 20 minutos a 4°C. Para precipitação do RNA, adicionou-se à fase aquosa igual volume de isopropanol que foi incubada a -20°C por 20 minutos e depois centrifugada a 10000 RPM a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 75% e secado a temperatura ambiente. Posteriormente foi ressuscitado com 100µl de água DEPEC. A concentração e pureza do RNA total foi verificada a 260 e 280nm no espectrofotômetro NanoVue da GE Healthcare (United Kingdom).

4.4.12.3- Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total utilizando o kit GeneAmp® RNA PCR da Applied Biosystems (Foster City, USA). O cDNA é preparado em uma reação 20 µl contendo 2 µg de RNA total, 2 µl do Tampão 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, pH 8.3), 0,8 µl mistura de 100mM dNTP, 1µl de 2,5 µM Oligo d(T)₁₆, 1 µl da enzima Transcriptase Reversa MultiScribe™ (50 U/ µl). A reação foi incubada no termociclador Biocycler modelo MJ96+ por 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37° C e 5 minutos a 85° C.

4.4.12.4- Especificidade dos iniciadores para qPCR

Os iniciadores utilizados para os genes estudados foram escolhidos de acordo com a literatura (Tabela I). Antes de realizar o PCR quantitativo (qPCR), cada iniciador foi testado quanto a sua eficiência de amplificação. A eficiência dos iniciadores foi realizada através de uma curva usando diluições seriadas de 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 nanogramas do cDNA preparado. Cada reação foi feita em triplicada e consistiu de uma mistura de 12,5 µl de 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de 10 µM de iniciador e 2 µl de cDNA de concentração correspondente. A reação foi incubada na máquina de PCR Tempo Real ABI 7300 (Applied Biosystems). Depois de uma etapa inicial de 50°C por 2 min para ativação da ampUNG e 95°C por 10 min para inativação ampUNG e ativação da TaqGOLD, foram feitos 40 ciclos de 60 e 95°C por 1 min cada um. Em seguida, foi feito um gráfico a partir dos valores do Ct e da concentração da amostra em cada uma das diluições. O cálculo da eficiência da PCR foi feito a partir da inclinação das retas.

4.4.12.5- PCR em Tempo Real (qPCR)

A análise da expressão gênica foi feita através da qPCR usando o cálculo relativo ΔCt . O Ct é o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência é detectada acima da linha basal. Após o cálculo da eficiência dos iniciadores, cada reação de 25 µl foi feita em duplicata e consistiu de uma mistura de 12,5 µl de 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de 10 µM de iniciador e 2 µl de cDNA. A reação foi incubada

na máquina de PCR Tempo Real ABI 7300 (Applied Biosystems). Depois de uma etapa inicial de 50°C por 2 min para ativação da ampUNG e 95°C por 10 min para inativação ampUNG e ativação da TaqGOLD, foram feitos 40 ciclos de 60 e 95°C por 1 min cada. Posteriormente foi feita uma curva de dissociação, o que nos indica a especificidade do primer utilizado. A seguir foi feita a determinação do ΔCt a partir do Ct fornecido pelo programa 7300 Fast System. O valor do ΔCt foi calculado pela subtração do Ct do gene de referência (β -actina ou GAPDH) pelo Ct do gene alvo. A partir do ΔCt foi calculado o $\Delta\Delta Ct$ que consiste na subtração do ΔCt dos grupos testes pelo ΔCt do grupo controle. A razão de expressão dos grupos foi calculada a partir da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 2: Iniciadores utilizados para o qPCR

Gene/Nome	Sequência dos iniciadores (5'→3')	Refefência
PPAR α	F – TGTCGAATATGTGGGGACAA	Palau <i>et al.</i> (2008)
	R – AAACGGATTGCATTGTGTGA	
Actina	F – ACTGGCATTGTGATGGACTC	Bonefeld <i>et al.</i> (2008).
	R – GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	
Ferritin L	F – GCCCTGAAGAACTTTGCCAAAT	Sheikh <i>et al</i> (2007)
	R – TGCAGGAAGATTCGTCCACCT	
Hepcidin	F – TCTCGTCTGTTGCCGGAGATAG	Sheikh <i>et al</i> (2007)
	R – TTGCTGAGGTAGAAGGTTGG	
Trf-1	F – ATACGTTCCCCGTTGTTGAGG	Sheikh <i>et al</i> (2007)
	R – GGC GGAACTGAGTATGGTTGA	
GAPDH	F – CAGTCAAGGCTGAGAATG	Sheikh <i>et al</i> (2007)
	R – CAGTAGACTCCACGACATAC	

4.4.12.6- Análise Histopatológica

Fragmentos não excedentes a 4 mm de diâmetro do fígado e do pâncreas foram fixados em solução de formol a 10% e foram desidratados, diafanizados e

embebidos em parafina. Após inclusão, os fragmentos foram seccionados em micrótomo rotativo para a obtenção de slides de parafina de aproximadamente 4 μ m e posterior fixação em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas. As lâminas foram coradas pela técnica histológica de rotina da Hematoxilina & Eosina, para visualização das alterações histológicas, e pela técnica de Perls, para a determinação dos estoques de ferro teciduais. As análises morfométricas digitais para a determinação do tamanho médio e da área das ilhotas pancreáticas e quantificação dos estoques teciduais de ferro foram realizadas no microscópio óptico Leica DM5000 associado ao software de análise leica Qwin plus.

4.5 – Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov. Todos os dados seguiram uma distribuição normal, com exceção da expressão de PPAR α , e foram analisados por análise de variância Bivariada (ANOVA- *two way*), os fatores de classificação foram diabetes, ferro e também sua interação. O diabetes apresenta efeito quando a média dos grupos diabéticos (D e DF) é estatisticamente diferente da média dos grupos não diabéticos (C e CF). O excesso de ferro apresenta diferença significativa quando a média dos grupos que receberam ferro (CF e DF) é diferente da média dos grupos que não receberam ferro (C e D). Quando houve efeito de um dos fatores usamos o teste de variância Univarida (ANOVA-*one way*) com o pós teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos. Para a expressão de PPAR α foi usado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

5 - RESULTADOS

EXPERIMENTO 1 – Efeito do diabetes sobre a homeostase do ferro em ratos

Perfil Glicêmico e Indicadores Bioquímicos da função pancreática

Avaliamos se a suplementação da dieta com ferro afeta o perfil glicêmico e função pancreática de ratos. Para glicose sérica, observamos um aumento de cerca de 2 vezes para o grupo tratado com STZ, demonstrando que o objetivo de tornar os ratos diabéticos foi alcançado (Figura 1), porém o excesso de ferro não alterou os níveis de glicose. Para frutossamina observamos que o mesmo ocorreu, os ratos dos grupos D e DF revelaram valores 92% maiores em relação aos demais e o ferro não promoveu alteração nesse parâmetro. Em relação à atividade de amilase os resultados encontrados mostraram que os grupos D e DF apresentaram diferença estatística em relação aos grupos C e CF, esses ratos apresentaram valores 2,2% menores que os encontrados nos outros grupos e o tratamento com ferro carbonílico não afetou a atividade amilásica. Não observamos diferenças estatísticas para a concentração de lipase entre os grupos analisados.

Concluimos, portanto que o tratamento com STZ apresentou efeito sobre a glicemia sérica, frutossamina e atividades amilásica, revelando um quadro compatível ao esperado para a patologia do diabetes. O excesso de ferro na dieta não promoveu nenhum efeito no perfil glicêmico e função pancreática.

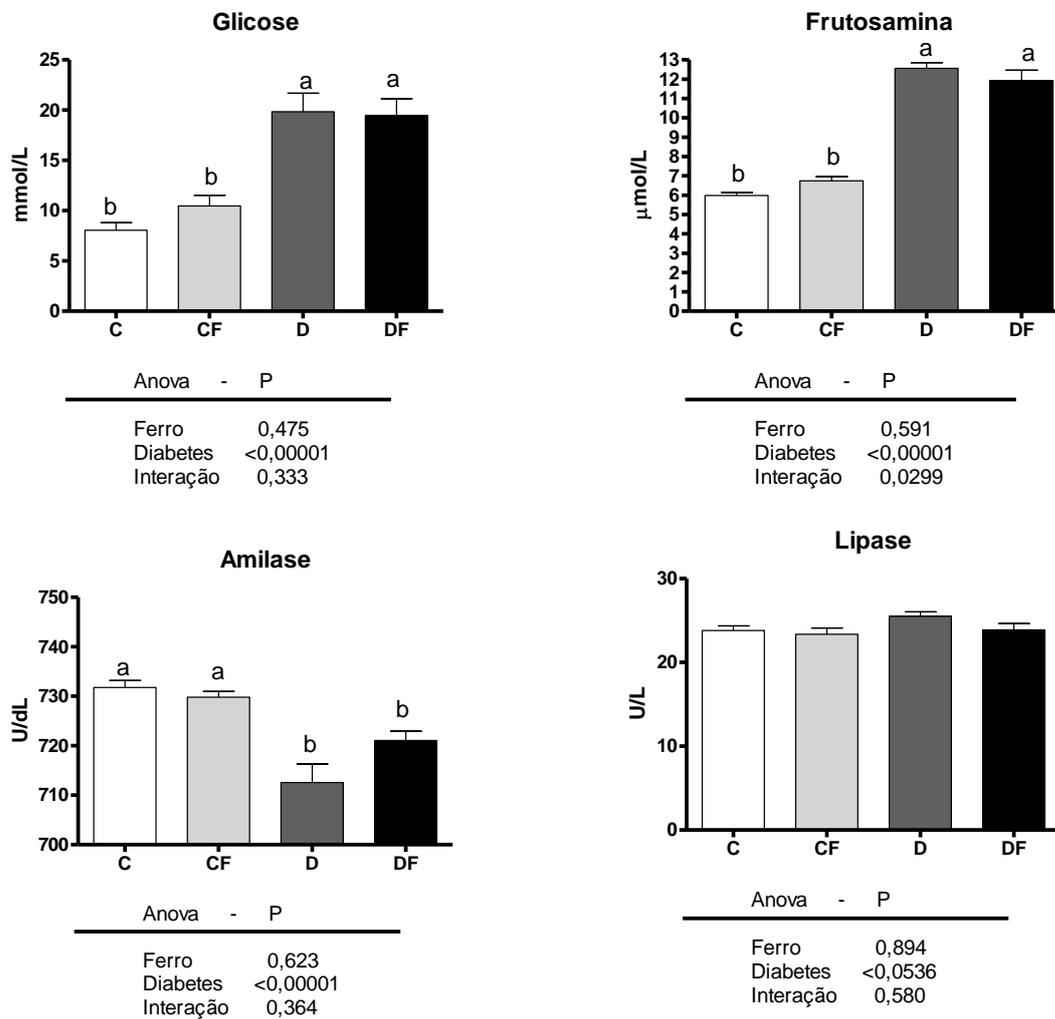


Figura 1. Níveis séricos de glicose, frutosamina e atividade de amilase e lipase de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Homeostase do Ferro

Avaliamos se a suplementação da dieta com ferro foi capaz de aumentar os níveis de ferro e o efeito do diabetes sobre a homeostase do ferro. Como mostra a figura 2, a suplementação da dieta com ferro carbonílico provocou aumento nos níveis de ferro sérico, ratos dos grupos CF e DF apresentaram níveis 87% aumentados comparados a C e D. O diabetes também alterou os níveis de ferro sérico, sendo que a média dos grupos D e DF mostrou-se os níveis de ferro 13% maiores que a média dos grupos que não foram tratados dessa forma. Ao analisarmos a CLLF observamos que os ratos CF e DF apresentaram esses valores 49% diminuídos em relação aos demais grupos. Para a CTLF, o tratamento com ferro aumentou em 47% os valores deste parâmetro. Concomitantemente, uma interação entre ferro e diabetes também foi observada, fazendo com que a CTLF fosse igual nos grupos CF, D e DF. A análise estatística revelou que o ferro carbonílico e o diabetes aumentaram o índice de saturação de transferrina em 34% e 12%, respectivamente. Sendo que os grupos CF e DF apresentaram os maiores valores, seguido do grupo D. Analisando os níveis de hemoglobina total observamos que os ratos diabéticos apresentaram concentrações 44% aumentadas, sem influência do excesso de ferro.

Em resumo, a suplementação das dietas com ferro carbonílico promoveu um aumento do conteúdo de ferro no organismo, provocando um aumento deste na circulação e nos estoques hepáticos. Surpreendentemente, o diabetes provocou uma alteração na homeostase do ferro, aumentando também os valores de ferro sérico e o índice de saturação da transferrina.

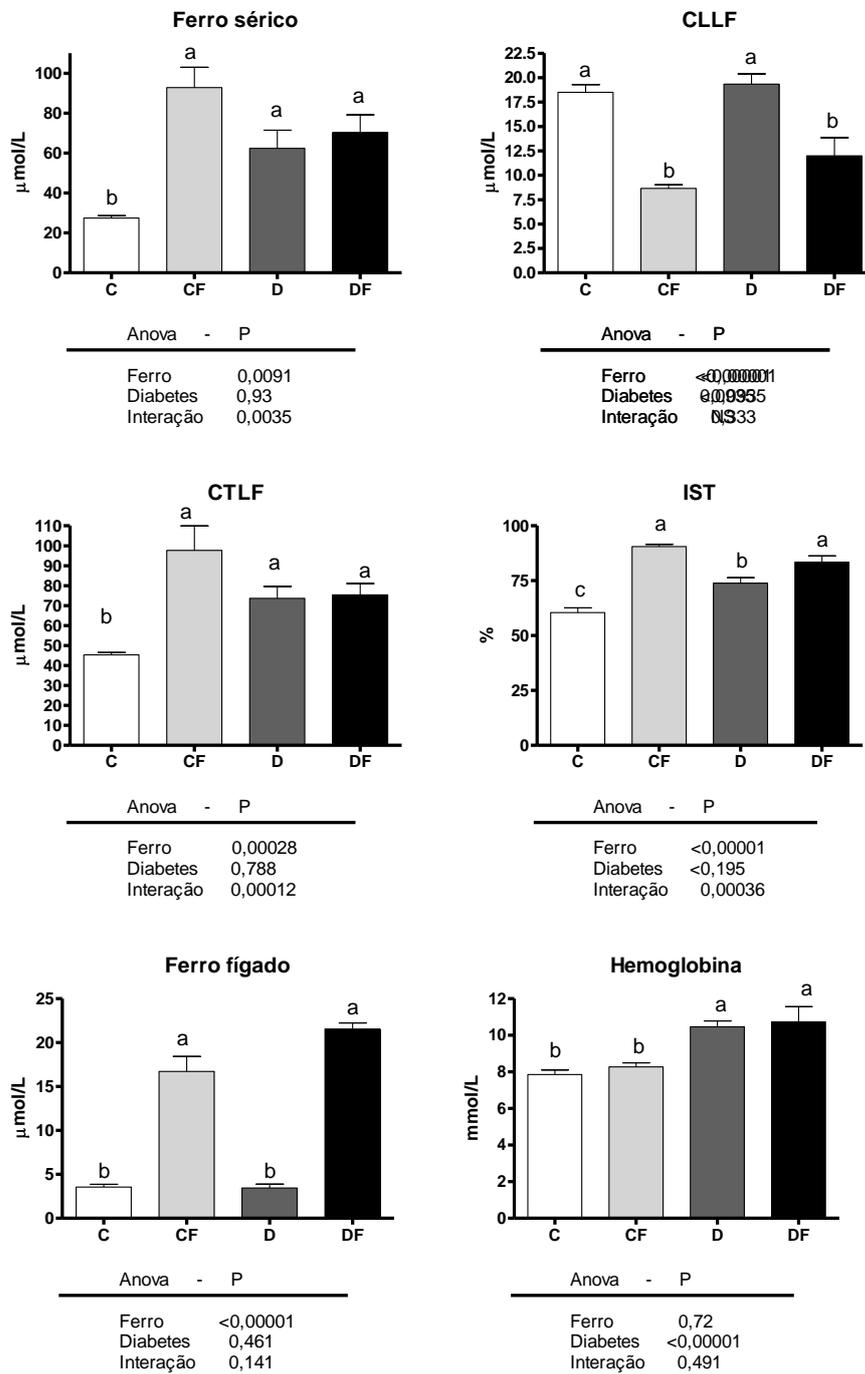


Figura 2. Níveis séricos de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação ao ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (IST), concentração de ferro no fígado e hemoglobina total de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as

diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Enzimas e metabólitos séricos

A função hepática foi avaliada a fim de verificar se o excesso de ferro e o diabetes provocaram injúria (figura 3). Para tal foi determinado os níveis séricos de proteínas totais e albumina e as atividades séricas da alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. A análise estatística dos dados da concentração de proteínas totais não revelou nenhuma alteração causada pelo diabetes e ferro. Os ratos diabéticos apresentaram a concentração de albumina 9% diminuída em relação aos demais ratos, como mostra a figura 3. Além disso, não observamos alterações nesse parâmetro promovidas pelo excesso de ferro. Observamos, para as atividades de ALT e AST, um efeito causado pelo diabetes, que aumentaram 2,69 vezes e 70%, respectivamente. Porém o excesso de ferro não promoveu alteração nas transaminases.

