UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

ÉRICA MARTINS FERREIRA GOTARDO

ESTUDO DA POSSÍVEL FUNÇÃO DO ACÚMULO DE FERRO E DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À HOMEOSTASIA DO FERRO NO TECIDO ADIPOSO

Bragança Paulista 2016

ÉRICA MARTINS FERREIRA GOTARDO - 001201201897

ESTUDO DA POSSÍVEL FUNÇÃO DO ACÚMULO DE FERRO E DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À HOMEOSTASIA DO FERRO NO TECIDO ADIPOSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Alessandra Gambero

Bragança Paulista 2016

WD 210 G699e	Gotardo, Érica Martins Ferreira. Estudo da possível função do acúmulo de ferro e de proteínas relacionadas à homeostasia do ferro no tecido adiposo / Érica Martins Ferreira Gotardo Bragança Paulista, 2016. 81 p.
	Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Orientação de: Alessandra Gambero.
	 Obesidade. 2. Ferro. 3. Desferroxamina. Hepcidina. 5. Macrófagos. 6. Interleucina-6. I. Gambero, Alessandra. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



GOTARDO, M. F., Érica, "Estudo da possível função do acúmulo de ferro e de proteínas relacionadas à homeostasia do ferro no tecido adiposo". Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 25 de fevereiro de 2016 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Jampero

Profa. Dra. Alessandra Gambero Universidade São Francisco

Manuela M. artiga

Profa. Dra. Manoela Marques Ortega Universidade São Francisco

wiero

Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero Universidade São Francisco

Flaria K

Profa. Dra. Flávia Rúbia Pallis Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Kleber Yotsumoto Fertrin Universidade Estadual de Campinas

Campus Bragança Paulista Campus Campinas - Unidade Cambui Campus Campinas - Unidade Swift Campus Itatiba Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825 R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C. - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370 R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321 R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015 R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ô - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

"A minha família, que sempre está ao meu lado apoiando e incentivando na construção do meu projeto de vida".

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda de inúmeras pessoas e instituições. A todos manifesto minha eterna gratidão. E de modo especial:

Agradeço primeiramente a Deus, por toda a sabedoria que me deste e os dons e a perseverança que junto com minha fé nunca me deixou desanimar, e sempre acreditar que sou capaz.

A minha professora amiga Alessandra Gambero por tudo, pela orientação, amizade, conselhos, apoio e confiança, em especial, pelo meu esforço e trabalho. Muitíssimo obrigada.

A todos meus amigos que me acompanharam durante todos esses anos, meus eternos agradecimentos, pois com vocês não só aprendi conhecimentos técnicos, mas também o verdadeiro sentido de uma amizade sincera e divertida. Nossa amizade que se iniciou em torno da bancada e levarei para vida toda.

A todos os membros da minha família, em especial aos meus pais, minha irmã, tia e ao Ney, agradeço todos os dias a Deus por fazer parte desse laço de amor tão especial em minha vida. Vocês me dão mais do que apoio, me fazem acreditar nos meus sonhos e perseverar na construção do mesmo todos os dias.

A UNIFAG-USF

Aos professores do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da USF, muito grata pelos bons momentos vivenciados durante o curso e pelas produtivas discussões em sala de aula.

À CAPES, por todo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta meus eternos agradecimentos.

v

"Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo depende de nossa vontade e perseverança".

Albert Einstein

RESUMO

A progressão da obesidade contribui para o estabelecimento de um quadro inflamatório sistêmico que parece estar diretamente envolvido na perda da homeostase do ferro observada em indivíduos obesos. Esse desbalanço na ferremia tem sido atribuído aos níveis circulantes de interleucina (IL)-6 e a capacidade do tecido adiposo de produzir hepcidina. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um modelo experimental onde as alterações de ferremia estivessem associadas à obesidade e estudar o papel do ferro e de proteínas relacionadas à homeostasia do ferro no tecido adiposo. Foram utilizados camundongos Swiss machos mantidos em dieta hiperlipídica (DH) ou AIN-93 (CN) por 12 ou 24 semanas. Os animais DH 12 semanas foram tratados com mesilato de desferroxamina (100mg/Kg/dia; via intraperitoneal; Desferal®; DH+DF) ou com complexo de Hidróxido de Ferro III Polimaltosado (50mg/Kg/2 dias; via intramuscular; Noripurum®; DH+Ferro) por duas semanas antecedentes a eutanásia. Os animais DH 24 semanas foram divididos em DH e DH+Ferro, nas mesmas condições já citadas. Foram avaliados ganho de peso, glicemia e teste de tolerância à insulina. Após eutanásia, estoques de tecido adiposo visceral (TA) foram pesados para caracterizar a composição corporal e empregados na obtenção da fração estromal vascular, na qual macrófagos foram isolados por seleção imunomagnética, sangue e soro para hemograma e dosagem de ferro sérico. A presença de ferro foi avaliada no TA e em macrófagos isolados por reação de Azul da Prússia. Amostras de TA foram empregadas na quantificação de marcadores inflamatórios, metaloproteinases (MMPs) e hepcidina por ELISA ou multiplex, e para a avaliação da expressão de genes. Animais DH 12 ou 24 semanas tornam-se obesos e resistentes à insulina. O grupo DH 24 semanas apresentou hipoferremia, aumento da hepcidina e IL-6 sérica e no TA tanto proteica e quanto gênica. Observou-se elevada expressão hepcidina nos Macrófagos isolados e do gene que codifica o receptor de transferrina 2 (TfR1) e da proteína reguladora de ferro 1 (IRP1) no TA. A suplementação com ferro ou o tratamento com DF não altera o peso final e adiposidade de animais mantidos em DH por 12 semanas. A DF foi capaz de reduzir a glicemia de jejum e melhorar a resistência à insulina, associada a uma redução da produção de mediadores inflamatórios, como IL-6 e hepcidina no TA e sérica e reduziu a expressão de MMPs. Já a suplementação com ferro não alterou inflamação no TA, embora a expressão de MMP-3, 8 e 9 tenha sido superexpressas. A suplementação com ferro nos animais DH 24 semanas com hipoferremia levou ao acúmulo de ferro no TA e nos macrófagos infiltrados, associando ao aumento da ferremia. Conclui-se que, camundongos DH 24 semanas resultam num modelo experimental na qual a obesidade está associada a alterações na homeostase do ferro. A DF parece exercer um efeito antioxidante e anti-inflamatório benéfico na obesidade. O ferro exerce um papel importante no remodelamento do TA através da modulação da expressão das MMPs no desenvolvimento da obesidade (12 semanas). Em animais com hipoferremia associada à obesidade bem estabelecida (24 semanas), a suplementação com ferro não piora o quadro inflamatório e metabólico previamente estabelecido, mas aumenta deposição do ferro nos macrófagos infiltrados no TA.

Palavras-chave: OBESIDADE; FERRO; DESFERROXAMINA, HEPCIDINA, INTERLEUCINA-6.

ABSTRACT

The progression of obesity contributes to the establishment of a systemic inflammatory condition which appears to be directly involved in iron homeostasis breakdown observed in some obese individuals. This imbalance in ferremia has been currently associated to circulating levels of interleukin (IL) -6 and hepcidin production by adipose tissue. The objective of this study was to characterize an experimental model of obesity where ferremia changes were present and to study the role of iron and proteins related to iron homeostasis in adipose tissue. Swiss mice were maintained on a high fat diet (HFD) or AIN-93 (NC) for 12 or 24 weeks. Animals receiving the HFD for 12 weeks were additionally treated with deferoxamine mesylate (100mg/kg/day; intraperitoneally; Desferal®; HFD + DF) or complex hydroxide Polimaltosate Iron III (50mg/kg/2 days; intramuscularly; Noripurum®; HFD + Iron) for two weeks preceding euthanasia. Animals were fed with HFD for 24 weeks and they were divided into HFD and HFD + Iron under the same conditions already mentioned. They were evaluated for weight gain, fasting plasma glucose and response to insulin tolerance test. After euthanasia, the adipose tissue (AT) stocks were measured to characterize obesity and employees in obtaining macrophages by immunomagnetic selection of cells from the stromal vascular fraction. Blood count and serum iron dosage were carried out. The presence of iron was also evaluated in AT and isolated macrophages by reaction with Prussian blue. AT samples were taken for protein quantification of inflammatory markers, matrix metalloproteinases (MMPs) and hepcidin by ELISA or multiplex, and of the gene expression. Animals HFD 12 or 24 weeks become obese and insulin resistant. But only animals kept in HFD for 24 weeks presented hypoferremia associated with increased serum hepcidin and increased hepcidin and IL-6 in adipose tissue protein and gene. Observed high expression of hepcidin in macrophages isolated and of the gene encoding the transferrin receptor 2 (TfR1) and iron regulatory protein 1 (IRP1) in obese AT. Iron supplementation or treatment with DF did not alter the final weight and adiposity of animals feed with HFD for 12 weeks. The DF was able to reduce fasting plasma glucose and improving insulin resistance associated with a reduced production of inflammatory mediators such as IL-6 in adipose tissue. The DF also reduced the amount of hepcidin in adipose tissue and serum, as well as reducing the expression of MMPs. Inflammation in adipose tissue was not altered by iron supplementation, although the expression of MMP-3, 8 and 9 has been increased. Animals fed with HFD for 24 weeks have hypoferremia and when supplemented with iron, there was no additional metabolic or systemic inflammation in adipose tissue. There was iron accumulation in adipose tissue and in infiltrated macrophages associated with increased ferremia. In conclusion, DH mice 24 weeks results in an experimental model in which obesity is associated with changes in iron homeostasis. DF seem to exert an antioxidant effect and anti-inflammatory beneficial in obesity. Iron plays an important role in the remodeling of the AT through modulation of the expression of MMPs in the development of obesity (12 weeks). In animals with hypoferremia associated with obesity well established (24 weeks), iron supplementation does not worsen inflammatory and metabolic condition previously established, but increases the deposition of iron in macrophages infiltrated in the AT.

Key-word: OBESITY; IRON; DEFEROXAMINE, HEPCIDIN, INTERLEUKIN-6.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **BMP: Bone Morphogenic Protein**
- DcytB: Duodenal cytochrome B
- DMT1: Divalent Metal Transporter 1
- HAMP: Hepcidin Anti-Microbial Peptide
- IL-1: Interleucina 1
- IL-10: Interleucina 10
- IL-6: Interleucina 6
- IL-8: Interleucina 8
- IRE: Elementos responsivos ao ferro
- IRP: Proteínas reguladoras do ferro
- JAK: Janus Kinase
- LEAP-1: Liver-Expressed Antimicrobial Peptide-1
- LPS: Lipopolissacarídeo
- MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1
- MMPs: Metaloproteinases
- PAMPS: Padrões de reconhecimento de patógenos moleculares
- PDGF-BB: platelet-derived growth factor BB
- ROS: Espécies reativas de oxigênio
- SMAD: Son of Mothers Against Decapentaplegic
- STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
- TfR: Receptor de transferrina
- TGF- β : Fatores de crescimento transformante- β
- Th1: Células T help 1
- TLR-4: Receptor do tipo Toll 4
- TNF- α : Fator de necrose tumoral α

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de macronutrientes das dietas	26
Tabela 2. Primers utilizados no qRT-PCR	29
Tabela 3. Parâmetros clínicos e metabólicos de camundongos controle e DH após12 e 24 semanas de dieta	32
Tabela 4. Parâmetros hematológicos de camundongos controle e DH após 12 e 24semanas de dieta	32
Tabela 5. Expressão gênica no tecido adiposo visceral de camundongos controle eDH após 24 semanas de dieta	35
Tabela 6. Expressão do gene Hepcidin em macrófagos e adipócitos isolados dotecido adiposo visceral de camundongos controles e DH mantidos em dieta 24semanas	36
Tabela 7. Expressão do gene Hepcidin no fígado e duodeno de camundongoscontroles e DH mantidos em dieta por 24 semanas.	37
Tabela 8. Parâmetros clínicos e metabólicos de camundongos controle, DH, DH+DFe DH+Ferro	41
Tabela 9.Parâmetros hematológicos de camundongos controle, DH, DH+DF eDH+Ferro	43
Tabela 10. Parâmetros férricos de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro	43
Tabela 11. Marcadores inflamatórios do tecido adiposo visceral de camundongoscontrole, DH, DH+DF e DH+Ferro	44
Tabela 12. Marcadores inflamatórios séricos de camundongos controle, DH, DH+DFe DH+Ferro	45
Tabela 13.Níveis de hepcidina no tecido adiposo e no soro de camundongoscontrole, DH, DH+DF e DH+Ferro	45
Tabela 14. Parâmetros clínicos de camundongos controles, obesos (DH) e obesossuplementado com ferro por 2 semanas (DH+Ferro)	48
Tabela 15. Parâmetros hematológicos de camundongos controles, obesos (DH) e obesos suplementado com ferro por 2 semanas (DH+Ferro)	49

Tabela 16. Parâmetros férrico de camundongos controles, obesos (DH) e obesos	
suplementados com ferro durante 2 semanas (DH+Ferro).	50
Tabela 17. Marcadores inflamatórios séricos de camundongos controles, obesos	
(DH) e obesos suplementados com ferro durante 2 semanas (DH+Ferro)	51
Tabela 18. Marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral de camundongos	
controles, obesos (DH), obesos suplementados com ferro por 2 semanas	
(DH+Ferro)	52
Tabela 19. Expressão gênica em macrófagos isolados do tecido adiposo visceral de	
camundongos controles, obesos (DH), obesos suplementados com ferro por 2	
semanas (DH+Ferro)	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação da hepcidina no metabolismo do ferro	17
Figura 2. Enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro	18
Figura 3. Regulação e transcrição do gene HAMP	22
Figura 4. Esquema ilustrativo dos grupos experimentais	27
Figura 5. Níveis de Hepcidina no tecido adiposo (TA) subcutâneo e visceral e no soro de camundongos controle e DH mantidos em dieta por 12 ou 24 semanas	34
Figura 6. Níveis de IL-6 no tecido adiposo no tecido adiposo (TA) subcutâneo e visceral de camundongos controle e DH mantidos em dieta por 12 ou 24 semanas	36
Figura 7. Tecido adiposo epididimal e macrófagos de camundongos controles e DH mantidos em dieta por 24 semanas	39
Figura 8. Níveis proteicos de metaloproteinases produzidas pelo tecido adiposo visceral de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro	47
Figure 9. Macrófagos isolados do tecido adipose de camundongos controles, obesos e obesos suplementados com ferro durante 2 semanas	53
Figura 10. Tecido adiposo epididimal de camundongos controles, obesos e obesos suplementados com ferro durante 2 semanas	54

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	24
2.1.	Objetivo geral	24
2.2.	Objetivos específicos	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1.	Animais	25
3.2.	Modelo de Obesidade	25
3.3.	Tratamento dos animais	25
3.4.	Avaliação do peso e homeostase glicêmica	26
3.5.	Eutanásia e coleta de amostras	27
3.6.	Obtenção de macrófagos do tecido adiposo	27
3.7.	Extração de RNA e a qRT-PCR	28
3.8.	Avaliação dos parâmetros hematológicos e determinação de ferro sérico	28
3.9.	Quantificação de citocinas, MMPs e hepcidina	29
3.10.	Análise de Imunoistoquímica e reação de azul da Prússia	30
3.11.	Análise estatística	30
4.	RESULTADOS	31
4.1. e a ex _l	Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 e 24 semanas pressão de hepcidina no tecido adiposo	31
4.1.1.	Obesidade, alterações metabólicas e hematológicas	31
4.1.2. obesid	Expressão de hepcidina no tecido adiposo durante o desenvolvimento da lade	33
4.1.3.	Expressão de hepcidina no fígado e duodeno durante a obesidade	37
4.1.4. tecido	Reação de azul da Prússia no tecido adiposo e nos macrófagos infiltrados no adiposo	38

4.2.	Efeito da suplementação com ferro ou uso de quelante de ferro nas	
altera	ções metabólicas, inflamatórias e no remodelamento tecidual de animais	
mantio	dos em dieta hiperlipídica durante 12 semanas	40
4.2.1.	Obesidade e alterações metabólicas	40
4.2.2.	Alterações hematológicas e níveis de ferro sérico	42
4.2.3	Hepcidina e marcadores inflamatórios do tecido adiposo e séricos	44
4.2.3.	Alterações das metaloproteinases de matriz extracelular no tecido adiposo	46
4.3.	Efeitos da suplementação de ferro em camundongos com hipoferremia pela	
manut	tenção em dieta hiperlipídica durante 24 semanas	48
4.3.1	Obesidade e alterações metabólicas	48
4.3.2	Alterações hematológicas e níveis de ferro sérico	49
4.3.3	Hepcidina e marcadores inflamatórios sistêmicos	51
4.3.4	Marcadores inflamatórios no tecido adiposo	52
4.3.5.	Depósito de ferro no tecido adiposo	53
4.3.6.	Avaliação da expressão gênica de marcadores fenótipos de macrófagos do	
tecido	adiposo	55
5.	DISCUSSÃO	56
6.	CONCLUSÃO	62
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8.	ANEXOS	71
8.1	Aprovação Comitê de Ética	71
8.2	Mice that are fed a high-fat diet display increased hepcidin expression in	
adipos	se tissue	72
8.3	Effects of iron supplementation in mice with hypoferremia induced by obesity	80

1. INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade está aumentando rapidamente, alcançando proporções epidêmicas e se tornando um grande problema de saúde mundial. Diversos fatores estão envolvidos com a progressão da obesidade, sendo eles genéticos ou ambientais, mas a disseminação de alimentos altamente energéticos e o estilo de vida sedentário têm sido os principais fatores (LEAR et al., 2014). A obesidade está associada às doenças como a síndrome metabólica, diabetes, hipertensão, asma, doença do fígado gorduroso não alcoólico, doença renal, doenças cardiovasculares e câncer (ZHOU et al., 2015).

