



Universidade de Brasília

Departamento de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Título

**A influência da manipulação dietético do ferro sobre os parâmetros
relacionados ao metabolismo de glicose.**

AZADEH MEHDAD

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como
requisito parcial para a obtenção do título de doutor
em Nutrição Humana. Área de Concentração:
Bioquímica Nutricional.

Orientadora: Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda

Brasília-2013

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

Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira
Presidente – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Lucia de Fatima Campos Pedrosa Schwarzschild
Membro - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profa. Dra. Eliana de Cassia Pinheiro
Membro – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima
Membro – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Membro – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Kênia Mara Baiocchi de Carvalho
Membro – Universidade de Brasília

ESTRUTURA DA TESE:

Esta tese será apresentada da seguinte forma: uma parte inicial composta por introdução, revisão bibliográfica, objetivos gerais e específicos e metodologia. Os resultados e a discussão estão apresentados na forma de artigo que foi submetido para revista: **Journal of Nutritional Biochemistry**.

Ao final será apresentada a conclusão deste estudo.

Resumo

Evidências indicam que a sobrecarga de ferro, hiperglicemia e resistência à insulina são biologicamente interligadas. O excesso de ferro na dieta é considerado um fator de risco para diabetes devido à ação oxidante deste íon. Este estudo foi desenhado para verificar o impacto da restrição e suplementação dietética de ferro na captação de glicose ativada pela insulina em ratos adultos e aparentemente saudáveis. Para tanto, 20 ratos foram distribuídos em três grupos e alimentados com a dieta controle AIN-M 93 contendo ferro em três concentrações: 35 mg/Kg (dieta controle, adequada em ferro), 10 mg/kg (dieta restrita em ferro) ou 350 mg/kg de ferro (dieta suplementada com ferro). Após 12 semanas de dieta, os ratos foram sacrificados, o sangue foi coletado para análises hematimétricas, o fígado e o músculo esquelético da perna foram coletados para determinação das concentrações de glicogênio, ferro, estado oxidativo, níveis de transcritos do receptor de insulina (Insr), do transportador de glicose 4 (Glut4) e do supressor de tumor 53 (Tp53). Os ratos alimentados com a dieta restrita em ferro apresentaram valor médio de glicemia em jejum com tendência à redução, apresentaram redução significativa na concentração de glicogênio hepático com concomitante aumento no músculo esquelético, em relação ao grupo controle. Além disso, a restrição de ferro, resultou em um aumento de duas vezes na expressão de transcrito de Insr e um aumento de 4 vezes na expressão de transcritos de Glut-4 no músculo esquelético. Tanto a restrição de ferro quanto a suplementação de ferro induziram uma diminuição na expressão de transcrito de p53. Embora a restrição de ferro não afetasse o estado corporal de ferro dos ratos, observou-se um aumento na atividade de NADPH oxidase hepática e também, um aumento nos níveis de oxidação de proteínas no músculo. A suplementação crônica com ferro aumentou a concentração de ferro sérico e hepático e resultou em níveis elevados de danos oxidativos no fígado e no músculo esquelético. A suplementação de ferro não afetou a captação de glicose

ou o conteúdo de glicogênio. Assim, a restrição dietética de ferro pode melhorar a síntese de glicogênio muscular e a captação de glicose ativada pela insulina através de *down-regulation* de p53. No entanto, o papel central de ferro na função biológica não deve ser subestimado.

Palavras chaves: Ferro dietético, sensibilidade à insulina, Glut-4, p53.

Abstract

Mounting evidence suggests that high body iron stores, hyperglycaemia and insulin resistance are biologically intertwined. The excess dietary iron is thought to be a risk factor of diabetes due to the prooxidant feature of iron. This investigation was designed to test the impact of dietary iron restriction and supplementation on functional outcome in adult, healthy rats. Twenty rats were fed diets containing either 10 mg / Kg (iron-restricted diet) or 350 mg /Kg (iron-supplemented diet) of elemental iron for 78 days compared with the control rats that were fed AIN-M 93 diet (35mg/kg). Then, rats were euthanized and blood samples was collected to hematological analysis, and liver and skeletal muscles were dissected out, for iron , glycogen and stress markers determination, and to evaluate the transcription of Insr, Glut-4 and Tp53. Fasting blood glucose values trended toward a decrease through the iron-restricted diet, moreover, hepatic glycogen content decreased with concomitant increases in skeletal muscle. In addition, dietary iron restriction resulted in a twofold increase in mRNA expression of Insr and fourfold increase in Glut4 expression in skeletal muscle. The p53 mRNA levels in iron-restricted group as well as in iron-supplemented group were decreased. Although the dietary iron restriction did not affect body iron status, it caused hepatic low oxidative damages; however, high liver NADPH oxidase activity and increased levels of protein oxidation in muscle were observed. Chronic feeding of high iron diet increases serum and hepatic iron and resulted in elevated levels of stress markers in liver and skeletal muscle. Dietary iron supplementation did not affect either glucose uptake or glycogen content. Thus, dietary iron deprivation may improve insulin-stimulated muscle glycogen synthesis and glucose uptake through the down-regulation of p53; nevertheless, the pivotal role of iron in the biological function should not be underestimated.

Key words: Dietary iron, insulin sensitivity, Glut4, p53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%: Porcentagem

µg: micrograma

µL: microlitro

°C: graus Celsius

A_{nm}: absorvância em nanômetros

ATP: trifosfato de adenosina

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

ALP: fosfatase alcalina

cDNA: DNA complementar

CRP: proteína reativa-C

C_T: cycle threshold

DNA: ácido desoxirribonucleico

DM2: diabetes melito tipo 2

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs: espécies reativas de oxigênio

Fe: Ferro

GGT: gama-glutamil transferase

GLUT- 4: transportador de glicose 4

Hb: hemoglobina

HCl: ácido clorídrico

HH: Hemocromatose

HNO₃: ácido nítrico

Ht: hematócrito

H₂SO₄: ácido sulfúrico

InsR: receptor de insulina

IRS: substrato de receptor de insulina

MDM₂: proteína “*murine doble minute 2*”

mRNA: RNA mensageiro

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

Nox: NADPH oxidase

ng: nanograma

P53: proteína supressora de tumor 53

PH: domínio homólogo à plecstrina

RPM: rotação por minuto

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

TfR:: receptor de transferrina

SH2: domínio do homologo 2 de Src

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

ST: saturação de transferrina

1. Introdução	6
2. Revisão Bibliográfica	8
2.1. Metabolismo de Ferro	8
2.2. Insulina	9
2.3. Sinalização de Insulina	10
2.3.1. O receptor de Insulina e seus substratos	10
2.3.2. Fosfatidilinositol 3-quinase e a proteína quinase B (PKB/Akt)	11
2.3.3. Regulação do transporte de glicose	12
2.4. Regulação da síntese de glicogênio	13
2.5. Proteína supressora de tumor p53	14
2.6. Cross-talk entre ferro e diabetes	16
3. Objetivos	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. Metodologia	20
4.1. Animais e tratamentos	20
4.2. Ganho de peso e consumo de dieta	20
4.3. Coleta de material	20
4.4. Análise bioquímica	21
4.5. Determinação da concentração de ferro	21
4.6. Determinação da concentração de glicogênio	22
4.7. Análise da expressão de mRNA	22
4.7.1. Extração de RNA total	22
4.7.2. Síntese de cDNA	24
4.7.3. Verificação de contaminação por DNA genômica	24
4.7.4. Especificidade e validação dos primers para RT-PCR	24
4.7.5. PCR em tempo real	25
5. Análise estatística	28
6. Artigo	29
7. Conclusão	64
8. Referências bibliográficas	66

1. Introdução

O ferro é um dos minerais mais abundantes do planeta, sendo necessário para todas as células aeróbicas. Participa de inúmeras funções fisiológicas, como transporte de oxigênio, transporte de elétrons, síntese de DNA e imunidade, entre outras. A deficiência de ferro resulta em consequências diversas, sendo a anemia ferropriva a mais comum. Apesar de vital para o organismo, o ferro pode ser extremamente danoso, uma vez que apresenta capacidade oxirredutora, devido participação em reações que produzem radicais livres[1].

O diabetes tipo 2 (DM2), a forma mais comum de diabetes, é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla que compreende um conjunto de alterações caracterizado por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na ação e na secreção da insulina. Estima-se que até 2030, a prevalência mundial de diabetes tipo 2 atinja mais de 365 milhões de indivíduos, constituindo um dos maiores desafios para a saúde pública [2].

No tocante à perspectiva do aumento no número de portadores de diabetes tipo 2, a suscetibilidade genética não pode justificar isoladamente esse quadro, sendo os fatores ambientais, indubitavelmente, parte fundamental desse cenário. Portanto, uma melhor compreensão da patogênese de diabetes mellitus deverá auxiliar na meta de prevenção e redução dessa doença, uma vez que permitirá que a população em risco seja identificada, propiciando intervenções preventivas.

Evidências epidemiológicas sugerem que a sobrecarga de ferro contribua para o desenvolvimento de doenças crônicas, como o diabetes mellitus [3] [4,5]. A intolerância a glicose ocorre em até 75% a 80% dos pacientes com hemocromatose; desses, 50% a 60% podem desenvolver diabetes [6,7,8]. A intolerância a glicose também foi identificada em aproximadamente 50% dos pacientes com talassemia, a maioria devido a transfusão de sangue [9,10]. Contrariamente, a hemocromatose foi diagnosticada em 1,3% dos 894 pacientes com diabetes[11]. A patogênese da intolerância à glicose em estados de sobrecarga de ferro permanece controversa, pois fatores múltiplos podem estar envolvidos. Contudo, o grau de intolerância à glicose e o controle do diabetes melhora em 35% a 45% dos pacientes após a depleção férrica [7,12].

Em julho de 2004, o Ministério da Saúde do Brasil iniciou um programa, em nível nacional, de combate à deficiência de ferro, tornando obrigatória a suplementação de todas as farinhas de trigo e milho comercializadas no Brasil com ferro e ácido fólico [12]. Resultados obtidos em um estudo longitudinal, realizado na população dos Estados Unidos, revelou que as reservas de ferro estavam aumentadas em aproximadamente 13% dos idosos saudáveis e, em contrapartida, havia apenas 2,7% de idosos deficientes em ferro, sugerindo que a suplementação de ferro era desnecessária para essa população [13].

A relevância do presente estudo reside na necessidade da compreensão dos mecanismos envolvidos na associação entre os teores de ferro corporal e a diabetes, capaz de orientar medidas preventivas em relação à doença e as complicações desencadeadas por ela. Assim, neste estudo foram avaliadas as alterações nas expressões de genes que regulam a captação de glicose no músculo esquelético em ratos submetidos à suplementação e restrição dietética de ferro.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Metabolismo de Ferro

Em função de sua capacidade de óxido-redução o ferro pode catalisar reações de geração de radicais livres, como por exemplo, a reação de Fenton. Dessa forma a homeostase do ferro nos mamíferos é finamente regulada por mecanismos moleculares específicos. Este íon está presente nos alimentos, principalmente na forma de ferro férrico (Fe^{2+}). No lúmen intestinal, por meio da ação de enzimas ferro-redutases como a citocromo B duodenal (Dcytb), o Fe^{3+} dietético é reduzido a Fe^{2+} para então acontecer sua absorção. O transportador de metal divalente (DMT1) é responsável por seu transporte, através da membrana, para dentro do enterócito [14]. O ferro heme também é absorvido da dieta, porém sua absorção é mais específica uma vez que não precisa passar por estas etapas, sendo, portanto absorvido mais facilmente no enterócito [15]. Apesar dos exatos mecanismos envolvidos em sua absorção ainda não estarem bem esclarecidos [16], um transportador de heme presente na borda em escova, a proteína carreadora de heme 1 (HCP1), parece ter participação neste transporte [17].

No interior do enterócito, este íon entra no *pool* do ferro podendo seguir dois destinos dependendo da demanda corporal ferro: 1- ser incorporado à ferritina, ficando assim armazenado no eritrócito; 2- ser oxidado pela hefaestina (ferroxidase) e então incorporado à ferroportina, que faz seu transporte através da membrana basolateral. O Fe^{3+} é então incorporado à transferrina, que faz seu transporte através do plasma para os tecidos [18]. A hepcidina é um hormônio que induz a degradação da ferroportina, inibindo assim a exportação de ferro através do plasma. O nível plasmático de hepcidina é regulado pelo status de ferro, hipóxia e citocinas do processo inflamatório [15].

Os níveis intracelular de ferro são regulados por meio de duas proteínas sensíveis ao status deste íon: proteínas reguladoras do ferro 1 e 2 (IRP1 e IRP2) [19]. O mRNA de algumas das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro apresenta na extremidade 3' ou 5' uma região não traduzida (UTR - Untranslated Region) denominada de elemento responsivo ao ferro (IRE) [14,15], que é um sítio de ligação das proteínas IRPs. Quando a IRP se liga ao IRE, localizado na extremidade 5', a tradução dos respectivos mRNAs é bloqueada. Porém, quando a ligação ocorre na porção 3', ocorre a estabilidade das moléculas de mRNA que são traduzidas [14].

A literatura apresenta dados que mostram que os mRNAs regulados por IRP/IRE incluem ferritina, receptor de transferrina, ferroportina e DMT-1[15]. Outras regulações também acontecem e estas podem variar conforme o tecido. Um estado de deficiência de ferro, por exemplo, resulta em baixa síntese de ferroportina hepática, porém alta produção duodenal [20].

2.2. Insulina

A insulina é um hormônio anabólico, liberado pelas células β das Ilhotas de Langerhans do pâncreas, em resposta ao aumento nos níveis plasmáticos de glicose. Apesar da secreção insulínica basal ser constante, alguns estímulos provenientes do catabolismo dos nutrientes, da atuação de neurotransmissores e de hormônios podem aumentar ou diminuir a insulinemia[21]. O regulador mais relevante, sob o ponto de vista fisiológico, é a glicemia[22]. Alguns hormônios específicos, tais como o hormônio do crescimento[23], o Glucagon[24] e o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), também regulam a secreção de insulina[25].