Com base nesses resultados, concluímos que o diabetes causou um injúria hepática, como nos mostra as atividades das transaminases e a concentração de albumina.

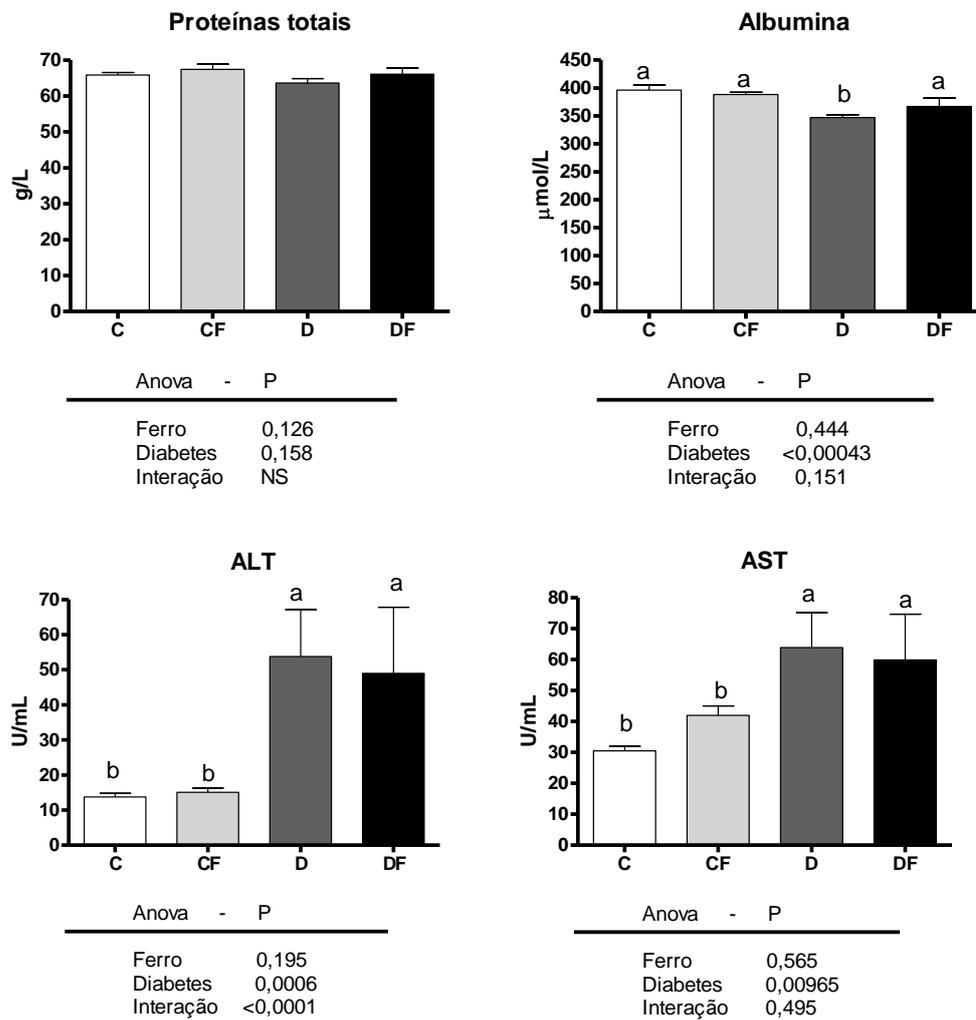


Figura 3. Níveis séricos de proteínas totais, albumina e atividade das transaminases ALT e AST de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Defesas Antioxidantes

Investigamos o *status* antioxidantes dos ratos avaliando a concentração de grupos sulfidrilas totais séricos, a atividade da superóxido dismutase sérica, a atividade da catalase no fígado e a concentração de glutathione total no fígado dos ratos. Os resultados de sulfidrilas totais revelam que os ratos que receberam o excesso de ferro na dieta apresentaram essa concentração 41% aumentada em relação aos ratos que não foram tratados dessa forma (figura 4). Porém a interação entre as duas variáveis provocou um aumento nessa concentração a níveis inferiores aos encontrados quando somente o ferro foi administrado. Para a concentração de glutathione no fígado e atividade de SOD sérica não houve diferença estatística entre os grupos. A atividade de catalase no fígado não foi afetada pelo excesso de ferro, porém os grupos D e DF apresentaram 17% de redução da atividade da catalase em relação aos demais.

Observamos então, para as defesas antioxidantes, efeitos causados pelo excesso de ferro e pelo diabetes. O ferro aumentou a concentração de sulfidrilas totais e o diabetes diminuiu a atividade da catalase.

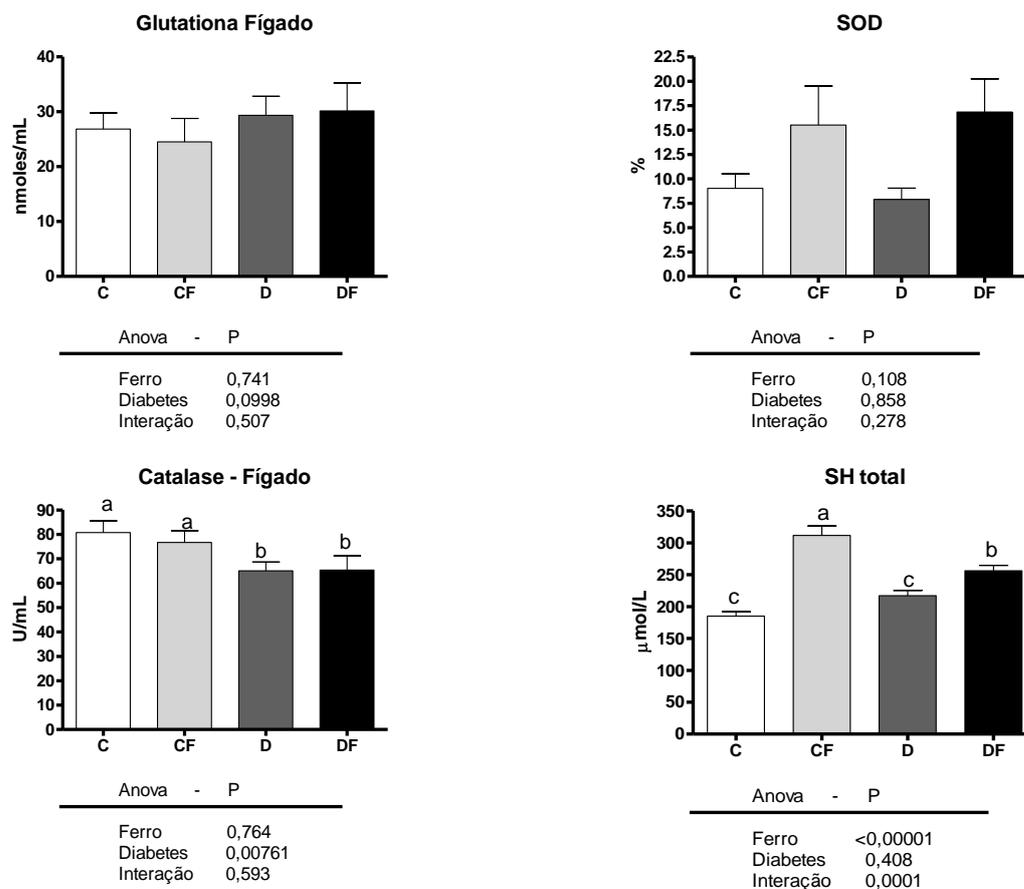


Figura 4. Níveis de glutathiona no fígado e atividade da catalase no fígado, atividade sérica da superóxido desmutase (SOD) e níveis de grupos sulfidrilas totais no soro de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Produtos do estresse oxidativo

As concentrações de proteína carbonilada e de TBARS no fígado foram determinados para avaliar modificação oxidativa sobre proteínas e lipídios, respectivamente. Os ratos diabéticos apresentam valores 2,13 vezes maiores do que os não diabéticos para proteínas carboniladas, o excesso de ferro não promoveu alterações nesse parâmetro. Para TBARS no fígado, notamos que os ratos com excesso de ferro apresentaram valores 86% aumentados em relação aos demais (figura 5).

Então, pela análise dos dados de produtos de oxidação, observamos um efeito do excesso de ferro e do diabetes sobre o estresse oxidativo. As proteínas carboniladas foram aumentadas pelo diabetes e os TBARS foram aumentados pelo ferro.

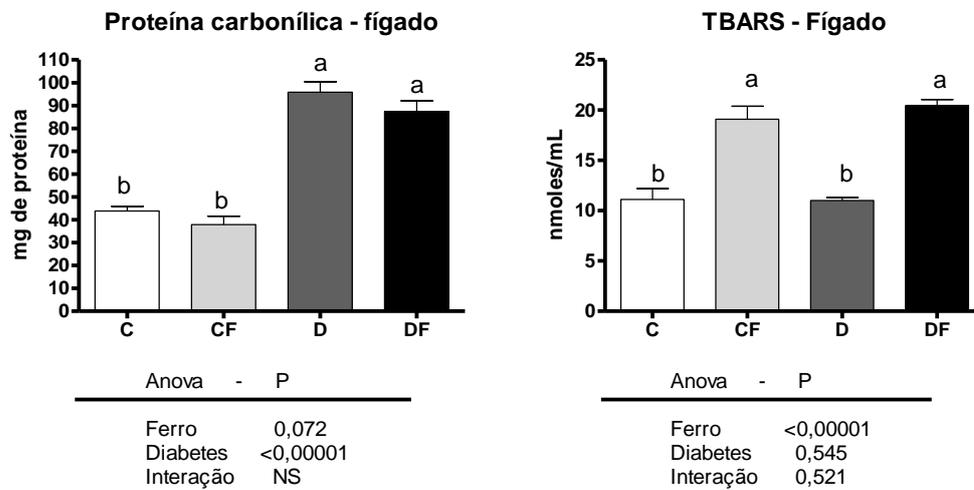


Figura 5. Níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de proteínas carboniladas no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Perfil lipídico

Avaliamos como diabetes e o excesso de ferro podem modificar o perfil sérico de lipídeos. A concentração de colesterol sérico foi influenciada pelo diabetes, ou seja, os ratos do grupo D apresentaram essa concentração 27% aumentada, houve também uma interação entre as duas variáveis, revelando não só os ratos diabéticos com os maiores valores, mas também o grupo CF (Figura 6). Analisando a concentração de triacilgliceróis observamos que os grupos diabéticos apresentaram esses níveis 25% diminuídos em relação aos demais, nenhum efeito do ferro foi observado. Para colesterol HDL observamos o mesmo perfil observado para o colesterol total, os grupos D e DF apresentaram valores 46% aumentados e houve interação, fazendo com que o excesso de ferro promovesse aumento de HDL nos ratos controle, mas esse efeito não foi observado nos ratos diabéticos suplementados com ferro. Para as outras frações do colesterol não houve alteração pelos tratamentos estudados. A análise estatística dos dados revelou que não há diferenças entre os grupos para a atividade de PON fenilacetato. Para a atividade de PON paraoxon, observamos que os ratos diabéticos apresentaram esses valores 45% aumentados em relação aos não diabéticos. E notamos também uma interação, revelando um aumento não tão pronunciado quanto ao observado no grupo que recebeu apenas a injeção de STZ. A interação fez com que esses valores voltassem a níveis iguais aos encontrados para os ratos controle.

Estes dados sugerem que o diabetes, promovido experimentalmente, causou modificações no perfil lipídico, provocando um aumento no colesterol total e HDL e redução de triacilgliceróis. A suplementação da dieta com ferro promoveu no grupo CF, valores de colesterol total e HDL, iguais aos grupos diabéticos.

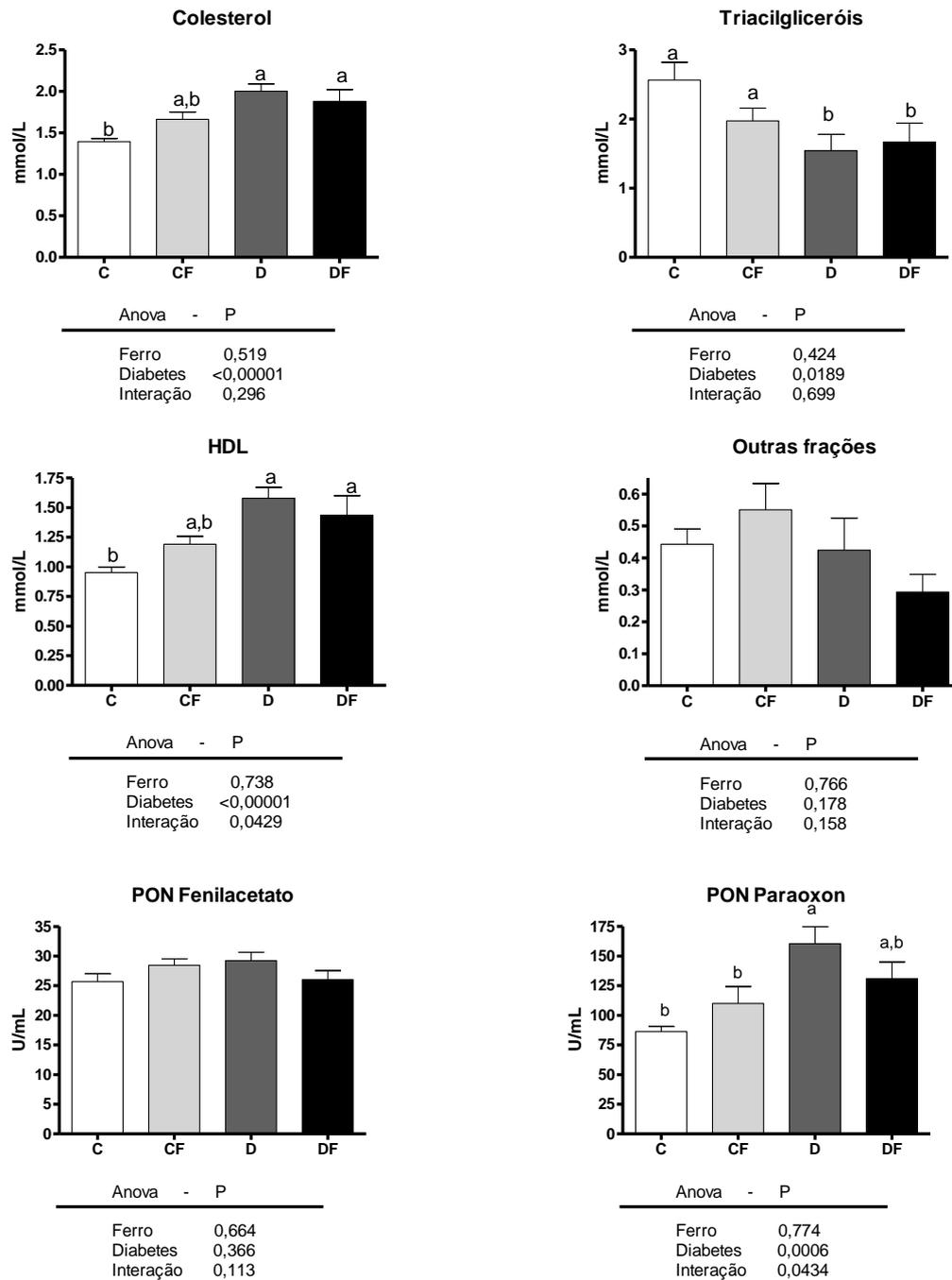


Figura 6. Níveis séricos de colesterol total, triacilgliceróis, HDL colesterol e outras frações e atividade de paraoxonase de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças

específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Peso corporal e dos órgãos

A tabela 3 mostra que o ganho de massa final foi 18% menor nos ratos diabéticos, comparados aos demais e sendo o grupo D o que apresentou menor ganho. A análise dos dados de peso do fígado nos permitiu observar que os ratos diabéticos apresentaram uma massa final 18% menor desse órgão em comparação aos demais ratos. O tratamento com STZ também influenciou na massa final dos rins, que apresentaram 25% aumentados, porém o grupo D apresentou valores iguais ao grupo controle.

A tabela 4 mostra a análise estatística dos dados de peso de baço, e esta não verificou nenhuma modificação neste parâmetro causado pelas variáveis. A quantidade de gordura abdominal foi influenciada pelo diabetes, onde verificamos uma diminuição de 90% em relação aos demais grupos, porém não observamos efeitos provocados pelo ferro nesse parâmetro. O teste estatístico revelou que não ocorreu nenhuma alteração no peso do coração por nenhum tratamento utilizado.

Estes dados sugerem que o diabetes promoveu uma perda de peso nos ratos, bem como perda de peso no fígado e gordura abdominal. Verificamos também um efeito do diabetes sobre os rins, os quais tiveram seus pesos aumentados por esse tratamento.