Além disso, é cada vez mais aceito que a obesidade tem um efeito adverso sobre a homeostase do ferro (BECKER et al., 2015). Parece contraintuitivo que a obesidade resultante de uma situação de excesso de calorias e nutrientes esteja associada à deficiência de ferro. No entanto, as profundas mudanças na homeostase energética no tecido adiposo, no fígado e em outros órgãos também estão intimamente envolvidas com a homeostase do ferro no organismo (AIGNER et al., 2014; BECKER et al., 2015).

A relação entre os baixos níveis de ferro e adiposidade foi descrita pela primeira vez na década de 60, quando Wenzel e colaboradores compararam os níveis séricos de ferro em adolescentes obesos e não obesos (WENZEL et al., 1962). Embora a etiologia da hipoferremia na obesidade permaneça incerta, vários estudos propõem que a ingestão de uma dieta pobre em ferro, aumento do volume sanguíneo (YANOFF et al., 2007), inibição da absorção de ferro duodenal e o sequestro e o estoque de ferro por células, atuem como importantes causas dessa associação (AIGNER et al., 2014). A descoberta da hepcidina possibilitou uma melhor compreensão do metabolismo e da homeostase férrica, acrescentando uma nova abordagem na associação entre obesidade e baixos níveis de ferro.

Durante estudos de propriedades antimicrobianas de vários fluidos corporais humanos, Park e colaboradores (2001) isolaram um novo peptídeo a partir da urina e denominaram hepcidina, com base no seu local de síntese (fígado, hep-) e propriedades antibacterianas *in vitro* (-cidin). Independentemente, Krause e colaboradores isolaram o mesmo peptídeo no plasma de humanos e nomearam-o LEAP-1 (*Liver-Expressed Antimicrobial Peptide-1*) (KRAUSE et al., 2000). Além do fígado como o principal órgão de síntese, a hepcidina já foi descrita no tecido adiposo e em células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (GANZ, 2003; BECKER et al., 2015).

Em humanos, o gene da hepcidina (HAMP - Hepcidin Anti-Microbial Peptide) está localizado no cromossomo 19q13.1. Ele codifica uma proteína precursora de 84

aminoácidos (a pré-pró-hepcidina), que é processada na extremidade aminoterminal por clivagem enzimática, resultando na pró-hepcidina (com 64 aminoácidos). Esta, por sua vez, é levada ao lúmen do retículo endoplasmático onde, em seguida, sofre uma remoção póstranscricional de 39 aminoácidos, resultando na hepcidina bioativa com 25 aminoácidos ou hepcidina-25 (PARK et al., 2001; GANZ, 2003).

A hepcidina está envolvida com a regulação de uma série de fatores, entre as quais a homeostase de ferro, reduzindo a quantidade de ferro circulante e controlando a absorção e liberação pelos enterócitos, macrófagos e hepatócitos (GANZ, 2006) (FIGURA 1). Embora o ferro seja o principal regulador da produção por hepcidina, a inflamação parece ter um importante papel em controlar a produção de hepcidina em macrófagos e diminuir a efluxo de ferro a partir destas células (ROCHETTE et al., 2015).

Como já dito, o fígado é o principal órgão de produção da hepcidina (DAO e MEYDANI, 2013). A hepcidina secretada controla a disponibilidade de ferro através de sua interação com a ferroportina, uma proteína transmembranar responsável pela exportação do ferro a partir de células, tais como enterócitos duodenais, hepatócitos e macrófagos. A ação da hepcidina promove a internalização e degradação da ferroportina, assim impede que ocorra a transferência de ferro a partir dos enterócitos para a circulação portal e interrompe a capacidade dos macrófagos em fornecer ferro para a corrente sanguínea (NEMETH, TUTTLE, et al., 2004).

O íon férrico (Fe³⁺) proveniente da dieta, após sofrer processo de redução a íon ferroso (Fe²⁺⁾ pela enzima ferroredutase DcytB (*Duodenal cytochrome B*), é captado pela superfície apical dos enterócitos através do transportador DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*). No citoplasma dos enterócitos, o ferro pode ser armazenado na forma de ferritina ou movido para a superfície basolateral das células para ser exportado pela ferroportina (BRASSE-LAGNEL et al., 2011). A ferroportina localiza-se na extremidade basolateral de vários tipos celulares, incluindo hepatócitos e macrófagos. Como a transferrina sérica tem grande afinidade pelo ferro na forma férrica, o Fe²⁺ externalizado pela ferroportina deve ser oxidado para Fe³⁺ pela oxidase hefaestina (WALLANDER et al., 2006) (FIGURA 2).

Outro importante mecanismo responsivo ao ferro envolve vias pós-transcricionais, baseado no sistema ferro-dependente IRP/IRE (IRP: proteínas reguladoras do ferro; IRE: elementos responsivos ao ferro) que leva a síntese de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro intracelular. Altos níveis intracelulares de ferro resultam no aumento da síntese de ferritina e inibem a síntese de receptores de transferrina (TfR) (HENTZE et al., 2010).

O ferro é um elemento essencial para quase todos os organismos vivos. É um biometal chave em várias reações metabólicas, tem a função de transporte e

armazenamento de moléculas de oxigênio (por exemplo, hemoglobina e mioglobina) e de transporte de elétrons em diversas enzimas que catalisam as reações necessárias para a geração de energia (por exemplo, citocromos), de produção de vários metabólicos, e de defesa do hospedeiro (DAO e MEYDANI, 2013).



FIGURA 1. Ação da hepcidina no metabolismo do ferro. No enterócito, o ferro não é transportado para o exterior da célula, a ferroportina é internalizada e degradada e a absorção é inibida (FIGURA à esquerda). No macrófago, o ferro fica acumulado no seu interior, diminuindo o ferro disponível para a eritropoiese (FIGURA à direita) (GROTTO, 2008).

Em excesso, o ferro pode ser extremamente tóxico às células, pois em condições aeróbicas catalisa a propagação de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) e geração de radicais altamente reativos (GANZ, 2003; DAO e MEYDANI, 2013). Vários estudos têm demonstrado que a suplementação de ferro em populações predispostas a certas doenças infecciosas, pode elevar o risco de morbidade e mortalidade (MARX, 2002; DAO e MEYDANI, 2013). Tanto o hospedeiro quanto os microrganismos dependem de ferro para seu metabolismo, e o sequestro de ferro pelas células do hospedeiro é um importante mecanismo de defesa durante uma infecção bacteriana, pois restringem a disponibilidade de ferro e dificultam a sobrevida dos organismos invasores (GANZ, 2003; MICHELS et al., 2015). Um mecanismo de defesa é a privação do ferro pela a produção de lipocalina-2, expressa por neutrófilos e células epiteliais, e lactoferrina que tem

alta afinidade por ferro livre durante a infecção (DRAKESMITH e PRENTICE, 2012). Além disso, a hepcidina, identificada também como um peptídeo antimicrobiano, desempenha um papel central na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos extracelulares (THEURL et al., 2009). A hepcidina é regulada positivamente por citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1), através de vias de sinalização que envolvem JAK/STAT3 (*Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription 3*) e receptor do tipo Toll 4 (TLR-4). A hepcidina regula o ferro extracelular, diminuindo os níveis circulantes pelo sequestro pelas células do hospedeiro e a oferta para os patógenos (PEYSSONNAUX et al., 2006).



FIGURA 2. Enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferroredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora de heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina (GROTTO, 2008).

Ao induzirem o sequestro de ferro por macrófagos e a diminuição da sua absorção pelas células intestinais, as infecções e as doenças inflamatórias crônicas podem resultar no estabelecimento da chamada Anemia da Inflamação, também conhecida como Anemia de Doenças Crônicas, caracterizada pela diminuição da concentração plasmática de ferro, assim como ocorre na anemia ferropriva, porém com a presença de ferro nos macrófagos e

com ferritina sérica elevada, indicando um estoque adequado de ferro (NEMETH e GANZ, 2014).

Adipócitos também expressam hepcidina (BEKRI et al., 2006). Além de desempenharem a importante função de armazenar o excesso de triglicerídeos e ácidos graxos livres também são consideradas células endócrinas com considerável impacto sobre o metabolismo de outros tecidos (WERNSTEDT ASTERHOLM et al., 2014). A adipogênese e a hipertrofia dos adipócitos que ocorre durante a obesidade, esta associada a várias desregulações fisiológicas, tais como hipóxia, estresse oxidativo e secreção de citocinas inflamatórias, que tornam o tecido adiposo disfuncional e menos eficiente em cumprir a sua função primária, o armazenamento e a neutralização de lipídios potencialmente nocivos (SARGENT, 2014).

A disfunção dos adipócitos e o infiltrado de células inflamatórias têm sido amplamente reconhecidos como as principais causas subjacentes das desordens metabólicas relacionadas com a obesidade, por resultarem em um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau (MAKKI et al., 2013). A expansão do tecido adiposo ainda é dependente da formação de novos vasos (angiogênese) e do remodelamento tecidual, pois a proliferação/expansão tecidual não é possível sem que ocorra um suprimento de nutrientes e oxigênio adequados para sustentar tal crescimento (ELIAS et al., 2012). O aumento do tamanho dos adipócitos está associado a uma maior secreção das citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, IL-6, interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), e à diminuição da secreção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) (SKURK et al., 2007).

Estudos mostram que monócitos, células de Kupffer e hepatócitos humanos cultivados com estímulos inflamatórios tais como lipopolissacarideo (LPS) e IL-6 tem a produção de hepcidina induzida *in vitro* (NEMETH, RIVERA, et al., 2004). Embora vários relatos corroborem para a existência da associação hepcidina-inflamação que explicaria a deficiência de ferro sistêmico na obesidade, pesquisas adicionais ainda são necessárias (MCCLUNG e KARL, 2009). Um trabalho recente mostrou que a redução do ferro circulante resultante do uso de um quelante, deferoxamina, em animais obesos resultou na redução do infiltrado de macrófagos, diminuiu o estresse oxidativo e a inflamação no tecido adiposo, contribuindo para a melhora das desordens metabólicas. Nestes animais, a produção de IL-6 e TNF- α pelo tecido adiposo mesentérico foi reduzida com o quelante de ferro, levantando a hipótese de que a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo possa ser uma consequência do acúmulo do ferro neste local e não sua causa (TAJIMA et al., 2012).

As alterações inflamatórias decorrentes da obesidade também estão associadas com número de macrófagos no tecido adiposo. Os macrófagos do tecido adiposo provavelmente interferem com função dos adipócitos e contribuem criticamente para a patogênese da diabetes mellitus de tipo 2 e a síndrome metabólica (ZEYDA e STULNIG, 2007). Os macrófagos residentes no tecido adiposo apresentam um importante papel sobre a homeostase do ferro. Macrófagos "clássicos" M1 e M2 apresentam caracteristicas distintas, e durante a obesidade os macrófagos residentes no tecido adiposo mesclam caracteristicas de ambos fenótipos (ZEYDA e STULNIG, 2007). A polarização dos macrófagos também está associada com regulação do metabolismo do ferro, a absorção, armazenamento e exportação do ferro (RECALCATI et al., 2012). Macrófagos M1 estão associados com um perfil pró-inflamatório, geralmente são estimulados por células T help 1 (Th1), citocinas, tais como o Interferon-y (IFN-y) e por padrões de reconhecimento de patógenos moleculares (PAMPs), tais como LPS (CASTOLDI et al., 2015). Além disso, apresentam baixa expressão de ferroportina e CD163 e elevada expressão de ferritina, o que favorece a retenção de ferro intracelular. Macrófagos M2, obtidos a partir a estimulação com IL-4, expressam CD91, CD163 e ferroportina em níveis elevados e ferritina em baixos níveis, caracterizando um fenótipo ferro-exportador ou de reciclagem (RECALCATI et al., 2010). Macrófagos M2 estão associados com o remodelamento tecidual e a resolução de inflamação, pois possuem propriedades imunossupressoras, elevada capacidade fagocítica, secretam componentes da matriz extracelular, citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, tais como IL-10 e o fator de crescimento transformante β (TGF- β) (CASTOLDI et al., 2015).

Baixas concentrações de ferro intracelular em macrófagos diminuem a expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF-α e IL-6 e a síntese do óxido nítrico (RECALCATI et al., 2012). Macrófagos com fenótipo M1 são caracterizados pela capacidade bacteriostática e por produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, devido ao acúmulo de ferro intracelular e pode contribuir no agravamento da inflamação pois são muito competentes na produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHU et al., 2015).

Como visto, processos inflamatórios podem influenciar a produção de hepcidina. Postula-se que a inflamação associada à obesidade possa explicar a maior expressão da hepcidina no tecido adiposo e, por consequência, a presença de deficiência de ferro nestes indivíduos (CHUNG et al., 2011). Estudos sugerem que a expressão e liberação das citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF-α, durante a obesidade, pode resultar no aumento da liberação da hepcidina pelo fígado e tecido adiposo (MCCLUNG e KARL, 2009). As principais vias de sinalização que desempenha um papel na regulação da hepcidina são a JAK-STAT-3 e a BMP-SMAD, sendo a via JAK-STAT-3 descrita como principal na sinalização inflamatória que determina sua síntese (FIGURA 3).

Durante a inflamação, a ligação de citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-6, aos seus receptores leva a fosforilação da JAK e em seguida do STAT3. STAT3 fosforilado é translocado para o núcleo onde se liga a fatores e cofatores de transcrição específicos para mediar à ativação da transcrição dos genes alvo, como *HAMP* (YU et al., 2014) (FIGURA 3). Dados *in vivo* mostraram que camundongos cuja produção de IL-6 foi inibida não ocorre a sinalização da via STAT3, nem a síntese de hepcidina (PIETRANGELO et al., 2007).

A transcrição da hepcidina também é controlada pela via BMP/SMAD (Bone Morphogenic Protein/Mothers against decapentaplegic homolog) em resposta ao aumento dos níveis férricos. À medida que a saturação de transferrina aumenta, a proteína da Hemocromatose (HFE) perde sua ligação com o TfR1, ficando disponível para se ligar ao TfR2, ativando assim a via de sinalização MAPK/ERK (Extracelular Regulated MAP Kinase). Isso contribui para o aumento da BMP6 (SCHMIDT et al., 2008). As BMPs pertencem família de fatores de crescimento transformante- β (TGF- β - Transforming Growth Factor- β) e tem mostrado desempenhar um papel crucial no desenvolvimento, na proliferação celular, na diferenciação celular e apoptose (PARROW e FLEMING, 2014). As BMPs induzem a transcrição do gene da hepcidina através da via das SMADs. A ligação das BMPs aos seus receptores BMP1 e BMP2, ativa a fosforilação das SMADs 1, 5 e 8, as quais interagem com a SMAD-4. Este complexo migra para o núcleo e, ligando-se à região promotora do gene da hepcidina, regula sua transcrição (WANG et al., 2005). A ligação entre o metabolismo do ferro e a via SMAD foi relatada quando em camundongos com deleção específica de Smad4 observou-se uma grave sobrecarga de ferro no fígado e vários órgãos e baixa expressão de HAMP (WANG et al., 2005).