Nos mamíferos, a expressão do gene e a biossíntese da insulina se restringem às células β do pâncreas. A função primária das células β é a produção, estocagem e secreção controlada da insulina. Em condições fisiológicas, as células β mantêm sempre um *pool* de insulina disponível, cuja secreção pode ocorrer rapidamente em resposta a um estímulo. Qualquer aumento na liberação de insulina é compensado por um aumento correspondente em sua biossíntese, de maneira que o nível dos estoques de insulina nas células β permaneça sempre constante. A insulina é sintetizada a partir da molécula precursora proinsulina, que sofre ação de enzimas proteolíticas conhecidas como pró-hormônio convertases. A molécula de insulina ativa é formada por duas cadeias de polipeptídeos ligadas por duas pontes dissulfídicas, com uma ligação dissulfídica adicional na cadeia A. A cadeia A consiste de 21 resíduos de aminoácidos, e a cadeia B, de 30 resíduos de aminoácidos. A parte restante da molécula de proinsulina é chamada de peptídeo C [20]. Esse polipeptídeo é liberado no sangue em quantidades iguais à da insulina. Como insulinas exógenas não contêm peptídeo C, o nível plasmático desse peptídeo é um bom indicador a produção endógena de insulina. Recentemente, descobriu-se que esse peptídeo C também possui atividade biológica, que está aparentemente restrita a um efeito na camada muscular das artérias [26].

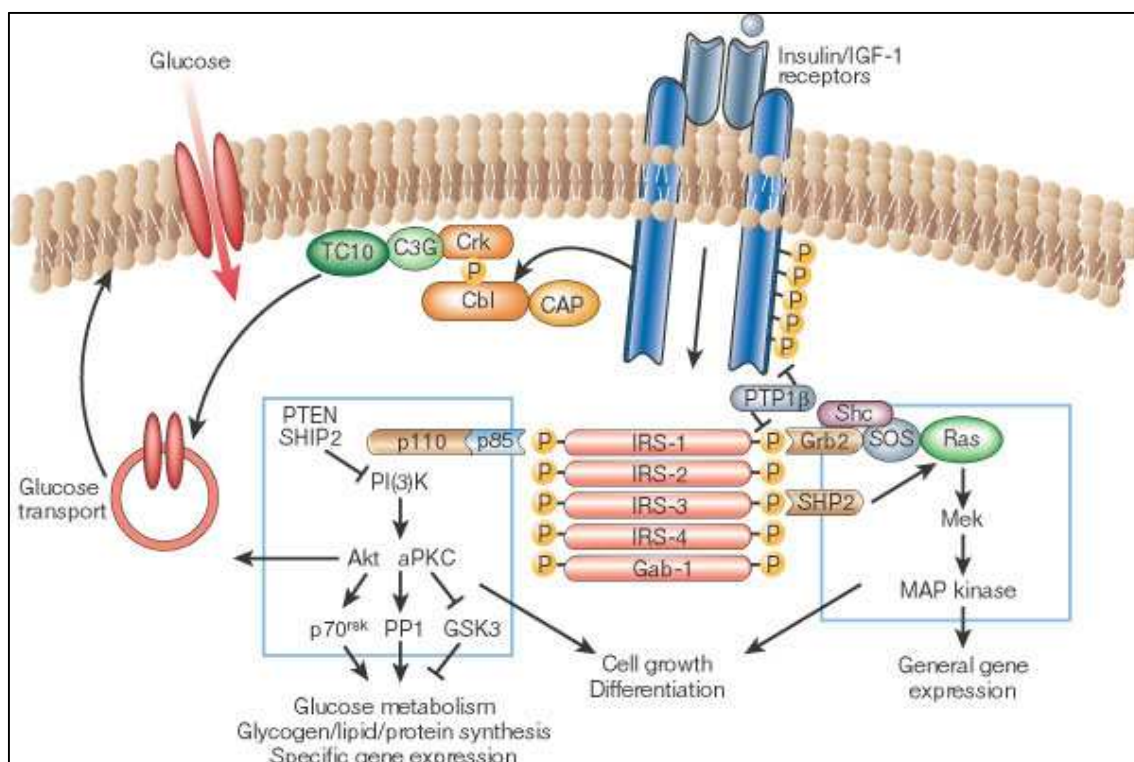
2.3. Sinalização de Insulina

2.3.1. O receptor de Insulina e seus substratos

A figura 1 mostra as etapas de sinalização intracelular. A via de sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase intrínseca, composta por duas subunidades α e duas subunidades β . O receptor de insulina atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α do receptor de insulina (IR) promove uma alteração conformacional nessa subunidade, induzindo à ativação da atividade quinase da subunidade β , o que leva à sua autofosforilação nos seus múltiplos resíduos de tirosina [27,28] [21, 22]. Uma vez ativada, a subunidade fosforilada β do IR passa a fosforilar vários substratos proteicos no resíduo de tirosina. Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS [29,30,31] [23-25]. A massa molecular das proteínas IRS varia de 60 kDa a 180 kDa. A IRS-1 e a IRS-2 são amplamente distribuídas nos tecidos, embora a IRS-3 e a IRS-4 tenham distribuições mais limitadas. A IRS-3 é mais abundante nos adipócitos, e seu mRNA também é detectado no fígado, no rim, no coração, no pulmão e no cérebro [25-27]. [31,32,33] Em contraste, os níveis do mRNA para a IRS-4 são muito baixos, mas são detectáveis em fibroblastos, tecidos embrionários, músculo esquelético, fígado, coração e rim [27,33]. Curiosamente, em seres humanos a IRS-3 parece ainda não ter função biológica conhecida, deixando somente a IRS-1, a IRS-2 e a IRS-4 [34] [28]. Outros substratos do receptor de insulina incluem a proteína de ligação 1 associada ao GRB2 (Gab-1) [35] [29], a Cbl [36] [30] e as várias isoformas de Shc [37] [31]. Após a estimulação pela insulina, o receptor de insulina então fosforila diretamente a maioria desses substratos em múltiplos resíduos de tirosina, criando sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios Src-homologia 2 (SH2) [38] [32]. Assim, os substratos do receptor de insulina atuam como intermediários-chave na transdução de sinais da insulina. Um estudo realizado em camundongos “*knockout*” para IRS-1, mostrou que estes animais exibiram resistência à insulina, primeiramente no tecido muscular e adiposo, resultando em intolerância à glicose [39] [33]. Por outro lado, os camundongos “*knockout*” para IRS-2 apresentaram um fenótipo diferente do camundongo que não expressa o gene da IRS-1: hiperglicemia acentuada devido

a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos, e a falência da atividade secretória acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas[40] [41] [34, 35]. Em contraste, os camundongos “*knockout*” para IRS-3 apresentaram crescimento e metabolismo normais, enquanto os camundongos que não expressam IRS-4 exibiram anormalidades mínimas na tolerância à glicose [42] [43] [36, 37].

Figura.1. As etapas de sinalização intracelular



2.3.2. Fosfatidilinositol 3-quinase e a proteína quinase B (PKB/Akt)

A primeira proteína do domínio SH2 identificada como interagindo com a IRS-1 foi a subunidade regulatória da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-Kinase). Essa enzima desempenha um papel fundamental na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado pela insulina[44,45,46,47].

A PI3K pertence a uma família de enzimas transdutoras de sinal intracelular, que catalisam a fosforilação do fosfatidilinositol na membrana das células. Inicialmente, observou-se que essa quinase catalisava a fosforilação de fosfoinosítídeos na posição 3' do anel inositol

[42]. Subsequentemente, foi demonstrado que a enzima “*in vivo*” tem como substrato principal o fosfoinosítido 4,5 (IP₂), que é convertido em um novo fosfoinosítido, o IP₃ (3,4,5).

A enzima PI3K consiste de uma subunidade regulatória e uma subunidade catalítica. A ativação da subunidade catalítica depende da interação de dois domínios SH2 na subunidade regulatória [48] [43]. Os mecanismos precisos pelos quais a PI3K transduz o sinal da insulina parecem ser múltiplos[49] [44]. Uma vez fosforilados, os fosfoinosítidos PI-(3)P, PI (3,4)P₂ e PI-(3,4,5)P₃ ligam-se ao domínio Homólogo à Plecstrina (PH), o qual é o responsável pela ligação com os lipídeos de uma variedade de moléculas de sinalização, alterando sua atividade ou localização subcelular[50].

Algumas classes principais de moléculas de sinalização são reguladas pelos PI-3 fosfatos; a via mais bem caracterizada é conhecida como fosfoinosítidos dependente quinase 1 (PDK1). Essa enzima é uma das duas serinas quinase que fosforilam e ativam a serina/ treonina quinase PKB/Akt/ [46]. A Akt possui um domínio PH que interage diretamente com o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, promovendo o direcionamento da proteína para a membrana celular, bem como sua atividade catalítica. Seus efeitos são dependentes da ativação de várias quinases intracelulares envolvidas na transmissão do sinal de insulina até a captação de glicose, a síntese de glicogênio e a síntese proteica. Além de fosforilar a Akt, há evidências de que a PDK-1 seja capaz de, em resposta à insulina, fosforilar isoformas atípicas da proteína quinase C (PKC) envolvidas na síntese proteica e no transporte de vesículas de GLUT-4 para a membrana celular para promover a captação de glicose[51,52,53,54,55].

2.3.3. Regulação do transporte de glicose

O efeito clássico da insulina na homeostasia da glicose é sua capacidade de estimular o transporte de glicose para o tecido muscular e adiposo. Isso ocorre por meio da migração dos transportadores de glicose, o GLUT-4, contidas nas membranas de vesículas intracelulares para a membrana plasmática. Permanecem obscuros os mecanismos pelos quais as etapas iniciais de sinalização da insulina convergem para as vesículas que contêm GLUT-4, incitando seu transporte para a membrana celular. No estado basal, o GLUT-4 é continuamente reciclado entre a membrana celular e os vários compartimentos intracelulares.

Na presença do estímulo da insulina, a taxa de exocitose das vesículas contendo GLUT-4 aumenta intensamente, além de ocorrer pequena redução da taxa de internalização. A exocitose estimulada pela insulina é similar à exocitose de vesículas sinápticas[56,57]. As vesículas de GLUT-4, em particular, contêm as proteínas V-SNARE, VAMP2 e VAMP3, que fisicamente interagem com seus pares t-SNARE (syntaxina 4 e SNAP23) na membrana celular durante a translocação das vesículas de GLUT-4 [56,57] .

Apesar estas interações serem essenciais para a translocação do GLUT-4, nenhuma dessas proteínas parece ser alvo da insulina; no entanto, pode-se especular que alterações específicas dos complexos de proteínas SNARE, que atuam paralelamente à via da PI 3-quinase, possam contribuir para a resistência à insulina.

2.4. Regulação da síntese de glicogênio

Após entrar na célula muscular, a glicose é rapidamente fosforilada pela hexoquinase a glicose 6-fosfato, podendo ser armazenada na forma de glicogênio, após duas etapas subsequentes – uma isomerização e a sua conversão ao difosfato de uridina-glicose (UDP-glicose), sendo este último substrato da enzima glicogênio sintase. Alternativamente, em condições de baixa energia celular, a glicose 6-fosfato é oxidada na via glicolítica, produzindo trifosfato de adenosina (ATP) e o piruvato, em dez reações – a última das quais é catalisada pela enzima piruvato quinase. A insulina estimula o acúmulo de glicogênio não apenas pelo estímulo à captação de glicose pelo músculo, mediado pelo GLUT-4, mas também porque promove a desfosforilação do glicogênio sintase, ativando-a, mediada pela cascata de reações desencadeada pela inibição de glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) (Figura.2). Esse processo está à jusante da etapa de fosforilação da PI-3 quinase na via de sinalização da insulina, envolvendo a fosforilação por Akt da GSK-3. Esta inativa a GSK-3, resultando em uma redução na fosforilação do glicogênio sintase e um aumento em seu estado de atividade [58].

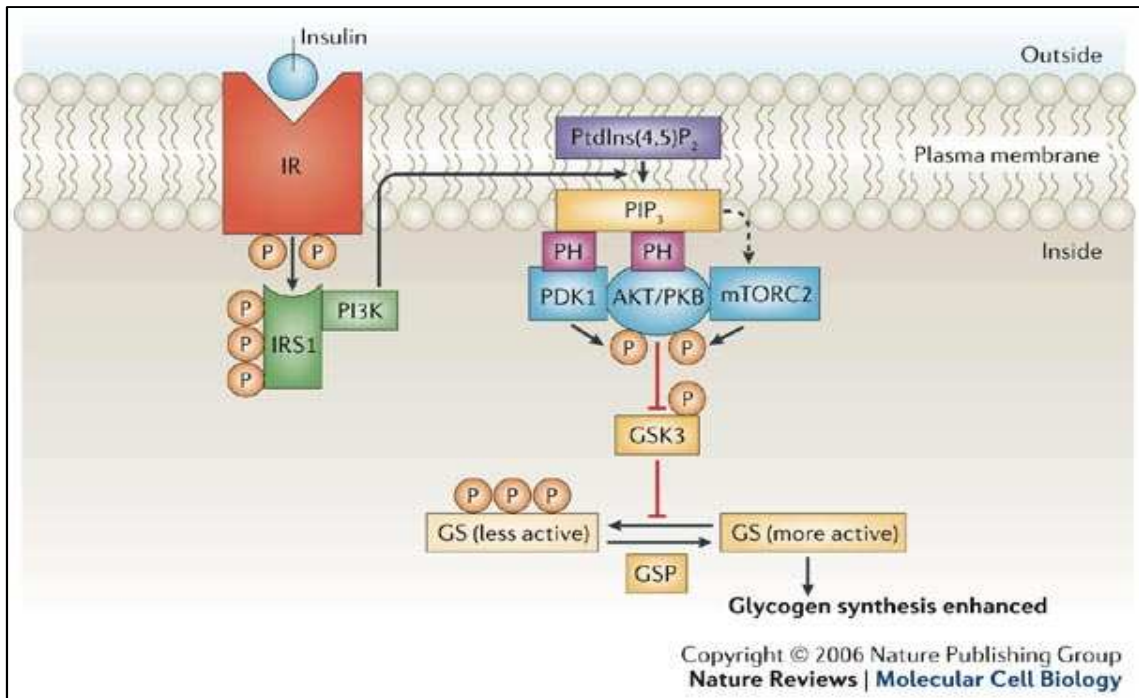


Figura 2. Regulação da síntese de glicogênio

A insulina inibe a produção e a liberação de glicose no fígado, inibindo a gliconeogênese e a glicogenólise. Inibe diretamente a transcrição do gene que codifica a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), primeira enzima na conversão de piruvato a glicose, da via gliconeogênica, que constitui uma etapa limitante da velocidade dessa via. Esse hormônio também inibe a transcrição dos genes das enzimas glicolíticas, como a glicoquinase e a piruvato quinase [38,59]. As vias de sinalização que regulam a transcrição desses genes permanecem desconhecidas, mas envolvem a Akt e fatores de transcrição da família “forkhead” (FOXO), receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR) e coativador 1 do PPAR gama (PGC-1).