Tabela 3 - Peso inicial, peso final e peso dos fígados e rins de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)¹

	Peso inicial	Peso final g	Fígado g	Rim g
C (n=8)	185,63 ± 24,99	285,63 ± 16,34 ^a	10,01 ± 1,7 ^a	1,6 ± 0,21 b
CF (n=8)	187,13 ± 19,22	266,25 ± 27,15 ^{a,b}	10,49 ± 2,39 ^a	1,56 ± 0,29 b
D (n=8)	185,25 ± 25,37	216,63 ± 36,64 ^c	7,74 ± 0,96 ^b	1,94 ± 0,28 ^{a,b}
DF (n=7)	181,13 ± 26,62	231,57 ± 47,06 ^{b,c}	8,91 ± 2,55 ^b	2,04 ± 0,22 b
Ferro	NS	0,93	0,201	0,848
Diabetes	NS	0,0001	0,009	0,0148
Interação	NS	0,157	NS	0,438

¹ Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Tabela 4. Peso do baço, gordura abdominal e coração de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D), e dieta padrão, injeção de STZ e ferro carbonílico (DF)¹

	Baço g	Gordura abdominal g	Coração g
C (n=8)	0,44 ± 0,05	7,77 ± 1,46 a	0,92 ± 0,15
CF (n=8)	0,44 ± 0,1	6,31 ± 1,2 a	0,92 ± 0,13
D (n=8)	0,48 ± 0,08	0,43 ± 0,5 b	0,79 ± 0,11
DF (n=7)	0,52 ± 0,11	0,88 ± 1,13 b	1,12 ± 0,6
Ferro	0,821	0,702	0,137
Diabetes	0,479	0,301	0,872
Interação	0,273	0,099	0,124

¹ Grupos de animais que receberam dieta padrão e solução salina (C e D) ou dieta padrão e ferro carbonílico (CF e DF) e que receberam STZ (D e DF) ou tampão citrato (C e CF) por um período de 6 semanas. Os dados foram analisados por análise de

variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Análise da expressão de mRNA

As figuras 7, 8 e 9 mostram que a análise do qPCR das expressões da hepcidina, ferritina e receptor de transferrina dos fígados de ratos dos quatro grupos, respectivamente. Os níveis do mRNA da hepcidina apresentaram significativamente aumentados em 81% no grupo DF em relação ao grupo C. Nenhum dos tratamentos alterou a expressão da ferritina. As medidas do qPCR dos níveis hepáticos do mRNA do Trf-1 foram 1,25 vezes aumentadas no grupo D quando comparado ao grupo C.

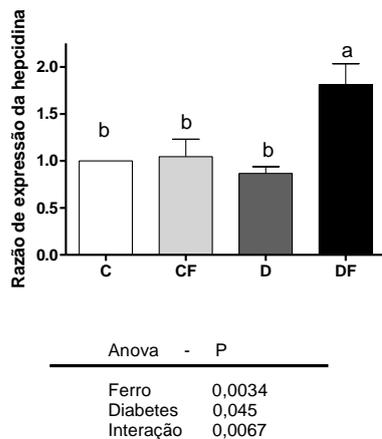
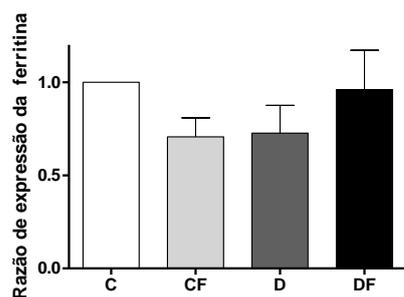


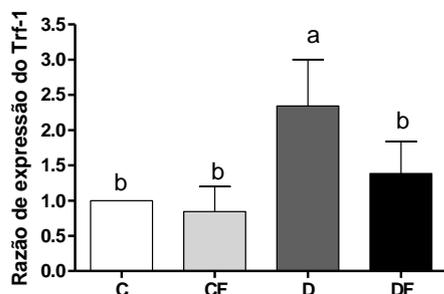
Figure 7 – Níveis relativos da expressão da hepcidina/GAPDH no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro (CF), ratos diabéticos tratados com dieta padrão (D) e ratos diabéticos tratados com dieta suplementada com ferro (DF). Os valores são média \pm desvio padrão ($n=6$). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.



Anova - P

Ferro	0,255
Diabetes	0,356
Interação	0,346

Figura 8 – Níveis relativos da expressão da ferritina/GAPDH no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro (CF), ratos diabéticos tratados com dieta padrão (D) e ratos diabéticos tratados com dieta suplementada com ferro (DF). Os valores são media \pm desvio padrão (n=6). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.



Anova - P

Ferro	0,707
Diabetes	1,00
Interação	0,000007

Figure 9 – Níveis relativos da expressão de Trf-1/GAPDH no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro (CF), ratos diabéticos tratados com dieta padrão (D) e ratos diabéticos tratados com dieta suplementada com ferro (DF). Os valores são media \pm desvio padrão (n=6). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

6 – DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO EFEITO DO DIABETES SOBRE A HOMEOSTASE DO FERRO EM RATOS:

Mudanças na homeostase do ferro têm sido consideradas um fator que contribui para o desenvolvimento do diabetes e suas complicações. Neste trabalho, estudamos a relação entre diabetes e expressão de mRNA de proteínas ligadas ao metabolismo de ferro em ratos diabéticos e suplementados com ferro. Não encontramos diferenças significativas entre as concentrações de ferro hepático total entre os grupos controle e diabéticos e também não encontramos diferenças entre os grupos controle e diabéticos ambos recebendo dieta suplementada com ferro. Entretanto, encontramos concentrações mais elevadas de ferro sérico nos animais diabéticos o que sugeriu alteração do metabolismo do metal. Sabe-se que a quantidade de ferro no plasma é determinada pela liberação regulada de ferro da maioria das células do corpo, sendo que macrófagos, enterócitos e hepatócitos têm participações particularmente importantes no processo e este efluxo celular é modulado pela hepcidina hepática (Darshan & Anderson 2009). Então nós testamos possíveis alterações da expressão desse hormônio. Embora os níveis de ferro no fígado fossem os mesmos entre ratos controle e diabéticos recebendo dieta suplementada com ferro, nossos resultados indicaram que a interação entre ferro e diabetes promoveu expressão aumentada de mRNA da hepcidina. Salientamos que não houve aumento de hepcidina nos animais controle e com dieta suplementada com ferro. Os dados do presente estudo sugerem que este mecanismo foi acionado para controlar a absorção do ferro intestinal e efluxo de ferro de vários tecidos, é mais sensível quando ocorre interação entre excesso de ferro e diabetes, possivelmente porque a expressão de hepcidina é influenciada por vários estímulos sistêmicos tais como estoque de ferro, velocidade da eritropoiese, inflamação e estresse oxidativo (Darshan & Anderson 2009). Um aumento na expressão de hepcidina pode indicar maior concentração deste hormônio na circulação, o que acarretará em maior degradação da ferroportina no enterócito, fígado e outros órgãos, diminuindo assim a concentração de ferro sérico, evitando possíveis danos oxidativos. Fernandez Real *et al.* (2009) estudaram os níveis de prohepcidina, um indicador sérico dos níveis de hepcidina, em

associação com sensibilidade à insulina e parâmetros do metabolismo de glicose e ferro. Eles relataram que a concentração de prohepcidina sérica é significativamente maior em pacientes com diabetes tipo 2 e níveis elevados de ferritina, corroborando com nossos achados para o grupo DF, mostrando que existe correlação entre diabetes, status de ferro e hepcidina.

Assim, um importante achado deste estudo é que existe uma interação entre diabetes e estoques de ferro na homeostase do metal. Nós postulamos que fatores presentes no diabetes como inflamação (van, I *et al.* 2010) e maior estresse oxidativo no diabetes (Baynes 1991a; Baynes & Thorpe 1999; Ceriello 2000) associados aos níveis de ferro modulam a expressão de hepcidina de forma distinta daquela que ocorre quando está presente somente o excesso de ferro ou somente o diabetes. De fato, nossos resultados para os dois grupos diabéticos mostraram níveis aumentados de TBARS e proteínas carboniladas, bem como atividade da catalase. Estes dados corroboram com outros da literatura para modelos de diabetes (Saxena *et al.* 1993; Young *et al.* 1995). Mas a suplementação com ferro isoladamente não alterou marcadores de estresse oxidativo e também não potencializou o estresse induzido pelo diabetes.

Além da hepcidina, receptores da transferrina têm importante papel na captação de ferro e, portanto, no controle da distribuição de ferro no organismo.

Receptor de transferrina -1 é um receptor específico e com alta afinidade à transferrina, o qual constitui um dos maiores meios pelo qual a célula internaliza o ferro. A insulina estimula o consumo celular de ferro, o qual circula ligado à transferrina. A insulina é conhecida por estimular consumo de ferro nas células adiposas e hepatócitos, redistribuindo os receptores de transferrina de compartimentos da membrana intracelular para a superfície da célula levando a uma maior síntese de ferritina nas células. (Davis *et al.* 1986; Finch 1994; Yokomori *et al.* 1991). Neste cenário poderíamos esperar que no modelo de diabetes induzido por STZ, a redução dos níveis de insulina poderia comprometer a expressão de transferrina. Paradoxalmente, observamos aumento expressão de mRNA de Tfr-1, dessa forma, esta maior expressão de mRNA do TFR-1 pode determinar a longo prazo, aumento da deposição de ferro no tecido. Este resultado corrobora com trabalhos anteriores que

mostraram um aumento nos transcritos do mRNA de TFR-1 in em rins de ratos diabéticos (Ward *et al.* 2005). Em outro estudo, um alto conteúdo de ferro e uma *up-regulation* do Trf-1 foram detectadas em miocárdio de ratos diabéticos (Zhao *et al.* 2010).

Aumento dos estoques de ferro tem sido relacionado ao desenvolvimento do diabetes tipo 2, e por outro lado depleção de ferro parece proteger (Fernandez-Real *et al.* 2002). À longo prazo, por apresentar *up-regulation* of TFR-1 no fígado, indivíduos com diabetes tipo I podem captar mais ferro sendo um possível fator que contribui para danos hepáticos envolvidos nas complicações tardias do diabetes. Cabe ressaltar que quando diabetes e suplementação com ferro estão associadas prevalece o efeito de regulação da homeostase de ferro já conhecido, ou seja, a expressão de TfR1 não é alterada, quando comparada aos controles.

Ferritina é uma molécula extremamente importante no metabolismo de ferro, ela estoca o ferro em uma forma disponível biologicamente para processos celulares enquanto protege proteínas, lipídios e DNA do potencial toxicológico desse elemento (Fleming & Bacon 2005). No fígado, a ferritina esta elevada em condições de inflamação incluindo esteatose alcoólica e não alcoólica, condições de necrose hepática e carcinoma hepático (Ramm *et al.* 2009). Sua expressão é regulada por ambos níveis transcricionais e traducionais depois da exposição crônica ao ferro. O mRNA da ferritina-H é estocado no citoplasma e é recrutado para os ribossomos quando os níveis de ferro aumentam. Nossos dados revelam que os animais dos grupos CF e DF apresentam excesso de ferro no fígado, porem os níveis de mRNA de ferritina não apresentam alterados. Também não foram observadas alterações nos níveis de mRNA da ferritina nos grupos diabéticos. Permanece a ser determinado se o aumento de ferro observado neste estudo e/ou o diabetes pode interferir a nível traducional pela regulação via IRP/IRE, pois a ativação induzida pelo ferro na ferritina é mediada pelos IREs em seu mRNA.

Os achados deste estudo forneceram informações sobre a homeostase do ferro no diabetes e em condições de diabetes e excesso de ferro. Os níveis de ferro no fígado e transportadores de ferro reagem diferentemente nestas duas condições. De acordo com nosso estudo, o diabetes aumenta o receptor de transferrina no fígado,

mas este efeito não é visto com a suplementação de ferro. Nesta condição a expressão da hepcidina é aumentada, podendo proteger contra efeitos deletérios do ferro. Assim, proteínas do metabolismo de ferro, como hepcidina e receptor de transferrina, podem ser alvos terapêuticos potenciais para o tratamento de distúrbios do metabolismo de ferro.

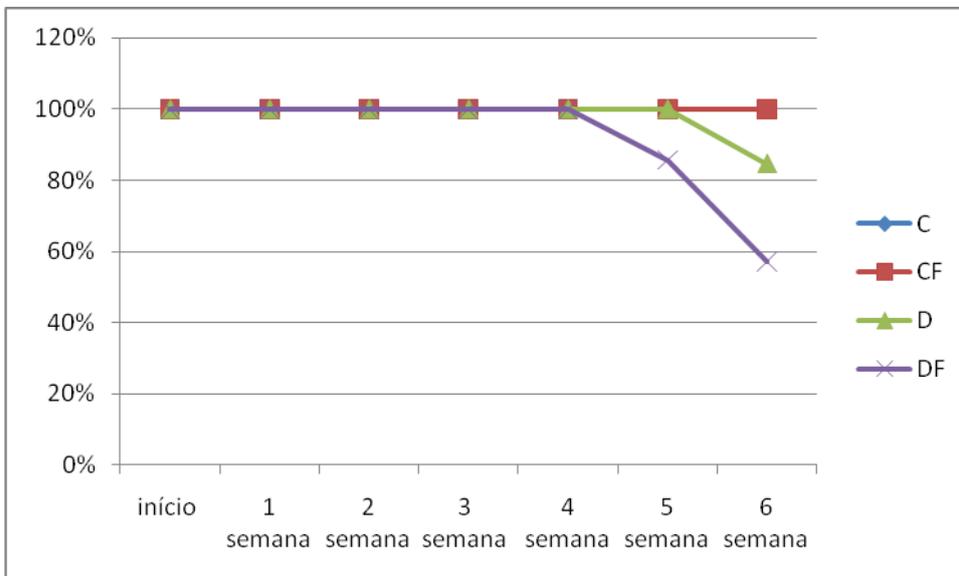
7- RESULTADOS

EXPERIMENTO 2 – Efeito do diabetes sobre a homeostase do ferro em hamster

Curva de Mortalidade

15% dos hamsteres diabéticos e 43% dos hamsteres diabéticos e suplementados com ferro morreram ao longo do experimento, como mostra a curva de mortalidade no gráfico 1.

Gráfico 1- curva de mortalidade dos hamsteres do experimento 2.



Perfil Glicêmico e Indicadores Bioquímicos da função pancreática

Como mostrado na figura 10, a concentração de glicose sérica no final do experimento mostrou 2,2 vezes aumentada no grupo D e 3,5 vezes no grupo DF em relação ao controle, assim o grupo DF apresentou os maiores valores para a concentração de glicose. A concentração de frutossamina no grupo D apresentou os maiores valores, 80% aumentado em relação ao controle, seguido os grupos DF e CF. A atividade da amilase dos hamsteres apresentou diminuída nos grupos CF, D e DF. A

atividade da lipase apresentou um aumento de 66% no grupo D em relação ao controle.

Portanto, como o esperado nosso tratamento com STZ aumentou os níveis séricos de glicose e alterou enzimas pancreáticas, o que é relatado ocorrer em um quadro diabético. O excesso de ferro, ou sua interação com a STZ, promoveu alterações importantes no perfil glicêmico e nas atividades de enzimas produzidas pelo pâncreas. E essas alterações podem acarretar em um agravamento do quadro diabético e em suas complicações.