A síntese hepática de hepcidina se reduz em situações de deficiência de ferro e hipóxia, e é estimulada em situações de sobrecarga de ferro, a fim de evitar o acúmulo do metal e danos teciduais irreversíveis (NEMETH e GANZ, 2014). Mediadores da resposta à hipóxia podem levar à repressão da via da hepcidina, embora ainda não sejam claros os mecanismos moleculares exatos desta repressão, se é um efeito direto da hipóxia ou uma consequência indireta da eritropoiese estimulada ou ambos (RISHI et al., 2015). Em um estudo com humanos voluntários que foram submetidos a condições hipóxicas durante 6h, os níveis de hepcidina diminuiram. Os níveis de outras citocinas também foram medidos os e os níveis de IL-6 aumentaram, assim como também houve um aumento do platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB). Houve uma correlação significativa entre o aumento do PDGF-BB e os níveis de *HAMP*, sugerindo que a PDGF-BB pode ser o mediador hipóxico da repressão de *HAMP* (SONNWEBER et al., 2014).



Nature Reviews | Immunology FIGURA 3. Regulação e transcrição do gene HAMP (GANZ e NEMETH, 2015)

Pacientes que recebem transfusões sanguíneas por longos períodos onde ocorre o acúmulo de ferro no organismo, principalmente no fígado e no coração, apresentam dano oxidativo a proteínas celulares e membranas lipídicas e em muitos casos, a presença de processos fibrogênicos no fígado (SOBBE et al., 2015). Pacientes com hemocromatose hereditária, onde a sobrecarga de ferro também causa danos hepáticos, cardíacos e endócrinos, têm incidência aumentada de osteoartrite (PIETRANGELO, 2010). Um trabalho experimental mostrou que o acúmulo de ferro no líquido sinovial seria o responsável pelo aumento da expressão da metaloproteinase de matriz (MMP)-3 e o estabelecimento da osteoartrite em camundongos (CAMACHO et al., 2015). Adicionalmente, mediadores como a lipocalin-2 são capazes de formar complexos com MMPs, reduzindo sua degradação (CANDIDO et al., 2015).

A expansão do tecido adiposo é dependente de diversos fatores entre eles o remodelamento da matriz extracelular. As MMPs são endopeptidases classificadas em quatro famílias de diferentes especificidades ao substrato, denominadas colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), gelatinases (MMP2 e MMP9), estromalisinas (MMP3, MMP7, MMP10, MMP11 e MMP26) e metaloproteinases de membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 e MMP25), essas enzimas contribuem com remodelamento do tecido na degradação da matriz extracelular, dos componentes da membrana basal ou na ativação

fatores de crescimento latentes (HOPPS e CAIMI, 2012). Autores sugerem um importante papel das MMPs no desenvolvimento do tecido adiposo. A alta expressão de MMP-2 foi relatada em tecido adiposo de camundongos obesos e no tecido adiposo humano (HOPPS e CAIMI, 2012). Uma análise detalhada do sistema de expressão de MMP revela a super-regulação nos níveis de MMP-3, -11, -12, -13, -14, e TIMP-1, e a regulação negativa nos níveis de MMP-7, -9, -16, -24, e TIMP-4 no tecido adiposo de camundongos obesos (MAQUOI et al., 2002). A expressão aumentada de MMP-2, MMP-3 e outras MMPs também foi observada no tecido adiposo de camundongos obesos (GUMMESSON et al., 2009). A administração de um inibidor de MMP em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica resultou num ganho de peso muito menor junto com a redução de peso dos estoques de gordura, além disso, também foi demonstrado a expressão reduzida de MMP-2 e MMP-14 (DEMEULEMEESTER et al., 2005). Um recente estudo mostrou que durante o desenvolvimento da resistência de um tecido tumoral, observou-se um aumento na concentração de ferro livre que pode estar diretamente correlacionado com elevação de espécies reativas de oxigênio e com o aumento nos níveis de MMP-2 e MMP-2 e MMP-9 ativas (CHEKHUN et al., 2015).

Justificativa:

Considerando que o tecido adiposo apresenta a capacidade de produzir IL-6 e expressar hepcidina na obesidade e que isto pode estar relacionado ao quadro de hipoferremia em indivíduos obesos, que macrófagos infiltrados no tecido adiposo podem ou não ter a capacidade de estocar ferro e que este evento pode modificar a inflamação e, que o acúmulo de ferro em tecidos pode interferir com processos de remodelamento tecidual, este trabalho buscou inicialmente um modelo experimental de obesidade onde as alterações na homeostase do ferro estivessem presentes e objetivou estudar os efeitos do acúmulo do ferro no tecido adiposo, observando se havia modificações na inflamação e remodelamento tecidual tecidual local.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

• Estudar o papel do ferro e de proteínas relacionadas à homeostase do ferro na inflamação e remodelamento do tecido adiposo em camundongos obesos.

2.2 Objetivos Específicos

 Caracterizar o modelo experimental de obesidade em camundongos induzida por dieta hiperlipídica quanto às alterações de ferremia e expressão de proteínas relacionadas à homeostase do ferro no tecido adiposo;

- Avaliar a ação da suplementação e quelação de ferro nas alterações metabólicas e inflamatórias sistêmicas em camundongos obesos;
- Avaliar a ação da suplementação e quelação de ferro nas alterações inflamatórias e no remodelamento do tecido adiposo em camundongos obesos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* com 6 semanas de idade adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas individuais e mantidos no Biotério da Universidade São Francisco, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada. Os animais se serviram a vontade de água e ração.

3.2 Modelo de obesidade

Os animais (média inicial de peso 27,2±0,5 g) foram divididos em dois grupos, em que um recebeu a ração AIN-93 (Controle n=5) contendo 20% Kcal de proteína, 70% Kcal de carboidrato e 10% Kcal de lipídeos e, outro foi alimentado com dieta hiperlipídica (DH n=5), preparada no nosso laboratório (TABELA 1), contendo 20% Kcal de proteína, 21% Kcal de carboidrato e 59% Kcal de lipídeos. Os animais foram mantidos nas respectivas dietas durante 12 e 24 semanas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios definidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e recebeu a aprovação do Comitê de Ética da Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil (Protocolo CEA/USF 001,02.10; ANEXO 8.1). Semanalmente foram pesadas a quantidade de dieta que os animais consumiram como forma de controle da ingestão alimentar.

3.3 Tratamento dos animais

Animais mantidos em dieta hiperlipídica (DH) foram randomicamente separados em diferentes grupos (n=5). Animais mantidos em dieta por 12 semanas foram subdivididos em 2 grupos: um que recebeu o quelante de ferro mesilato de desferroxamina (Desferal®) na dose de 100mg/kg diariamente por via intraperitoneal e foi denominado DH+DF e, o outro que recebeu ferripolimaltose (Noripurum®) 50mg/kg a cada 2 dias por via intramuscular e foi denominado DH+Ferro. Adicionalmente, um grupo mantido em dieta por 24 semanas foi também tratado com ferripolimaltose nas mesmas condições descritas anteriormente. Os grupos receberam a suplementação de ferro ou o quelante de ferro durante duas semanas antecedentes a eutanásia dos animais (FIGURA 4).

	AIN-93		Dieta Hiperlipídica	
	g.kg ⁻¹	kcal.kg⁻¹	g.kg ⁻¹	kcal.kg⁻¹
Amido de milho (Q.S.P.)	397,5	1590	115,5	462
Caseina	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Maltodextrina	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de minerais (AIN-93)	35	-	35	-
Mix de vitaminas (AIN-93)	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948/kg	1000	5358/kg

TABELA 1. Composição de macronutrientes das dietas

3.4 Avaliação do peso e homeostase glicêmica

O peso dos animais foi mensurado durante todo o período de vigência das dietas. Dias antes da eutanásia, os animais passaram por uma avaliação da homeostase glicêmica (glicemia de jejum, teste de tolerância à insulina e a glicose). Para o teste de tolerância à insulina, os camundongos foram mantidos em jejum por 6h, amostras de sangue foram coletadas da cauda (tempo 0) e determinada a glicemia basal. Uma solução de insulina (1,5 U/kg) foi administrada via intraperitonial (i.p.), e amostras de sangue foram coletadas para determinação de glicose no soro a 0, 5, 10, 20 e 30 min. A constante de velocidade da queda da glicose durante o teste de tolerância à insulina (kITT) foi calculada usando a fórmula de 0,693/T1/2. A glicose t1/2 foi calculada a partir do declive da análise dos mínimos quadrados das concentrações de glicose no plasma durante a fase de decaimento linear. Para o teste de tolerância a glicose, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e amostras de sangue foram coletadas da cauda (tempo 0) e em seguida foi aplicado glicose 20% (20g/kg de peso corpóreo) via i.p. Para determinação da glicose sérica, foram coletadas amostras de sangue no período de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os níveis de glicose

foram determinados pelo método de glicose oxidase e os valores obtidos foram representados graficamente por uma curva e a área sob a curva (AUC) foi mensurada.



FIGURA 4. Esquema ilustrativo dos grupos experimentais

3.5 Eutanásia e coleta de amostras

Após 6 horas de jejum, os camundongos foram anestesiados com xilazina/cetamina (1:1 v/v de xilazina a 2% e cetamina 10%), e as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Tecido adiposo epididimal (visceral), fígado, duodeno e músculo gastrocnêmio foram cuidadosamente dissecados e pesados para avaliação da composição corporal. Biópsias dos tecidos coletados e congelados foram adequadamente armazenadas a -80°C para posterior utilização. Fragmentos de tecido adiposo epididimal foram também fixados em paraformaldeído, para posterior análise histológica. Tecido adiposo fresco foi utilizado para obtenção da fração estromal vascular como descrito a seguir.

3.6 Obtenção de macrófagos do tecido adiposo

Fragmentos de tecido adiposo epididimal foram obtidos e digeridos utilizando colagenase tipo IV 0,2 mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em tampão Krebs-Henseleit (pH 7,4). O tecido digerido foi filtrado em filtro com malha de 180µm e centrifugado para obtenção de um halo superior de adipócitos e da fração de células estromais vasculares (CEV). As CEV foram coletadas, contadas e submetidas à separação imunomagnética utilizando microbeads ligados à anti-CD11b e colunas MS (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Células CD11b⁺ e adipócitos isolados foram aplicadas em lâminas de microscopia por "citospin" e o restante foi acondicionado em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA.

3.7 Extração de RNA e a qRT-PCR

A expressão de hepcidina e genes relacionados com a homeostase férrica no tecido adiposo visceral, em macrófagos e adipócitos maduros isolados do tecido adiposo, no fígado e duodeno foi avaliada utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). A expressão de genes que caracterizam o fenótipo de macrófagos também foi avaliada em macrófagos isolados. Amostras de tecido adiposo foram armazenadas em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA. A extração foi realizada utilizando o *RNeasy tissue kit* (QIAGEN). Após a extração, ~50 ng de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive* Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A análise da expressão dos genes e do gene constitutivo β -actina e Gapdh foi feita por meio de qRT-PCR, utilizando-se o Platinum® qPCR Supermix UDG (Invitrogen). As amostras foram amplificadas no equipamento 7300 Real-Time PCR System e analisadas com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os experimentos foram feitos em duplicata de 4 amostras distintas, e as amostras foram normalizadas com os valores do gene constitutivo. Os *primers* utilizados estão descritos na TABELA 2.

3.8 Avaliação dos parâmetros hematológicos e determinação de ferro sérico

Sangue/EDTA foi utilizado para análise automatizada dos parâmetros hematológicos (ABX Pentra 120, da Horiba Instruments Brasil, Jundiai, SP, Brasil), realizado no Laboratório Universitário de Análises Clínicas LUAC (Bragança Paulista, SP, Brasil). Amostras de soro foram obtidas a partir do sangue recolhido sem uma solução anticoagulante e utilizadas para quantificação de ferro sérico, capacidade ligadora de ferro e índice de saturação da transferrina e por kit comercial colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Primer	Sense (5'- 3')	Antisense (5'- 3')
Hepcidin-1 ^(a)	CCTATCTCCATCAACAGATG	AACAGATACCACACTGGGAA
Hepcidin-2 ^(b)	CCTATCTCCATCAACAGATG	AACAGATACCACAGGAGGGT
Hepcidin ^(b)	CTTCCCCATCTGCATCTTCT'	GGTCAGGATGTGGCTCTAGG
IL-6	CCGGAGAGAGACTTCACAG	TCCACGATTTCCCAGAGAAC
TfR1	TGAGGGAAATCAATGATCGTATT	CTCTCTTGGAGATACATAGGGCGA
TfR2	ACCCATCAGACTTCTCCCAGG	GTTTGATTGAAGGACGGGAAG
DMT1	CCAGTGATGAGTGAGTTCCAAT	AGCAGACGATCAGGACCAGG
BMP6	GTCATGAGCTTTGTGAACCTGG	TGAACTCTTTGTGTGTCGTTGA
FT-heavy	ACTGGCTACTGACAAGAATGATCC	TAATGGATTTCACCTGTTCACTCA
Ferroportin	ATAGTCTCTGTCAGCCTGCTGTTT	CGTCAAATCAAAGGACCAAAGA
IRP-1	ATGCGTGGAATCCCAAATCTA	CACTATGGACTTGGGTGGCTG
IRP-2	CCATAGCAGGCACAGTGAATATAG	TAAATTTCCTTGCCCGTAGAGTC
HIF-1	GAAGCACTAGACAAGTTCACCTGA	TTAGGCTGGGAAAAGTTAGGAGT
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT
TNF-α	TAGCCAGGAGGGAGACAGA	TTTTCTGGAGGGAGATGTGG
iNOS	TGGTGGTGACAAGCACATTT	AAGGCCAAACACAGCATACC
CD206	ATTGCCCTGAACAGCAACTT	GACTTAAGCTTCGGCTCGTC
IL-10	ATCGATTTCTCCCCTGTGAA	TTCATGGCCTTGTAGACACCT

TABELA 2. Primers utilizados no qRT-PCR

(a) *Primer* desenhado a partir de uma região de consenso para amplificar os genes HEPC1 e HEPC2.(b) (ILYIN et al., 2003).

3.9 Quantificação de citocinas, MMPs e hepcidina

Biópsias de tecido adiposo foram homogeneizadas em tampão de solubilização a 4°C (1% de Triton X-100, 100mM de Tris-HCI (pH 7,4), 100mM pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2,0mM e 0,1mg/ml de aprotinina). Material insolúvel foi removido por centrifugação durante 20 min a 9000g a 4°C. As concentrações de proteína nos sobrenadantes foram determinadas pelo método de Lowry e estes armazenados para posterior utilização na quantificação de citocinas. Hepcidina, IL-6, IL-10, MCP-1, leptina, adiponectina, PAI-1, resistina TNF-α foram

quantificadas nas amostras de tecido adiposo usando kits comerciais imunoenzimáticos (hepcidina de USCN Life Science, Wuhan, China; IL-6, IL-10 e MCP-1 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e Multiplex/Luminex (MAGPIX® - Millipore, MA, EUA). A quantificação das metaloproteinases MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e MMP-12 também foram realizadas por Multiplex/Luminex. Soro obtido conforme descrito anteriormente também foi empregado na quantificação de hepcidina (USCN Life Science, Wuhan, China) e transferrina (GenWay, San Diego, CA, USA) por kits imunoenzimáticos e marcadores inflamatórios como IL-6, TNF-α, leptina, MCP-1, PAI-1, resitina e insulina foram quantificados por Multiplex/Luminex (MAGPIX® - Millipore, MA, EUA).

3.10 Análise de Imunoistoquímica e Reação de Azul da Prússia

Fragmentos de tecido adiposo epididimal foram acondicionados em formalina tamponada a 3,7%, processados e emblocados em parafina. Para avaliar a população de macrófagos residentes no tecido adiposo, cortes histológicos de 5µm foram utilizados para realização de ensaio de imunoistoquímica, onde os cortes foram incubados com anticorpo primário F4/80 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), seguido por anticorpo secundário biotinilado e corados com DAB (kit ABC - Santa Cruz Biotechnology). Hematoxilina foi emprega para contra-coloração

Para a reação de Pearls, lâminas com células CD11b+ foram incubadas com uma solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 5% e uma solução aquosa de ácido clorídrico a 5%, proporcionando a reação azul da Prússia. Depois de lavar em água destilada, as células foram contrastadas com Vermelho neutro. As células foram classificadas como azul da Prússia positivo ou negativo e contadas em cinco campos aleatórios utilizando microscópio óptico de alta potência. Cortes histológicos de tecido adiposo visceral embebido em parafina, hidratados e desparafinizados também foram empregados para reação de azul da Prússia.