2.5. Proteína supressora de tumor p53

O p53 é um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 17 e codifica uma proteína de 393 resíduos de aminoácidos, a proteína p53, que controla a progressão de células da fase G1 para a fase S do ciclo celular, atuando como regulador negativo do crescimento celular em resposta à ocorrência de dano ao DNA com o intuito de restaurar a integridade genômica. Se houver um dano genotóxico ao DNA, a proteína p53 se acumula e bloqueia a replicação para permitir um tempo adicional para a ação dos mecanismos de reparo. Por outro lado, a perda de função do gene p53 está associada a

imortalização celular, resultando em atividade proliferativa aumentada e progressão de tumor, pelo fato de o gene p53 regular negativamente o ciclo celular [60,61] .

A proteína p53, além de promover o reparo do DNA, atua também no controle da apoptose[62,63]. Como um fator de transcrição, a p53 exerce principalmente uma função de supressão tumoral por meio da regulação da transcrição de genes-alvo [64,65,66,67] . Em resposta a uma grande variedade de sinais de estresse intracelular e extracelular, incluindo danos ao DNA, hipóxia e ativação de oncogênese, a p53 se acumula no núcleo através da fosforilação da proteína. Esse processo está associado à ativação da p53, que inibe sua exportação para o citoplasma. Assim, o reparo ocorre com a superexpressão e com o conseqüente acúmulo da proteína p53 selvagem no núcleo, que atua em alvos específicos e por mecanismos de transativação gênica, ativando outros genes e determinando a parada do ciclo celular no início da fase G1 e o reparo do DNA. Caso a lesão seja extensa, a p53 ativa genes envolvidos no mecanismo de apoptose, suprimindo a ação de genes com ação antiapoptótica.

A concentração e atividade de p53 e são reguladas e mantidas sob um rígido controle. Um dos processos para manter os níveis de p53 baixos é a degradação dessa proteína. Nesse contexto, o oncogene *Mouse Double Minute 2* (MDM2) é importante, pois codifica uma proteína de mesmo nome e é um gene ativado pela p53. A proteína MDM2 se associa ao domínio de transativação de p53, inibindo sua transcrição, o que diminui a indução do apoptose e a parada do ciclo celular. Também é responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma da célula. O transporte do complexo MDM2/p53 do núcleo para o citoplasma é mediado por proteínas exportinas que se ligam à MDM2 expondo o p53 a ubiquitinação e a complexos proteolíticos que, no final de suas ações, favorecem o controle negativo de p53. Assim, a MDM2 atua como uma E3-ubiquitina-ligase, a qual se liga nos domínios de transativação da proteína e transporta p53 para o citoplasma, onde é degradada[68].

Estudos recentes revelaram que o p53 regula o metabolismo energético celular[69,70,71,72], e a defesa antioxidante[73], os quais contribuem fortemente para o papel da p53 na supressão de tumores. Esse conceito é apoiado por algumas evidências reportadas na literatura: um estudo recente realizado em camundongos "*knockout*" para p53 revelou que enquanto a deficiência de p53 resulta em elevados níveis de espécies reativas de oxigênio

(ROS) intracelulares, oxidação do DNA e mutações nas células, a suplementação dietética com antioxidante N-acetilcisteína melhora substancialmente a estabilidade do cariótipo e evita o desenvolvimento de tumores precoces, proporcionando um novo paradigma para função da p53 e destacando a importância potencial de antioxidantes no tratamento de câncer[73].

A p53 tem papel chave na regulação de consumo de glicose por induzir a ativação sistemática de várias vias metabólicas e estimular a glicólise. Os efeitos da p53 na glicólise podem ser afetados pela proteína reguladora do apoptose e da glicólise estimulada pela p53 (TIGAR), a qual inibe a glicólise via redução dos níveis de frutose 2,6-bifosfato na célula [69]. Além disso, a p53 inibe a via glicólise aeróbica por meio de regulação dos transportadores de glicose e ainda por meio da inibição de enzimas glicolíticas; a p53 reduz a captação de glicose através da repressão da expressão direta de transportadores de glicose GLUT-1 e GLUT-4 [74]. Através da regulação desses processos metabólicos, a p53 mantém a homeostase do metabolismo celular e o equilíbrio redox em células, o que contribui significativamente para a função da p53 como um supressor de tumor.

2.6. Cross-talk entre ferro e diabetes

Componentes da dieta podem modificar o estado redox do organismo e ser um fator crucial no controle do diabetes e suas complicações. O ferro em excesso pode levar à formação de radicais livres, e conseqüentemente ocasionar danos oxidativos de componentes celulares. Embora o exato mecanismo do envolvimento da sobrecarga de ferro na etiologia da diabetes ainda não esteja devidamente compreendido, acredita-se que possa ser mediado por três fatores principais: (1) deficiência de insulina, (2) resistência à insulina, e (3) disfunção hepática [75,76]. A associação entre a sobrecarga de ferro e diabetes é sugerida pela observação de que a incidência do diabetes é aumentada em pacientes com hemocromatose. a sobrecarga de ferro no fígado pode levar à resistência à insulina; acúmulo de ferro nas células β do pâncreas e, conseqüentemente, apoptose e redução na secreção de insulina, uma vez que as células β têm uma suscetibilidade extrema aos danos oxidativos [75,76,77,78] . Recentemente, em um modelo de camundongo com hemocromatose, foi demonstrado 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 contribui para o risco de diabetes [79] .

A sobrecarga de ferro na dieta é bem descrita em populações tribais da África do Sul. Esse fato é atribuído ao fato de cozinhar alimentos em panelas de ferro e consumir bebidas e cereais cítricos, o que aumenta a absorção do ferro[80]. Resultados obtidos em um estudo realizado na população dos Estados Unidos revelaram uma correlação positiva entre os níveis de ferritina sérica e glicemia de jejum, embora nenhuma correlação fosse encontrada entre a saturação de transferrina e o perfil glicêmico[81]. No entanto, em vista dessas inconsistências e da ausência de dados específicos sobre a utilização de quelantes de ferro ou flebotomia para reverter diabetes ou melhorar o controle glicêmico, é difícil tirar conclusões abrangentes sobre a relação entre a sobrecarga de ferro e diabetes em afro-americanos.

Estudos têm descrito não só um risco significativamente aumentado de diabetes em pacientes com infecção pela hepatite C (HCV), mas também as suas condições associadas, tais como porfiria cutânea tarda [82,83]. Em pacientes com porfiria cutânea tarda (PCT) – uma condição cutânea associada com aumento da sobrecarga de ferro –, até 87% dos pacientes eram intolerantes à glicose[84]. Além disso, a infecção por hepatite C (HCV) é bem conhecida por estar associada com o acúmulo de ferro nas células parenquimais do fígado. Pacientes com HCV crônica muitas vezes têm alta concentração de ferro, alta saturação de transferrina e altas concentrações de ferritina, e alguns têm sobrecarga de ferro hepática grave[85,86]. Esses resultados sugerem que a sobrecarga de ferro tem um papel importante na patogenicidade de HCV, e acelera dano ao fígado.

Pela primeira vez, em 1985, um estudo realizado em população adventista de *Loma Linda* do estado da Califórnia relatou a associação entre consumo de carne vermelha e o risco de diabetes tipo 2 [87]. Desde então, vários estudos confirmaram que essa associação se deve ao conteúdo elevado do grupo heme na carne [88,89,90]. Da mesma forma, as reservas elevadas de ferro têm sido associadas com a resistência à insulina [4,91], síndrome metabólica [92,93,94] e diabetes gestacional [95]. Resultados de um estudo de caso-controle, entre 1989–1990, em mulheres, mostraram que, entre os casos de incidência de diabetes, a concentração média de ferritina no soro foi significativamente superior em comparação com indivíduos de controle, e a razão média entre os níveis de receptores de transferrina e ferritina foi

significativamente menor. Essa relação com marcadores de reservas de ferro persistiu após correção para vários outros fatores de risco para diabetes, incluindo marcadores de obesidade e inflamação, sugerindo que a sobrecarga de ferro (refletida por uma elevada concentração de ferritina e uma proporção menor de receptores de transferrina para ferritina) está associada com um aumento do risco de diabetes tipo 2 em mulheres saudáveis, independentemente de fatores de risco conhecidos para diabetes[96]. Por outro lado, tem sido argumentado que as elevações nos níveis de ferritina observados no diabetes podem ser uma consequência ou um marcador de inflamação e não necessariamente a causa da resistência à insulina iminente; e que a ferritina elevada pode não refletir a quantidade de ferro biodisponível que participa nos danos oxidativos[97].

Interessantemente, mesmo em indivíduos aparentemente saudáveis, a doação de sangue, que resulta na redução das reservas de ferro, tem sido associada com uma baixa incidência de diabetes[98]. Um estudo randomizado em pacientes com diabetes tipo 2 demonstrou que as reservas de ferro influenciam a ação da insulina, e na sequência de flebotomia ao longo de um período de 4 meses, a sensibilidade à insulina é melhorada [99] . Além disso, a doação de sangue foi associada com um aumento na sensibilidade à insulina. Suporte adicional a essa associação também vem de um estudo em pacientes com deficiência de ferro que apresentam uma diminuição da incidência de diabetes[95].

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Tendo em vista o exposto anteriormente, o objetivo principal deste estudo foi investigar possíveis ligações entre ferro e patogênese de diabetes. Para isso, avaliamos o impacto de restrição e suplementação dietética de ferro sobre o estado de ferro corporal, estado redox. Função hepática e os parâmetros relacionados ao metabolismo de glicose.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar a concentração de ferro tecidual e de marcadores do estado corporal em ferro nos ratos;
- Verificar o efeito do ferro dietético no consumo de dieta e ganho de peso de ratos;
- Determinar níveis de glicemia jejum de ratos;
- Determinar a concentração de glicogênio tecidual nos ratos;
- Determinar níveis de peroxidação lipídica (concentração de MDA) e oxidação protéica (concentração de carbonil) nos tecidos de ratos;
- Determinar atividade específica de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase), da gama glutamiltransferase e da NADPH oxidase nos tecidos de ratos;
- Quantificar os transcritos de transportador de glicose 4 (Glut-4), o receptor de insulina (InsR) e a proteína supressora de tumor (p53).

4. METODOLOGIA

4.1. Animais e tratamento:

Os ratos Wistar, machos adultos (523.18 ± 3.5 g de peso) foram aclimatados por 103 dias com dieta comercial (ração para ratos LABINA - marca PURINA), a mesma dieta que recebiam quando estes foram adquiridos. Durante o período de aclimação, perdemos alguns animais e por este motivo, o grupo controle iniciou o estudo com sete animais e o grupo deficiente iniciou o estudo com cinco animais (suplementado ficou com oito animais). Após o período de aclimação, os 20 animais foram distribuídos em três grupos em gaiolas de inox, individuais, sob um ciclo de luz de 12 h, a temperatura controlada (22 ± 2 °C), com acesso livre à água e acesso a dieta apenas durante o ciclo escuro. Os animais foram tratados por 12 semanas com uma das seguintes dietas modificadas em ferro conforme Reeves et al., [100]:

- Dieta Controle: AIN-93M, contendo 35 mg de Fe/kg de dieta, (n=7);
- Dieta restrita em Fe: AIN-93M, contendo 10 mg de Fe/Kg de dieta, (n=5);
- Dieta suplementada com Fe: AIN-93M, contendo 350 mg de Fe/kg de dieta, (n=8);

A dose de suplementação e restrição de ferro foi determinada a partir do valor denominado "Limite Superior Tolerável de Ingestão" (40 mg/dia) descrito para indivíduo adulto de 70 kg, ajustando-se o valor proporcional à recomendação para ratos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil (No. 100.199/2009).

4.2. Ganho de peso e consumo de dieta:

Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da evolução ponderal. O consumo de dieta foi obtido diariamente através da diferença de peso entre a quantidade de dieta ofertada e a sobra.

4.3. Coleta de material:

Após o período de tratamento, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, em dois tubos com e sem EDTA

7,0 % (21 µL/mL sangue) e fígado e músculo esquelético foram removidos, lavados com NaCl, secados em papel toalha para remover o excesso de salina, congelados em nitrogênio líquido e armazenados para análises posteriores.

4.4. Análise Bioquímica:

O hemograma completo e as concentrações séricas de glicose, ferro, transferrina, proteína C reativa (PCR), Aspartato-aminotransferase (AST); Alanina-aminotransferase (ALT); Gama-glutamilttransferase (GGT); Fosfatase alcalina (FALC) obtido na amostra de sangue foram realizados no laboratório SABIN, Brasília-DF.

4.5. Determinação da Concentração de Ferro:

A determinação da concentração de ferro foi feita segundo o método descrito por Baranowska et al.(1995) [101] com modificações. Brevemente, pesou-se aproximadamente 0,1 g de tecido (fígado e músculo esquelético) para determinação da concentração de ferro. A alíquota previamente pesada foi colocada na cápsula de digestão onde adicionou-se 5,0mL de HNO₃PA (Sigma Aldrich®, Alemanha), e 2,5 mL de H₂SO₄ PA (Sigma Aldrich®, Alemanha). Para a digestão das amostras, as cápsulas foram colocadas em forno microondas (DGT 100 Plus - Provecta Analítica) e submetidas ao seguinte programa: 5 min – 330W; 6 min – 700W ; 1 min – 800W; 20 min – 0W (resfriamento) Após a digestão, as amostras foram colocadas separadamente em balão de 25,0mL e o volume completado com HNO₃ 0,1 mol/L(Sigma Aldrich®, Alemanha). Utilizando papel de filtro quantitativo faixa preta, as amostras foram filtradas e armazenadas em tubos sob-refrigeração. A concentração de ferro foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP- AES- Shapes- SpectroflameModulates – SpectroAnalyticalInstruments - Kleve-Germany). Todas as vidrarias utilizadas nas análises foram colocadas em HCl 10% (Sigma Aldrich®, Alemanha) por 3 horas, e posteriormente lavadas com H₂O deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation) antes de serem utilizadas.

4.6. Determinação da Concentração de Glicogênio:

Foram pesadas amostras de 0,1 g do tecido (hepático e muscular) e colocadas em tubo de ensaio de 1,0 mL solução de KOH 30% saturado com NaSO₄ (Sigma Aldrich®, Alemanha). Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria fervente (100 °C) durante 30 min. Após a digestão completa, foram adicionados 2,0 mL de etanol 95% (4°C) (Merck®, Alemanha) para precipitar o glicogênio e em seguida as amostras foram incubadas no gelo por 20 minutos e centrifugadas por 30 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 1,0 mL de água Mili-Q (sistema Milli-Q, Millipore Corporation) sob agitação em vortex. A reação colorimétrica foi obtida pela adição de 1,0 mL de fenol 5% 5,0 ml de ácido sulfúrico e incubado no gelo por 30 minutos [102]. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Shimadzu – TCC 240A) no comprimento de onda de 490 nm [103]. Uma curva de calibração foi obtido num intervalo de 0 a 500 ppm de solução de glicogênio a partir de fígado de bovino (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), para calcular a concentração de glicogênio nos tecidos.