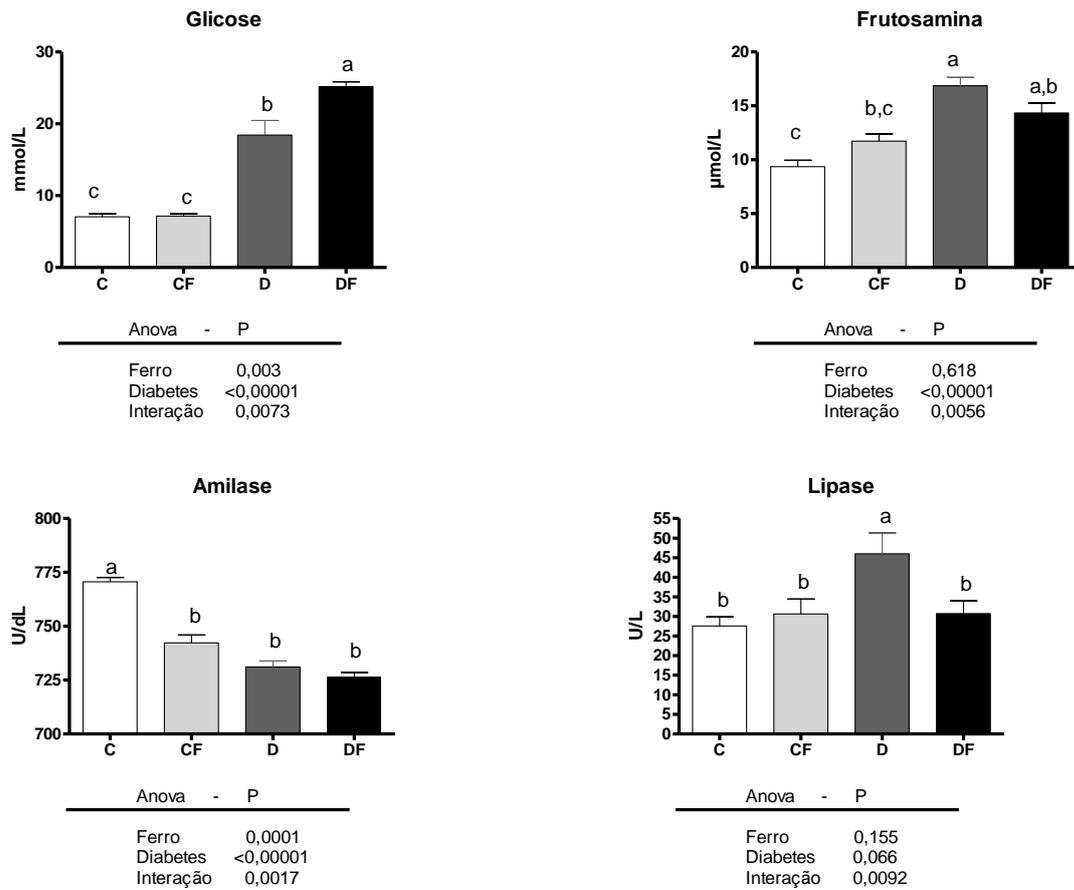


Figura 10. Níveis séricos de glicose, frutosamina e hemoglobina e atividade das enzimas amilase e lipase de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Teste de tolerância a glicose

Realizamos o teste de tolerância a glicose nos hamsteres após 7 dias da aplicação da STZ a fim de verificarmos o efeito dos tratamentos sobre o perfil glicêmico após a administração de uma dose de glicose. Observamos que antes do consumo da glicose, minuto zero, os animais do grupo D já apresentavam os níveis de glicose 3,7 vezes aumentados e o grupo DF apresentava essa concentração 7,92 vezes aumentado em relação ao controle (tabela 11). Após 30 minutos da administração do açúcar, o diabetes e o ferro aumentaram os níveis de glicose isoladamente. O mesmo perfil ocorreu com 60 minutos passados do recebimento da glicose. Porém 120 minutos após a administração, os níveis de glicose do grupo controle estavam novamente iguais aos encontrados em jejum, e novamente, como no jejum o grupo D apresentou os níveis de glicose 6,75 vezes aumentados e o grupo DF apresentou estes níveis 8,31 vezes aumentados, sendo o grupo com maiores valores. É importante ressaltar que os níveis de glicose encontrados nos hamsteres do grupo DF, no minuto zero e com 30 minutos, foram todos maiores que 33,36mmol/L, porém o aparelho utilizado para a leitura desses níveis não consegue detectar uma leitura maior que esta. Sendo assim as diferenças encontradas deste grupo em relação aos outros grupos podem ser maiores que as mostradas.

Portanto, observamos que além do tratamento com a STZ, o ferro aumenta os níveis de glicose dos animais seja em jejum ou após a ingestão de glicose. Comprovando assim que o ferro pode causar danos maiores que os vistos quando apenas um quadro diabético está presente.

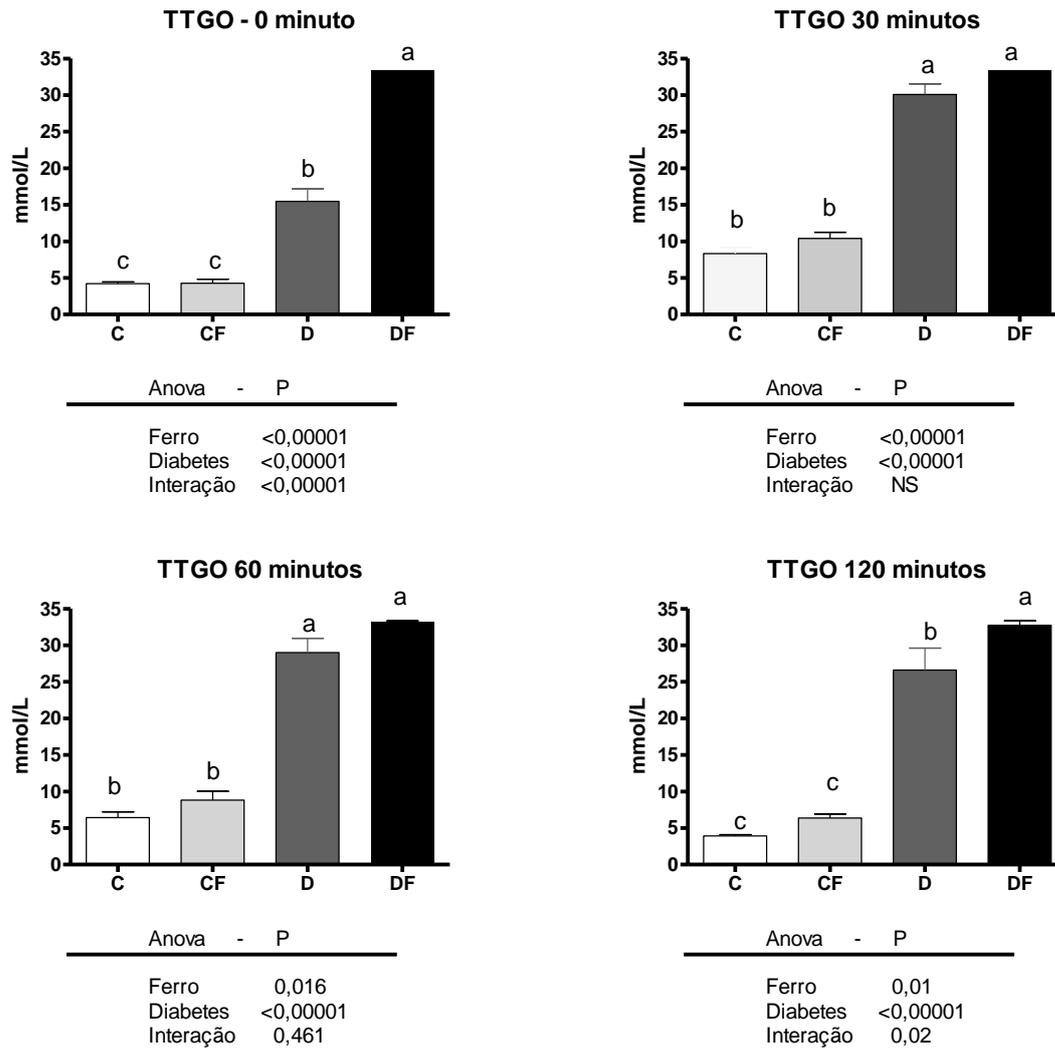


Figura 11. Teste de tolerância oral a glicose (TTGO) de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Homeostase de Ferro

Ao analisarmos os dados de concentração de ferro sérico percebemos que o grupo CF apresentou os maiores valores, 2 vezes aumentado. O grupo D apresentou estes níveis 44% aumentados. Porém o grupo DF apresentou valores estatisticamente iguais ao grupo C (figura 12). O grupo CF apresentou os menores valores para CLLF, 41% diminuído em relação ao controle. Já para CTLF verificamos que os grupos CF e D apresentaram os maiores valores. O índice de saturação de transferrina foi aumentado no grupo CF 42% em relação ao grupo C. O tratamento com ferro carbonílico aumentou os estoques de ferro no fígado, mostrando que nosso tratamento foi eficaz em produzir uma sobrecarga de ferro. O grupo CF apresentou estes valores 6,3 vezes aumentados e o grupo DF apresentou um aumento de 4,47 vezes, sendo considerado menor que o grupo CF. A concentração de hemoglobina não foi influenciada por nenhum dos tratamentos.

Em resumo, nos animais controles, o excesso de ferro promoveu um aumento da concentração de ferro sérico e no fígado, uma diminuição da CLLF e um aumento da saturação da transferrina. Porém a interação das duas variáveis diminuiu a concentração de ferro sérico, no fígado e a saturação de transferrina, mostrando que um quadro diabético foi capaz de alterar a homeostase do ferro.

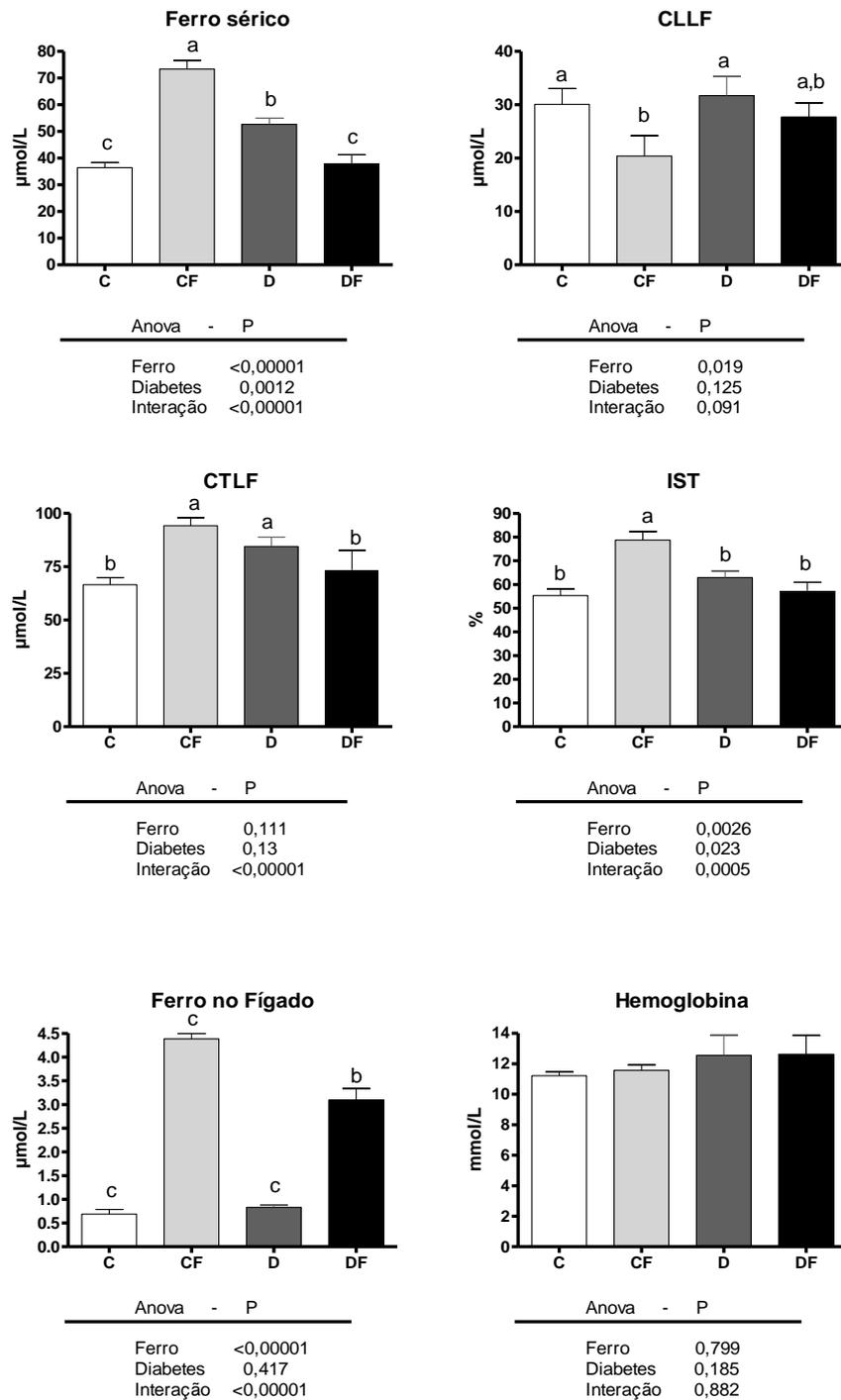


Figura 12 - Níveis séricos de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação ao ferro (CTLF), índice de saturação de transferrina e concentração de ferro no fígado de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre

os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Enzimas e metabólitos séricos

Para a atividade de ALT os hamsteres do grupo D apresentaram valores 2,58 vezes maiores que o grupo C (figura 13). Para a atividade de AST, os animais do grupo DF apresentaram os maiores valores, seguido do grupo CF. A concentração de albumina não foi alterada por nenhuma das variáveis estudadas. A concentração de proteína sérica total apresentou diminuída nos hamsteres dos grupos D e DF. Ao analisarmos os níveis de creatinina sérica observamos que o grupo DF apresentou os maiores níveis, 2,02 vezes aumentado em relação ao controle.

Com base nesses resultados, concluímos que o diabetes e o excesso de ferro promoveram alterações no fígado, isoladamente. E a concentração de creatinina só foi aumentada quando os dois tratamentos foram associados.

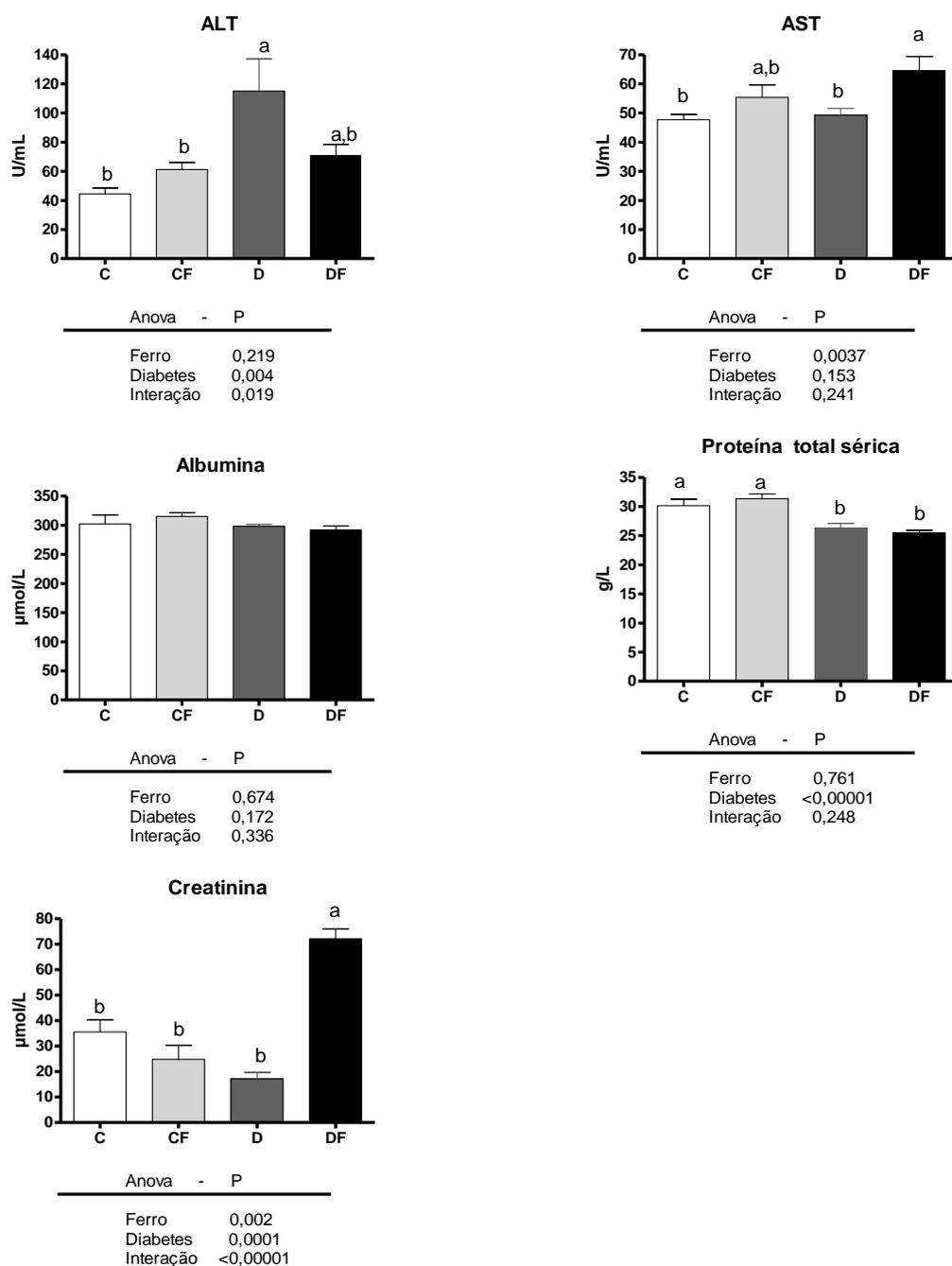


Figura 13 - Atividade das transaminases pirúvica e oxalacéticas (ALT e AST) e níveis séricos de albumina, proteínas totais e creatinina de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Defesas Antioxidantes

A concentração de glutathiona total no fígado foi diminuída no grupo D 14%, como mostrado na figura 14. A atividade da superóxido desmutase apresentou maior valor no grupo CF e menor valor no grupo DF. A atividade da catalase no fígado mostrou que o diabetes promoveu uma diminuição de 33% no grupo D em relação ao controle, porém o grupo DF apresentou valores iguais aos encontrados para o grupo C. A atividade da catalase em homogenatos de rins revelou os maiores valores nos grupos CF e DF e menor valor no grupo D, porém não há diferença significativa entre os grupos comparados ao C. A concentração de grupos sulfidrilas totais séricos foi aumentada em 15% no grupo CF.