3.11 Análise Estatística

Os dados estão expressos em média acompanhados do respectivo erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de *Dunnett*. Os testes foram realizados utilizando o software GraphPad InStat. Uma probabilidade (valor de P) inferior a 5% foi considerada significativa.

4. RESULTADOS

Para facilitar a apresentação dos resultados, estes serão divididos em três partes sendo que na primeira serão mostrados os resultados obtidos durante a padronização do modelo experimental de obesidade e caracterização das alterações da expressão de hepcidina e de demais genes relacionados a da homeostase do ferro (protocolos de 12 e 24 semanas de DH). Na segunda parte, os resultados sobre a inflamação e remodelamento tecidual após suplementação com ferro ou uso de quelante de ferro em animais mantidos em DH durante 12 semanas. E, finalmente, a apresentação dos resultados da suplementação de ferro sobre a inflamação e metabolismo em animais com hipoferremia resultante da manutenção da DH durante 24 semanas.

4.1 Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 e 24 semanas e a expressão de hepcidina no tecido adiposo

4.1.1 Obesidade, alterações metabólicas e hematológicas

Camundongos Swiss que foram alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, tornaram-se obesos com uma grande quantidade de tecido adiposo visceral (epididimal) e subcutâneo, a resistência à insulina e tolerância da glicose foi bem estabelecida (TABELA 3). Um aumento da duração do período de alimentação com a dieta rica em gordura resultou na manutenção destas alterações (TABELA 3). Em camundongos obesos, o número de leucócitos está aumentado em ambos os grupos (TABELA 4). O número de hemácias, a quantidade da hemoglobina e o hematócrito foram reduzidos nos camundongos obesos (24semanas) em comparação com os controles da mesma idade (TABELA 4). A ingestão de alimentos entre os grupos de 24 semanas, não foi diferente (4,6±0,4 e 4,3±0,2 g/dia para o controle e DH, respectivamente).

	12 semanas		24 semanas	
	Controle	DH	Controle	DH
Peso corporal final (g)	41,3±1,1	56,8±1,7**	45,5±1,2	62,0±2,2**
Tecido adiposo edipidimal ¹	2,7±0,3	3,6±0,1*	4,0±0,3	5,5±0,3*
Tecido adiposo subcutâneo ¹	1,5±0,2	5,3±0,8**	2,2±0,2	6,2±0,5**
Glicose basal (mg/dL)	119,7±15,8	203,0±14,9**	130,0±11,5	219,2±25,3**
ITT (k)	3,4±0,7	1,2±0,1**	2,1±0,5	0,4±0,1**
i.p. GTT	21040±894	42484±1168**	30709±2082	40165±2380**
Ferro sérico (µg/dL)	NA	NA	245±2	173±2*

TABELA 3. Parâmetros clínicos e metabólicos de camundongos controle e DH após 12 e 24 semanas de dieta.

¹ Expresso em % do peso corporal

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 e **p<0,01 comparados ao controle.

TABELA 4. Parâmetros hematológicos de camundongos controle e DH após 12 e 24 semanas de dieta.

	12 semanas		24 semanas	
	Controle	DH	Controle	DH
Hemácias (10 ⁶ /μL)	8,9±0,2	8,7±0,2	9,15±0,2	7,8±0,6*
Hemoglobina (g/dL)	13,3±0,3	13,2±0,2	13,1±0,3	11,5±0,8*
Hematócrito (%)	42,1±1,1	40,6±0,8	41,9±0,9	34,6±3,0*
Leucócitos (cells/µL)	2016±241	3120±522*	2025±363	2850±125*
Transferrina (ng/ml)	50,6±6	53,2±7,4	43,9±2,4	43,1±1,5

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 comparados ao controle.

4.1.2 Expressão de hepcidina no tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade

O tecido adiposo subcutâneo e visceral dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas apresentaram níveis normais de hepcidina, o mesmo ocorreu com os níveis séricos. No entanto, observou-se um aumento significativo dos níveis de hepcidina no tecido adiposo visceral (epididimal) e no soro dos camundongos mantidos em dieta hiperlipídica por 24 semanas (FIGURA 5). A expressão gênica de Hepcidin-1 foi mais elevada no tecido adiposo do grupo obeso a partir do grupo de 24 semanas, quando comparado ao grupo controle (TABELA 5). A expressão gênica de Hepcidin-1 foi mais elevada do que Hepcidin-2 em todos os grupos testados (TABELA 5), ambos primers foram sintetizados utilizando a referência descrita por Ilyin e colaboradores (2003). O uso de um primer adicional que pode amplificar ambos os genes (Hepcidin) confirmou a expressão aumentada de hepcidina no tecido adiposo visceral de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 24 semanas (TABELA 5). No mesmo grupo (DH 24 semanas), os níveis proteicos de IL-6 foram significativamente aumentados no tecido adiposo visceral (FIGURA 6). Também foi analisada a expressão de vários genes relacionados com a expressão de hepcidina no tecido adiposo. Observou-se um aumento na expressão gênica do receptor de transferrina-2 (TfR2) e uma diminuição na expressão da proteína morfogenética óssea-6 (BMP6) e proteína reguladora de ferro 1 (IRP1) no tecido adiposo de camundongos obesos (24 semanas). A expressão de TfR1, proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT1), cadeia pesada da ferritina (FT-HEAVY), ferroportina, proteína reguladora de ferro 2 (IRP-2) e o fator indutor hipóxia 1 (HIF-1) não foram alterados (TABELA 6). Adipócitos isoladas a partir de tecido adiposo epididimal de camundongos magros e obesos (24 semanas) não apresentaram diferencas significativas com relação a seus níveis de expressão da hepcidina (TABELA 6). No entanto, os macrófagos isolados a partir da fração vascular estromal do tecido adiposo epididimal de camundongos obesos mostraram aumento nos níveis de hepcidina. No experimento utilizando células isoladas, apenas o primer Hepcidin, concebido a partir de uma região consenso comum de ambos os genes, foi utilizado, devido ao baixo nível de amostra obtida.



FIGURA 5. Níveis de Hepcidina no tecido adiposo (TA) subcutâneo e visceral (A e B) e no soro (C) de camundongos controle e DH mantidos em dieta por 12 (A) ou 24 (B) semanas, quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 e **p<0,01 comparados ao controle.

Gene	Controle (UA)	DH (UA)
Hepcidin ^(a)	8,91±0,38	16,34±2,95*
Hepcidin-1 ^(b)	0,06±0,01	0,37±0,11*
Hepcidin-2 ^(b)	0,02±0,01	0,02±0,01
IL-6	0,06±0,02	0,228±0,06**
FERROPORTIN	6,23±1,35	4,25±1,14
TFR 1	11,35±2,75	8,08±2,08
TFR 2	7,85±1,07	12,83±1,57*
IRP 1	105,87±19,07	54,77±11,28**
IRP 2	32,90±5,20	28,09±2,11
DMT 1	16,68±1,85	12,65±1,91
FT-HEAVY	1473,69±110,75	1220,89±108,78
BMP 6	15,93±0,98	10,18±1,11**
HIF-1	50,60±0,50	53,18±11,04

TABELA 5. Expressão gênica no tecido adiposo visceral de camundongos controle e DH após 24 semanas de dieta.

Os valores estão expressos em médias (n=4) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 e **p<0,01 comparados ao controle.

(a) *Primer* desenhado a partir de uma região de consenso para amplificar os genes HEPC1 e HEPC2.(b) (ILYIN et al., 2003)


FIGURA 6. Níveis de IL-6 no tecido adiposo no tecido adiposo (TA) subcutâneo e visceral de camundongos controle e DH mantidos em dieta por 12 (A) ou 24 (B) semanas, quantificados por ELISA. Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). **p<0,01 comparados ao controle.

TABELA 6. Expressão do gene *Hepcidin* em macrófagos e adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de camundongos controles e DH mantidos em dieta 24 semanas.

	Controle (UA)	DH (UA)	
Macrófagos	2,10±1,09	19,20±7,75**	-
Adipócitos	26,10±12,50	25,21±7,27	

Os valores estão expressos em médias (n=4) seguido do erro padrão da média (EPM). **p<0,01 comparados ao controle.

4.1.3 Expressão de hepcidina no fígado e duodeno durante a obesidade

A expressão do gene *Hepcidin-1* foi significativamente diminuída no fígado. *Hepcidin-2*, também foi reduzida, mas a redução não foi estatisticamente significativa (p=0,104). A expressão de *Hepcidin-1* no duodeno não foi alterada nos camundongos obesos quando comparada com os controles (TABELA 7). Estes dados foram coerentes com os gerados usando o *primer Hepcidin* (TABELA 7)

TABELA 7. Expressão do gene *Hepcidin* no fígado e duodeno de camundongos controles e DH mantidos em dieta por 24 semanas.

	Fíga	ado	Duodeno			
	Controle (UA) DH (UA)		Controle (UA)	DH (UA)		
Hepcidin ^(a)	1123,56±108,41	677,53±165,45*	15,42±1,30	35,82±11,84		
Hepcidin-1 ^(b)	916,55±157,11	485,55±117,73*	0,02±0,01	0,03±0,01		
Hepcidin-2 ^(b)	25,42±9,14	8,88±2,28	ND	ND		

Os valores estão expressos em médias (n=4) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 comparados ao controle. ND = não detectado

(a) Primer desenhado a partir de uma região de consenso para amplificar os genes HEPC1 e HEPC2.

(b) (ILYIN et al., 2003)

4.1.4 Reação de azul da Prússia no tecido adiposo e nos macrófagos infiltrados no tecido adiposo

A manutenção dos camundongos Swiss em dieta hiperlipídica durante 24 semanas resultou em um grande aumento no número de macrófagos que se infiltraram entre os adipócitos (FIGURA 7). Secções do mesmo tecido adiposo foram incubadas com ferrocianeto de potássio num meio ácido e foram marcadas com pequenos pontos azuis entre os adipócitos (FIGURA 7), demonstrando a presença de hemossiderina ou ferritina. A presença da Reação de azul da Prússia foi mais evidente em macrófagos isolados do tecido adiposo de camundongos obesos (FIGURA 7).



FIGURA 7. Tecido adiposo epididimal e macrófagos de camundongos controles (A, C e E) e DH (B, D e F) mantidos em dieta por 24 semanas. Reação com Azul da Prússia determinando a presença de hemossiderina e ferritina (A, B, E e F). Imunoistoquímica de F4/80 em cortes parafinizados de tecido adiposo epididimal para detectar infiltrados de macrófagos (C e D). Painel A-D: 5.0 μm; aumento: 100x; asterisco indicando adipócitos. Painel E e F: aumento: 1000x.

4.2 Efeito da suplementação com ferro ou uso de quelante de ferro nas alterações metabólicas, inflamatórias e no remodelamento tecidual de animais mantidos em dieta hiperlipídica durante 12 semanas

4.2.1 Obesidade e alterações metabólicas

Os camundongos Swiss que receberam dieta hiperlipídica durante 12 semanas tiveram um ganho de peso significativo comparado com os camundongos magros, que não foi alterado com suplementação com ferro ou uso do quelante de ferro desferroxamina (TABELA 8). A adiposidade dos animais obesos foi alterada pela DH, bem como se pode observar aumento do volume hepático, embora o tratamento não modifique estes achados (TABELA 8). A glicemia basal elevada nos animais e a resistência à insulina estabelecida nos animais obesos foi menor no grupo tratado com o quelante de ferro desferroxamina (DH+DF). A glicemia basal também foi menor no grupo suplementado com ferro (DH+Ferro; TABELA 8). A ingestão de alimentos entre os grupos, não foi diferente (4,0 controle; 3,5±0,2 DH; 3,6±0,4 DH+DF e 2,9±0,2 DH+Ferro).

	Controle	DH	DH+DF	DH+Ferro
Peso corporal final (g)	35,8±0,8	59,8±1,7**	55±4,4*	62,4±1,2**
Tecido adiposo epididimal (g)	1,2±0,06	2,3±0,2*	2,2±0,3*	2,4±0,2*
Tecido adiposo epididimal ¹	3,4±0,1	3,8±0,3	4,08±0,05	3,9±0,2
Fígado (g)	1,6±0,1	3,5±0,4**	2,7±0,2*	3,4±0,2**
Músculo gastrocnêmio (g)	0,15±0,01	0,2±0,01	0,2±0,02	0,2±0,01
Glicose Basal (mg/dL)	147±4,9	306,6±31,1**	231,2±11.6#	218±20,7#
Insulina (pg/mg proteína)	408,7±39,9	2511,7±496,5*	1566,3±502,4*	1570,8±210,1*
ITT (k)	4,8±0,4	1,43±0,4**	2,9±0,2#	2,5±0,3**

TABELA 8. Parâmetros clínicos e metabólicos de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro.

¹ Expresso em % do peso corporal

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). **p<0,01 comparados ao controle e #p<0,05 comparados ao DH.

4.2.2 Alterações hematológicas e níveis de ferro sérico

Após 12 semanas de dieta hiperlipídica, os camundongos não apresentaram alterações nas concentrações de hemácias, hemoglobina e hematócrito, embora haja uma diferença na concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos grupos DH, quantificados por hemograma automatizado. Não houve outras alterações nos níveis hematimétricos como o volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM). A concentração dos leucócitos também se encontra elevada no grupo DH, mas não foi alterada com o tratamento por duas semanas com ferro e desferroxamina (TABELA 9). Os níveis de ferro sérico, quantificados por kit colorimétrico, não foram modificados nos animais obesos e a desferroxamina (DH+DF) diminui a capacidade total de ligação do ferro à transferrina comparada aos obesos (TABELA 10).

	Controle	DH	DH+DF	DH+Ferro
Hemácias (10 /µL)	6,9±0,4	7,7±0,5	7,5±0,4	7,5±0,4
Hemoglobina (g/dL)	14,2±0,7	14,7±0,5	14,2±0,6	14,8±0,8
Hematócrito (%)	29,5±1,3	33,3±1,6	32,2±1,5	33,5±1,7
VCM (f1)	42,5±0,5	43,3±0,6	43,02±0,4	44,9±1,07
HCM (pg/cell)	20,53±0,77	19,1±0,5	19,06±0,5	19,8±0,7
CHCM (g/dL)	48,3±1,5	44,2±0,7*	44,3±1,4*	44,02±1,02*
Leucócitos (cell/µL)	3780±926,3	7975±686,02*	6380±1443	7020±1516

TABELA 9. Parâmetros hematológicos de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro.

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 comparados ao controle.

TABELA 10. Parâmetros férricos de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro.

	Controle	DH	DH+DF	DH+Ferro
Ferro sérico (µg/dL)	280,7±31,3	260,2±22,1	316,5±26,7	217,3±28,5
CTLF (mcg/dL) ¹	242,04±28,1	312,7±35,3	447,08±45,7#	319,4±32,7
ÍST (%)²	114,2±13,6	85,05±11,4	76,4±13,9	73,7±12,8

¹ Capacidade total de ligação do ferro

² Índice de saturação da transferrina

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). #p<0,05 comparados ao DH.

4.2.3 Hepcidina e marcadores inflamatórios do tecido adiposo e séricos

O nível dos marcadores inflamatórios, quantificados por ensaios imunoenzimáticos, no tecido adiposo está alterado nos camundongos obesos comparados ao grupo controle. Citocinas como IL-6, leptina, MCP-1, resistina e PAI-1 estão elevadas no tecido e IL-10 reduzida (TABELA 11). O tratamento por duas semanas com quelante de ferro desferroxamina foi capaz de reduzir a produção de algumas citocinas, como IL-6, MCP-1 e PAI-1. Além disso, a suplementação de ferro resultou na queda da proteína quimiotática de monócitos-1 (TABELA 11). Os níveis de citocinas séricas como leptina e PAI-1, também se encontram elevados nos animais mantidos em DH (TABELA 12). O PAI-1 sérico também passa a ser reduzido com o tratamento de quelante de ferro desferroxamina e a leptina com a suplementação de ferro. As concentrações de hepcidina estão elevadas nos animais DH tanto no soro quanto no tecido adiposo, o tratamento com quelante de ferro desferroxamina reduziu em ambos locais a hepcidina (TABELA 13).