4.7. ANALISE DOS TRANSCRITOS

4.7.1. Extração de RNA total:

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1,0 mL para cada 100 mg de tecido. O procedimento constituiu em homogeneizar 0,1 g de tecido (Ultra-Turrax T8, IKA®- Werke, Alemanha) com 1,0mL do reagente Trizol até a completa dissociação, logo após adicionar 0,2 mL de clorofórmio (Merck®, Alemanha), e misturar por inversão e incubar por 3 min, à temperatura ambiente (15-30°C). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min, 12.000 rpm à 4°C (centrífuga refrigerada 5417-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Coletou-se a fase aquosa transferindo-a para tubo limpo e adicionando 0,5 mL de isopropanol (Merck®, Alemanha), em cada tubo. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 min visando à precipitação do RNA. Ao final do período de precipitação, novamente o material foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e precipitado

lavado com 1,0 mL de etanol 75% (Merck®, Alemanha). Por último, a amostra foi centrifugada novamente a 12,000 rpm por 5 minutos, à 4°C, descartou-se o sobrenadante, deixando secar o sedimento por 10-15 minutos, o qual foi ressuspenso em 20 µL de água Mili-Q (sistema Milli-Q, Millipore Corporation) e armazenado a -80°C.

Apos a extração, a integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese, conforme descrito a seguir: Uma alíquota de RNA total equivalente a aproximadamente 300 ng foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, tampão de corrida TAE 1,0 X (Tris: Shimadzu – TCC 240A Vetec, RJ, Brasil; EDTA: Sigma, MO, EUA; ácido acético: Vetec) e corado com 0,2 µg/mL de brometo de etideo (Sigma, MO, EUA). O gel foi analisado utilizando-se o software LabImage 1D (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Alemanha) para confirmar a ausência de material genético degradado.

A determinação da concentração de pureza das amostras de RNA totais foi verificada através da determinação das absorbâncias a 230, 260 e 280 nm em espectrofotômetro (Shimadzu – TCC 240^a). A concentração de RNA total foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$[RNA] = 40 \times A_{260} \times D$, onde:

[RNA] = concentração de RNA total, em µg/mL,

A₂₆₀ = leitura espectrofotométrica de absorbância no comprimento de onda 260 nm,

D = diluição empregada, em número de vezes diluídas.

A verificação da pureza das amostras de RNA para resquícios de proteína foi feita através da razão A₂₆₀/A₂₈₀ nm, enquanto para a contaminação com compostos aromáticos (como fenóis) foi utilizada a razão A₂₆₀/A₂₃₀ nm. O valor de referência utilizado para avaliar as razões A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₃₀ foi $\geq 1,8$, onde:

A₂₈₀ = leitura espectrofotométrica de absorbância no comprimento de onda 280 nm,

A₂₃₀ = leitura espectrofotométrica de absorbância no comprimento de onda 230 nm.

O RNA foi então tratado com acetato de sódio anidro 3 mol/L, pH 5,2 (Sigma, Saint Louis, MO, EUA); etanol 100% à 4°C (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e incubado a -20°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12,000 rpm a 4°C por 30 minutos (Centrifuga Eppendorf, 5415 R, Hamburgo, Alemanha), o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 1,0 mL de etanol a 75% a 4°C (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). As amostras foram

novamente centrifugadas a 7,000 rpm a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O material foi então secado a temperatura ambiente e posteriormente dissolvido em 20 µL de água Mili-Q. Após esse procedimento, as absorvâncias a 230, 260 e 280 nm foram determinadas e as razões A 260/280 e A 260/230 novamente determinadas para avaliação da pureza e determinação da concentração de RNA no material tratado.

4.7.2. Síntese de cDNA:

Após o procedimento de isolamento do RNA total, foram realizadas transcrições reversas (RT) para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o Kit *Improm II Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, EUA). Para cada amostra foram utilizados 1,0 µg de RNA total, 1,0 µL de oligo dT e 3,0 µL de H₂O MilliQ (sistema Milli-Q, Millipore Corporation). Os tubos foram incubados por 10 min a 70°C e, em seguida, foram reservados em gelo para adição do mix contendo: 4,0 µL de 5x Buffer, 1,0 µL de dNTP (10mM) (Promega, Madison, WI), 3,0 µL de MgCl₂ (25mM), 1,0 µL de enzima IMPROM II reverse (Promega, Madison, WI), e 5,0 µL de H₂O MilliQ (sistema Milli-Q, Millipore Corporation); incubadas por 50 minutos a 42°C e, em seguida, 15 minutos a 70°C. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

4.7.3. Verificação de contaminação por DNA genômica:

Uma reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa foi realizada para cada amostra (controle negativo). Uma alíquota dessa reação controle foi submetida a RT-PCR

4.7.4. Especificidade e validação dos primers para Real Time PCR:

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers, para as reações de polimerase em cadeia, estão descritos na Tabela 1. A eficiência dos primers foi estimada através de uma curva usando diluições em série do cDNA preparado. Cada reação foi feita em triplicata e consistiu de uma mistura 2 µL de cDNA, 3 µL de primer e 5 µL de SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para cada curva padrão, o software procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R², o slope (inclinação da curva) e o y-intercept (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006) mede o quão próximo é o ajuste entre a

regressão linear da curva padrão e os valores individuais de CT das amostras padrão (um valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O slope indica a eficiência de amplificação para o ensaio (um valor de -3,32 representa uma eficiência de 100%), e o y-intercept indica o valor esperado de CT para uma amostra com razão 1. Utilizando-se o slope pôde-se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

Tabela. 1. Primers utilizados para RT- PCR

Nome do gene	Sequencia dos iniciadores	Gene ID
Glut4	F →CTG GGC TGA TGT GTC TGA TGC	NM-012751
	R → CCC CCG ATA CCT CTA CAT	
Insr	F →GGG ATG CAC TTG TTGTTG TG	NM-017071
	R → TTG GCG CTG TGT AAA CTT CA	
Tp53	F → CCCAGGGAGTGCAAAGAGAG	NM-030989
	R → TCTCGGAACATCTCGAAGCG	

F: Oligonucleotídeo iniciador forward ; R: Oligonucleotídeo iniciador reverso

4.7.5. Real Time - PCR

A análise da expressão genica foi feita usando calculo relativo ΔCt . O Ct é o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência é detectada acima da linha basal. Após o calculo da eficiência dos iniciadores, cada reação com volume final de 10,0 μL foi feita em triplicata e consistiu de uma mistura de 2,0 μL de cDNA, 3,0 μL de primer e 5,0 μL de SYBR GREEN PCR Master Mix (AppliedBiosystems). A reação foi incubada no sistema PCR 7500 Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Cingapura). Depois de uma etapa inicial, foram feitos 40 ciclos de 95°C por 2 segundos, 60°C por 3 segundos e 60°C por 20 segundos. 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. O valor do ΔCt foi calculado pela subtração do Ct do gene de referência (β -Actina) 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 genes foi calculada a partir da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

5. Análise estatística:

O tratamento dos dados foi realizado através da estatística descritiva (média e desvio padrão). Uma vez que as distribuições de todas as variáveis eram normais, aplicou-se o teste t nas análises comparativas entre as médias das variáveis entre os grupos controle e testes. O valor de significância estabelecido para todos os testes foi de $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences para Windows®) versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2004).

6. Artigo

“Cross-talk between iron and diabetes:

Dietary iron restriction improves insulin sensitivity and promotes Glut4 transcription without causing anemia”

Azadeh mehdad, Department of Human Nutrition, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Natalia Aboudib Campos , Department of Human Nutrition, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Sandra Fernandes Arruda , Department of Human Nutrition, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Egle Machado de Almeida Siqueira, Department of cellular Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

A running title: Cross-talk between iron and diabetes

Corresponding author: Azadeh Mehdad

azadehmehdad@gmail.com

Department of Nutrition, School of Health Science, University of Brasilia,

Campus Universitario Darcy Ribeiro,

70910-900

Asa Norte, Brasilia _DF.

Brazil

Tel: +55-61-31073100

Funding sources: The National Counsel of Technological and Scientific Development

(Cnpq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES).

Key words: dietary iron; insulin sensitivity; Glut4; p53.

1. Introduction:

A reciprocal influence between iron metabolism and diabetes type 2 was first derived from the observation that the frequency of diabetes is increased in hereditary hemochromatosis (HH) [75,104,105]. In human and mouse model of HH, iron overload results in β -cells oxidative stress and decreased insulin secretory capacity with a compensatory increase in insulin sensitivity that is reversed with iron depletion [106,107]. Indeed, iron depletion through phlebotomy and/or iron chelators reduced hyperinsulinemia, hyperglycemia, and improved liver function in patients with diabetes and non-alcoholic fatty liver diseases [108]. Besides, in apparently healthy people, frequent blood donation seems to have a protective effect against the development of diabetes type 2[98]. Albeit the possible mediators of the association between iron and diabetes risk are not known, oxidative stress and inflammation are thought to be involved in the interplay between iron overload and insulin-resistant disorders [75].

Insulin exerts a wide range of metabolic functions in target tissue_by interacting with specific, high-affinity insulin receptors (InsR), which are down regulated in diabetes, because of hyperinsulinemia and hyperglycemia [109,110]. Iron depletion by deferoxamine (DFO) has been shown to modulate InsR mRNA levels resulting in its increased binding and internalization activity in hepatocytes [111].

The tumor protein p53- a critical mediator of cell cycle arrest and apoptosis- is activated by cellular stress including an increase in reactive oxygen species [112]. Recent findings show that p53 is involved in iron homeostasis and may contribute to growth arrest by reducing the availability of intracellular iron through the inactivation of iron regulatory protein [113]. Hence, iron chelation therapy has been suggested as potential antineoplastic treatment, since iron deprivation can inhibit cell proliferation

and/or induce apoptosis [114]. Several lines of evidence suggest that p53 negatively regulates insulin signaling [115]. Because the glucose transporters mediate glucose uptake, they represent potential regulatory targets of oncogenes. It has been demonstrated that Glut1 and Glut4 promoters, are directly regulated by p53 in a cell type specific manner [74], and p53 can suppress the transcription of glucose transporters along with the insulin receptor to inhibit glucose uptake [116].

Considering that phenotype related to iron overload associated with pathological conditions differs from that caused by dietary iron excess, our study set out to evaluate the impact of dietary iron manipulation on serum glucose levels; glycogen concentration and transcription of Glut4, Insr and p53 in muscle, in apparently healthy adult rats. Our data showed that iron deprivation improves insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle without inducing anemia. Moreover, dietary iron restriction can prevent or promote oxidative damage in a tissue-specific manner, emphasizing the importance of maintaining optimal iron intake.

2. Methods and materials:

2.1. Animals and diets

Adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), approximately 15 months, were purchased from Biotecnologia Planalto, Planaltina, DF, Brazil, and housed individually in stainless – steel cages, inside a room at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with light from 08.00 to 20.00 hours and dark from 20.00 to 08.00 hours. Rats were routinely maintained on a regular Purina ® chow for rodent containing about 200 mg iron/kg of diet (a diet corresponding to the iron present in the rodent chow), for nearly 3 months before starting the experimental diet. All handling and management procedures were carried out in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the

University of Brasilia (UnB) (No. 100.199/2009). After that period, rats were divided into the three groups with similar body weight distribution (523.18 ± 3.5 g) and placed on their respective iron diet, for the period of 12 weeks, as follows: (i) the control diet, the American Institute of Nutrition -93M (AIN-93M) [117], a widely used purified diet for laboratory rodents formulated with 35 mg of iron/kg of diet, an amount considered to meet the minimum requirement of iron for normal growth and hematopoiesis (n=7); (ii) iron-restricted diet (IRD) containing 10 mg of iron/kg of diet which was the lowest concentration possible to achieve due to iron contamination of the other diet ingredients (n=5); (iii) and the iron- supplemented diet (ISD) by supplementing the AIN-93M with ferrous sulphate to reach a final concentration of 350 mg of iron/kg of diet which was estimated from the “tolerable upper limit intake” for humans (70 kg, adult), adjusting the value proportionally to the recommendation for rats, (n=8). Ferrous sulphate was used as an iron source because it is highly bioavailable and often used in iron supplementation and for food fortification. The diet was prepared weekly, freeze-dried and stored at 4°C. The rats were fed between 16.00 h and 08.00 h, weighed weekly, and the food intake was recorded daily throughout the treatment. They had free access to water. Following an overnight fast, anesthesia was induced and maintained with 1-2% isoflurane. Blood samples was collected with heparinized syringes into the tubes with and without EDTA 7.0% (21 ml/ml blood), by cardiac puncture from all the animals and then, serum was harvested from centrifuged blood ($3,000 \times g$ for 15 min). Liver and skeletal muscles were dissected out, washed with ice-cold saline, weighed and immediately plunged into liquid nitrogen, and then transferred to a -80 °C freezer until assay.

2.2. Blood parameters

Blood was drawn for a complete blood count using an automated hematological analyzer. C-reactive protein concentration (CRP) was measured using an immunoturbidimetric method, which is based on the agglutination of latex particles coated with anti-CRP antibodies when they are mixed with serum containing CRP. The iron parameters for serum iron, transferrin saturation and transferrin concentration were determined using the colorimetric ferrozine-based assay. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities were by kinetic colorimetric assay. All parameters were measured by the Sabin[®] Laboratory (Distrito Federal, Brazil).

2.3. Hepatic and muscle iron determination

The concentration of iron in tissues was determined using the method described by Baranowska et al. (1995) [118]. Briefly, samples of liver and skeletal muscle were digested with 5 mL concentrated HNO₃ (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and 2.5 mL H₂SO₄ (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in a Provecto Analitica Microwave System (DGT 100 Plus, Jundiai, Sao Paulo, Brazil, 2003). After digestion, the samples were resuspended in 0.1 mol/L nitric acid to a final volume of 25 mL. The concentration of iron in the samples was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP – AES/Spectro, Kleve, Germany) using a 238 nm line. A calibration curve was obtained for the range from 0 to 10 ppm solution of Fe-Merck Titrisol (Merck, Darmstadt, Germany) to calculate the concentrations of iron in the tissues.