Contudo, verificamos que no diabetes ocorre redução no status antioxidante, verificado pela concentração de glutathiona no fígado, atividade da superóxido desmutase sérica e catalase no fígado e rins. Porém para atividade da catalase no fígado, a associação diabetes e ferro fez com que essa atividade retornasse a valores iguais aos do grupo controle. Em alguns parâmetros, o excesso de ferro aumentou o status antioxidantes, como na atividade de superóxido dismutase, atividade de catalase nos rins e sulfidrilas totais.

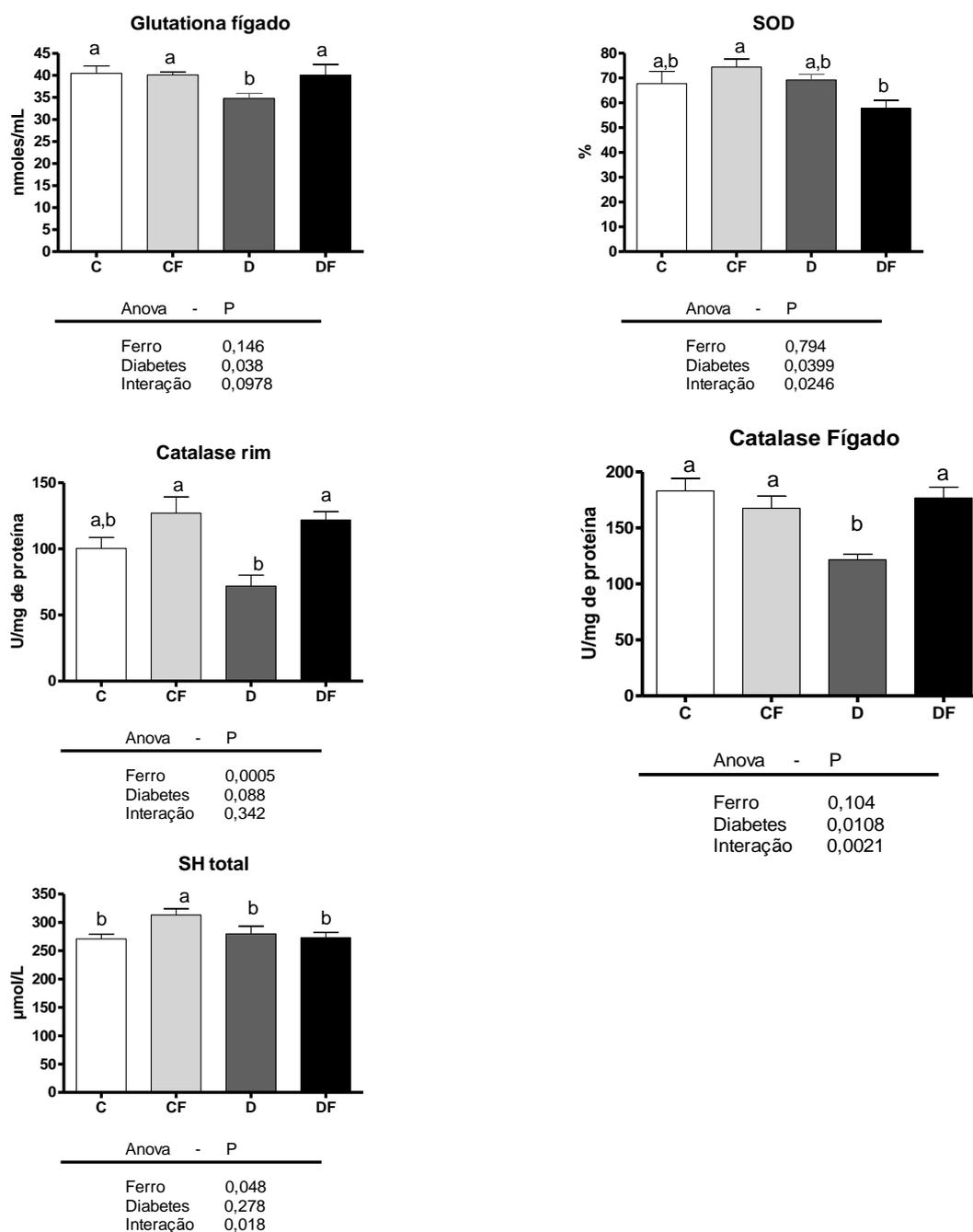


Figura 14. Níveis de glutathiona no fígado, atividade de superóxido dismutase sérica, atividade da catalase no fígado e rins e níveis de sulfidrilas totais no soro de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Produtos do estresse oxidativo

A concentração de proteína carbonilada no fígado apresentou aumentada no grupo D, mas a interação com o ferro reverteu este aumento. A concentração de proteínas carboniladas nos rins foi aumentada 84% no grupo D (figura 15). A análise dos dados de TBARS no fígado revelou que os animais com excesso de ferro apresentaram esse nível aumentado, revelando 3 vezes aumentado no grupo CF e 6,88 vezes aumentado no grupo DF, sendo este o grupo com as maiores concentrações. Os níveis de TBARS nos rins foram aumentados 2,4 vezes no grupo CF. Porém o grupo DF não apresentou diferenças em relação ao grupo controle. Para a concentração de TBARS no pâncreas percebemos que o grupo DF apresentou concentração de TBARS 4,3 vezes maior.

Como mostram nossos dados, verificamos que os hamsteres diabéticos apresentaram nível de proteínas carboniladas nos rins e fígado aumentado. Porém a interação com o excesso de ferro reverteu esse efeito. Os níveis de TBARS no fígado e pâncreas foram alterados pelo excesso de ferro e a interação com o diabetes potencializou esse aumento.

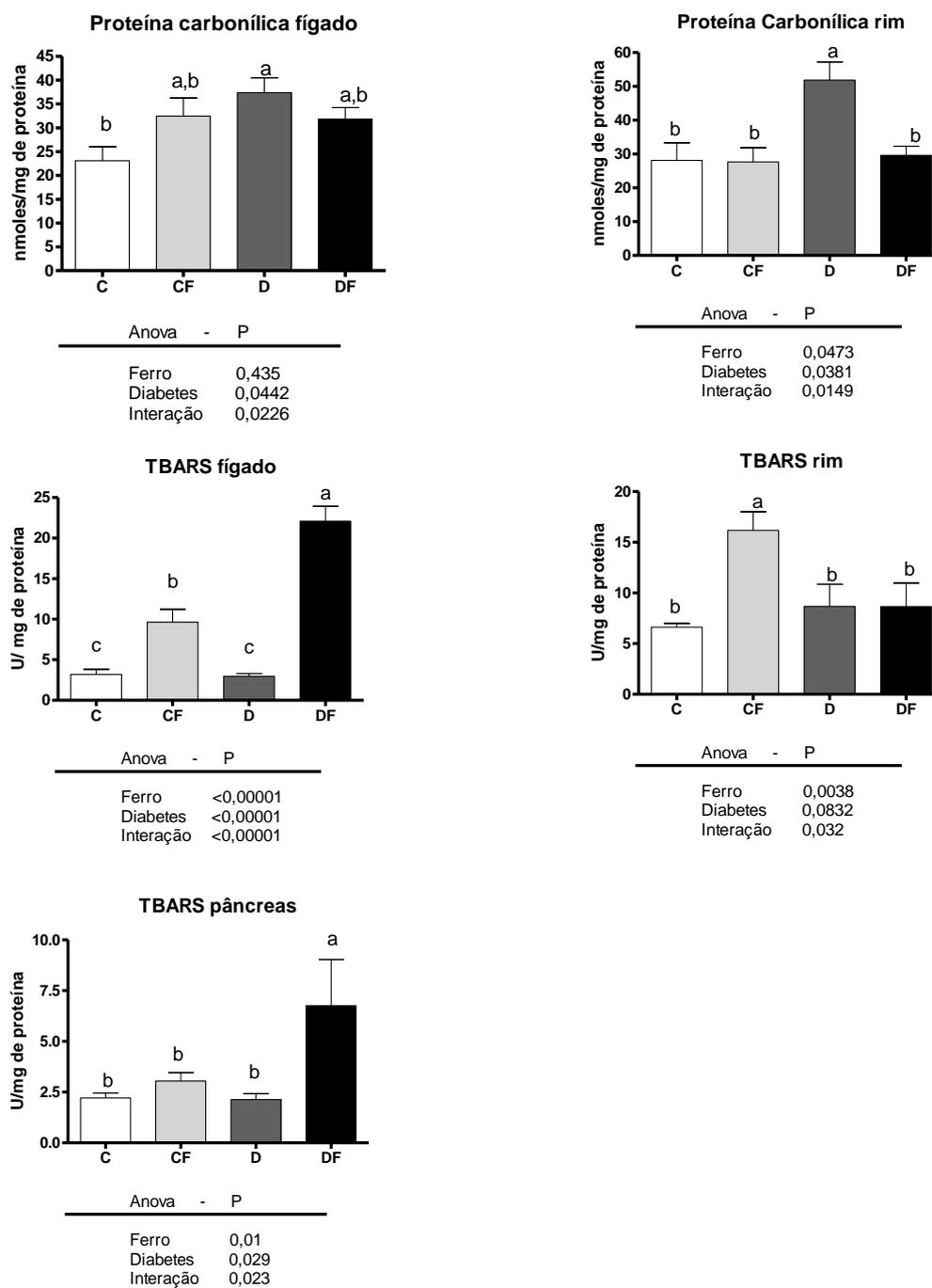


Figura 15. Níveis de proteínas carboniladas no fígado e rim e concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado, rins e pâncreas de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Perfil lipídico

Verificamos o efeito do diabetes e o excesso de ferro sobre o perfil lipídico em hamsteres. A concentração de triacilgliceróis séricos apresentou maiores valores no grupo DF e menores nos grupo D e CF, porém não há diferença significativa entre os grupos comparados ao controle (figura 16). O grupo DF apresentou diminuição de 36% na concentração de colesterol sérico, o que não foi observado quando um dos tratamentos foi usado isoladamente. A análise dos dados de concentração de colesterol HDL revelou nos animais dos grupos D e DF com os menores valores. A concentração das outras frações do colesterol apresentou 39% aumentada no grupo D, seguido do grupo CF. As atividades de PON fenilacetato e paraoxon não foram alteradas por nenhum tratamento.

Assim, verificamos que a interação das duas variáveis promoveu modificações no perfil lipídico que não eram observadas quando somente um tratamento foi administrado.

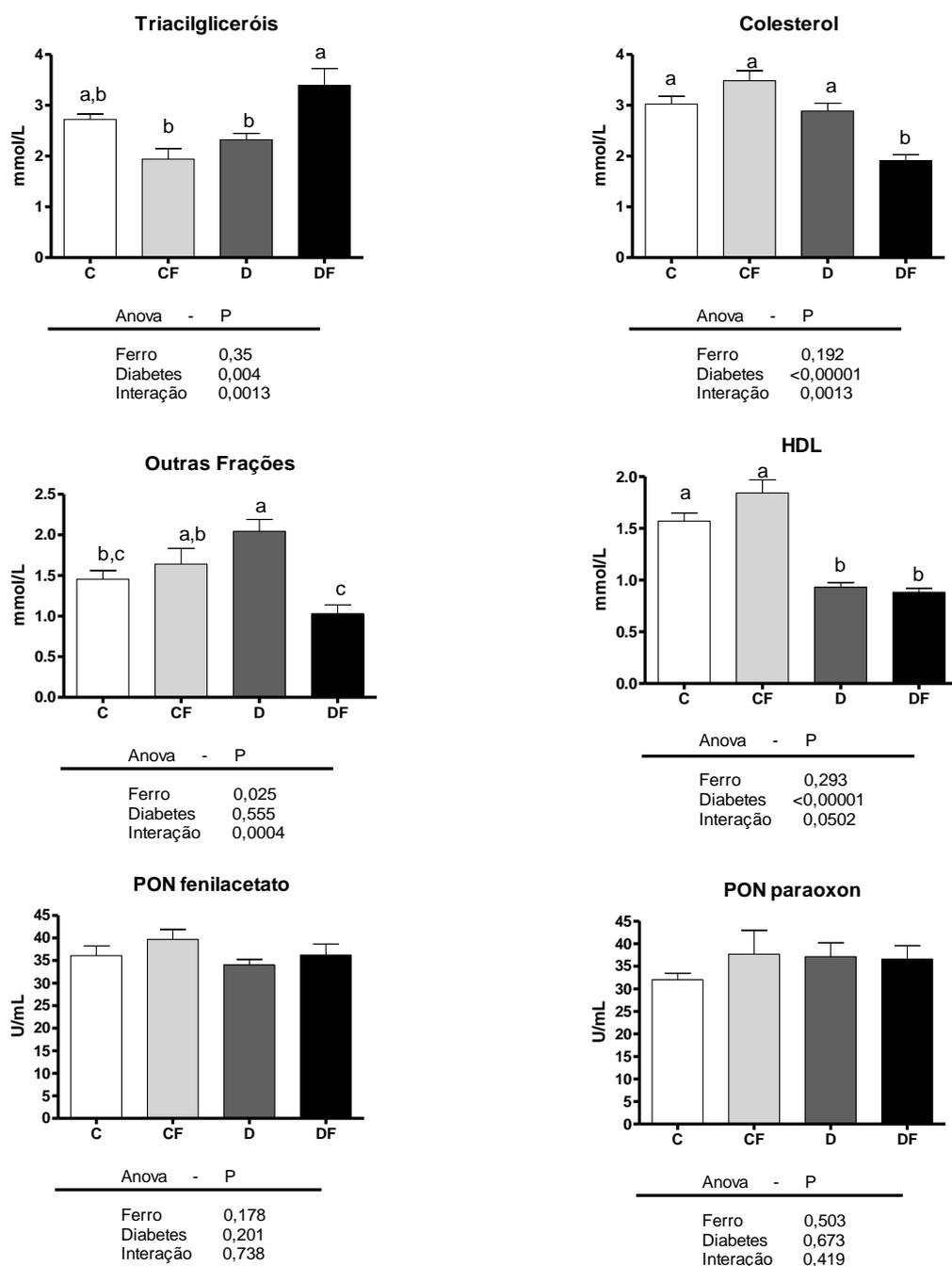


Figura 16. Níveis séricos de triacilgliceróis e colesterol total e suas frações e atividade de paraoxonase de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF). Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou $P < 0,05$ o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Peso corporal e dos órgãos

O peso final foi diminuído 13% nos hamsteres do grupo D e 20% no grupo DF (tabela 5). O peso no fígado foi diminuído pelo diabetes e não sofreu influência do excesso de ferro. Já o peso dos rins dos hamsteres do grupo DF foram os que apresentaram os menores valores.

Concluimos então que o diabetes diminuiu o peso corporal e do fígado dos hamsteres. Porém aumentou o peso dos rins e este aumento foi potencializado com a interação com o excesso de ferro. Podendo indicar danos maiores ocorridos nos rins pela interação dos dois fatores.

Tabela 5. Peso inicial, final e dos fígados e rins de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e ferro carbonílico (CF), dieta padrão e injeção de STZ (D) e dieta padrão, ferro carbonílico e injeção de STZ (DF)¹

	Peso inicial	Peso final g	Fígado g	Rim g
C	119,5 ± 15,19	130,88 ± 12,99a,b	4,36 ± 0,36 a	1,08 ± 0,13 b
CF	117,89 ± 22,23	136,11 ± 14,25a	4,91 ± 0,69 a	1,04 ± 0,23 b
D	119,92 ± 18,25	113,55 ± 17,92b,c	3,61 ± 0,62 b	1,24 ± 0,16 b
DF	118,86 ± 16,18	105,13 ± 14,08c	3,49 ± 0,43 b	1,54 ± 0,17 a
Ferro	NS	0,893	0,09	0,1
Diabetes	NS	0,00005	<0,00001	<0,00001
Interação	NS	0,17	0,221	0,0029

¹ Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando um dos fatores apresentou P<0,05 o teste de variância univariada com pós teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes significam diferença significativa pelo pós-teste de Tukey, p<0,05.

Análise da expressão de RNAm

Como mostrado na figura 17, analisamos a expressão de PPAR- α no fígado de hamsteres diabéticos e com excesso de ferro por qPCR. Os níveis de mRNA de PPAR- α foram significativamente diminuídos no grupo D, 85% em relação ao grupo C. Porém o excesso de ferro (grupos CF e DF) não alterou a expressão do mRNA do PPAR- α .

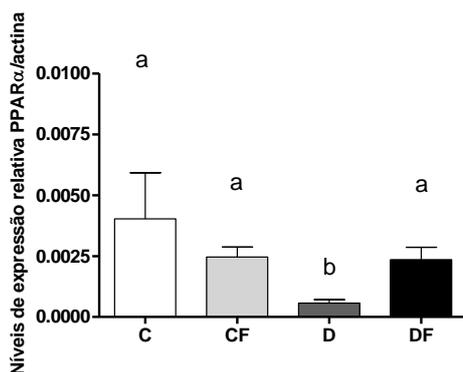


Figura 17 – Níveis de expressão relativa PPAR- α / β -actina no fígado de hamsteres que foram alimentados com dieta padrão (C), dieta suplementada com ferro carbonílico (CF), diabetes (D) e Diabetes suplementado com ferro carbonílico (DF). Valores são média \pm desvio padrão (n=4). Dados foram analisados por teste de kruskal Wallis. Diferenças estatísticas são demonstradas por diferentes letras sobrescritas.