	Controle	DH	DH+DF	DH+Ferro
Adiponectina ¹	4022,4±59,7	3889±107,6	3689,4±241,2	4005,9±104,7
IL-6 ¹	0,21±0,06	1,5±0,2**	0,7±0,1#	1,07±0,4**
IL-10 ¹	4,2±0,8	2,1±0,5*	3,03±0,7	1,8±0,6*
Leptina ¹	258,4±44,4	1761,4±196,01***	1072,3±363,7**	1629,8±221,05**
MCP-1 ¹	21,6±0,68	38,61±7.06	23,21±2,38	24,29±1,78
PAI-1 ¹	64,5±9,3	362,6±92,6*	130,6±33,6#	276,7±75,8*
Resistina ¹	351,5±14	186,1±41,8*	182,9±51,2*	182,1±14,8*
TNF-α ¹	5,7±0,2	5,4±0,4	6,2±0,7	4,7±0,4

TABELA 11. Marcadores in	nflamatórios no teo	cido adiposo	visceral de	e camundongos	controle, DH,
DH+DF e DH+Ferro.					

¹pg/mg proteína

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 **p<0,01 e p<0,001 comparados ao Controle; #p<0,05 e ##p<0,01 comparados ao DH.

	Controle	DH	DH+DF	DH+Ferro
IL-6 ¹	17,3±7,05	103,02±55,5	6,1±1,3	9,3±2,8
Leptina ¹	6186,2±1892,9	20034,4±3434,2*	13709,7±1732,8	11306±1957,7#
MCP-1 ¹	62,3±12,2	84±12,08	71,04±14,3	80,08±23,4
PAI-1 ¹	2361,7±831,6	6073,4±1035,1*	2703±731,3#	3563,8±988,6
Resistina ¹	414,6±18,09	571,2±115,4	534,1±132,5	520,9±161,7
TNF-α ¹	8,05±0,6	9,9±1	9,09±1,4	7,6±1,1

TABELA 12. Marcadores inflamatórios séricos de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro.

¹pg/mL

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 e **p<0,01 comparados ao Controle; #p<0,05 comparados ao DH.

TABELA 13. Níveis de hepcidina no tecido adiposo e no soro de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro.

	Controle	DH	DH+DF	DH+Ferro
Tecido adiposo (pg/mg proteína)	63,9±8	364,1±6,6**	287,5±23,3#	325,01±46,2**
Sérica (pg/ml)	2575±777,6	6888±232,2**	2640±455,01##	7304±314,5**

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). **p<0,01 comparados ao Controle; #p<0,05 e ##p<0,01 comparados ao DH.

4.2.4 Alterações das metaloproteinases de matriz extracelular no tecido adiposo

A expressão proteica das metaloproteinases de matriz (MMPs), analisadas por ensaio imunoenzimático, encontra-se modificadas nos grupos experimentais. Camundongos obesos (DH) apresentam aumento da expressão de MMP-2, MMP-8 e MMP-12 no tecido adiposo visceral (FIGURA 8). A suplementação de ferro resulta em um aumento das MMP-3, MMP-8 e MMP-9 quando comparados com o grupo DH (FIGURA 8). O tratamento com desferroxamina levou a redução da MMP-9 das MMPs elevadas durante a obesidade, tais MMP-2, MMP-8 e MMP-12.



FIGURA 8. Níveis proteicos de metaloproteinases produzidas pelo tecido adiposo visceral de camundongos controle, DH, DH+DF e DH+Ferro: MMP-2 (Painel A), MMP-3 (Painel B), MMP-8 (Painel C), MMP-9 (Painel D) e MMP-12 (Painel E), quantificados por ensaio inumoenzimático. Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 comparados ao controle; #p<0,05 e ##p<0,01 comparados ao DH.

4.3 Efeitos da suplementação de ferro em camundongos com hipoferremia pela manutenção em dieta hiperlipídica durante 24 semanas

4.3.1 Obesidade e alterações metabólicas

Camundongos Swiss que foram alimentados com dieta hiperlipídica por 24 semanas, tornaram-se obesos com uma grande quantidade de tecido adiposo visceral (epididimal) e resistentes à insulina (TABELA 14). A suplementação de ferro durante as duas últimas semanas não alterou o peso corporal final ou a quantidade de tecido adiposo visceral, bem como o status metabólico destes animais (glicemia de jejum, insulinemia ou resistência à insulina; TABELA 14). A ingestão de alimentos entre os grupos, não foi diferente (3,8±0,2 controle; 3,5±0,2 DH e 3,2±0,1 DH+Ferro).

Controle DH DH+Ferro Peso corporal final (g) 44,8±1,7 70,8±4,3** 72,4±4,01** Tecido adiposo epididimal (g) 2,7±0,1** 2,2±0,3* 1,2±0,1 Tecido adiposo epididimal¹ 2,9±0,1 38±0,2* $3,0\pm0,4$ Fígado (g) 3,7±0,2 5,8±0,5** 5,2±0,2** Músculo gastrocnêmio (g) 0,3±0,0 0,2±00 $0,3\pm0,0$ Glicose Basal (mg/dL) 134±12 207±30* 174±22 Insulina (pg/mg proteína) 3748±1086* 4553±1675* 193±111 ITT (k) 1,2±04** 1,1±0,5** $3,7\pm0,4$

TABELA 14. Parâmetros clínicos de camundongos controles, obesos (DH) e obesos suplementado com ferro por 2 semanas (DH+Ferro).

¹Expresso em % do peso corporal

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). **p<0,01 comparados ao controle.

4.3.2 Alterações hematológicas e níveis de ferro sérico

Os parâmetros hematológicos, quantificados por hemograma automatizado, foram alterados nos camundongos obesos, houve uma redução na concentração da hemoglobina e aumento dos níveis circulantes de leucócitos comparados aos camundongos magros (TABELA 15). A suplementação de ferro normalizou o número de leucócitos circulantes no sangue (TABELA 15). Hipoferremia foi observada nos camundongos obesos juntamente com aumento da capacidade latente de ligação do ferro na transferrina, quantificados por kit colorimétrico (TABELA 16). Nosso protocolo de suplementação de ferro foi capaz de aumentar os níveis de ferro e diminuir a capacidade latente de ligação ferro, bem como aumentar a saturação da transferrina (TABELA 16).

TABELA 15. Parâmetros hematológicos de camundongos controles, obesos (DH) e obesos suplementado com ferro por 2 semanas (DH+Ferro).

	Controle	DH	DH+Ferro
Hemácias (10 /µL)	7,7±0,3	6,8±0,6	7,1±0,2
Hemoglobina (g/dL)	16,02±0,3	13,1±1,2*	14,9±0,15
Hematócrito (%)	32,9±1,3	26,4±2,5	31,8±1,08
VCM (f1)	42,8±0,4	42,7±6±0,7	44,7±0,6*
HCM (pg/cell)	20,7±0,7	21,2±1,4	21±0,6
CHCM (g/dL)	48,9±1,6	49,7±2,9	46,9±1,18
Leucócitos (cell/µL)	7184±1650	16100±2910*	8125±1518 [#]

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). **p<0,01 comparados ao controle e #p<0,05 comparados ao DH.

	Controle	DH	DH+Ferro
Ferro sérico (µg/dL)	217,16±16,9	172,5±13,3*	376,5±34,6 ^{##}
CTLF (mcg/dL) ¹	362,5±33,8	401,4±48,7	371±38,5
ÍST (%)²	79,8±10,09	69,29±15,6	104,4±12,05 [#]

TABELA 16. Parâmetros férrico de camundongos controles, obesos (DH) e obesos suplementados com ferro durante 2 semanas (DH+Ferro).

¹ Capacidade total de ligação do ferro

² Índice de saturação da transferrina

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 e **p<0,01 comparados ao controle; #p<0,05 e ##p<0,01 comparados ao DH.

4.3.3 Hepcidina e marcadores inflamatórios sistêmicos

Leptina, MCP-1 e resistina sérica estão aumentadas nos camundongos obesos quando comparado com os camundongos magros (TABELA 17). Os níveis séricos de TNF-α e IL-6 não há diferença entre os grupos. A suplementação com ferro não resultou em nenhuma alteração dos marcadores inflamatórios séricos mensurados (TABELA 17). A hepcidina está aumentada no soro dos camundongos obesos quando comparado com os camundongos magros, mas também, não foi modificada com a suplementação de ferro (TABELA 17). Os níveis dos marcadores inflamatórios séricos foram quantificados por ensaios imunoenzimáticos.

TABELA	17. Marcadores	inflamatórios	séricos	de car	nundongos	controles,	obesos	(DH)	e obesos
suplemen	tados com ferro o	durante 2 sem	anas (DH	l+Ferro	o).				

	Controle	DH	DH+Ferro
IL-6 ¹	4,1±0,5	9,3±2,8	13,1±3,3*
TNF-α ¹	6,5±0,9	9,1±1,5	11,2±2,1
MCP-1 ¹	24,3±7,2	53,45±6,5*	58,9±20,7
Leptina ¹	5251±1864	15060±1979**	13183±596*
Resistina ¹	376,4±110,2	714,7±137,07*	966,3±192,8*
Hepcidina ¹	1782,6±239,9	3432,8±754,7*	3819,02±1083,8*

¹pg/mL

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 e **p<0,01 comparados ao Controle.

4.3.4 Marcadores inflamatórios no tecido adiposo

O tecido adiposo visceral dos camundongos obesos apresentam maiores níveis de IL-6, MCP-1, leptina e PAI-1 quando comparado com camundongos magros (TABELA 18). A suplementação com ferro não modificou os níveis de adipocinas localmente que se encontram alteradas pela obesidade, exceto pela tendência de redução dos níveis de PAI-1, observado (p=0,06; TABELA 18). A quantificação de hepcidina no tecido adiposo visceral está alta nos camundongos obesos e manteve-se com o mesmo nível nos camundongos obesos suplementados com ferro (TABELA 18). Os níveis dos marcadores inflamatórios no tecido adiposo foram quantificados por ensaios imunoenzimáticos

	Controle	DH	DH+Ferro
IL-6 ¹	1,8±0,1	2,5±0,2*	2,8±0,4
TNF-α ¹	0,5±0,1	0,5±0,1	0,8±0,2
MCP-1 ¹	1.8±0,5	12,9±2,0**	11,0±1,7**
Leptina ¹	399±53	1891±240**	1298±250
IL-10 ¹	2,4±0,5	2,3±0,3	3,5±0,3#
Adiponectina ¹	5560±118	5648±101	5245±237
PAI-1 ¹	53±11	220±76*	104±21
Hepcidina ¹	168±37	355±22*	351±19*

TABELA 18. Marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral de camundongos controles, obesos (DH), obesos suplementados com ferro por 2 semanas (DH+Ferro).

¹pg/mg proteína

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). *p<0,05 e **p<0,01 comparados ao Controle, #p<0,05 comparados ao DH.

4.3.5 Depósito de ferro no tecido adiposo

Macrófagos isolados, CD11b+, do tecido adiposo de camundongos obesos apresentam mais células positivas para a reação azul da Prússia quando comparadas com células do tecido adiposo dos camundongos magros (FIGURA 9). A suplementação de ferro resultou num aumento significativo da reação de azul da Prússia nos macrófagos (FIGURA 9). A análise do tecido adiposo visceral confirma a presença de hemossiderina e ferritina pela marcação positiva com azul da Prússia entre os adipócitos (FIGURA 10).



FIGURA 9. Macrófagos isolados do tecido adiposo de camundongos controles (A), obesos (B) e obesos suplementados com ferro durante 2 semanas (C). Reação azul da Prússia determina a presença de hemossiderina e ferritina (1000x). D. Contagem de células positivas com azul da Prússia, macrófagos isolados do tecido adiposo. Foram contados cinco aleatórios campos em alta potência (*high-power fields* HPF; n=5 por grupo). **p<0,01 comparados ao controle; ##p<0,01 comparados ao DH.



FIGURA 10. Tecido adiposo epididimal de camundongos controles (A, B), obesos (C, D) e obesos suplementados com ferro durante 2 semanas (E, F). Reação azul da Prússia determina a presença de hemossiderina e ferritina (seta; D e F). H&E em cortes parafinizados (A, C e E). 5.0 µM; aumento: 200x.

4.3.6 Avaliação da expressão gênica de marcadores fenotípicos de macrófagos isolados do tecido adiposo

Macrófagos isolados do tecido adiposo (CD11b+) de camundongos obesos apresentam baixa expressão gênica da Interleucina-10 (IL-10) e com a suplementação de ferro há um aumento significativo (TABELA 19). Os genes específicos para fenótipos M1 (TNF-α e iNos) e o receptor de manose CD206, marcador de superfície superexpresso em fenótipos M2, não foram alterados (TABELA 19).

TABELA 19. Expressão gênica em macrófagos isolados do tecido adiposo visceral de camundongos controles, obesos (DH), obesos suplementados com ferro por 2 semanas (DH+Ferro).

	Controle (UA)	DH (UA)	DH+Ferro (UA)
TNF-α	0,25±0,04	0,45±0,04**	0,7±0,2
iNos	0,001±0,0	0,003±0,0	0,002±0,0
IL-10	0,09±0,0	0,03±0,0*	0,15±0,06#
CD206	0,1±0,06	0,7±0,2*	0,3±0,07

Os valores estão expressos em médias (n=4) seguido do erro padrão da média (EPM).*p<0,05 e p<0,01comparados ao controle, # p<0,05 comparados ao DH.

5. DISCUSSÃO

A obesidade está associada à um quadro de inflamação sistêmica de baixo grau, caracterizada pelo aumento nos níveis de vários mediadores pró-inflamatórios no plasma oriundos principalmente do tecido adiposo e que interfere com a homeostase energética não somente no tecido adiposo mas também em outros órgãos. Estas mudanças na homeostase energética presentes na obesidade estão ligadas também com uma desregulação da homeostase férrica (AIGNER et al., 2014). Um estado de ferro ideal é essencial para a saúde humana, pois a eficiência energética é afetada diretamente por situações de deficiência de ferro. A prevalência de deficiência de ferro aumenta concomitante com o aumento no índice de massa corporal (IMC) (MENZIE et al., 2008). A ligação mais provável entre obesidade e hipoferremia foi originalmente descrito por Bekri e colaboradores (BEKRI et al., 2006) que demonstram pela primeira vez que a hepcidina é expressa tanto em nível de RNA mensageiro quanto em proteína no tecido adiposo e que esta expressão encontra-se aumentada em pacientes obesos proporcionalmente ao aumento do IMC nos pacientes. O aumento da expressão de hepcidina em doenças inflamatórias resulta em hipoferremia devido a uma combinação de uma diminuição na absorção de ferro duodenal e um aumento da captura de ferro nos macrófagos. Esta hipoferremia é responsável pela anemia associada à inflamação, uma manifestação clínica comum de doenças crônicas (GANZ, 2003).

O modelo experimental de obesidade induzida por DH tem sido extensivamente empregado em estudos de fisiopatologia e terapêutica, empregando linhagens heterogênicas (outbread) ou isogênicas (inbread) de roedores. Neste trabalho, inicialmente objetivamos caracterizar um modelo experimental que pudesse ser empregado no estudo dos efeitos do ferro e de proteínas relacionadas ao controle da ferremia sobre o tecido adiposo obeso. Como vimos, a manutenção de animais em DH resultou em ganho de peso, aumento da adiposidade, alterações nos níveis glicêmicos e resistência periférica à insulina. Mostramos pela primeira vez na literatura que após 24 semanas de DH, o tecido adiposo visceral apresentava níveis elevados de hepcidina associados à presença de alterações hematológicas e a hipoferremia. Embora níveis aumentados da expressão de proteína hepcidina no soro e tecido adiposo visceral possam ser observados em ambos os períodos de tempo de obesidade, as alterações hematológicas e de ferremia não foram observadas nos grupos com menor tempo de obesidade (12 semanas), sugerindo que estas alterações necessitem de um tempo maior para seu estabelecimento do que a expansão do tecido adiposo.

Acredita-se que exista apenas um gene de hepcidina no genoma humano embora o genoma de camundongos contenha dois genes para hepcidina (*Hepcidin-1 e 2*) com organização genômica semelhante (ILYIN et al., 2003). A análise proteica de hepcidina nos tecidos coletados dos animais mantidos em DH durante 24 semanas foi semelhante aos resultados de expressão gênica de hepcidina (hepcidina-1, 2-hepcidina e hepcidina – primer randômico). Em humanos, o gene da hepcidina foi expresso em adipócitos isolados e na fração vascular estromal (BEKRI et al., 2006). Os nossos resultados demonstram que as células CD11b+ (macrófagos) isoladas a partir da fração estromal de tecido adiposo de visceral de camundongos expressam mais hepcidina durante a obesidade. Não houve diferença na expressão de hepcidina nos adipócitos isolados durante a obesidade. Curiosamente, o nível de expressão do gene hepcidina diminuiu significativamente no fígado dos camundongos obesos (24 semanas), sugerindo que possa ocorrer um mecanismo de *feedback* negativo em relação a produção hepática de hepcidina quando o tecido adiposo passa a produzir esta em grande quantidade e causar aumentos séricos.