2.4. Hepatic and muscle glycogen determination

The concentration of glycogen in tissues was determined using the method described by Lo et al. (1970) [103]. Samples of liver and skeletal muscle were hydrolyzed in 1 mL of 30% (wt/vol) KOH solution in a boiling water bath for 30 min. At 20 min of the incubation, tubes were shaken by hand to facilitate the digestion. After cooling to room temperature, 2 mL of ethanol (95%) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) were added, the samples were boiled again for 5 min to facilitate precipitation of glycogen and then centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min. The Glycogen precipitates were dissolved in water and analyzed by the phenol sulfuric acid calorimetric method [103]. The absorbance of the samples was measured at 490 nm (spectrophotometer Shimadzu – TCC 240A). A calibration curve was obtained for the range from 0 to 500 ppm solution of glycogen from bovine liver (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) to calculate the concentrations of glycogen in the tissues.

2.5. Oxidative stress markers

2.5.1. Lipid peroxidation assay

The formation of malondialdehyde (MDA) in liver and skeletal muscle homogenates were measured by a high-performance liquid chromatographic system (15 cm Shim-park C18 CLC-ODS (M) column Shimadzu, Kyoto, Japan) as described previously [119]. Briefly, 1 mL of 1% sulfuric acid (H_2SO_4) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to 0.1 g of tissue and homogenized in an Ultra-Turrax homogenizer (Ultra-Turrax T8, IKA - Werke, Staufen, Germany). The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at $4^\circ C$. An aliquot of 250 μL of the supernatant was mixed with 375 μL of 440 mmol/L phosphoric acid (H_3PO_4) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and 125 μL of 42 mmol/L 2-thiobarbituric acid (TBA) (Sigma, St. Louis, MO,

USA) and heated at 100°C for 1 h. After cooling, 500 µL of this mixture was mixed with 500 µL of a 91:9 mixture of MeOH and 1 mol/L NaOH(Sigma, St. Louis, MO, USA). The resulting precipitation solution was centrifuged at 12,000 × g for 5 min at 4°C, and the supernatant was filtered using a 13 mm, 0.45 µm, Tuffryn membrane filter (Gelman Sciences). Aliquots of 20-30 µL of the tissues samples were injected onto a HPLC. The spectrofluorometric detector wavelengths were set at 532 nm (excitation) and 553 nm (emission). A four-point standard curve (0.81–16.16 nmol/mL) was made with tetraethox-ypropane (TEP) (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in 1% H₂SO₄, as acid hydrolysis of TEP yields stoichiometric amounts of MDA (column 15 cm: $y = 7.1027620.132; r^2 = 0.9903$ and column 25 cm: $y = 7.10\ 266+0.0473; r^2 = 0.9974$). The results were expressed as nmol MDA/mg total protein. The total protein concentration of the homogenates was determined by the method as previously described [120].

2.5.2. Carbonylated protein assay

For determination of oxidatively modified proteins in liver and skeletal muscle, the carbonyl formation was assayed [121]. The absorbance of the samples was measured at 376 nm (spectrophotometer Shimadzu – TCC 240A), and the carbonyl content was expressed as nmol carbonyl groups/mg total protein using an extinction coefficient of 22.000 mM⁻¹cm⁻¹. The total protein concentration of the homogenates was determined by the method as previously described [120].

2.6. Measurement of enzyme activities

Preparation of extracts for enzyme assays: Aliquots of liver and skeletal muscle were homogenized (Ultra-Turrax T8, IKA - Werke, Staufen, Germany) using 0.5 mol/L potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing 50 mmol/L EDTA and 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 4°C. The homogenate

was centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min and the supernant was used immediately to determine the enzyme activities.

2.6.1. Catalase activity:

The activity of catalase was quantified by the consumption of 10 mmol/L of H_2O_2 at 240 nm (spectrophotometer Shimadzu –TCC 240A) in buffer containing 10–50mL of tissue homogenates. Blanks were run without H_2O_2 . One unit of catalase was defined as the amount of enzyme required to decompose 1mmol of H_2O_2 /min [122].

2.6.2. Glutathione Peroxidase activity:

Glutathione peroxidase activity was quantified using H_2O_2 as a substrate in a coupled assay with Glutathione Reductase-catalyzed oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm (spectrophotometer Shimadzu – TCC 240A). First, the basal consumption of 0.15 mmol/L of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate was measured in buffer containing 2 mmol/L of azide, 5 mmol/L of glutathione (GSH), 1.5 U of glutathione reductase and 10–50 mL of tissue homogenates. Then, 20mL of H_2O_2 was added to a final concentration of 0.2 mmol/L. Blanks were run without tissue homogenate. One unit of glutathione peroxidase was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/min [122].

2.6.3. Glutathione Reductase activity:

Glutathione reductase (GR) activity was quantified by spectrophotometry (spectrophotometer Shimadzu - TCC 240A) at 340 nm, where the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate was monitored for 20 seconds. Tissue homogenate activity (75–250mL) was measured in 50 mmol/L of potassium phosphate

buffer (pH 7.2) containing 0.5 mmol/L of ethylenedia-minetetra-acetic acid, 0.2 mmol/L of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and 1 mmol/L of glutathione oxidized (GSSG) [122]. Blanks were run only with GSSG. One unit of glutathione reductase was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/min.

2.6.4. Glutathione-S-transferase activity:

The Glutathione-S-transferase (GST) activity was measured by following the conjugation of 1 mmol /L of GSH with 1 mmol /L of 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene at 340 nm (spectrophotometer Shimadzu - TCC 240A) in 50 mmol/L of potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 50 mL of tissue homogenate [123]. One unit of GST was the amount of enzyme required to yield 1 nmol of product/min.

2.6.5. NADPH Oxidase activity:

The NADPH oxidase (Nox) activity was measured spectrophotometrically (Spectrophotometer, Shimadzu – TCC 240A) at 340 nm by following the reduction of NADPH through its consumption by the NADPH oxidase [124]. The assay was monitored over 300 seconds and the assay buffer contained 50 mmol/L of potassium phosphate buffer (pH 7.2) with 0.5 mmol/L of ethylenediaminetetra-acetic acid, 0.1 mmol/L of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and 125–250mL of tissue homogenate. The rate of NADPH oxidation was calculated using a molar extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. One unit of NADPH oxidized was the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol of NADPH/min.

2.7. Total RNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (PCR):

Total RNA was isolated from hepatic and skeletal muscle was performed using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Briefly, 100 mg of tissue were homogenized in 1 mL of TRIzol using an Ultraturrax homogenizer, (UKA, Deutschland, Germany). After extraction, RNA from the aqueous phase was precipitated using isopropyl alcohol, washed with 70% ethanol and then was dissolved in deionized water. The integrity of the RNA was assessed by electrophoretic profile on 1% agarose, 1,000 x GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, California, USA), and Tris/Boric acid/Ethylenediamine tetraacetic acid buffer solution 1x gels (Sigma, St. Louis, MO, USA). The gel was analysed using the software 1D LabImage (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Germany) to confirm the absence of degraded genetic material. The RNA samples were quantified by measuring their absorbance at 230, 260 and 280 nm (UV-visible Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England). The purity of RNA was verified by assessing the presence of proteins with the 260/280 nm ratio, while the presence of aromatic compounds, such as phenols, was assessed with the ratio 260/230 nm. The benchmark used to evaluate these ratios was greater than or equal to 1.8. Total RNA was then precipitated using anhydrous sodium acetate at 3 mol/L and pH 5.2 (0.1 vol) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 100% ethanol (2.5 vol) at 4°C (Sigma, St. Louis, MO, USA, 2.5 times the volume 825mL) and incubated at 220°C overnight. After incubation, the samples were centrifuged at 10000 × g at 4°C for 30 min (Centrifuge Eppendorf 5415R, Hamburg, Germany). Ethanol (1 mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to the pellet and it was centrifuged at 10000 × g for 5 min at 4°C, dried at room temperature and diluted in 20 mL of deionized water. After this procedure, the absorbance at 230, 260 and 280 nm was determined (UV-visible Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)

and the A260/A280 and A260/A230 ratios were again determined to assess the purity and concentration of the RNA in the treated material. Total RNA (1 µg) was used for the cDNA synthesis reactions (20 µL final volume) using an ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, USA). Oligo(dT) primers were added to the total RNA and denaturation was at 70°C for 5 min. ImProm-II Reverse Transcriptase was added, and the samples were incubated at 42°C for 50 min, followed by inactivation at 70°C for 15 min. An attempt at cDNA synthesis without the reverse transcriptase enzyme was performed for each sample (negative control). An aliquot of the reaction control (no reverse transcriptase) was subjected to RT-PCR using a reaction system that had been tested and the oligonucleotide sequences had previously been used by other authors and described in scientific articles to confirm the absence of amplified genetic material. Real-time PCR was carried out using the Fast SYBR Green Master Mix 2x reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 2.0 µL of cDNA (corresponding to 0.6 ng of total RNA) in a final volume of 10 µL, 5 µL Fast SYBR Green Master Mix and 0.2 µmol/L (final concentration) of each primer. The following oligonucleotides were used as PCR primers: p53 (NM-030989), sense: 5' CCC AGG GAG TGC AAA GAG AG-3', antisense: 5'-TCT CGG AAC ATC TCG AAG CG-3'; Insr (NM-017071) sense: 5'- GGG ATG CAC TTG TTG TTG TG-3', antisense: TTG GCG CTG TGT AAA CTT CA-3'; Glut4 (NM-012751), sense: 5'- CTG GGC TGA TGT GTC TGA TGC-3', antisense: 5'- CCC CCG ATA CCT CTA CAT-3'; and β-actin (Actb), sense: GTC GTA CCA CTG GCA TTG TG; antisense: CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA (NM_031144.3). Quantitative PCR was performed using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Cingapura) for 40 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 3 s and 60°C for 20 s. The amplification specificity of each amplified product was verified using a melting curve. The PCR amplification efficiency was

evaluated by running standard curves for each amplicon in different template dilutions. A standard curve was plotted for each studied gene correlating the ΔC_T (C_T gene of interest – C_T internal control) versus the log of the cDNA amount. A slope value of the regression line plot of ΔC_T values vs. log of input nucleic acid < 0.1 was used as a general criterion to accept the validation of the experiment, and a slope value of the regression line plot of C_T values vs. log of input nucleic acid ~ -3.32 was considered as an efficient reaction. The concentration of gene-specific mRNA in treated samples relative to untreated samples was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formula as follow [125]:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ treatment group}] - [(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ control group}]$$

Results are shown as fold changes compared to the control group, being expresses in arbitrary units.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Histograms represent means (bars) \pm S.D. (brackets); $n=7$ for the control group, $n=5$ for the IRD group, and $n=8$ for the ISD group. The data obtained from the three groups were analyzed by independent sample test t-test for equality of means. Differences were considered significant when the P value was less than .05.

3. Results

3.1. Body weight and food intake:

During the experimental period, body weight loss was observed across all groups, but at the end of treatment, rats fed with iron-restricted diet showed greater

weight loss than those fed with the control diet ($p=0.024$). The daily food intake was significantly lower in iron-restricted diet rats than the control ($p<0.001$) (Table 1).

3.2. Hematological variables and serum iron status:

Although the hemoglobin concentration did not differ statistically among the groups, however, its values trended toward an increase through the iron-restricted diet ($p=0.06$). Hematocrit levels were higher in the iron-restricted and iron-supplemented diet than in the control group ($p=0.036$ and $p=0.025$, respectively). No differences in numbers of red blood cells, mean corpuscular volume, and mean corpuscular hemoglobin value were found. The other parameters (numbers of lymphocytes, monocytes and leukocytes) did not alter across all groups. With regard to the circulating iron status, serum iron concentration significantly increased in iron-supplemented diet group ($p=0.034$); however, its concentration did not significantly altered in the rats fed iron-restricted diet. Although statistical difference was not reached in total iron binding capacity (TIBC) and in transferrin concentrations, a strong trend towards decreased values of transferrin saturations induced by iron-restricted diet was observed ($p=0.084$) (Table 2).

3.3. Hepatic function, C-reactive protein levels and fasting blood glucose:

The iron-supplemented diet induced higher levels of aspartate aminotransferase (AST) ($p=0.035$), however, did not change ALT levels. Iron-restricted diet did not cause any alterations in AST and ALT levels. Mean values of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) were significantly increased by iron-supplemented diet ($p=0.019$) (Table 3). Lower levels of C-reactive protein (CRP) were found in rats fed with iron-supplemented diet relative to the control group ($p=0.047$). Even though significance was not reached in fasting blood glucose levels among the groups, nonetheless, its values trended toward a decrease through the iron-restricted diet ($p=0.055$) (Figure 1).

3.4. Iron deposition in liver and skeletal muscle:

Iron-supplemented group showed a significant elevation in liver iron concentration ($p=0.005$). A slight increase in hepatic iron concentration in rats fed with iron-restricted diet was observed; nevertheless, significant difference was not reached ($p=0.066$; Figure 2). In skeletal muscle, reduced levels of iron induced by the iron-restricted and iron-supplemented diets were observed ($p=0.001$ and $p=0.049$, respectively; Figure 2).

3.5. Liver and skeletal muscle glycogen content:

Liver glycogen content was markedly reduced in iron-restricted group ($p=0.007$; Figure 3); while in skeletal muscle, the glycogen content was significantly augmented ($p<0.001$; Figure 3). In iron-supplemented group, no significant difference was found in both tissues.

3.6. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant enzyme activity:

Iron-restricted diet led to a concurrent decrease in lipid peroxidation and protein oxidation in the liver ($p=0.005$ and $p=0.029$, respectively). In rats fed with iron-supplemented diet, increase levels of protein oxidation, as indicated by carbonyl formation, were found ($p = 0.033$) (Figure 4B); however, MDA levels did not differ among the groups (Figure 4A). In skeletal muscle, carbonyl formation was significantly higher in rats fed with iron-restricted ($p=0.006$) and the iron-supplemented ($p=0.008$) (Figure 4B), though, MDA levels was not affected by either iron-restricted or iron-supplemented diets (Figure 4A). In addition, iron-restricted diet led to a greater activity of NADPH oxidase in liver ($p < 0.001$); however, this activity had no change in skeletal muscle (Figure 5C). Of the antioxidant enzymes measured, the activities of GR, GPx,

GST and CAT did not differ in liver and skeletal muscle, across all groups (Figure 5A, 5B).

3.7. Quantification of Glut4, Insr and p53 transcription in tissues:

In liver, iron-restricted diet promotes p53 expression (up to 1.5-fold, $p=0.006$); nevertheless, its expression in iron-supplemented group remained unchanged (Figure 7). Gene expression analysis in skeletal muscle showed up-regulation of Glut4 gene (up to 2-fold, $p=0.011$) and also Insr gene (up to 4-fold, $p=0.002$) in iron-restricted group. The p53 mRNA levels in iron-restricted group as well as in iron-supplemented group were decreased ($p=0.010$ and $p<0.001$, respectively) (Figure 6).