Análise histológica

As avaliações histológicas apontaram quadro hepático geral, nos animais C, compatível com a normalidade, entretanto, algumas hepatócitos apresentavam-se baloniformes, de citoplasma amplo e claro (figura 18a), indicando processo degenerativo hidrópico, que se associados a processos inflamatórios com predominância de células mononucleares, principalmente macrófagos, e estoques teciduais de ferro compatíveis com a normalidade. Animais do grupo CF apresentaram presença moderada de células hepáticas baloniformes, difusas por todo o parênquima tecidual, associadas á focos inflamatórios granulomatosos e a estoques teciduais de

ferro localizados principalmente nos hepatócitos e células de Kupffer (figuras 18c e 18e).

A presença de inúmeras células hepáticas apresentando múltiplas vesículas intracitoplasmáticas, de imagem negativa à coloração de HE, indicativo morfológico da esteatose multilocular foi a lesão fundamental encontrada em animais dos grupos D e DF. No grupo D a esteatose se mostrou de caráter leve, localizada nas regiões porta-hepáticas (figura 18b) e associada à presença de pequenos focos inflamatórios sem presença de estoques teciduais de ferro. Nos animais DF a esteatose apresentou caráter leve, difusa por todas as regiões do órgão e associada a pequenos focos inflamatórios e a estoques teciduais de ferro (figuras 18d e 18f).

A porcentagem total de área pancreática ocupada pelas ilhotas foi de 8,23% para o grupo C e 10,24% para o grupo CF, significativamente maior que a porcentagem da área ocupada pelas ilhotas pancreáticas de 2,98% nos animais D e 4,82% os animais DF (figura 19). As avaliações histológicas não evidenciaram alterações no perfil celular em nenhuma das regiões pancreáticas, bem como a ausência de estoques teciduais de ferro em todos os grupos avaliados.

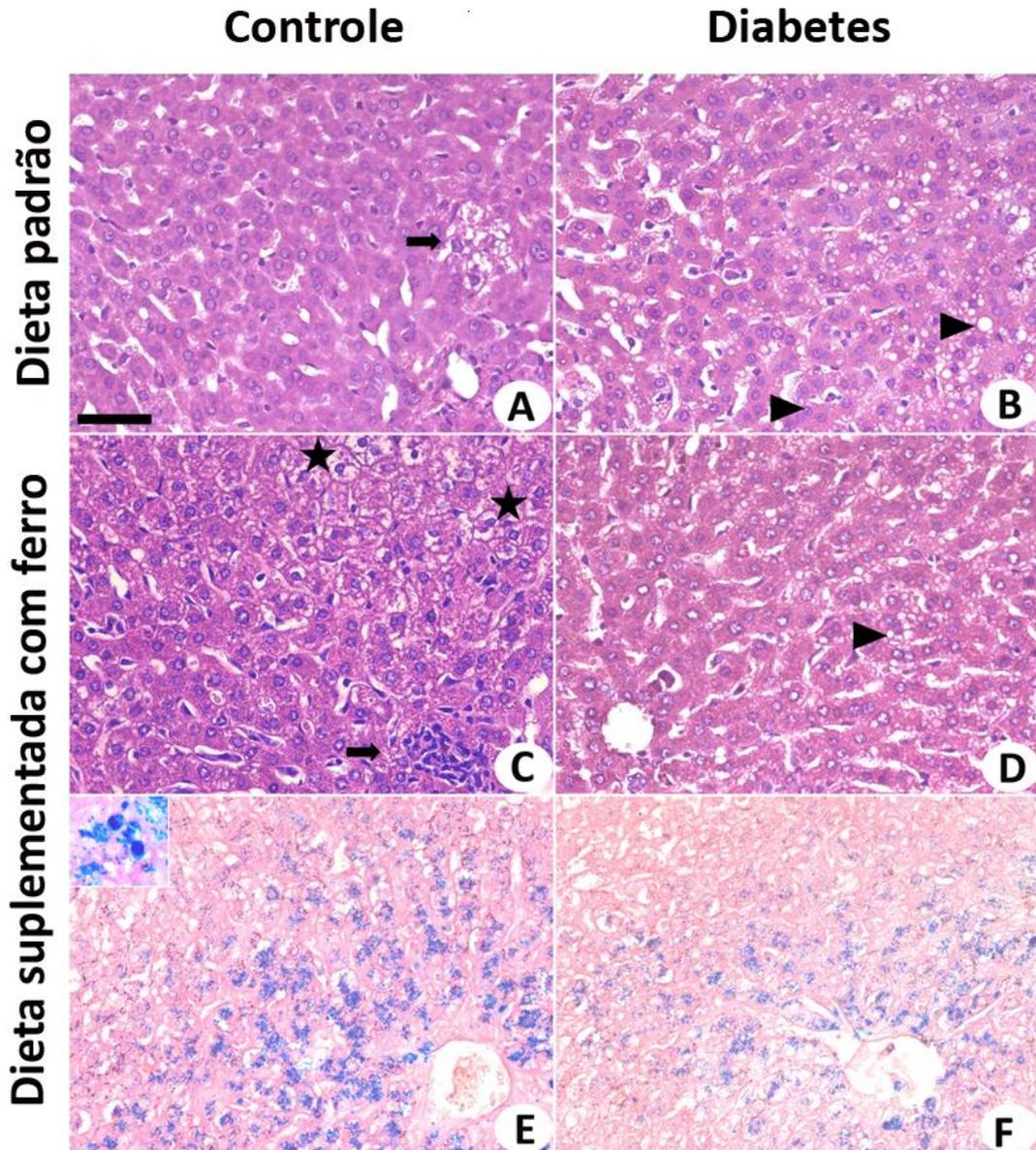


Figura 18 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado. (A) Grupo Controle mostrou aspecto histológico normal com números pequenos de células em processo degenerativos (seta). (B) Grupo Diabético apresentando citoplasma microvesicular indicativo de processo de esteatose (cabeça de seta). (C) Grupo controle que recebeu dieta suplementada com ferro (grupo CF) apresentando células com aspecto baloniforme (estrela) sugestivo de processo de degeneração hídrica com inflamação granulomatosa focal (seta). (D) Grupo Diabético que recebeu dieta suplementada com ferro mostrou histologia similar ao grupo D. Cabeças de seta indicam células com citoplasma microvesicular. (E) Grupo Controle que recebeu dieta suplementada com ferro e (F) grupo diabético que recebeu dieta suplementada com ferro, mostrando aspecto dos depósitos de ferro nos hepatócitos. No inserto mostra estoques de ferro no citoplasma dos hepatócitos (cabeça de seta) e células de kupffer (estrela) em magnitude de 1100. A, B, C, D – Hematoxilina & eosina. E e F – coloração de Perls. Barra= 50µM.

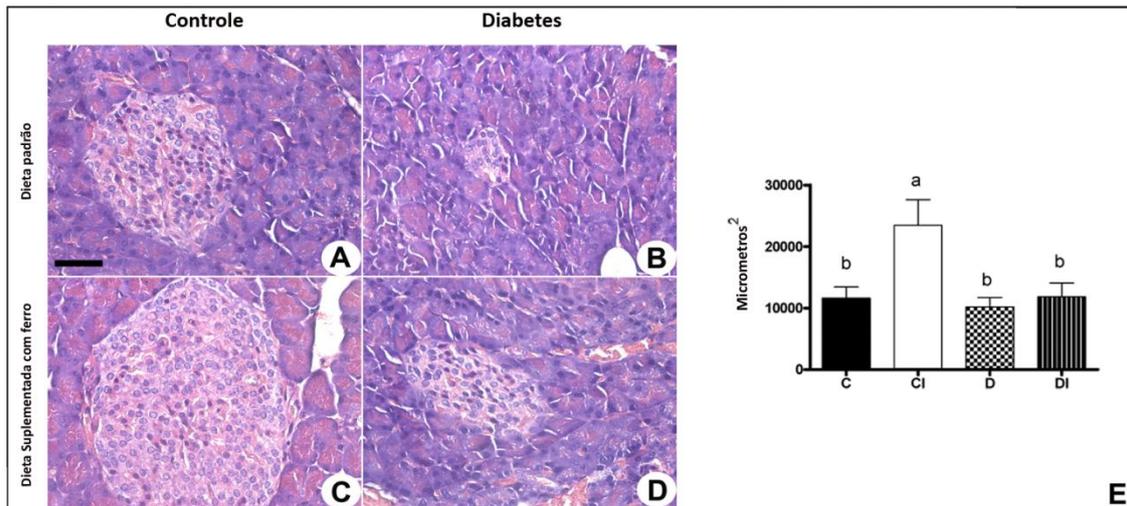


Figura 19 - **Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas.** (A) Grupo Controle. (B) Grupo Diabético. Notar diminuição do tamanho das ilhotas pancreáticas quando comparado ao Grupo Controle. (C) Grupo Controle com dieta suplementada com ferro apresentando aumento significativo das ilhotas pancreáticas comparado aos demais grupos. (D) Grupo Diabético com dieta suplementada com ferro. Notar ilhota pancreática de tamanho reduzido em relação aos grupos de animais controle. Hematoxilina & Eosina. Barra = 50 μ M. Figura E - Tamanho médio das ilhotas pancreáticas de hamsteres. Os valores são média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram analisados por análise de variância biraviada. Diferenças estatísticas são mostradas por letras superescritas.

8 - DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO EFEITO DO DIABETES SOBRE A HOMEOSTASE DO FERRO EM HAMSTER:

Nossos dados de perfil glicêmico e lipídico, além do aspecto histológico do pâncreas, mostraram uma interação entre ferro e diabetes. Estes dados corroboram com estudos epidemiológicos que mostram correlação entre estoques aumentados de ferro e diabetes. Por outro lado, o aspecto histológico do fígado do grupo DF seguiu o mesmo perfil que o grupo D e os níveis de antioxidantes no fígado foram aumentados em relação ao grupo diabético. Nossos resultados mostraram uma vulnerabilidade diferente de cada tecido à interação ferro diabetes.

Danos provocados por estresse oxidativo são determinados não somente pela geração de radicais livres, mas também pelo estado antioxidante da célula. Isto porque órgãos diferentes exibem diferenças consideráveis em suas susceptibilidades ao dano citotóxico. Lenzen *et al* (1996) mostraram que ilhotas pancreáticas apresentam níveis baixos de expressão gênica de todos os genes de enzimas antioxidantes quando comparadas ao fígado. Assim nos parece que a reversão do aumento da expressão de PPAR α e o estresse oxidativo diminuído podem ter tido um importante papel na integridade hepática. Nossos dados histológicos indicam que nosso modelo de suplementação de ferro causou menos dano ao fígado, por também não apresentar nenhuma fibrose, o que sugere preservação das funções metabólicas, suportado pelas concentrações de proteínas e albumina.

Este estudo encontramos expressão diferenciada no mRNA de PPAR alfa no fígado de hamsteres diabéticos e diabéticos suplementados com ferro. O PPAR α foi expresso em níveis menores em animais diabéticos. Estudos anteriores mostraram que a expressão de PPAR-alfa pode ser regulada pelo diabetes. Marcell *et al.* (2006) mostraram que o estresse oxidativo diminui a expressão de PPAR α em macrófagos de animais diabéticos. Além disso, Wang *et al.* (2008) investigaram a expressão de PPAR α na aorta, córtex renal e retina de animais diabéticos e encontraram expressão diminuída em todos os tecidos estudados. Li *et al.* (2009) trabalharam com hamsteres com diabetes tipo 2 e verificaram expressão diminuída de mRNA de PPAR α no fígado. Tem-se sugerido que estresse oxidativo aumentado durante o diabetes pode contribuir

para uma diminuição da expressão do PPAR α em miócitos atriais em vitro (Lee *et al.* 2009) e em vivo (Lee *et al.* 2010). Neste trabalho, o diabetes aumentou significativamente o estresse oxidativo como sugere os dados para os níveis de proteínas carboniladas, a diminuição da concentração da glutathiona e a atividade de catalase, e o stress oxidativo é atenuado em hamsteres diabéticos tratados com ferro. A efetividade do ferro em atenuar o estresse oxidativo pode ser devido a indução de genes alvos do NF-E2-related factor 2 (Nrf2). Esta ativação induz a produção de compostos e enzimas antioxidantes (Dringen *et al.* 2005; McCord & Edeas 2005). Tanaka *et al.* (2008) demonstraram que a nefrotoxicidade produzida pelo ferro nitrilotriacetato (FeNTA) era evitada pela indução de genes alvos do Nrf2. Nossos dados relacionados às defesas antioxidantes sugerem que a interação entre ferro e diabetes altera o status redox, o que pode contribuir para reverter a expressão de PPAR α a níveis iguais ao controle.

Expressões reduzidas de PPAR α são associadas com acúmulo de lipídios (Chinetti-Gbaguidi *et al.* 2005). Concentrações aumentadas de triacilgliceróis e níveis reduzidos de HDL são características de dislipidemia no diabetes (Syvanne & Taskinen 1997). Estudos prévios mostram que o excesso de ferro pode aumentar as concentrações de triacilgliceróis séricos (Silva *et al.* 2008a). Embora níveis aumentados de LDL colesterol e triacilgliceróis sejam comuns em dislipidemia diabética, nós não observamos estas mudanças em nosso modelo experimental, talvez devido o fato do diabetes induzido pelo STZ reduzir a secreção de insulina (Elsner *et al.* 2000a). Quando o ferro foi associado ao diabetes, os níveis de colesterol diminuíram e os de triacilgliceróis aumentaram em relação ao grupo controle. Nossos dados sugerem que as alterações na homeostase de lipídios no grupo DF são independentes da expressão de PPAR α , porque os níveis desse mRNA são comparáveis ao grupo C e mais altos que o grupo D. Isto é possível devido a forte influência da deficiência de insulina. A HMG-CoA redutase, a enzima chave no metabolismo de síntese de colesterol, tem sua atividade regulada pela insulina, então níveis baixos deste hormônio acarretam uma menor síntese de colesterol. A atividade diminuída da lipoproteína lipase pode contribuir para níveis aumentados de triacilgliceróis na circulação porque esta enzima é atenuada e degradada na privação de insulina. Outra possível explicação para os

níveis de lipídeos séricos aumentados e a expressão do mRNA do PPAR alfa não modificada nos animais do grupo DF, pode ser também devido a atividade do PPAR estar diminuída por menor capacidade de ligação no elemento responsivo do DNA ou menor expressão de sua proteína na membrana nuclear. Isso refletiria uma desregulação no metabolismo de lipídeos, porém não seria detectada realizando apenas a expressão do mRNA do PPAR.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a suplementação de ferro no diabetes aumenta a concentração de glicose. A interação do ferro com o diabetes promove efeitos diferentes no fígado e pâncreas, possivelmente porque a susceptibilidade destes tecidos ao estresse oxidativo é diferente. Além disso, mostramos pela primeira vez que o PPAR alfa tem sua expressão reduzida em fígado de hamsteres diabéticos, mas a expressão permanece igual ao controle nos ratos diabéticos suplementados com ferro.

9 – CONCLUSÃO GERAL

Nossos resultados indicam que em ratos, o diabetes promove alterações na homeostase de ferro. Concentrações mais elevadas de ferro sérico no grupo diabético e maior expressão do mRNA hepático do receptor de transferrina foram observadas no grupo diabético. Entretanto, quando avaliamos a expressão do mRNA da hepcidina, só foi observado aumento da expressão decorrentes da interação dos dois fatores, isto é, ferro e diabetes. Estes dados sugerem que este mecanismo acionado para controlar a absorção do ferro intestinal e efluxo de ferro de vários tecidos, é mais sensível quando ocorre interação entre excesso de ferro e diabetes, possivelmente porque a expressão de hepcidina é influenciada por vários estímulos sistêmicos tais como estoques de ferro, inflamação e estresse oxidativo, estímulos estes possivelmente mais presentes no grupo DF do que nos grupos CF e D. Em ratos os níveis glicêmicos não foram afetados pela suplementação com ferro carbonílico.

Em hamsteres um aumento dos níveis glicêmicos no diabetes foi causado pela suplementação com ferro, além do efeito do diabetes na homeostase do ferro. Sugerindo que este modelo é mais sensível para demonstrar a relação bidirecional entre o metabolismo de glicose e ferro. Os resultados mostraram efeitos diferentes causados pela interação dos dois fatores no fígado e pâncreas. O aspecto histológico do fígado do grupo DF seguiu o mesmo perfil que o grupo D e os níveis de antioxidantes no fígado foram aumentados em relação ao grupo D. Para o pâncreas ilhotas menores foram observadas nos grupos D e DF, curiosamente o grupo CF apresentou aumento significativo das ilhotas pancreáticas comparado aos demais grupos. Nossos resultados mostraram uma vulnerabilidade diferente de cada tecido à interação ferro diabetes, possivelmente porque a susceptibilidade destes tecidos ao excesso de ferro e conseqüentemente ao estresse oxidativo é diferente. Analisamos também que a diminuição da expressão do mRNA do gene para PPAR alfa provocado pelo diabetes, foi revertido quando associado ao excesso de ferro.