A expressão de hepcidina, como vimos, parece ser dependente do aumento de IL-6 no tecido adiposo (LEE et al., 2005). O efeito estimulador da IL-6 é transcricional e depende da interação entre STAT3 e um elemento de ligação de STAT3 no promotor de hepcidina (WRIGHTING e ANDREWS, 2006). A elevada expressão da hepcidina no tecido adiposo em nossos protocolos experimentais esteve relacionada com os níveis aumentados de IL-6 encontrado nos nossos animais obesos.

O Receptor de transferrina 2 (TFR2) é outro candidato a regulação da síntese de hepcidina no fígado mediada pela sobrecarga de ferro (GEHRKE et al., 2003). Observou-se um aumento significativo na expressão TFR2 no tecido adiposo visceral, sugerindo que o ferro pode também ajudar a regular a expressão hepcidina no tecido adiposo durante a obesidade. Além disso, o nível da proteína morfogenética óssea 6 (BMP-6), também é alta no fígado em resposta a uma sobrecarga de ferro (ANDRIOPOULOS et al., 2009). No entanto, os nossos resultados mostraram uma redução significativa do gene *BMP*-6, no tecido adiposo, o que sugere que esta via não esteja envolvida com a expressão da hepcidina induzida pela obesidade. Embora a supressão da expressão de hepcidina possa ser mediada pela hipóxia, à expressão do gene do fator indutor de hipóxia -1 (HIF-1) não foi alterada no tecido adiposo visceral dos nossos camundongos obesos.

O armazenamento de ferro celular e de absorção são coordenadamente regulados por fatores citoplasmáticos e proteínas reguladora de ferro 1 e 2 (IRP-1 e IRP-2). Sob condições de fornecimento de ferro limitada, a ligação IRP e o elemento responsivo ao ferro (IRE) bloqueia a tradução da ferritina e do transportador de metal divalente (DMT-1) e a degradação receptor de transferrina TfR1. O cenário é oposto quando existe abundância de ferro circulante. Além disso, os níveis da atividade de IRPs podem ser afetados por estresse oxidativo e óxido nítrico (WANG e PANTOPOULOS, 2011). O nível da expressão do gene de *IRP-1* foi baixo, sugerindo um aumento celular do ferro no tecido adiposo, embora os níveis de ferritina de cadeia pesada (*FT-HEAVY*) e a expressão de *TfR1* e *DMT-1* permaneceram inalterados.

Macrófagos isolados do tecido adiposo de animais obesos (24 semanas) apresentaram um conteúdo aumentado de ferro, mostrando também que a obesidade induziria a este acúmulo de ferro localmente e que estas células realmente desempenham um papel importante no controle da ferremia (RECALCATI et al., 2010). O acúmulo de ferro em macrófagos no entanto, poderia contribuir para o estabelecimento de um fenótipo mais pro-inflamatório. Deste forma, nosso objetivo seguinte foi suplementar os animais que não apresentavam alterações hematológicas (12 semanas) com ferro ou criar uma condição de redução da disponibilidade de ferro com o uso do quelante desferroxamina, avaliando a inflamação do tecido adiposo (produção de adipocinas). Adicionalmente, vários estudos já demonstraram efeitos favoráveis da redução de ferro em quadros de diabetes melito. As alterações metabólicas em pacientes com diabetes melito tipo 2 foi amenizada pela flebotomia (FERNANDEZ-REAL et al., 2002), pela redução de ferro por via farmacológica (CUTLER, 1989) ou por restrições da ingestão de ferro na dieta (MINAMIYAMA et al., 2010). Experimentalmente, o tratamento com quelante de ferro, desferroxamina, durante 2 semanas em camundongos espontaneamente obesos KKAy, levou a melhorias no estado metabólico e a redução da adiposidade (TAJIMA et al., 2012). Com 2 semanas de tratamento com mesilato de desferroxamina também observamos a melhora a resistência insulínica e a redução nos níveis de alguns marcadores inflamatórios, tais como IL-6, PAI-1 e MCP-1, embora não tenhamos registrado efeitos sobre a adiposidade. A suplementação com ferro não foi capaz de modificar a adiposidade ou a resistência à insulina, mas também não piorou a produção de adipocinas. Tajima e colaboradores sugeriram que os efeitos observados com o uso da desferroxamina melhorando o quadro inflamatório pudesse estar relacionado com a supressão do estresse oxidativo, dado que o ferro é um potencial catalisador do estresse oxidativo através da reação de Fenton / Haber-Weiss (TAJIMA et al., 2012). Furukawa e colaboradores (FURUKAWA et al., 2004) relataram que o aumento da expressão de NADPH-oxidase e diminuição da expressão de enzimas antioxidantes resultou num aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e, assim, aumentou o estresse oxidativo no tecido adiposo de ratos KKAy obesos. No entanto, a adição de ferro não piora este quadro inflamatório o que nos leva a sugerir que talvez seja um efeito da desferroxamina per se e não da disponibilidade de ferro localmente. Os níveis de hepcidina no tecido adiposo se reduziram após o tratamento com desferroxamina e este resultado pode estar relacionado à redução da inflamação local (redução de IL-6). Curiosamente, animais suplementados com ferro apresentaram uma redução dos níveis de leptina sérica. Indivíduos com deficiência de ferro tem perda de apetite, enquanto a suplementação de ferro na dieta está associada com aumento do apetite. Embora não seja muito bem compreendida essa associação, a leptina tem sido um dos alvos de estudo dessa relação. A leptina, produto proteico do gene *ob*, é um hormônio que é secretado principalmente pelo tecido adiposo e é responsável pela regulação do comportamento alimentar (MOAYERI et al., 2006). Dongiovanni e colaboradores (DONGIOVANNI et al., 2013), relataram que a leptina sérica é diminuída em ratos alimentados com dieta de 2% de ferro. Alguns autores mostram que o ferro regula negativamente a transcrição da leptina pela ativação do CRE (*cAMP responsive element*), um fator conhecido que regula a expressão de leptina (GAO et al., 2015).

O estresse oxidativo tem mostrado aumentar a atividade e a expressão das metaloproteinases (MMP) em vários tipos celulares, incluindo células hepáticas (GALLI et al., 2005) e monócitos humanos (LU e WAHL, 2005). O acúmulo de ferro em articulações inflamadas também parece ser responsável pelo aumento da expressão da metaloproteinase de matriz (MMP)-3 em camundongos (Camacho et al., 2015). As MMPs desempenham um papel importante no remodelamento do tecido adiposo durante a obesidade. A regulação das MMPs pode ocorrer em vários níveis, quer por transcrição do gene e a síntese de pró-enzimas inativas, ativação pós-tradução de pró-enzimas, ou por meio da interação das MMPs com os inibidores de metaloproteinases (TIMPs) (OUM'HAMED et al., 2004).

O remodelamento da matriz extracelular é determinado pelo equilíbrio entre a síntese de colágeno e o equilíbrio das enzimas de degradação, as MMPs, e dos inibidores das metaloproteinases teciduais (TIMPs). Além disso, o remodelamento ineficiente da matriz extracelular no tecido adiposo diminui a adipogênese, prejudica a angiogênese e leva a hipóxia do tecido. Esta, por sua vez, aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que promovem a infiltração de células imunológicas no tecido adiposo e levam a mudança fenotípica das células do sistema imunológico residentes (BERG et al., 2014; BADOUD et al., 2015). Durante a obesidade as MMPs podem ser co-expressas ou co-reprimidas em respostas ao desbalanço dos mediadores inflamatórios, como leptina e adiponectina (BERG et al., 2014). Animais mantidos em 12 semanas com dieta hiperlipídica não só apresentaram aumento de mediadores proinflamatórios e a resistência a insulina, como também alteração dos níveis das MMPs (2; 8 e 12) no tecido adiposo. A MMP-2 (gelatinase A) é altamente expressa no tecido adiposo de camundongos obesos e é

responsável pela hipertrofia dos adipócitos (BIGA et al., 2013). Embora a MMP-9 (gelatinase B) não tenha sido significativamente elevada nos nossos animais obesos, outros autores relatam que a MMP-9 é positivamente regulada no tecido adiposo e na circulação de seres humanos obesos. É possível que as MMPs coordenem o remodelamento do tecido em resposta à ingestão excessiva de nutrientes, o que leva a alterações na capacidade metabólica nesses tecidos (BIGA et al., 2013).

A suplementação de ferro por duas semanas resultou no aumento dos níveis de MMP-9 e MMP-3 e da colagenase MMP-8 no tecido adiposo visceral dos camundongos. A utilização de desferroxamina reduziu os níveis das MMP-2, MPP-8, MMP-9 e MMP-12 no tecido adiposo, mostrando claramente que o ferro é responsável por alterar a expressão das MMPs no tecido adiposo. Deugnier e colaboradores (DEUGNIER et al., 2011), demonstraram que o tratamento por longo prazo com quelante de ferro (deferasirox) melhorou o quadro de fibrose hepática e a necroinflamação em pacientes com β-talassemia com sobrecarga de ferro. Mais estudos ainda deverão ser conduzidos para uma melhor caracterização do remodelamento tecidual nos animais suplementados com ferro ou em uso de desferroxamina.

Após 24 semanas de DH, em nosso modelo experimental é possível observar claramente a hipoferremia. A suplementação de ferro por duas semanas nestes animais não foi capaz de interferir com a produção da hepcidina local ou sistêmica, mostrando que a inflamação sistêmica e do tecido adiposo se sobrepõem à sinalização das alterações de ferremia. Mas novamente, a suplementação com ferro e a deposição deste em macrófagos no tecido adiposo não contribui para o agravamento na produção das citocinas inflamatórias ou do quadro metabólico já estabelecido pela obesidade. A suplementação parenteral de ferro resultou num excesso de ferro sérico livre e a saturação da transferrina, mas não alterou os níveis de hemoglobina de forma significativa. A diminuição da saturação da transferrina durante a deficiência de ferro e seu aumento na sobrecarga de ferro torna-se um indicador apropriado do status de ferro no organismo (NEMETH, TUTTLE, et al., 2004). No entanto, a leucocitose foi reduzida pela suplementação de ferro nos camundongos obesos de 24 semanas. A obesidade é reconhecida como a causa de leucocitose e que contribuem para o estado inflamatório sistêmico de baixo grau (SARGENT, 2014). A leptina tem sido apontada como responsável por aumentar a diferenciação de granulócitos a partir de progenitores hematopoiéticos na medula óssea (LAHARRAGUE et al., 2000; COUSIN et al., 2015). Mas curiosamente, não registramos inibição de leptina neste grupo experimental, como observamos no grupo de 12 semanas, o que poderia explicar a melhora do quadro de leucocitose.

Diferentes estímulos ativam macrófagos a expressar padrões distintos de quimiocinas e marcadores de superfície modulados pelos fatores ambientais locais (LUMENG et al., 2008). Zeyda e colaboradores demonstram que macrófagos de tecido adiposo apresentam marcadores de superfície característicos do fenótipo M2, mas com capacidade de produzirem citocinas pro inflamatórias clássicas de M1 (ZEYDA e STULNIG, 2007). Estudos tem demonstrado que a polarização fenotípica dos macrófagos pode ser relevante na capacidade de incorporar ferro e que macrófagos M1 possuem uma capacidade de reter ferro devido a aumentos agudos durante e inflamação aguda e produção de citocinas pró inflamatórias (RECALCATI et al., 2012). A expressão gênica em CD11b e os níveis proteicos de IL-10 no tecido adiposo visceral camundongos obesos foi significativamente menor do que nos camundongos controles. A principal função da IL-10 é limitar e resolver respostas inflamatórias, seus efeitos anti-inflamatórios envolve tanto a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, e TNF- α e IL1 β quanto à repressão de bioatividade em células alvo. Para Fujikata e colaboradores, a superexpressão sistêmica de IL-10 leva o aumento da expressão de marcadores de macrófagos M2 no tecido adiposo epididimal de camundongos magros e obesos, mas não afeta o nível de MCP1, TNF, e IL-6 (FUJISAKA et al., 2009). Outros autores relatam que a obesidade em camundongos induzida por dieta rica em gordura causa um desvio na polarização dos macrófagos do tecido adiposo de um estado polarizado M2 em animais magros para um estado pró-inflamatório M1, mas expressam marcadores de superfície M2, receptor de manose CD206, em níveis semelhantes aos de camundongos magros (LUMENG et al., 2007).

A suplementação por duas semanas com ferro resultou num aumento da expressão de IL-10 pelas CD11b e pelo tecido adiposo, sugerindo a participação do ferro na polarização dos macrófagos do tecido adiposo. Estudos demonstram que heme e hemoglobina desnaturadas podem desencadear toxicidade ao organismo, sabe-se que macrófagos apresentam receptores scavenger específicos CD163, e a ligação haptoglobina de hemoglobinas desnaturadas e CD163 induz a secreção de IL-10 que contribui para a desintoxicação em resposta ao estresse gerado pelo heme oxigenase 1 (HO-1), que ao degradado também parece mediar um efeito antiinflamatório (SIERRA-FILARDI et al., 2010). Em um estudo *in vitro* com monócito humanos THP-1, Rojas e colaboradores mostraram que nanopartículas de ferro utilizadas como carreadores de drogas alteram a ativação do perfil de macrófagos a produzem níveis elevados de IL-10 (ROJAS et al., 2015). Nairz e colaboradores demonstram que durante uma infecção por Salmonella, macrófagos com depleção de lipocalina- 2, Lcn2 (-/-),também resultam em elevados níveis de IL-10 e ferro intracelular, conseguindo controlam a proliferação bacteriana (NAIRZ et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir, com base nos resultados obtidos, que foi possível caracterizar um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica que apresentasse alterações na homeostase do ferro devido às alterações na expressão de várias proteínas relacionadas ao ferro no tecido adiposo. Estes animais apresentaram alterações hematológicas, hipoferremia e a produção aumentada no tecido adiposo, bem como alterações sistêmicas de hepcidina, sempre associadas ao aumento dos níveis de IL-6 no tecido adiposo.

O tratamento com desferroxamina resultou num efeito anti-inflamatório no tecido adiposo e reverteu a resistência à insulina estabelecida pela obesidade. Em contrapartida, a suplementação com ferro não agravou a inflamação no tecido adiposo dos animais obesos, bem como não apresentou efeitos deletérios adicionais na homeostase glicêmica. Mas a suplementação com ferro resultou no agravamento do remodelamento do tecido adiposo, levando a superatividade das metaloproteinases (MMPs), sendo que a desferroxamina apresentou efeito contrário. Associamos essas alterações nas metaproteinases à presença de ferro, corroborando a hipótese de que o acúmulo local de ferro pode alterar o remodelamento tecidual.

Enfim, a deposição de ferro no tecido adiposo foi bem evidente nos grupos obesos de 24 semanas que apresentavam hipoferremia, principalmente nos macrófagos, e foi aumentada com a suplementação de ferro, o que sugere que estas células tenham um mecanismo para promover o sequestro de ferro e a polarização do perfil de macrófagos do tecido adiposo, mas sem alterar sua capacidade em produzir mediadores pró-inflamatórios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER, E.; FELDMAN, A.; DATZ, C. Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. **Nutrients,** v. 6, n. 9, p. 3587-600,2014.

ANDRIOPOULOS, B., JR.; CORRADINI, E.; XIA, Y.; FAASSE, S. A.; CHEN, S.; GRGUREVIC, L.; KNUTSON, M. D.; PIETRANGELO, A.; VUKICEVIC, S.; LIN, H. Y.; BABITT, J. L. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. **Nat Genet**, v. 41, n. 4, p. 482-7,2009.

BADOUD, F.; PERREAULT, M.; ZULYNIAK, M. A.; MUTCH, D. M. Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals. **FASEB J**, v. 29, n. 3, p. 748-58,2015.

BECKER, C.; OROZCO, M.; SOLOMONS, N. W.; SCHUMANN, K. Iron metabolism in obesity: how interaction between homoeostatic mechanisms can interfere with their original purpose. Part I: underlying homoeostatic mechanisms of energy storage and iron metabolisms and their interaction. **J Trace Elem Med Biol**, v. 30, p. 195-201,2015.