4. Discussion:

Evidence suggests that iron overload may favor diabetes and iron depletion may decrease this risk. In this study, we investigated the impact of high and low iron diet on the glucose and glycogen levels; insulin sensitivity and glucose transporter transcription in skeletal muscle; and the redox status in adult rats. Because p53 is a redox regulated transcription factor [126] and also p53 is able to contribute to the regulation of insulin sensitivity [116]; we then investigated whether those alterations were modulated by p53 transcription.

Our results showed that dietary iron restriction induces a slight decreased in fasting glucose (Fig 1), increased glycogen concentration and up regulated Insr and Glut4 transcription in the skeletal muscle (Fig 4) without causing anemia. A reduction on cellular oxidative damage seems not be involved in insulin-stimulated glucose transport because iron restriction did not reduce oxidant damage and, in contrary, an increased protein oxidation in skeletal muscle was observed.

It has been shown that tumor protein p53 can repress the transcription of Glut4 along with the insulin receptor, leading to the inhibition of cellular glucose uptake [116]. In the present study, the mRNA levels of p53 were lower in the muscle of rats fed iron-restricted diet (Figure 4). This result suggests that iron restriction induces the expression of Glut4 and Insr by down regulation of p53 in skeletal muscle.

Earlier studies have been shown that, an iron chelator, deferoxamine, stabilizes the hypoxia- inducible factor 1 α expression (HIF-1 α), which increased glucose transporter expression (Glut-1) in hepatic tissue [111]. Furthermore, iron depletion has been shown to increase nuclear HIF-1 α expression in the pancreas [127]. A tumor suppressor p53 promotes the ubiquitin-mediated degradation of HIF-1 α via recruitment of an E3 ubiquitin–protein ligase (Mdm2), and loss of p53 function increases HIF-1 α activity [128]. Taken together, although we did not measure HIF-1 α expression in skeletal muscle, a concurrent iron depletion and down regulation of p53 leads to the speculation that dietary iron restriction may promotes glucose transporter expression through the up-regulation of HIF-1 α . Moreover, we found the accumulation of glycogen in muscle of rats fed iron-restricted diet. This increase in the intracellular storage of glucose also may attributable to the stabilization of HIF-1 α induced by iron depletion in skeletal muscle; nevertheless, it might seem paradoxical since anaerobic glycolysis is characterized by increased glucose demand. Recent findings showed a significant increase in glycogen synthase activity and glycogen accumulation in myoblasts exposed to hypoxia [129]. In the present study, we observed the up-regulation of Glut4 by iron-restricted diet; thus, a concomitant increase in glycogen levels and Glut4 mRNA levels in the skeletal muscle point out to the possible up-regulation of HIF-1 α . In accordance with our results, it has been proposed that glycogen synthase (GYS1) promoter is

induced by HIF-1 α , suggesting that HIF-1 α stimulates glycogen synthesis and repress its degradation [129].

Quite the contrary, in the liver of rats fed with iron-restricted diet, despite the low levels of oxidative stress, we found up-regulation of p53 and higher activity of NADPH oxidase. Considering that NADPH oxidase is a principal producer of reactive oxygen species (ROS) in many tissues [130,131,132] and superoxide anion and oxidant drives from it by complex chain reactions are main contributors in the defense of against invading foreign microorganisms [133], it seems reasonable to assume that the up regulation of p53 is a response to the higher activity of NADPH oxidase, even though dietary iron restriction did not induce overt liver injury, as indicated by serum aminotransferase levels and organ weight. Evidences have also been shown that high levels of ROS activate p53, which in turn leads to the p53-mediated apoptosis and senescence [115,134,135]. This seems inconsistent with the low levels of lipid and protein oxidation markers found in the liver, however, the reason is not clear. Probably, other competitive antioxidant mechanism such as the effect of weight loss or apoptosis induced by activation of p53 may have been hidden the oxidative damage. Moreover, the lack of alteration in antioxidant enzymes activity in rats fed iron-restricted diet might also be due to the fact that this group consumed less and lost more weight during the treatment than those rats fed the control diet. Evidences suggest that caloric restriction protect tissues against oxidative stress [136,137,138].

Recent findings show that iron depletion mediates cell arrest and apoptosis through the activation of p53 [139,140]. It has been shown that monocytes of individuals homozygous for the C282Y HFE mutation (that are relatively iron poor due to inability to retain iron) had lower p53 levels than their normal counterpart, suggesting that down-regulation of p53 improves cell survival in the presence of iron depletion. In

the present study, we observed down-regulation of p53 due to iron deprivation in skeletal muscle while in the liver the p53 was up-regulated. Together, these data suggest that p53 expression responds to dietary iron deprivation in a cell type specific manner.

It is well known that skeletal muscle cells continuously generate ROS, and aging reduces the ability for muscles to buffer oxidants leading to the oxidative damages [141]. Previous studies have been shown that iron deficiency causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in liver, heart, skeletal muscle and blood cells, however, the skeletal muscle was more severely affected than liver [142], and it might be caused by decreased heme level and complex IV activity [143,144]. This fact may explain the increased oxidative damage to proteins observed in the skeletal muscle of rats fed either iron-restricted or iron-supplemented diet because both these groups had lost iron. Besides, iron depletion induced- protein damage in both these groups may have have damaged the integrity of the mitochondrial membrane, resulted in decreases of DNA synthesis and DNA repair [145].

In the present study, the iron restricted-diet did not cause a significant reduction of serum iron or hepatic iron concentration. Decreasing iron supply may increase intracellular iron trafficking from iron store in ferritin and hemosiderin, catalyzing some of the oxidant-induced damage due to the increase iron availability [144]. Moreover, concurrent increases in hematocrit levels with slight decrease in transferrin saturation suggest a reduction in iron mobilization in rats fed iron-restricted diet. Besides the possibility of hemoconcentration should be considered because these animals lost more weight as compared to the control rats.

As expected the high diet iron led to the iron overload and increase oxidative stress in tissues, as indicated by increased serum and hepatic iron concentration and also

increased protein oxidation. Iron supplementation also led to the liver injury as indicated by serum AST and GGT levels. However, no alteration in insulin-stimulated glucose transport, glycogen synthesis and fasting blood glucose was observed.

Taken together and considering limitations in the present study, our results suggest that dietary iron restriction enhances insulin receptor expression and promotes glucose transporter transcription in skeletal muscle without causing iron deficiency anemia. Furthermore, the hepatic up-regulation of p53 induced by iron restriction supports the antiproliferative activity of iron chelators as shown previously [112,146,147]. However, down-regulation of p53 in skeletal muscle due to iron deprivation suggests that iron modulates p53 transcription in a context-dependent and cell type-specific manner. These findings also suggest iron restriction can promote and prevent oxidative damage in a tissue-specific manner, because the response of cells to iron deprivation is complex with multiple molecules and signaling pathways being involved. In conclusion, our results imply that both iron deficiency and excess from daily supplementation are undesirable and emphasize the importance of maintaining optimal iron intake. Further studies are warranted to evaluate the functional and clinical outcomes of dietary iron restriction on healthy and diabetic subjects.

References:

1. Ford ES, Cogswell ME (1999) Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 22: 1978-1983.
2. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W (2002) Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 51: 2348-2354.
3. Utzschneider KM, Kowdley KV (2010) Hereditary hemochromatosis and diabetes mellitus: implications for clinical practice. *Nature reviews Endocrinology* 6: 26-33.
4. Cooksey RC, Jouihan HA, Ajioka RS, Hazel MW, Jones DL, et al. (2004) Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology* 145: 5305-5312.
5. Cooksey RC, Jones D, Gabrielsen S, Huang J, Simcox JA, et al. (2010) Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (*ob/ob lep^{-/-}*) mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1236-1243.
6. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, et al. (2007) Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *The American journal of gastroenterology* 102: 1251-1258.
7. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci E, Willett WC, Stampfer MJ (2001) Blood donations and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 103: 52-57.
8. Briata P, Gherzi R, Adezati L, Cordera R (1989) Effect of two different glucose concentrations on insulin receptor mRNA levels in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 1415-1420.
9. Nakajima K, Yamauchi K, Shigematsu S, Ikeo S, Komatsu M, et al. (2000) Selective attenuation of metabolic branch of insulin receptor down-signaling by high glucose in a hepatoma cell line, HepG2 cells. *J Biol Chem* 275: 20880-20886.
10. Dongiovanni P, Valenti L, Ludovica Fracanzani A, Gatti S, Cairo G, et al. (2008) Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *The American journal of pathology* 172: 738-747.

11. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, et al. (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 392: 405-408.
12. Zhang F, Wang W, Tsuji Y, Torti SV, Torti FM (2008) Post-transcriptional modulation of iron homeostasis during p53-dependent growth arrest. *The Journal of biological chemistry* 283: 33911-33918.
13. Simonart T, Degraef C, Andrei G, Mosselmans R, Hermans P, et al. (2000) Iron chelators inhibit the growth and induce the apoptosis of Kaposi's sarcoma cells and of their putative endothelial precursors. *J Invest Dermatol* 115: 893-900.
14. Bensaad K, Vousden KH (2007) p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol* 17: 286-291.
15. Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004) The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer research* 64: 2627-2633.
16. Maddocks OD, Vousden KH (2011) Metabolic regulation by p53. *J Mol Med (Berl)* 89: 237-245.
17. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
18. Baranowska I, Czernicki K, Aleksandrowicz R (1995) The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. *Sci Total Environ* 159: 155-162.
19. Lo S, Russell JC, Taylor AW (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of applied physiology* 28: 234-236.
20. Candan N, Tuzmen N (2008) Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Neurotoxicology* 29: 708-713.
21. Hartree EF (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry* 48: 422-427.
22. Richert S, Wehr NB, Stadtman ER, Levine RL (2002) Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. *Archives of biochemistry and biophysics* 397: 430-432.

23. Joannisse DR, Storey KB (1996) Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *The American journal of physiology* 271: R545-553.
24. Habig WH, Jakoby WB (1981) Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods in enzymology* 77: 218-231.
25. Souza HP, Liu X, Samouilov A, Kuppasamy P, Laurindo FR, et al. (2002) Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 282: H466-474.
26. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.
27. Bykov VJ, Lambert JM, Hainaut P, Wiman KG (2009) Mutant p53 rescue and modulation of p53 redox state. *Cell cycle* 8: 2509-2517.
28. Minamiyama Y, Takemura S, Kodai S, Shinkawa H, Tsukioka T, et al. (2010) Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1140-1149.
29. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, et al. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14: 34-44.
30. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, et al. (2010) Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One* 5: e9644.
31. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS (1994) NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *The American journal of physiology* 266: H2568-2572.
32. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology* 91: 7A-11A.
33. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 29-38.
34. Halliwell B (2006) Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci* 31: 509-515.
35. Martindale JL, Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192: 1-15.

36. Derdak Z, Lang CH, Villegas KA, Tong M, Mark NM, et al. (2011) Activation of p53 enhances apoptosis and insulin resistance in a rat model of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 54: 164-172.
37. Antebi A (2007) Ageing: when less is more. *Nature* 447: 536-537.
38. Goto S, Takahashi R, Radak Z, Sharma R (2007) Beneficial biochemical outcomes of late-onset dietary restriction in rodents. *Ann N Y Acad Sci* 1100: 431-441.
39. Sharma S, Kaur G (2007) Intermittent dietary restriction as a practical intervention in aging. *Ann N Y Acad Sci* 1114: 419-427.
40. Saletta F, Suryo Rahmanto Y, Noulisri E, Richardson DR (2010) Iron chelator-mediated alterations in gene expression: identification of novel iron-regulated molecules that are molecular targets of hypoxia-inducible factor-1 alpha and p53. *Mol Pharmacol* 77: 443-458.
41. Saletta F, Suryo Rahmanto Y, Siafakas AR, Richardson DR (2011) Cellular iron depletion and the mechanisms involved in the iron-dependent regulation of the growth arrest and DNA damage family of genes. *J Biol Chem* 286: 35396-35406.
42. Clanton TL, Zuo L, Klawitter P (1999) Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 253-262.
43. Dallman PR (1986) Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annu Rev Nutr* 6: 13-40.
44. Atamna H, Liu J, Ames BN (2001) Heme deficiency selectively interrupts assembly of mitochondrial complex IV in human fibroblasts: relevance to aging. *J Biol Chem* 276: 48410-48416.
45. Walter PB, Knutson MD, Paler-Martinez A, Lee S, Xu Y, et al. (2002) Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2264-2269.
46. Furukawa T, Naitoh Y, Kohno H, Tokunaga R, Taketani S (1992) Iron deprivation decreases ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis. *Life Sci* 50: 2059-2065.
47. Buss JL, Torti FM, Torti SV (2003) The role of iron chelation in cancer therapy. *Curr Med Chem* 10: 1021-1034.

48. Yu Y, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Siafakas AR, Jansson PJ, et al. (2009)
Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just
ribonucleotide reductase inhibitors. *J Med Chem* 52: 5271-5294.

Table 1

	Control	IRD	ISD
Body wt, g			
<i>Initial</i>	527.1 ± 43.3	522.0 ± 68.4	520.4 ± 46.9
<i>Final</i>	506.7 ± 38.5	474.7 ± 87.1	471.8 ± 48.5
Δ	- 20.5 ± 19.2	- 47.3 ± 37.6 *	- 48.5 ± 27.5 *
Food intake, g	23.1 ± 2.3	21.5 ± 3.0 *	23.0 ± 2.4

Table 1. Initial and final body weight and daily food consumption in rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 weeks. Values are mean ± SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * p < 0.05; Δ: weight change.