Em conjunto nossos dados sugerem que algumas vezes o ferro promove estresse intermediário e fortifica as defesas antioxidantes, tornando células tolerantes

ou adaptadas num fenómeno conhecido como hormesis. Outras vezes promove stress intenso promovendo injuria celular e agravamento da patologia .

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121-6.
- Aisen P. 2004. Transferrin receptor 1. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **36**, 2137-43.
- Aragno M., Tamagno E., Gatto V., Brignardello E., Parola S., Danni O. & Boccuzzi G. 1999a. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* **26**, 1467-74.
- Aragno M., Tamagno E., Gatto V., Brignardello E., Parola S., Danni O. & Boccuzzi G. 1999b. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* **26**, 1467-74.
- Arruda S. F., Siqueira E. M. & de Valencia F. F. 2009. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition* **25**, 472-8.
- Barbieri M., Ragno E., Benvenuti E., Zito G. A., Corsi A., Ferrucci L. & Paolisso G. 2001. New aspects of the insulin resistance syndrome: impact on haematological parameters. *Diabetologia* **44**, 1232-7.
- Barbosa N. B., Rocha J. B., Soares J. C., Wondracek D. C., Goncalves J. F., Schetinger M. R. & Nogueira C. W. 2008. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem.Toxicol.* **46**, 186-94.
- Baynes J. W. 1991b. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-12.
- Baynes J. W. 1991a. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-12.
- Baynes J. W. & Thorpe S. R. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**, 1-9.
- Bekri S., Gual P., Anty R., Luciani N., Dahman M., Ramesh B., Iannelli A., Staccini-Myx A., Casanova D., Ben A., I, Saint-Paul M. C., Huet P. M., Sadoul J. L., Gugenheim J., Srai S. K., Tran A. & Le Marchand-Brustel Y. 2006. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* **131**, 788-96.
- Beltowski J., Wojcicka G. & Jamroz A. 2002. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol.J.Pharmacol.* **54**, 661-71.
- Bertelsen M., Anggard E. E. & Carrier M. J. 2001. Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetologia* **44**, 605-13.

- Bonefeld B. E., Elfving B. & Wegener G. 2008. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* **62**, 302-9.
- Breuer W., Hershko C. & Cabantchik Z. I. 2000. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus.Sci.* **23**, 185-92.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-20.
- Buege J. A. & Aust S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**, 302-10.
- Calkin A. C., Giunti S., Jandeleit-Dahm K. A., Allen T. J., Cooper M. E. & Thomas M. C. 2006. PPAR-alpha and -gamma agonists attenuate diabetic kidney disease in the apolipoprotein E knockout mouse. *Nephrol.Dial.Transplant.* **21**, 2399-405.
- Ceriello A. 2000. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* **49**, 27-9.
- Ceriello A., Morocutti A., Mercuri F., Quagliaro L., Moro M., Damante G. & Viberti G. C. 2000. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* **49**, 2170-7.
- Chen W., Esselman W. J., Jump D. B. & Busik J. V. 2005. Anti-inflammatory effect of docosahexaenoic acid on cytokine-induced adhesion molecule expression in human retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* **46**, 4342-7.
- Chinetti-Gbaguidi G., Fruchart J. C. & Staels B. 2005. Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. *Curr.Opin.Pharmacol.* **5**, 177-83.
- Clairmont K. B. & Czech M. P. 1990. Insulin injection increases the levels of serum receptors for transferrin and insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate in intact rats. *Endocrinology* **127**, 1568-73.
- Cornejo P., Fernandez V., Vial M. T. & Videla L. A. 2007. Hepatoprotective role of nitric oxide in an experimental model of chronic iron overload. *Nitric.Oxide.* **16**, 143-9.
- Crawford R. D. 1995. Proposed role for a combination of citric acid and ascorbic acid in the production of dietary iron overload: a fundamental cause of disease. *Biochem.Mol.Med.* **54**, 1-11.
- Cumaoglu A., Cevik C., Rackova L., Ari N. & Karasu C. 2007. Effects of antioxidant stobadine on protein carbonylation, advanced oxidation protein products and reductive capacity of liver in streptozotocin-diabetic rats: role of oxidative/nitrosative stress. *Biofactors* **30**, 171-8.
- Dabbagh A. J., Mannion T., Lynch S. M. & Frei B. 1994. The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem.J.* **300 (Pt 3)**, 799-803.

- Darshan D. & Anderson G. J. 2009. Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* **22**, 77-87.
- Davis R. J., Corvera S. & Czech M. P. 1986. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **261**, 8708-11.
- Dominguez C., Ruiz E., Gussinye M. & Carrascosa A. 1998. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* **21**, 1736-42.
- Dringen R., Pawlowski P. G. & Hirrlinger J. 2005. Peroxide detoxification by brain cells. *J.Neurosci.Res.* **79**, 157-65.
- Du Y., Miller C. M. & Kern T. S. 2003. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic.Biol.Med.* **35**, 1491-9.
- Duan R. D., Cheng Y. & Erlanson-Albertsson C. 1992. Effect of emeriamine on exocrine and endocrine pancreatic function in normal and diabetic rats. *Scand.J.Clin.Lab Invest* **52**, 579-84.
- Duan R. D., Poensgen J., Wicker C., Westrom B. & Erlanson-Albertsson C. 1989. Increase in pancreatic lipase and trypsin activity and their mRNA levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Dig.Dis.Sci.* **34**, 1243-8.
- Dunford H. B. 1987. Free radicals in iron-containing systems. *Free Radic.Biol.Med.* **3**, 405-21.
- Ebara T., Hirano T., Mamo J. C., Sakamaki R., Furukawa S., Nagano S. & Takahashi T. 1994. Hyperlipidemia in streptozocin-diabetic hamsters as a model for human insulin-deficient diabetes: comparison to streptozocin-diabetic rats. *Metabolism* **43**, 299-305.
- Eckerson H. W., Wyte C. M. & La Du B. N. 1983. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am.J.Hum.Genet.* **35**, 1126-38.
- Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R. & Lenzen S. 2000a. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* **43**, 1528-33.
- Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R. & Lenzen S. 2000b. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* **43**, 1528-33.
- Fang Y. Z., Yang S. & Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872-9.
- Federiuk I. F., Casey H. M., Quinn M. J., Wood M. D. & Ward W. K. 2004. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med.* **54**, 252-7.

- Fernandez-Real J. M., Equitani F., Moreno J. M., Manco M., Ortega F. & Ricart W. 2009. Study of circulating prohepcidin in association with insulin sensitivity and changing iron stores. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **94**, 982-8.
- Fernandez-Real J. M., Lopez-Bermejo A. & Ricart W. 2002. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* **51**, 2348-54.
- Fernandez-Real J. M., Moreno J. M., Lopez-Bermejo A., Chico B., Vendrell J. & Ricart W. 2007. Circulating soluble transferrin receptor according to glucose tolerance status and insulin sensitivity. *Diabetes Care* **30**, 604-8.
- Finch C. 1994. Regulators of iron balance in humans. *Blood* **84**, 1697-702.
- Fleming D. J., Tucker K. L., Jacques P. F., Dallal G. E., Wilson P. W. & Wood R. J. 2002. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *Am.J.Clin.Nutr.* **76**, 1375-84.
- Fleming R. E. & Bacon B. R. 2005. Orchestration of iron homeostasis. *N.Engl.J.Med.* **352**, 1741-4.
- Ford E. S. & Cogswell M. E. 1999. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* **22**, 1978-83.
- Fujita N., Sugimoto R., Takeo M., Urawa N., Mifuji R., Tanaka H., Kobayashi Y., Iwasa M., Watanabe S., Adachi Y. & Kaito M. 2007. Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol.Med.* **13**, 97-104.
- Galy B., Ferring-Appel D., Kaden S., Grone H. J. & Hentze M. W. 2008. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metab* **7**, 79-85.
- Gunshin H., Allerson C. R., Polycarpou-Schwarz M., Rofts A., Rogers J. T., Kishi F., Hentze M. W., Rouault T. A., Andrews N. C. & Hediger M. A. 2001. Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett.* **509**, 309-16.
- Halliwell B. & Gutteridge J. M. 1990b. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
- Halliwell B. & Gutteridge J. M. 1990a. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
- Hansen L. L., Ikeda Y., Olsen G. S., Busch A. K. & Mosthaf L. 1999. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J.Biol.Chem.* **274**, 25078-84.
- Harrison-Findik D. D., Klein E., Crist C., Evans J., Timchenko N. & Gollan J. 2007. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology* **46**, 1979-85.

- Heidland A., Sebekova K. & Schinzel R. 2001. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am.J.Kidney Dis.* **38**, S100-S106.
- Hirotsu Y., Ikeda T., Yamamoto K. & Kurokawa N. 2007. Effects of Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol.Pharm.Bull.* **30**, 1015-20.
- Hodgkinson A. D., Bartlett T., Oates P. J., Millward B. A. & Demaine A. G. 2003. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes* **52**, 846-51.
- Huang J., Jones D., Luo B., Sanderson M., Soto J., Abel E. D., Cooksey R. C. & McClain D. A. 2010. Iron overload and diabetes risk: A shift from glucose to fatty acid oxidation and increased hepatic glucose production in a mouse model of hereditary hemochromatosis. *Diabetes*.
- Iemitsu M., Miyauchi T., Maeda S., Tanabe T., Takanashi M., Irukayama-Tomobe Y., Sakai S., Ohmori H., Matsuda M. & Yamaguchi I. 2002. Aging-induced decrease in the PPAR-alpha level in hearts is improved by exercise training. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **283**, H1750-H1760.
- Jacob S., Streeper R. S., Fogt D. L., Hokama J. Y., Tritschler H. J., Dietze G. J. & Henriksen E. J. 1996. The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes* **45**, 1024-9.
- Jain S. K. 1989b. The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility. *Semin.Hematol.* **26**, 286-300.
- Jain S. K. 1989a. The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility. *Semin.Hematol.* **26**, 286-300.
- Jialal I., Devaraj S. & Venugopal S. K. 2002. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocopherol therapy. *Free Radic.Res.* **36**, 1331-6.
- Jiang R., Ma J., Ascherio A., Stampfer M. J., Willett W. C. & Hu F. B. 2004. Dietary iron intake and blood donations in relation to risk of type 2 diabetes in men: a prospective cohort study. *Am.J.Clin.Nutr.* **79**, 70-5.
- Jones D. P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid.Redox.Signal.* **8**, 1865-79.
- Junod A., Lambert A. E., Stauffacher W. & Renold A. E. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J.Clin.Invest* **48**, 2129-39.
- Kakkar P., Mehrotra S. & Viswanathan P. N. 1998. Influence of antioxidants on the peroxidative swelling of mitochondria in vitro. *Cell Biol.Toxicol.* **14**, 313-21.
- Kakkar R., Mantha S. V., Radhi J., Prasad K. & Kalra J. 1997. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci.* **60**, 667-79.

- Kanie N., Matsumoto T., Kobayashi T. & Kamata K. 2003. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR alpha and PPAR gamma) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br.J.Pharmacol.* **140**, 23-32.
- Kaul D., Sikand K. & Shukla A. R. 2004. Effect of green tea polyphenols on the genes with atherosclerotic potential. *Phytother.Res.* **18**, 177-9.
- Kaur D. & Andersen J. 2004. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res.Rev.* **3**, 327-43.
- Kirk E. A., Heinecke J. W. & LeBoeuf R. C. 2001. Iron overload diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J.Clin.Invest* **107**, 1545-53.
- Knutson M. D., Walter P. B., Ames B. N. & Viteri F. E. 2000. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J.Nutr.* **130**, 621-8.
- Konrad R. J. & Kudlow J. E. 2002. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int.J.Mol.Med.* **10**, 535-9.
- Lao T. T. & Tam K. F. 1997. Maternal serum ferritin and gestational impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **20**, 1368-9.
- Le G. G., Chanseume E., Ruivard M., Morio B. & Mazur A. 2007. Study of iron metabolism disturbances in an animal model of insulin resistance. *Diabetes Res.Clin.Pract.* **77**, 363-70.
- Lee D. H., Liu D. Y., Jacobs D. R., Jr., Shin H. R., Song K., Lee I. K., Kim B. & Hider R. C. 2006. Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 1090-5.
- Lee T. I., Kao Y. H., Chen Y. C. & Chen Y. J. 2009. Proinflammatory cytokine and ligands modulate cardiac peroxisome proliferator-activated receptors. *Eur.J.Clin.Invest* **39**, 23-30.
- Lee T. I., Kao Y. H., Chen Y. C., Pan N. H. & Chen Y. J. 2010. Oxidative stress and inflammation modulate peroxisome proliferator-activated receptors with regional discrepancy in diabetic heart. *Eur.J.Clin.Invest* **40**, 692-9.
- Lei Y. C., Hwang J. S., Chan C. C., Lee C. T. & Cheng T. J. 2005. Enhanced oxidative stress and endothelial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats exposed to fine particles. *Environ.Res.* **99**, 335-43.
- Lenzen S., Drinkgern J. & Tiedge M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic.Biol.Med.* **20**, 463-6.
- Leonarduzzi G., Scavazza A., Biasi F., Chiarpotto E., Camandola S., Vogel S., Dargel R. & Poli G. 1997. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates

- transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J.* **11**, 851-7.
- Levine R. L., Williams J. A., Stadtman E. R. & Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **233**, 346-57.
- Li G., Liu X., Zhu H., Huang L., Liu Y., Ma C. & Qin C. 2009. Insulin resistance in insulin-resistant and diabetic hamsters (*Mesocricetus auratus*) is associated with abnormal hepatic expression of genes involved in lipid and glucose metabolism. *Comp Med.* **59**, 449-58.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. & RANDALL R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-75.
- Machado A. F., Zimmerman E. F., Hovland D. N., Jr., Weiss R. & Collins M. D. 2001. Diabetic embryopathy in C57BL/6J mice. Altered fetal sex ratio and impact of the splotch allele. *Diabetes* **50**, 1193-9.
- Maddux B. A., See W., Lawrence J. C., Jr., Goldfine A. L., Goldfine I. D. & Evans J. L. 2001. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* **50**, 404-10.
- Marcil V., Delvin E., Sane A. T., Tremblay A. & Levy E. 2006. Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovasc.Res.* **72**, 473-82.
- Masiello P. 2006. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **38**, 873-93.
- Maxwell S. R., Thomason H., Sandler D., LeGuen C., Baxter M. A., Thorpe G. H., Jones A. F. & Barnett A. H. 1997. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann.Clin.Biochem.* **34 (Pt 6)**, 638-44.
- McClain D. A., Abraham D., Rogers J., Brady R., Gault P., Ajioka R. & Kushner J. P. 2006. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia* **49**, 1661-9.
- McCord J. M. & Edeas M. A. 2005. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed.Pharmacother.* **59**, 139-42.
- Mekinova D., Chorvathova V., Volkovova K., Staruchova M., Grancicova E., Klvanova J. & Ondreicka R. 1995. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nahrung* **39**, 257-61.
- Mendes J. F., Arruda S. F., Siqueira E. M., Ito M. K. & Silva E. F. 2009. Iron status and oxidative stress biomarkers in adults: a preliminary study. *Nutrition* **25**, 379-84.

- Mendler M. H., Turlin B., Moirand R., Jouanolle A. M., Sapey T., Guyader D., Le Gall J. Y., Brissot P., David V. & Deugnier Y. 1999. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* **117**, 1155-63.
- Merzouk H., Madani S., Chabane S. D., Prost J., Bouchenak M. & Belleville J. 2000. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin.Sci.(Lond)* **98**, 21-30.
- Mihm M. J., Seifert J. L., Coyle C. M. & Bauer J. A. 2001. Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. *Life Sci.* **69**, 527-42.
- Mohan I. K. & Das U. N. 1998. Effect of L-arginine-nitric oxide system on chemical-induced diabetes mellitus. *Free Radic.Biol.Med.* **25**, 757-65.
- Moirand R., Adams P. C., Bicheler V., Brissot P. & Deugnier Y. 1997a. Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men. *Ann.Intern.Med.* **127**, 105-10.
- Moirand R., Mortaji A. M., Loreal O., Paillard F., Brissot P. & Deugnier Y. 1997b. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* **349**, 95-7.
- Mooradian A. D. 2003. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: current management guidelines. *Arch.Intern.Med.* **163**, 33-40.
- Murata M., Takahashi A., Saito I. & Kawanishi S. 1999. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem.Pharmacol.* **57**, 881-7.
- Mythili M. D., Vyas R., Akila G. & Gunasekaran S. 2004. Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microsc.Res.Tech.* **63**, 274-81.
- Najib S. & Sanchez-Margalet V. 2001. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J.Mol.Endocrinol.* **27**, 85-91.
- Naziroglu M. & Butterworth P. J. 2005. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can.J.Appl.Physiol* **30**, 172-85.
- Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., Danan J. L., Bigard X., Devaux I., Beaumont C., Kahn A. & Vaulont S. 2002. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J.Clin.Invest* **110**, 1037-44.
- Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M. A., Beebe D., Oates P. J., Hammes H. P., Giardino I. & Brownlee M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**, 787-90.