BEKRI, S.; GUAL, P.; ANTY, R.; LUCIANI, N.; DAHMAN, M.; RAMESH, B.; IANNELLI, A.; STACCINI-MYX, A.; CASANOVA, D.; BEN AMOR, I.; SAINT-PAUL, M. C.; HUET, P. M.; SADOUL, J. L.; GUGENHEIM, J.; SRAI, S. K.; TRAN, A.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 788-96,2006.

BERG, G.; SCHREIER, L.; MIKSZTOWICZ, V. Circulating and adipose tissue matrix metalloproteinases in cardiometabolic risk environments: pathophysiological aspects. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 17, n. 2, p. 79-87,2014.

BIGA, P. R.; FROEHLICH, J. M.; GREENLEE, K. J.; GALT, N. J.; MEYER, B. M.; CHRISTENSEN, D. J. Gelatinases impart susceptibility to high-fat diet-induced obesity in mice. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 8, p. 1462-8,2013.

BRASSE-LAGNEL, C.; KARIM, Z.; LETTERON, P.; BEKRI, S.; BADO, A.; BEAUMONT, C. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. **Gastroenterology**, v. 140, n. 4, p. 1261-1271 e1,2011.

CAMACHO, A.; SIMAO, M.; EA, H. K.; COHEN-SOLAL, M.; RICHETTE, P.; BRANCO, J.; CANCELA, M. L. Iron overload in a murine model of hereditary hemochromatosis is associated with accelerated progression of osteoarthritis under mechanical stress. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15,2015.

CANDIDO, S.; ABRAMS, S. L.; STEELMAN, L. S.; LERTPIRIYAPONG, K.; FITZGERALD, T. L.; MARTELLI, A. M.; COCCO, L.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; POLESEL, J.; LIBRA, M.; MCCUBREY, J. A. Roles of NGAL and MMP-9 in the tumor microenvironment and sensitivity to targeted therapy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 3, p. 438–448,2015.

CASTOLDI, A.; NAFFAH DE SOUZA, C.; CAMARA, N. O.; MORAES-VIEIRA, P. M. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Front Immunol**, v. 6, p. 637,2015.

CHEKHUN, V. F.; LOZOVSKA, Y. V.; BURLAKA, A. P.; GANUSEVICH, II; SHVETS, Y. V.; LUKIANOVA, N. Y.; TODOR, I. M.; DEMASH, D. V.; PAVLOVA, A. A.; NALESKINA, L. A. Metalloproteins during Development of Walker-256 Carcinosarcoma Resistant Phenotype. **Ukr Biochem J,** v. 87, n. 2, p. 103-12,2015.

CHUNG, J.; KIM, M. S.; HAN, S. N. Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice. **Nutr Res,** v. 31, n. 12, p. 915-21,2011.

COUSIN, B.; CASTEILLA, L.; LAHARRAGUE, P.; LUCHE, E.; LORSIGNOL, A.; CUMINETTI, V.; PAUPERT, J. Immuno-metabolism and adipose tissue: The key role of hematopoietic stem cells. **Biochimie**, v. 30, p. 6,2015.

CUTLER, P. Deferoxamine therapy in high-ferritin diabetes. **Diabetes**, v. 38, n. 10, p. 1207-10,1989.

DAO, M. C.; MEYDANI, S. N. Iron biology, immunology, aging, and obesity: four fields connected by the small peptide hormone hepcidin. **Adv Nutr,** v. 4, n. 6, p. 602-17,2013.

DEMEULEMEESTER, D.; COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on adipose tissue development. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 329, n. 1, p. 105-10,2005.

DEUGNIER, Y.; TURLIN, B.; ROPERT, M.; CAPPELLINI, M. D.; PORTER, J. B.; GIANNONE, V.; ZHANG, Y.; GRIFFEL, L.; BRISSOT, P. Improvement in liver pathology of patients with beta-thalassemia treated with deferasirox for at least 3 years. **Gastroenterology**, v. 141, n. 4, p. 1202-11, 1211 e1-3,2011.

DONGIOVANNI, P.; RUSCICA, M.; RAMETTA, R.; RECALCATI, S.; STEFFANI, L.; GATTI, S.; GIRELLI, D.; CAIRO, G.; MAGNI, P.; FARGION, S.; VALENTI, L. Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. **Am J Pathol**, v. 182, n. 6, p. 2254-63,2013.

DRAKESMITH, H.; PRENTICE, A. M. Hepcidin and the iron-infection axis. **Science**, v. 338, n. 6108, p. 768-72,2012.

ELIAS, I.; FRANCKHAUSER, S.; FERRE, T.; VILA, L.; TAFURO, S.; MUNOZ, S.; ROCA, C.; RAMOS, D.; PUJOL, A.; RIU, E.; RUBERTE, J.; BOSCH, F. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1801-13,2012.

FERNANDEZ-REAL, J. M.; PENARROJA, G.; CASTRO, A.; GARCIA-BRAGADO, F.; HERNANDEZ-AGUADO, I.; RICART, W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1000-4,2002.

FUJISAKA, S.; USUI, I.; BUKHARI, A.; IKUTANI, M.; OYA, T.; KANATANI, Y.; TSUNEYAMA, K.; NAGAI, Y.; TAKATSU, K.; URAKAZE, M.; KOBAYASHI, M.; TOBE, K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. **Diabetes,** v. 58, n. 11, p. 2574-82,2009.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61,2004.

GALLI, A.; SVEGLIATI-BARONI, G.; CENI, E.; MILANI, S.; RIDOLFI, F.; SALZANO, R.; TAROCCHI, M.; GRAPPONE, C.; PELLEGRINI, G.; BENEDETTI, A.; SURRENTI, C.; CASINI, A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. **Hepatology**, v. 41, n. 5, p. 1074-84,2005.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 783-8,2003.

_____. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 29-35, 507,2006.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 8, p. 500-10,2015.

GAO, Y.; LI, Z.; GABRIELSEN, J. S.; SIMCOX, J. A.; LEE, S. H.; JONES, D.; COOKSEY, B.; STODDARD, G.; CEFALU, W. T.; MCCLAIN, D. A. Adipocyte iron regulates leptin and food intake. **J Clin Invest**, v. 125, n. 9, p. 3681-91,2015.

GEHRKE, S. G.; KULAKSIZ, H.; HERRMANN, T.; RIEDEL, H. D.; BENTS, K.; VELTKAMP, C.; STREMMEL, W. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 371-6,2003.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 30, n. 5, p. 8,2008.

GUMMESSON, A.; HAGG, D.; OLSON, F. J.; HULTHE, J.; CARLSSON, L. M.; FAGERBERG, B. Adipose tissue is not an important source for matrix metalloproteinase-9 in the circulation. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 69, n. 6, p. 636-42,2009.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; GALY, B.; CAMASCHELLA, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 24-38,2010.

HOPPS, E.; CAIMI, G. Matrix metalloproteinases in metabolic syndrome. **Eur J Intern Med**, v. 23, n. 2, p. 99-104,2012.

ILYIN, G.; COURSELAUD, B.; TROADEC, M. B.; PIGEON, C.; ALIZADEH, M.; LEROYER, P.; BRISSOT, P.; LOREAL, O. Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. **FEBS** Lett, v. 542, n. 1-3, p. 22-6,2003.

KRAUSE, A.; NEITZ, S.; MAGERT, H. J.; SCHULZ, A.; FORSSMANN, W. G.; SCHULZ-KNAPPE, P.; ADERMANN, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Lett**, v. 480, n. 2-3, p. 147-50,2000.

LAHARRAGUE, P.; OPPERT, J. M.; BROUSSET, P.; CHARLET, J. P.; CAMPFIELD, A.; FONTANILLES, A. M.; GUY-GRAND, B.; CORBERAND, J. X.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34+ progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 24, n. 9, p. 1212-6,2000.

LEAR, S. A.; TEO, K.; GASEVIC, D.; ZHANG, X.; POIRIER, P. P.; RANGARAJAN, S.; SERON, P.; KELISHADI, R.; TAMIL, A. M.; KRUGER, A.; IQBAL, R.; SWIDAN, H.; GOMEZ-ARBELAEZ, D.; YUSUF, R.; CHIFAMBA, J.; KUTTY, V. R.; KARSIDAG, K.; KUMAR, R.; LI, W.; SZUBA, A.; AVEZUM, A.; DIAZ, R.; ANAND, S. S.; ROSENGREN, A.; YUSUF, S.; PROSPECTIVE URBAN RURAL EPIDEMIOLOGY, S. The association between ownership of common household devices and obesity and diabetes in high, middle and low income countries. **CMAJ**, v. 186, n. 4, p. 258-66,2014.

LEE, P.; PENG, H.; GELBART, T.; WANG, L.; BEUTLER, E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 102, n. 6, p. 1906-10,2005.

LU, Y.; WAHL, L. M. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. **J Immunol**, v. 175, n. 8, p. 5423-9,2005.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-84,2007.

LUMENG, C. N.; DELPROPOSTO, J. B.; WESTCOTT, D. J.; SALTIEL, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3239-46,2008.

MAKKI, K.; FROGUEL, P.; WOLOWCZUK, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. **ISRN Inflamm,** v. 2013, p. 139239,2013.

MAQUOI, E.; MUNAUT, C.; COLIGE, A.; COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1093-101,2002.

MARX, J. J. Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 15, n. 2, p. 411-26,2002.

MCCLUNG, J. P.; KARL, J. P. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. **Nutr Rev,** v. 67, n. 2, p. 100-4,2009.

MENZIE, C. M.; YANOFF, L. B.; DENKINGER, B. I.; MCHUGH, T.; SEBRING, N. G.; CALIS, K. A.; YANOVSKI, J. A. Obesity-related hypoferremia is not explained by differences in reported intake of heme and nonheme iron or intake of dietary factors that can affect iron absorption. **J Am Diet Assoc**, v. 108, n. 1, p. 145-8,2008.

MICHELS, K.; NEMETH, E.; GANZ, T.; MEHRAD, B. Hepcidin and Host Defense against Infectious Diseases. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 8, p. e1004998,2015.

MINAMIYAMA, Y.; TAKEMURA, S.; KODAI, S.; SHINKAWA, H.; TSUKIOKA, T.; ICHIKAWA, H.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; OKADA, S. Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 6, p. E1140-9,2010.

MOAYERI, H.; BIDAD, K.; ZADHOUSH, S.; GHOLAMI, N.; ANARI, S. Increasing prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents (Tehran Adolescent Obesity Study). **Eur J Pediatr,** v. 165, n. 11, p. 813-4,2006.

NAIRZ, M.; SCHROLL, A.; HASCHKA, D.; DICHTL, S.; SONNWEBER, T.; THEURL, I.; THEURL, M.; LINDNER, E.; DEMETZ, E.; ASSHOFF, M.; BELLMANN-WEILER, R.; MULLER, R.; GERNER, R. R.; MOSCHEN, A. R.; BAUMGARTNER, N.; MOSER, P. L.; TALASZ, H.; TILG, H.; FANG, F. C.; WEISS, G. Lipocalin-2 ensures host defense against Salmonella Typhimurium by controlling macrophage iron homeostasis and immune response. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 11, p. 3073-86,2015.

NEMETH, E.; GANZ, T. Anemia of inflammation. **Hematol Oncol Clin North Am,** v. 28, n. 4, p. 671-81, vi,2014.

NEMETH, E.; RIVERA, S.; GABAYAN, V.; KELLER, C.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, B. K.; GANZ, T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J Clin Invest**, v. 113, n. 9, p. 1271-6,2004.

NEMETH, E.; TUTTLE, M. S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M. B.; DONOVAN, A.; WARD, D. M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090-3,2004.

OUM'HAMED, Z.; GARNOTEL, R.; JOSSET, Y.; TRENTESEAUX, C.; LAURENT-MAQUIN, D. Matrix metalloproteinases MMP-2, -9 and tissue inhibitors TIMP-1, -2 expression and secretion by primary human osteoblast cells in response to titanium, zirconia, and alumina ceramics. **J Biomed Mater Res A**, v. 68, n. 1, p. 114-22,2004.

PARK, C. H.; VALORE, E. V.; WARING, A. J.; GANZ, T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **J Biol Chem**, v. 276, n. 11, p. 7806-10,2001.

PARROW, N. L.; FLEMING, R. E. Bone morphogenetic proteins as regulators of iron metabolism. **Annu Rev Nutr,** v. 34, p. 77-94,2014.

PEYSSONNAUX, C.; ZINKERNAGEL, A. S.; DATTA, V.; LAUTH, X.; JOHNSON, R. S.; NIZET, V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3727-32,2006.

PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology,** v. 139, n. 2, p. 393-408, 408 e1-2,2010.

PIETRANGELO, A.; DIERSSEN, U.; VALLI, L.; GARUTI, C.; RUMP, A.; CORRADINI, E.; ERNST, M.; KLEIN, C.; TRAUTWEIN, C. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 294-300,2007.

RECALCATI, S.; LOCATI, M.; GAMMELLA, E.; INVERNIZZI, P.; CAIRO, G. Iron levels in polarized macrophages: regulation of immunity and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 11, n. 12, p. 883-9,2012.

RECALCATI, S.; MINOTTI, G.; CAIRO, G. Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 10, p. 1593-616,2010.

RISHI, G.; WALLACE, D. F.; SUBRAMANIAM, V. N. Hepcidin: Regulation of the master iron regulator. **Biosci Rep**, v. 35, p. 12,2015.

ROCHETTE, L.; GUDJONCIK, A.; GUENANCIA, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target? **Pharmacol Ther**, v. 146, p. 35-52,2015.

ROJAS, J. M.; SANZ-ORTEGA, L.; MULENS-ARIAS, V.; GUTIERREZ, L.; PEREZ-YAGUE, S.; BARBER, D. F. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle uptake alters M2 macrophage phenotype, iron metabolism, migration and invasion. **Nanomedicine**,2015.

SARGENT, J. Obesity: Rethinking inflammation and adipocyte homeostasis. **Nat Rev Endocrinol,** v. 10, n. 8, p. 446,2014.

SCHMIDT, P. J.; TORAN, P. T.; GIANNETTI, A. M.; BJORKMAN, P. J.; ANDREWS, N. C. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. **Cell Metab**, v. 7, n. 3, p. 205-14,2008.

SIERRA-FILARDI, E.; VEGA, M. A.; SANCHEZ-MATEOS, P.; CORBI, A. L.; PUIG-KROGER, A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. **Immunobiology**, v. 215, n. 9-10, p. 788-95,2010.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; HAUNER, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 3, p. 1023-33,2007.

SOBBE, A.; BRIDLE, K. R.; JASKOWSKI, L.; DE GUZMAN, C. E.; SANTRAMPURWALA, N.; CLOUSTON, A. D.; CAMPBELL, C. M.; SUBRAMANIAM, V. N.; CRAWFORD, D. H. Inconsistent hepatic antifibrotic effects with the iron chelator deferasirox. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 30, n. 3, p. 638-45,2015.

SONNWEBER, T.; NACHBAUR, D.; SCHROLL, A.; NAIRZ, M.; SEIFERT, M.; DEMETZ, E.; HASCHKA, D.; MITTERSTILLER, A. M.; KLEINSASSER, A.; BURTSCHER, M.; TRUBSBACH, S.; MURPHY, A. T.; WROBLEWSKI, V.; WITCHER, D. R.; MLECZKO-SANECKA, K.; VECCHI, C.; MUCKENTHALER, M. U.; PIETRANGELO, A.; THEURL, I.; WEISS, G. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. **Gut,** v. 63, n. 12, p. 1951-9,2014.

TAJIMA, S.; IKEDA, Y.; SAWADA, K.; YAMANO, N.; HORINOUCHI, Y.; KIHIRA, Y.; ISHIZAWA, K.; IZAWA-ISHIZAWA, Y.; KAWAZOE, K.; TOMITA, S.; MINAKUCHI, K.; TSUCHIYA, K.; TAMAKI, T. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAy mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 1, p. E77-86,2012.

THEURL, I.; AIGNER, E.; THEURL, M.; NAIRZ, M.; SEIFERT, M.; SCHROLL, A.; SONNWEBER, T.; EBERWEIN, L.; WITCHER, D. R.; MURPHY, A. T.; WROBLEWSKI, V. J.; WURZ, E.; DATZ, C.; WEISS, G. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. **Blood**, v. 113, n. 21, p. 5277-86,2009.