Table 2

	Control	IRD	ISD
RBC (M/mm ³)	8.6 ± 0.5	8.9 ± 0.7	8.8 ± 0.4
Hb (g/dL)	16.0 ± 0.8	16.5 ± 0.6	16.2 ± 0.8
Htc (%)	45.9 ± 2.3	47.4 ± 1.7 *	47.4 ± 2.1*
MCV (fl)	53.3 ± 1.9	53.4 ± 3.5	54.2 ± 1.9
MCH (pg)	18.6 ± 0.6	18.6 ± 1.0	18.5 ± 0.6
Iron (µg/dL)	214.8 ± 120.6	164.0 ± 99.7	346.5 ± 78.3 *
Transferrin (µg/dL)	283.8 ± 49.2	294.1 ± 25.2	320.8 ± 32.6
TIBC (µg/dL)	405.4 ± 66.0	420.2 ± 36.1	458.4 ± 46.5
TS (%)	63.7 ± 19.8	39.6 ± 23.6	75.1 ± 13.2

Table 2. Hemoglobin, hematocrit, blood cells levels and serum iron status in rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 weeks. Values are mean ± SD, n=6. Symbol indicate that means differ compared with the control group, * p < 0.05; RBC: red blood cells; Hb: hemoglobin; Htc: hematocrits; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; TIBC: total iron binding capacity; TS: transferrin saturation

Table 3

	Control	IRD	ISD
Liver wt (g)	12.7± 2.0	12.4 ± 1.3	11.1 ± 2.0
CRP (mg/dL)	0.48 ± 0.06	0.56 ± 0.12	0.38 ± 0.11 *
ALT (U/L)	92.2 ± 48.8	57.2 ± 19.5	156.5 ± 99.8
AST (U/L)	355.8 ± 140.1	440.6 ± 173.4	735.7 ± 328.3*
ALP (U/L)	62.3 ± 15.6	61.0 ± 13.9	65.7 ± 21.5
GGT (U/L)	1.6 ± 1.1	1.4 ± 0.8	6.9 ± 5.3 *

Table 3. Liver weight and hepatic enzymes activity in rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 weeks. Values are mean ± SD. Symbol indicate that means differ compared with the control group, * p < 0.05; CRP: C-reactive protein; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase.

Figure 1

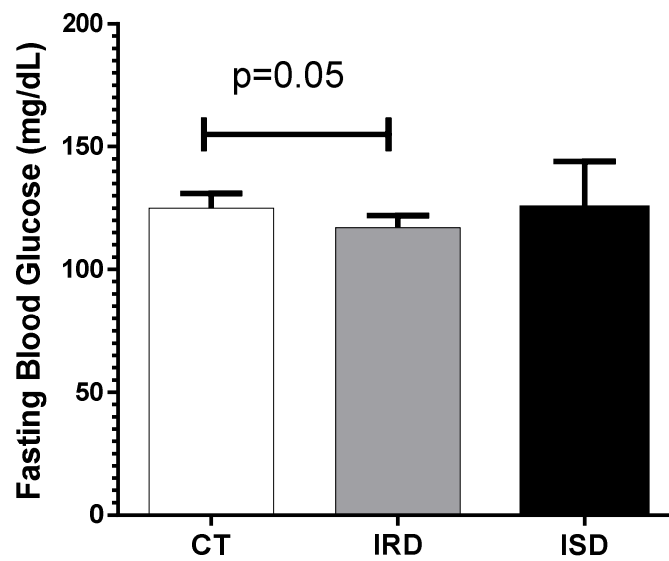


Figure 1. Fasting blood glucose levels in rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 wk. Values are mean \pm SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * $p < 0.05$.

Figure 2

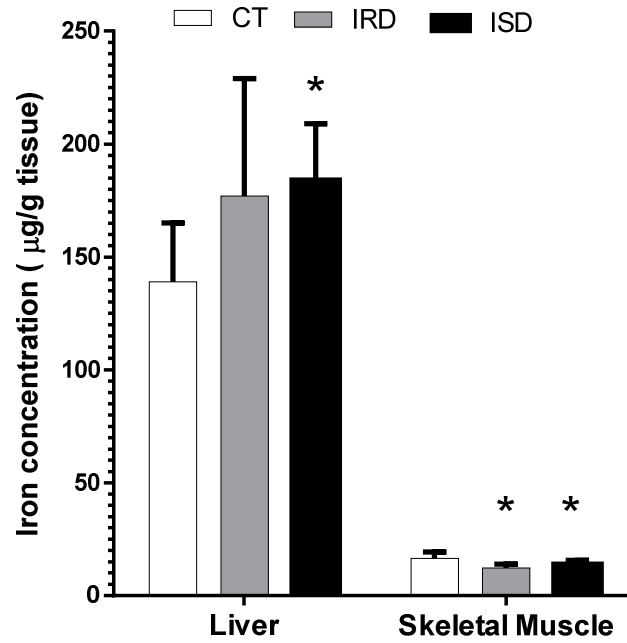


Figure 2. Concentration of iron in the liver and skeletal muscle of rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 wk. Values are mean \pm SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * $p < 0.05$.

Figure 3

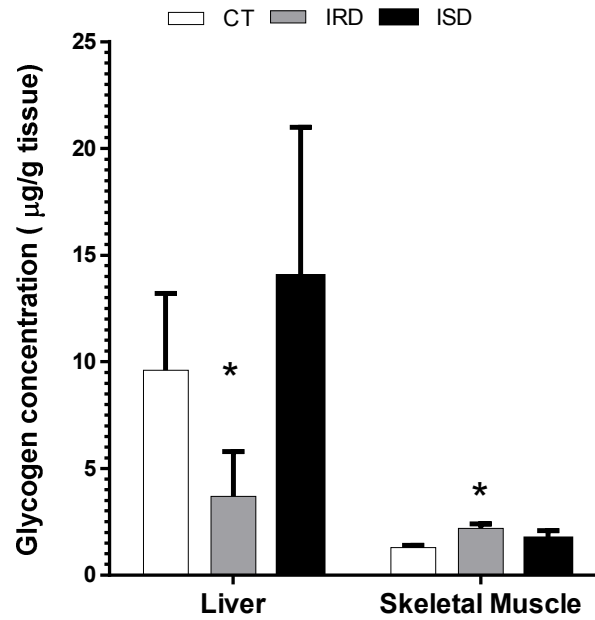


Figure 3. Glycogen concentration in liver and skeletal muscle of rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 wk. Values are mean \pm SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * $p < 0.05$.

Figure 4

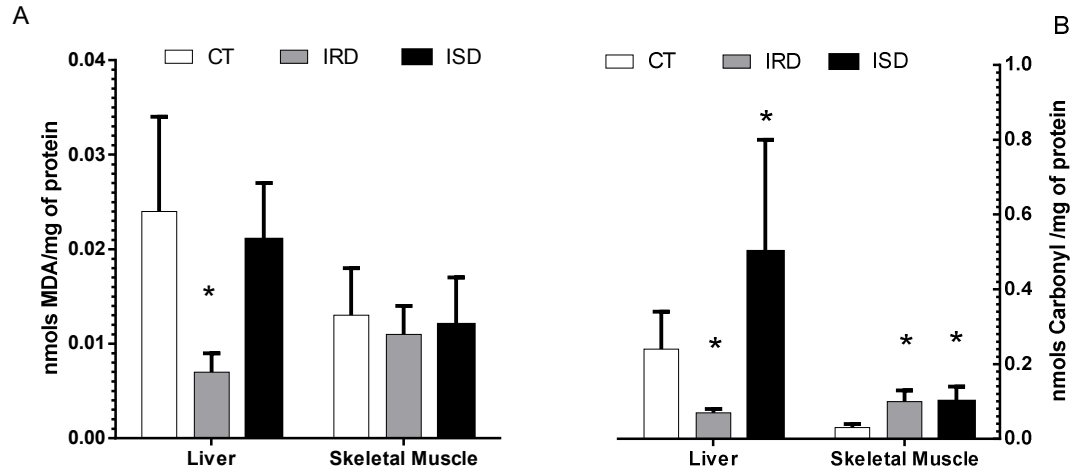


Figure 4. Malondialdehyde (MDA) (A) and protein carbonyl concentration (B) in liver and skeletal muscle of rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 wk. Values are mean \pm SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * $p < 0.05$.

Figure 5

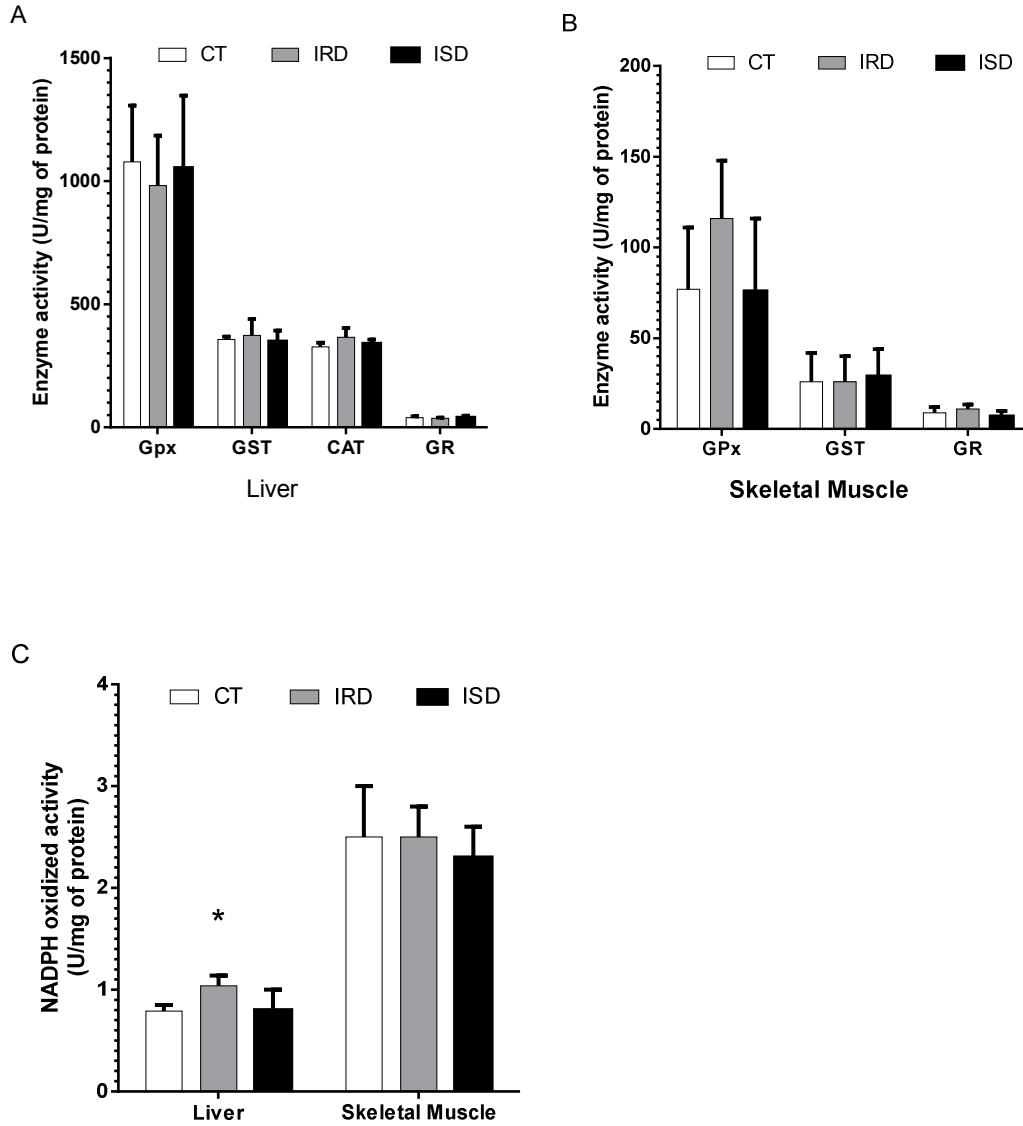


Figure 5. Specific activity of GPx,GST,GR,CAT and NADPH oxidized from liver and skeletal muscle homogenates of rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 wk. Values are mean \pm SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * $p < 0.05$. GR, glutathione reductase; GPX, glutathione peroxidase; GST, glutathione-S-transferase; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase.

Figure 6

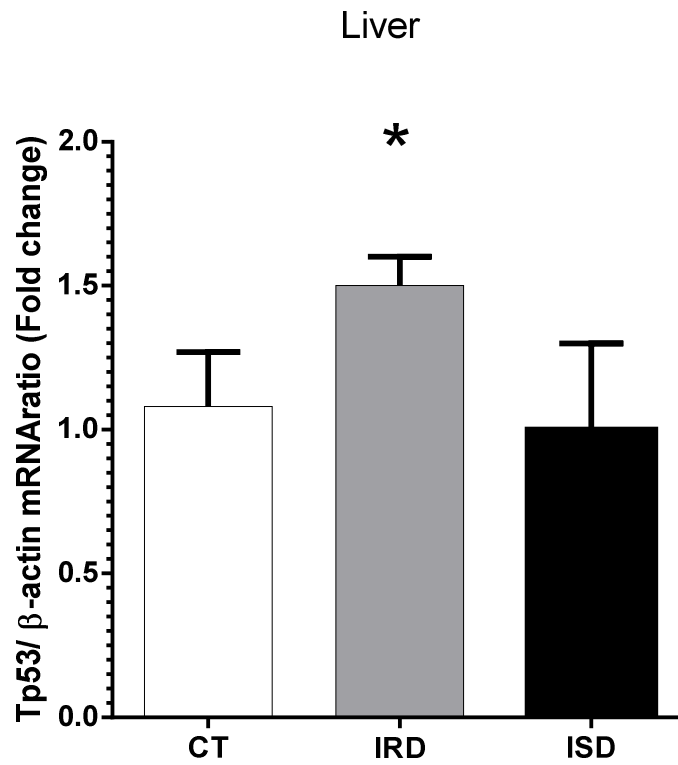


Figure 6. Quantification of tumor protein 53 (Tp53) mRNA from liver of rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 wk. Values are mean \pm SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * $p < 0.05$.

Figure 7

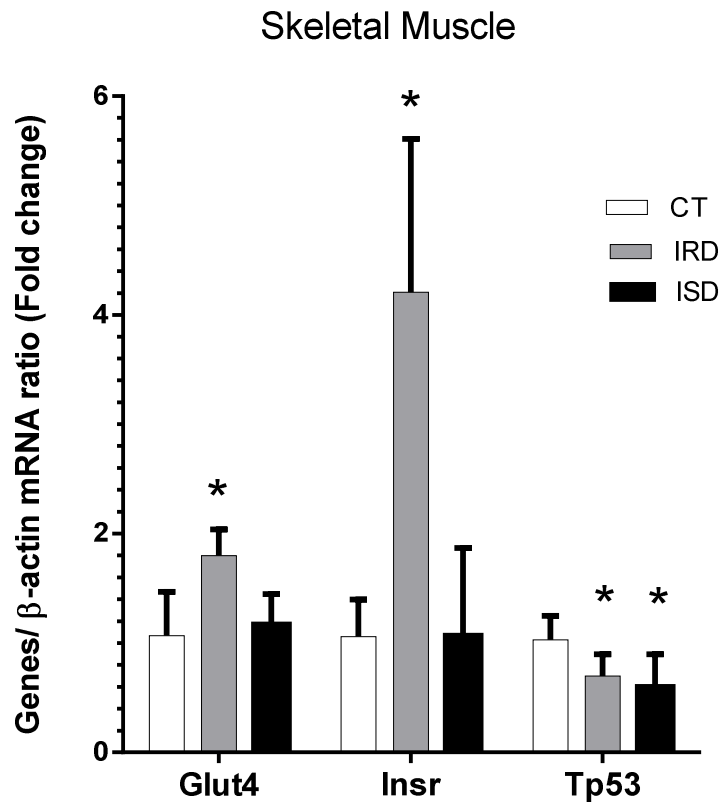


Figure 7. Quantification of glucose transporter 4 (Glut-4), insulin receptor (Insr) and tumor protein 53 (Tp53) mRNA from skeletal muscle of rats treated with control (CT), iron-restricted (IRD) and iron-supplemented (ISD) diets during 12 wk. Values are mean \pm SD. Symbol indicates that means differ compared with the control group, * $p < 0.05$.