- Nishina S., Hino K., Korenaga M., Vecchi C., Pietrangelo A., Mizukami Y., Furutani T., Sakai A., Okuda M., Hidaka I., Okita K. & Sakaida I. 2008. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* **134**, 226-38.
- Oberley L. W. 1988. Free radicals and diabetes. *Free Radic.Biol.Med.* **5**, 113-24.
- Okabayashi Y., Ohki A., Sakamoto C. & Otsuki M. 1985. Relationship between the severity of diabetes mellitus and pancreatic exocrine dysfunction in rats. *Diabetes Res.Clin.Pract.* **1**, 21-30.
- Olsson K. S., Marsell R., Ritter B., Olander B., Akerblom A., Ostergard H. & Larsson O. 1995. Iron deficiency and iron overload in Swedish male adolescents. *J.Intern.Med.* **237**, 187-94.
- Ookawara T., Kawamura N., Kitagawa Y. & Taniguchi N. 1992b. Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. *J.Biol.Chem.* **267**, 18505-10.
- Ookawara T., Kawamura N., Kitagawa Y. & Taniguchi N. 1992a. Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. *J.Biol.Chem.* **267**, 18505-10.
- Patel R., Singh J., Yago M. D., Vilchez J. R., Martinez-Victoria E. & Manas M. 2004. Effect of insulin on exocrine pancreatic secretion in healthy and diabetic anaesthetised rats. *Mol.Cell Biochem.* **261**, 105-10.
- Perrone M. G., Santandrea E., Dell'Uomo N., Giannessi F., Milazzo F. M., Sciarroni A. F., Scilimati A. & Tortorella V. 2005. Synthesis and biological evaluation of new clofibrate analogues as potential PPARalpha agonists. *Eur.J.Med.Chem.* **40**, 143-54.
- Phares C. K. 1980. Streptozotocin-induced diabetes in Syrian hamsters: new model of diabetes mellitus. *Experientia* **36**, 681-2.
- Pieper A. A., Verma A., Zhang J. & Snyder S. H. 1999. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol.Sci.* **20**, 171-81.
- Poladia D. P. & Bauer J. A. 2004. Oxidant driven signaling pathways during diabetes: role of Rac1 and modulation of protein kinase activity in mouse urinary bladder. *Biochimie* **86**, 543-51.
- Povoski S. P., McCullough P. J., Zhou W. & Bell R. H., Jr. 1993. Induction of diabetes mellitus in Syrian golden hamsters using stored equilibrium solutions of streptozotocin. *Lab Anim Sci.* **43**, 310-4.
- Ramm G. A., Ruddell R. G. & Subramaniam V. N. 2009. Identification of ferritin receptors: their role in iron homeostasis, hepatic injury, and inflammation. *Gastroenterology* **137**, 1849-51.

- Rauscher F. M., Sanders R. A. & Watkins J. B., III 2001. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* **15**, 159-64.
- Ravnskjaer K., Boergesen M., Rubi B., Larsen J. K., Nielsen T., Fridriksson J., Maechler P. & Mandrup S. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) potentiates, whereas PPARgamma attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **146**, 3266-76.
- Rees D. A. & Alcolado J. C. 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet.Med.* **22**, 359-70.
- Reznick A. Z. & Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**, 357-63.
- Robertson R. P., Harmon J., Tran P. O., Tanaka Y. & Takahashi H. 2003. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* **52**, 581-7.
- Rowland N. & Caputo F. A. 1985. Voluntary exercise, food intake, and plasma metabolites in streptozotocin-diabetic Syrian hamsters. *Physiol Behav.* **34**, 635-40.
- Rudich A., Tirosh A., Potashnik R., Hemi R., Kanety H. & Bashan N. 1998. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **47**, 1562-9.
- Rudich A., Tirosh A., Potashnik R., Khamaisi M. & Bashan N. 1999. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* **42**, 949-57.
- Salonen J. T., Tuomainen T. P., Nyyssonen K., Lakka H. M. & Punnonen K. 1998. Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ* **317**, 727.
- Sanders R. A., Rauscher F. M. & Watkins J. B., III 2001. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* **15**, 143-9.
- Sanguino E., Ramon M., Michalik L., Wahli W., Alegret M., Sanchez R. M., Vazquez-Carrera M. & Laguna J. C. 2004. Lack of hypotriglyceridemic effect of gemfibrozil as a consequence of age-related changes in rat liver PPARalpha. *Biochem.Pharmacol.* **67**, 157-66.
- Saxena A. K., Srivastava P., Kale R. K. & Baquer N. Z. 1993. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem.Pharmacol.* **45**, 539-42.
- Schafer A. I., Cheron R. G., Dluhy R., Cooper B., Gleason R. E., Soeldner J. S. & Bunn H. F. 1981. Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N.Engl.J.Med.* **304**, 319-24.

- Sedlak J. & Lindsay R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* **25**, 192-205.
- Sheikh N., Dudas J. & Ramadori G. 2007. Changes of gene expression of iron regulatory proteins during turpentine oil-induced acute-phase response in the rat. *Lab Invest* **87**, 713-25.
- Silva M., Silva M. E., de P. H., Carneiro C. M. & Pedrosa M. L. 2008b. Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. *Nutr.Res.* **28**, 391-8.
- Silva M., Silva M. E., de P. H., Carneiro C. M. & Pedrosa M. L. 2008a. Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. *Nutr.Res.* **28**, 391-8.
- Simionescu M., Popov D., Sima A., Hasu M., Costache G., Faitar S., Vulpanovici A., Stancu C., Stern D. & Simionescu N. 1996. Pathobiochemistry of combined diabetes and atherosclerosis studied on a novel animal model. The hyperlipemic-hyperglycemic hamster. *Am.J.Pathol.* **148**, 997-1014.
- Sociedade Brasileira de Diabetes 2003. Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. *Diagraphic - Rio de Janeiro*.
- Sozmen B., Delen Y., Girgin F. K. & Sozmen E. Y. 1999. Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control. *Clin.Biochem.* **32**, 423-7.
- Srinivasan S., Hatley M. E., Reilly K. B., Danziger E. C. & Hedrick C. C. 2004. Modulation of PPARalpha expression and inflammatory interleukin-6 production by chronic glucose increases monocyte/endothelial adhesion. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**, 851-7.
- Striffler J. S. & Nadler J. L. 2004. Lisofylline, a novel anti-inflammatory agent, enhances glucose-stimulated insulin secretion in vivo and in vitro: studies in prediabetic and normal rats. *Metabolism* **53**, 290-6.
- Sullivan J. L. 1981. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* **1**, 1293-4.
- Sundaram R. K., Bhaskar A., Vijayalingam S., Viswanathan M., Mohan R. & Shanmugasundaram K. R. 1996. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin.Sci.(Lond)* **90**, 255-60.
- Sung B., Park S., Yu B. P. & Chung H. Y. 2004. Modulation of PPAR in aging, inflammation, and calorie restriction. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* **59**, 997-1006.
- Syvanne M. & Taskinen M. R. 1997. Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* **350 Suppl 1**, S120-S123.

- Takatori A., Ohta E., Inenaga T., Horiuchi K., Ishii Y., Itagaki S., Kyuwa S. & Yoshikawa Y. 2003. Protective effects of probucol treatment on pancreatic beta-cell function of SZ-induced diabetic APA hamsters. *Exp.Anim* **52**, 317-27.
- Tanaka Y., Aleksunes L. M., Goedken M. J., Chen C., Reisman S. A., Manautou J. E. & Klaassen C. D. 2008. Coordinated induction of Nrf2 target genes protects against iron nitritotriacetate (FeNTA)-induced nephrotoxicity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **231**, 364-73.
- Tanaka Y., Gleason C. E., Tran P. O., Harmon J. S. & Robertson R. P. 1999. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 10857-62.
- Theil E. C. 1990. Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J.Biol.Chem.* **265**, 4771-4.
- Thompson K., Molina R., Donaghey T., Brain J. D. & Wessling-Resnick M. 2006. The influence of high iron diet on rat lung manganese absorption. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **210**, 17-23.
- Torti F. M. & Torti S. V. 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* **99**, 3505-16.
- Tsai E. C., Hirsch I. B., Brunzell J. D. & Chait A. 1994. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* **43**, 1010-4.
- Turbino-Ribeiro S. M., Silva M. E., Chianca D. A., Jr., de P. H., Cardoso L. M., Colombari E. & Pedrosa M. L. 2003. Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J.Nutr.* **133**, 15-20.
- Valentovic M. A., Alejandro N., Betts C. A., Brown P. I. & Ramos K. 2006. Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(alpha)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *Toxicol.Lett.* **164**, 214-20.
- van d. O., I, Raterman H. G., Nurmohamed M. T. & Simsek S. 2010. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators.Inflamm.* **2010**, 792393.
- Verges B. 1991. [Anomalies of lipid metabolism in diabetes mellitus]. *Rev.Med.Interne* **12**, 277-81.
- Vokurka M., Krijt J., Sulc K. & Necas E. 2006. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res.* **55**, 667-74.
- Wang F., Gao L., Gong B., Hu J., Li M., Guan Q. & Zhao J. 2008. Tissue-specific expression of PPAR mRNAs in diabetic rats and divergent effects of cilostazol. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **86**, 465-71.

Ward D. T., Hamilton K., Burnand R., Smith C. P., Tomlinson D. R. & Riccardi D. 2005. Altered expression of iron transport proteins in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Biochim.Biophys.Acta* **1740**, 79-84.

Weinberg E. D. 1990. Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev.* **22**, 531-79.

Yokomori N., Iwasa Y., Aida K., Inoue M., Tawata M. & Onaya T. 1991. Transcriptional regulation of ferritin messenger ribonucleic acid levels by insulin in cultured rat glioma cells. *Endocrinology* **128**, 1474-80.

Young I. S., Tate S., Lightbody J. H., McMaster D. & Trimble E. R. 1995. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic.Biol.Med.* **18**, 833-40.

Zhang S., Chai F. Y., Yan H., Guo Y. & Harding J. J. 2008. Effects of N-acetylcysteine and glutathione ethyl ester drops on streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Mol.Vis.* **14**, 862-70.

Zhao N., Sun Z., Egert U., Mao Y., Hang P., Jiang X., Sun L., Zhao J. & Du Z. 2010. Myocardial iron metabolism in the regulation of cardiovascular diseases in rats. *Cell Physiol Biochem.* **25**, 587-94.

<http://www.idf.org/> (International diabetes Federation)

11 - ANEXOS - PUBLICAÇÕES

Artigos aceitos para a publicação

1. SILVA, M., LIMA, W G, SILVA, Marcelo Eustáquio, PEDROSA, Maria Lúcia. Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profile and oxidative stress in hamsters. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (Online). , 2011.
2. SILVA, M., BONOMO, L. F., LIMA, W. G., OLIVEIRA, R. P., SILVA, Marcelo Eustáquio, PEDROSA, Maria Lúcia. Effects of the interaction of diabetes and iron supplementation on hepatic and pancreatic tissues, oxidative stress markers, and liver PPAR-alpha expression. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. , 2011.

Artigo submetido para publicação

1. SILVA, M., MAGALHAES, C.B.L., OLIVEIRA, R. P., SILVA, Marcelo Eustáquio, PEDROSA, Maria Lúcia. Differential expression of iron metabolism proteins expression in diabetic and diabetic iron-supplemented rat liver. Journal of Diabetes and Its Complications. Em 14 de dezembro de 2010.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. Guerra, J. F. C. ; Camini, F. C. ; Silva, M. ; Rossoni Junior, J. V. ; Silva, Marcelo Eustáquio ; Pedrosa, Maria Lúcia . Diabetes Produzida Experimentalmente Em Ratos Promove Alterações Na Homeostase Do Ferro. In: III COMAN Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição, 2009, Ouro Preto. Anais do III COMAN Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição, 2009.
2. Camini, F. C. ; Guerra, J. F. C. ; Rossoni Jr, J. V. ; Silva, M. ; Silva, Marcelo Eustáquio ; Pedrosa, Maria Lúcia . Suplementação da dieta com ferro carbonílico

umenta colesterol e diminui triacilgliceróis no soro de ratos e hamsteres.. In: III Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição, 2009, Ouro Preto - MG. Anais do III Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1. CAMINI, F. C., GUERRA, J. F. C., Silva, M., SILVA, Marcelo Eustáquio, PEDROSA, Maria Lúcia. Efeitos da suplementação de ferro sobre o diabetes induzido por estreptozotocina, em hamsteres. In: XVIII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2010, Ouro Preto. Anais do XVIII Seminário de Iniciação Científica da UFOP. , 2010.
2. Silva, M., CAMINI, F. C., GUERRA, J. F. C., SILVA, Marcelo Eustáquio, PEDROSA, Maria Lúcia. Supplementation of Carbonyl Iron increases Glycemia and Markers of Oxidative stress in Diabetic Hamsters In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. Anais do XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2010.
3. Bonomo, L. F. ; Guerra, J. F. C. ; Silva, M. ; Silva, Marcelo Eustáquio ; Pedrosa, Maria Lúcia . Iron Supplementation Effects On Glycaemia, Lipaemia And Oxidative Stress In Diabetics Hamsters. In: Xxxviii Reunião Anual Da Sbbq, 2009, Águas De Lindoia. Anais Da Xxxviii Reunião Anual Da Sbbq, 2009.
4. Silva, M. ; Camini, F. C. ; Silva, Marcelo Eustáquio ; Pedrosa, Maria Lúcia . Glucose And Lipid Profile And Markers Of Oxidative Stress In Diabetic Rats Submitted To Iron Overload.. In: XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009, Águas de Lindoia. Anais da XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009.
5. Silva, M. ; SILVA, Marcelo Eustáquio ; PEDROSA, Maria Lúcia . Hamsteres Diabéticos, Ou Não, Suplementados Com Ferro Apresentam Aumento Da Peroxidação Lipídica No Fígado E Rins, Mas Não No Pâncreas.. In: 10º Congresso Nacional Da

Sociedade Brasileira De Alimentação E Nutrição, 2009, São Paulo. Anais Do 10º Congresso Nacional Da Sociedade Brasileira De Alimentação E Nutrição, 2009.

6. Silva, M. ; Camini, F. C. ; Silva, Marcelo Eustáquio ; Pedrosa, Maria Lúcia . Ratos Diabéticos E Suplementados Com Ferro Apresentam Maior Estresse Oxidativo E Alterações Na Homeostase Do Ferro. In: 10º Congresso Nacional Da Sociedade Brasileira De Alimentação E Nutrição, 2009, São Paulo. Anais Do 10º Congresso Nacional Da Sociedade Brasileira De Alimentação E Nutrição, 2009.

7. Guerra, J. F. C. ; Silva, M. ; Silva, Marcelo Eustáquio ; Pedrosa, Maria Lúcia . Avaliação Do Hamster Como Modelo Experimental Para Estudo Da Relação Entre Diabetes E Estresse Oxidativo. In: XVI Seminário De Iniciação Científica Da UFOP, 2008, Ouro Preto. Anais Do XVI Seminário De Iniciação Científica da UFOP, 2008.

Outras publicações no período

1. SOUZA, M. O, Silva, M., SILVA, Marcelo Eustáquio, OLIVEIRA, R. P., PEDROSA, Maria Lúcia. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats.. *Nutrition.* , v.26, p.804 - 810, 2010.

2. FRANCISCO, A. F., VIEIRA, P. M. A., ARANTES, J. M., Silva, M., Pedrosa, Maria Lucia, Elói-Santos, Silvana Maria, Martins-Filho, Olindo Assis, Teixeira-Carvalho, Andréa, Araújo, Márcio Sobreira Silva, TAFURI, W. L., CARNEIRO, C. M. Increase of reactive oxygen species by desferrioxamine during experimental Chagas' disease. *Redox Report (Edinburgh).* , v.15, p.185 - 190, 2010.

3. Silva, M., de Paula, H., SILVA, Marcelo Eustáquio, CARNEIRO, C. M., PEDROSA, Maria Lúcia. Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis and increases serum triacylglycerols in rats. *Nutrition Research (New York).* , v.28, p.391 - 398, 2008.

4. FRANCISCO, A. F., VIEIRA, P. M. A., ARANTES, J. M., PEDROSA, Maria Lúcia, MARTINS, H. R., Silva, M., VELOSO, V. M., LANA, M., BAHIA, M. T., TAFURI, W. L., CARNEIRO, C. M. Trypanosoma cruzi: effect of Benznidazole therapy combined with the iron chelator Desferrioxamine in mice. *Experimental Parasitology.* , v.120, p.314 - 319, 2008