7. Conclusão

A partir dos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

A restrição dietética de ferro induziu a expressão do receptor de insulina e do transportador de glicose (Glut-4) e inibiu a expressão do P53 no músculo esquelético, sem alteração dos níveis de ferro hepáticos ou causar anemia, em ratos adultos;

Além disso, a restrição de ferro dietético induziu a transcrição do gene p53 no fígado. Este resultado consubstancia a hipótese de função antiproliferativa de quelantes de ferro;

A suplementação de ferro promoveu o acúmulo de ferro no fígado e a redução desse teor no músculo esquelético dos ratos e também promoveu a inibição da transcrição do gene da P53.

A variação na resposta celular relativa à expressão de p53 induzida pelas duas dietas, restrita e com excesso de ferro, observada nos animais dos dois grupos, sugere que o ferro module a transcrição de gene da p53 de forma tecido-específica;

O acúmulo hepático de ferro nos animais suplementados com ferro sem, no entanto, alteração no estado oxidativo neste órgão, associado às alterações tecidos-específicas observadas no estado oxidativo dos ratos com restrição dietética de ferro, que apresentaram maior perda de peso refletem a complexidades do envolvimento do ferro como promotor do estresse oxidativo e como elemento fundamental em diversos processos fisiológicos.

Finalmente, nossos resultados sugerem que tanto a deficiência de ferro quanto o excesso de ferro são indesejáveis, enfatizando a importância de manter a ingestão ideal de ferro.

Reflexões Finais

Tendo em vista as limitações no presente modelo de estudo, desenvolvido em ratos, mas considerando principalmente a inadequada ingestão de alimentos ricos em antioxidantes e fitoquímicos, como frutas e verduras pela população brasileira, identificada no censo do IBGE (2008-2009) e, considerando ainda as diferentes necessidades de ferro de cada indivíduo; a grande variação do consumo de alimentos fontes de ferro na população em geral; e o

crescente número de evidências que estão associando o acúmulo de ferro nos tecidos com aumento de estresse oxidativo, incluindo o presente estudo, bem como a sua associação com diversos processos patológicos; sugere-se a reavaliação do programa governamental de fortificação mandatória de ferro nas farinhas de milho e trigo, em todo o território nacional, posto que esta medida possa estar por um lado contribuindo para reduzir a prevalência de anemia no país, porém, por outro lado, pode estar contribuindo para aumentar a incidência de doenças crônicas associadas ao envelhecimento da população.

8. Referências Bibliográficas

1. Ponka P (2000) Iron metabolism: Physiology and pathophysiology. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 13: 73-83.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27: 1047-1053.
3. Salonen JT, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Lakka HM, Punnonen K (1998) Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ* 317: 727.
4. Tuomainen TP, Nyyssonen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela H, et al. (1997) Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes care* 20: 426-428.
5. Bao W, Rong Y, Rong S, Liu L (2012) Dietary iron intake, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine* 10: 119.
6. Bulaj ZJ, Ajioka RS, Phillips JD, LaSalle BA, Jorde LB, et al. (2000) Disease-related conditions in relatives of patients with hemochromatosis. *The New England journal of medicine* 343: 1529-1535.
7. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, et al. (1985) Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *The New England journal of medicine* 313: 1256-1262.
8. Dymock IW, Cassar J, Pyke DA, Oakley WG, Williams R (1972) Observations on the pathogenesis, complications and treatment of diabetes in 115 cases of haemochromatosis. *The American journal of medicine* 52: 203-210.
9. Lassman MN, Genel M, Wise JK, Hendler R, Felig P (1974) Carbohydrate homeostasis and pancreatic islet cell function in thalassemia. *Annals of internal medicine* 80: 65-69.
10. Saudek CD, Hemm RM, Peterson CM (1977) Abnormal glucose tolerance in beta-thalassemia major. *Metabolism: clinical and experimental* 26: 43-52.
11. Conte D, Manachino D, Colli A, Guala A, Aimo G, et al. (1998) Prevalence of genetic hemochromatosis in a cohort of Italian patients with diabetes mellitus. *Annals of internal medicine* 128: 370-373.

12. Crosby WH (1987) Hemochromatosis: current concepts and management. *Hospital practice* 22: 173-177, 181-192.
13. Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, Massaro JM, D'Agostino RB, Sr., et al. (2001) Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *The American journal of clinical nutrition* 73: 638-646.
14. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ (2002) Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of inorganic biochemistry* 91: 9-18.
15. Nemeth E, Ganz T (2006) Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annual review of nutrition* 26: 323-342.
16. Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD (2009) Iron absorption and metabolism. *Current opinion in gastroenterology* 25: 129-135.
17. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, et al. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127: 917-928.
18. Frazer DM, Anderson GJ (2003) The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood cells, molecules & diseases* 30: 288-297.
19. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117: 285-297.
20. Loh A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL (2009) Iron homeostasis and eye disease. *Biochimica et biophysica acta* 1790: 637-649.
21. Campbell IL, Hellquist LN, Taylor KW (1982) Insulin biosynthesis and its regulation. *Clinical science* 62: 449-455.
22. Ashcroft SJ, Bunce J, Lowry M, Hansen SE, Hedeskov CJ (1978) The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis. *The Biochemical journal* 174: 517-526.
23. Billestrup N, Moldrup A, Serup P, Mathews LS, Norstedt G, et al. (1990) Introduction of exogenous growth hormone receptors augments growth hormone-responsive insulin biosynthesis in rat insulinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 7210-7214.

24. Schatz H, Maier V, Hinz M, Nierle C, Pfeiffer EF (1973) Stimulation of H-3-leucine incorporation into the proinsulin and insulin fraction of isolated pancreatic mouse islets in the presence of glucagon, theophylline and cyclic AMP. *Diabetes* 22: 433-441.
25. Fehmann HC, Habener JF (1992) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 130: 159-166.
26. Steiner DF, Oyer PE (1967) The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57: 473-480.
27. Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 106: 171-176.
28. Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR (1998) Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Molecular and cellular biochemistry* 182: 91-99.
29. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, et al. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77.
30. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Jr., et al. (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377: 173-177.
31. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997) The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *The Journal of biological chemistry* 272: 11439-11443.
32. Myers MG, Jr., White MF (1995) New frontiers in insulin receptor substrate signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 6: 209-215.
33. Fantin VR, Lavan BE, Wang Q, Jenkins NA, Gilbert DJ, et al. (1999) Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology* 140: 1329-1337.
34. Bjornholm M, He AR, Attersand A, Lake S, Liu SC, et al. (2002) Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia* 45: 1697-1702.

35. Lehr S, Kotzka J, Herkner A, Sikmann A, Meyer HE, et al. (2000) Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. *Biochemistry* 39: 10898-10907.
36. Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, et al. (2000) CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407: 202-207.
37. Boney CM, Sekimoto H, Gruppuso PA, Frackelton AR, Jr. (2001) Src family tyrosine kinases participate in insulin-like growth factor I mitogenic signaling in 3T3-L1 cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 12: 379-386.
38. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
39. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, et al. (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Molecular and cellular biology* 16: 3074-3084.
40. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, et al. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-904.
41. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, et al. (2000) Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49: 1880-1889.
42. Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR (1999) Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 274: 18093-18099.
43. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR (2000) Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 278: E127-133.
44. Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR (1992) Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *The Journal of biological chemistry* 267: 22171-22177.

45. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, et al. (1992) Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 90: 1839-1849.
46. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR (1993) Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *The Journal of clinical investigation* 92: 2065-2072.
47. Shepherd PR, Nave BT, Siddle K (1995) Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *The Biochemical journal* 305 (Pt 1): 25-28.
48. Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P, Cantley LC (1989) PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 57: 167-175.
49. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical journal* 333 (Pt 3): 471-490.
50. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, et al. (2000) Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of clinical investigation* 105: 311-320.
51. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, Yu B, Avignon A, et al. (1997) Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem* 272: 2551-2558.
52. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB (1999) Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104: 733-741.
53. Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, Hino Y, Kuroda S, et al. (1998) Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol* 18: 3708-3717.
54. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of biological chemistry* 271: 31372-31378.

55. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, et al. (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* 3: 1009-1013.
56. Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem* 274: 2593-2596.
57. Rea S, James DE (1997) Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 46: 1667-1677.
58. Lawrence JC, Jr., Roach PJ (1997) New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* 46: 541-547.
59. Cohen P, Nimmo HG, Proud CG (1978) How does insulin stimulate glycogen synthesis? *Biochemical Society symposium*: 69-95.
60. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, et al. (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252: 1708-1711.
61. McBride OW, Merry D, Givol D (1986) The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 130-134.
62. Choi DH, Kim S, Rimm DL, Carter D, Haffty BG (2005) Immunohistochemical biomarkers in patients with early-onset breast carcinoma by tissue microarray. *Cancer J* 11: 404-411.
63. Gao RJ, Bao HZ, Yang Q, Cong Q, Song JN, et al. (2005) The presence of serum anti-p53 antibodies from patients with invasive ductal carcinoma of breast: correlation to other clinical and biological parameters. *Breast Cancer Res Treat* 93: 111-115.
64. Levine AJ, Hu W, Feng Z (2006) The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell death and differentiation* 13: 1027-1036.
65. Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews Cancer* 9: 749-758.
66. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
67. Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137: 413-431.

68. Alarcon-Vargas D, Ronai Z (2002) p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23: 541-547.
69. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, et al. (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126: 107-120.
70. Feng Z, Levine AJ (2010) The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends in cell biology* 20: 427-434.
71. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, et al. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650-1653.
72. Vousden KH, Ryan KM (2009) p53 and metabolism. *Nature reviews Cancer* 9: 691-700.
73. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, et al. (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine* 11: 1306-1313.
74. Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004) The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer research* 64: 2627-2633.
75. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W (2002) Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 51: 2348-2354.
76. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46: 1733-1742.
77. Abraham D, Rogers J, Gault P, Kushner JP, McClain DA (2006) Increased insulin secretory capacity but decreased insulin sensitivity after correction of iron overload by phlebotomy in hereditary haemochromatosis. *Diabetologia* 49: 2546-2551.
78. McClain DA, Abraham D, Rogers J, Brady R, Gault P, et al. (2006) High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia* 49: 1661-1669.
79. Huang J, Jones D, Luo B, Sanderson M, Soto J, et al. (2011) 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* 60: 80-87.
80. Walker AR, Segal I (1999) Iron overload in Sub-Saharan Africa: to what extent is it a public health problem? *The British journal of nutrition* 81: 427-434.

81. Wilson JG, Lindquist JH, Grambow SC, Crook ED, Maher JF (2003) Potential role of increased iron stores in diabetes. *The American journal of the medical sciences* 325: 332-339.
82. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Pampana A, Ferrari SM, et al. (2005) Hepatitis C virus infection: evidence for an association with type 2 diabetes. *Diabetes care* 28: 2548-2550.
83. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, et al. (2000) Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Annals of internal medicine* 133: 592-599.
84. Franks AG, Jr., Pulini M, Bickers DR, Rayfield EJ, Harber LC (1979) Carbohydrate metabolism in porphyria cutanea tarda. *The American journal of the medical sciences* 277: 163-171.
85. Arber N, Konikoff FM, Moshkowitz M, Baratz M, Hallak A, et al. (1994) Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Digestive diseases and sciences* 39: 2656-2659.
86. Boujaoude L, Baker S, Baker R (2000) Iron and hepatitis C. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 31: 91-92.
87. Snowdon DA, Phillips RL (1985) Does a vegetarian diet reduce the occurrence of diabetes? *American journal of public health* 75: 507-512.
88. Lee DH, Folsom AR, Jacobs DR, Jr. (2004) Dietary iron intake and Type 2 diabetes incidence in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Diabetologia* 47: 185-194.
89. Song Y, Manson JE, Buring JE, Liu S (2004) A prospective study of red meat consumption and type 2 diabetes in middle-aged and elderly women: the women's health study. *Diabetes care* 27: 2108-2115.
90. Rajpathak SN, Crandall JP, Wylie-Rosett J, Kabat GC, Rohan TE, et al. (2009) The role of iron in type 2 diabetes in humans. *Biochimica et biophysica acta* 1790: 671-681.
91. Sheu WH, Chen YT, Lee WJ, Wang CW, Lin LY (2003) A relationship between serum ferritin and the insulin resistance syndrome is present in non-diabetic women but not in non-diabetic men. *Clinical endocrinology* 58: 380-385.

92. Bozzini C, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Bassi A, et al. (2005) Prevalence of body iron excess in the metabolic syndrome. *Diabetes care* 28: 2061-2063.
93. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W (2005) Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clinical chemistry* 51: 1201-1205.
94. Jehn M, Clark JM, Guallar E (2004) Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes care* 27: 2422-2428.
95. Lao TT, Tam KF (1997) Maternal serum ferritin and gestational impaired glucose tolerance. *Diabetes care* 20: 1368-1369.
96. Jiang R, Ma J, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC, et al. (2004) Dietary iron intake and blood donations in relation to risk of type 2 diabetes in men: a prospective cohort study. *The American journal of clinical nutrition* 79: 70-75.
97. Jehn ML, Guallar E, Clark JM, Couper D, Duncan BB, et al. (2007) A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American journal of epidemiology* 165: 1047-1054.
98. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci E, Willett WC, Stampfer MJ (2001) Blood donations and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 103: 52-57.
99. Facchini FS, Saylor KL (2003) A low-iron-available, polyphenol-enriched, carbohydrate-restricted diet to slow progression of diabetic nephropathy. *Diabetes* 52: 1204-1209.
100. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* 123: 1939-1951.
101. Baranowska I (1995) Lead and cadmium in human placentas and maternal and neonatal blood (in a heavily polluted area) measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Occupational and environmental medicine* 52: 229-232.
102. Dubois M GK, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28: 350-356.
103. Lo S, Russell JC, Taylor AW (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of applied physiology* 28: 234-236.