WALLANDER, M. L.; LEIBOLD, E. A.; EISENSTEIN, R. S. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 7, p. 668-89,2006.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochem J,** v. 434, n. 3, p. 365-81,2011.

WANG, R. H.; LI, C.; XU, X.; ZHENG, Y.; XIAO, C.; ZERFAS, P.; COOPERMAN, S.; ECKHAUS, M.; ROUAULT, T.; MISHRA, L.; DENG, C. X. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. **Cell Metab**, v. 2, n. 6, p. 399-409,2005.

WENZEL, B. J.; STULTS, H. B.; MAYER, J. Hypoferraemia in obese adolescents. Lancet, v. 2, n. 7251, p. 327-8,1962.

WERNSTEDT ASTERHOLM, I.; TAO, C.; MORLEY, T. S.; WANG, Q. A.; DELGADO-LOPEZ, F.; WANG, Z. V.; SCHERER, P. E. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell Metab**, v. 20, n. 1, p. 103-18,2014.

WRIGHTING, D. M.; ANDREWS, N. C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3204-9,2006.

YANOFF, L. B.; MENZIE, C. M.; DENKINGER, B.; SEBRING, N. G.; MCHUGH, T.; REMALEY, A. T.; YANOVSKI, J. A. Inflammation and iron deficiency in the hypoferremia of obesity. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 9, p. 1412-9,2007.

YU, H.; LEE, H.; HERRMANN, A.; BUETTNER, R.; JOVE, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 11, p. 736-46,2014.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunol Lett,** v. 112, n. 2, p. 61-7,2007.

ZHOU, S. S.; LI, D.; CHEN, N. N.; ZHOU, Y. Vitamin paradox in obesity: Deficiency or excess? **World J Diabetes**, v. 6, n. 10, p. 1158-67,2015.

ZHU, L.; ZHAO, Q.; YANG, T.; DING, W.; ZHAO, Y. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. **Int Rev Immunol**, v. 34, n. 1, p. 82-100,2015.

8. ANEXOS

8.1 Aprovação Comitê de Ética

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Estudo da expressão de hepcidina no modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

ÁREA DE CONHECIMENTO: Farmacologia

Autor(es): Prof(a). Dr (a). Alessandra Gambero; Aline Noronha dos Santos.

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.02.10

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária do dia 25/02/2010 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,

Maria Betania de Oliveira Garcia Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa Universidade São Francisco

CÂMPUS DE CAMPINAS CÂMPUS DE ITATIBA

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825 Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Ars CEP 13045-270 (19) 3779-3300 Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933 CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036
8.2 Mice that are fed a high-fat diet display increased hepcidin expression in adipose tissue

J Nutr Sci Vitaminol, 59, 454–461, 2013

Mice That Are Fed a High-Fat Diet Display Increased Hepcidin Expression in Adipose Tissue

Érica Martins Ferreira GOTARDO, Aline Noronha dos SANTOS, Renan Akira MIYASHIRO, Sheley GAMBERO, Thalita ROCHA, Marcelo Lima RIBEIRO and Alessandra GAMBERO*

Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, Sao Francisco University Medical School, Braganca Paulista, SP, Brazil (Received April 19, 2013)

Summary Since the discovery that hepcidin is expressed in the adipose tissue of obese subjects, attention has been increasingly focused on alterations in iron homeostasis that are associated with adiposity. We examined the production of hepcidin, the expression of hepcidin-related genes and the iron content of the adipose tissue in obesity using Swiss mice fed a high-fat diet (HFD). The mice were maintained on a control diet or HFD for 12 or 24 wk, and body weight, adiposity and glucose homeostasis were evaluated. The expression of several genes (hepcidin, TfR1, TfR2, DMT1, FT-heavy, ferroportin, IRP-1, IRP-2 and HIF-1) and the protein expression of hepcidin and IL-6 were quantified. The iron level was assessed using a Prussian blue reaction in paraffin-embedded tissue. After 24 wk on the HFD, we observed increases in the levels of hepcidin in the serum and the visceral adipose tissue. The IL-6 levels also increased in the visceral adipose tissue. Adipocytes isolated from the visceral adipose tissues of lean and obese mice expressed hepcidin at comparable levels; however, isolated macrophages from the stromal vascular fraction expressed higher *hepcidin* levels. Adipose tissues from obese mice displayed increased tfR2 expression and the presence of iron. Our results indicate that IL-6 and iron may affect the signaling pathways governing hepcidin expression. Thus, the mice fed HFD for 24 wk represent a suitable model for the study of obesity-linked hepcidin alterations. In addition, hepcidin may play local roles in controlling iron availability and interfering with inflammation in adipose tissue. Key Words high-fat diet model, IL-6, iron, adipocyte, macrophage

A relationship between adiposity and alterations in iron homeostasis was first described more than 40 y ago (1). However, until recently, this topic has been poorly understood; research in this field became popular only after hepcidin was found to be expressed in the adipose tissue of obese subjects (2). Hepcidin, which was first described in 2001 (3), is a 25-amino-acid-long, cysteine-rich peptide with weak antimicrobial properties. Hepcidin is regulated by a number of factors, such as liver iron levels, inflammation, hypoxia and anemia. Hepcidin reduces the level of circulating iron by controlling its efflux from cells such as enterocytes, macrophages and hepatocytes via ferroportin internalization and degradation (4).

During chronic inflammation, which is hypothesized to exist at low levels in obese subjects, hepcidin expression may result in hypoferremia due to decreased duodenal iron absorption and increased iron sequestration by macrophages; this process results in anemia of inflammation (4). Although iron is required for oxygen transport, it may be toxic because it reacts with oxygen and catalyzes the production of reactive oxygen species. Therefore, organisms have evolved many proteins that can transport and store iron in a non-toxic form (5). During inflammation, hepcidin expression is apparently induced by interleukin (IL)-6, which is known to be involved in the development of obesity and insulin resistance (4, 6). In obesity, the expanded adipose tissue mass (which contains a significant number of infiltrating macrophages) seems to produce one-third of all detected plasma IL-6 (7). In fact, IL-6 expression correlates with hepcidin expression in human adipose tissue, and IL-6 treatment induces hepcidin expression in adipose tissue explants (2). A stromal vascular fraction (SVF) displayed higher hepcidin expression than adipocytes isolated from obese adipose tissue, suggesting that macrophages may contribute to hepcidin production (2).

High-fat diet (HFD)-induced obesity in mice is a useful model that can be used to study adipose tissue inflammation. We aimed to determine whether a HFD could induce changes in hepcidin levels in adipose tissue and whether infiltrated macrophages contribute to this phenomenon. We also analyzed the expression of several genes that regulate or are regulated by hepcidin, and we measured iron levels in the adipose tissue in experimentally induced obesity.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male, 8-wk-old Swiss strain mice $(33.4\pm0.4 \text{ g})$ that were free of specific pathogens were

^{*}To whom correspondence should be addressed.

E-mail: alessandra.gambero@usf.edu.br

Table 1. Components of the control and H	FD.
--	-----

	Control		H	H FD
	$g \cdot kg^{-1}$	$kcal \cdot kg^{-1}$	$g \cdot kg^{-1}$	kcal∙kg ⁻¹
Cornstarch (Q.S.P.)	397.5	1,590	115.5	462
Casein	200	800	200	800
Sucrose	100	400	100	400
Dextrinated starch	132	528	132	528
Lard	_		312	2,808
Soybean oil	70	630	40	360
Cellulose	50	·	50	_
Mineral Mix (AIN-93)	35	—	35	—
Vitamin Mix (AIN-93)	10	—	10	_
L-Cystine	3	_	3	_
Choline	2.5	_	2.5	_
Total	1,000	3,948	1,000	5,358

obtained from CEMIB (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil). The experiments were performed in accordance with the principles outlined by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and received approval from the Ethics Committee of São Francisco University, Bragança Paulista, SP, Brazil (Protocol 001.02.10). The animals were maintained on a 12:12 h artificial light-dark cycle and housed individually.

Diet-induced obesity and metabolic status. After random selection, the mice were introduced to a control (15% energy from fat) or high-fat diet (HFD; 60% energy from fat) (Table 1). Body weights and food intake were assessed weekly. The mice were evaluated after 12 or 24 wk on a HFD. One week before the feeding protocols ended, glucose and insulin tolerance tests were performed. For the glucose tolerance test, mice were fasted for 6 h, and blood samples were collected from the tails (time 0). A solution of 20% glucose (2.0 g/ kg body weight) was injected into the peritoneal cavity (i.p.). To determine the serum glucose concentrations, blood samples were collected from the tail at 30, 60, 90 and 120 min. Glucose levels were measured using the glucose oxidase method, and the obtained values were plotted as a curve. Insulin (1.5 U/kg) was administered by an i.p. injection, and blood samples were collected for serum glucose determination at 0, 5, 10 and 15 min. The rate constant for glucose disappearance during an insulin tolerance test (kITT) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase. The basal glucose level was also determined at the end of the feeding protocol before the animals were euthanized.

Blood and tissue collection. After 6 h of fasting, the mice were anesthetized with xylazine/ketamine (1:1 v/v of xylazine 2%-ketamine 10%), and blood samples were collected by cardiac puncture. Blood/EDTA was used to analyze the hematological parameters, and

serum samples were obtained from the collected blood lacking an anticoagulant solution for EIA quantification of hepcidin. Serum was also employed for iron measurements using a colorimetric test (BioClin, Belo Horizonte, MG, Brazil). Epididymal and subcutaneous adipose tissues were carefully dissected and weighed. Fragments of adipose tissue were homogenized in solubilizing buffer at 4°C (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/mL). Any insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9,000 $\times g$ at 4°C. The protein concentrations of the supernatants were determined by the Biuret method. The supernatants were employed in EIA measurements of hepcidin and IL-6. The epididymal adipose tissue and liver fragments were immediately collected and stored at 80°C in the RNAlater solution (Qiagen, Valencia, CA). Fragments of epididymal adipose tissue were also collected and fixed in paraformaldehyde.

Macrophage and adipocyte isolation from adipose tissue. Epididymal adipose tissue was digested in a collagenase solution (100 μ g/mL in Krebs-Henseleit buffer) for 45 min at 37°C with constant shaking (100 cycles/min). The cells were filtered through nylon mesh (180 μ M) and washed three times with Krebs-Henseleit buffer. The stromal vascular fraction (SVF) was collected after the cell suspension was centrifuged, and the adipocytes were collected after flotation. Macrophages (CD11b+ cells) were obtained from the SVF via magnetic-activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Germany). The isolated adipocytes and macrophages were stored at 80°C in RNAlater solution (Qiagen). In these experiments, primarily in the control diet (non-obese) group, the epididymal adipose tissues from different animals were pooled due the low amount of sample obtained.

Measurement of IL-6 and hepcidin proteins. IL-6 and hepcidin were quantified in serum and adipose tissue samples using commercial EIA kits (IL-6 from R&D Systems, Minneapolis, MN; hepcidin from USCN Life Science, Wuhan, China).

RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction. Total RNA was isolated from isolated cells or tissues using the RNeasy Mini kit (Qiagen). Single-stranded cDNA was synthesized using a High-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's protocol. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed using a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems), and the threshold cycle numbers were determined using the RQ STUDY software program (Applied Biosystems). The reactions were performed in triplicate, and the threshold cycle numbers were averaged. Each 50 μ L reaction was prepared as follows: 25 μ L of Platinum SYBR Green Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA), 10 nM each primer (Table 2) and 100 ng cDNA. The reaction was subjected to a preliminary UDG treatment for 2 min at 50°C and a denaturation for 2 min at 95°C; this process was followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing

m 1 1 m			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Table 2.	Primers used	in real-time po	vmerase chain reactions	s.

Primer	Sense	Antisense
Hepcidin-1 ¹	5'CCTATCTCCATCAACAGATG 3'	5'AACAGATACCACACTGGGAA 3'
Hepcidin-2 ¹	5'CCTATCTCCATCAACAGATG 3'	5'AACAGATACCACAGGAGGGT 3'
Hepcidin ²	5'CTTCCCCATCTGCATCTTCT 3'	5'GGTCAGGATGTGGCTCTAGG 3'
IL-6	5'CCGGAGAGGAGACTTCACAG 3'	5'TCCACGATTTCCCAGAGAAC 3'
TfR1	5'ATGAGGGAAATCAATGATCGTATT 3'	5'CTCTCTTGGAGATACATAGGGCGA 3'
TfR2	5'ACCCATCAGACTTCTCCCAGG 3'	5'GTTTGATTGAAGGACGGGAAG 3'
DMT1	5'CCAGTGATGAGTGAGTTTTTCCAAT 3'	5'AGCAGACGATCAGGACCAGG 3'
BMP6	5'GTCATGAGCTTTGTGAACCTGG 3'	5'TGAACTCTTTGTGGTGTCGTTGA 3'
FT-heavy	5'ACTGGCTACTGACAAGAATGATCC 3'	5'TAATGGATTTCACCTGTTCACTCA 3'
Ferroportin	5'ATAGTCTCTGTCAGCCTGCTGTTT 3'	5'CGTCAAATCAAAGGACCAAAGA 3'
IRP-1	5'ATGCGTGGAATCCCAAATCTA 3'	5'CACTATGGACTTGGGTGGCTG 3'
IRP-2	5'CCATAGCAGGCACAGTGAATATAG 3'	5'TAAATTTCCTTGCCCGTAGAGTC 3'
HIF-1	5'GAAGCACTAGACAAGTTCACCTGA 3'	5'TTAGGCTGGGAAAAGTTAGGAGT 3'

¹ Ref. 10).

² Primer designed from a consensus region to amplify both the HEPC1 and HEPC2 genes.

Table 3. Clinical parameters of the control and HFD-fed mice after 12 and 24 wk.

	12	wk	24	wk
	Control	HFD	Control	HFD
Final body weight (g)	41.3 ± 1.1	56.8±1.7**	45.5 ± 1.2	62.0±2.2**
Epididymal fat ¹	2.77 ± 0.32	$3.60 \pm 0.11^*$	4.08 ± 0.33	$5.54 \pm 0.37^{*}$
Subcutaneous fat ¹	1.49 ± 0.19	$5.32 \pm 0.79^{**}$	2.21 ± 0.2	$6.18 \pm 0.55^{**}$
Basal glucose (mg/dL)	120 ± 16	203±15**	130 ± 11	$219 \pm 25^{**}$
ITT (k)	3.39 ± 0.75	$1.17 \pm 0.09^{**}$	2.12 ± 0.50	$0.38 \pm 0.15^{**}$
i.p. GTT (AUC)	$21,040 \pm 894$	42,484±1,168**	$30,709 \pm 2,082$	40,165±2,380**
Serum iron (μ g/dL)	NA	NA	245 ± 2	$173 \pm 20^{*}$

¹Expressed as% of body weight.

Significantly different from the control, p<0.05 and p<0.01 (n=5). NA: not analyzed.

for 15 s and primer extension at 72°C for 15 s. A melting point analysis of the double-stranded amplicons was then performed using 40 cycles of 1°C decrements (15 s each) beginning at 95°C. The first derivative of this plot, *dF/dT*, represents the rate of fluorescence change in the reaction; a significant change in fluorescence accompanies the melting curve of the double-stranded PCR products. A plot of *dF/dT* vs. temperature was used to display these changes as distinct peaks. The expression levels of the genes listed in Table 2 were examined and normalized to a constitutively expressed gene (GAPDH), and the relative fold induction was calculated according to the formula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (*8*).

Immunohistochemistry and Prussian blue reaction in adipose tissue. Hydrated 5.0 μ m sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded adipose tissue specimens were probed with anti-rabbit F4/80 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); they were then probed with a biotinylated anti-rabbit secondary antibody and developed with DAB (ImmunoCruz ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology). Hematoxylin was used to reveal the nuclear morphology. Slides were additionally incubated with a 5% potassium ferrocyanide aqueous solution and a 5% hydrochloric acid aqueous solution, providing the Prussian blue reaction. After washing in distillated water, the sections were counterstained with Nuclear Fast Red. Isolated macrophages (CD11b+ cells) were also subjected to Prussian blue reaction.

Statistical analysis. All of the data are expressed as the means \pm SE. Comparisons among groups of data were performed using unpaired Student's *t* tests. An associated probability (*p* value) of less than 5% was considered to be significant.

RESULTS

Obesity, metabolic and hematological alterations

Swiss mice that were fed a HFD for 12 wk became obese and contained large amounts of visceral and subcutaneous adipose tissue, concurrent with the establishment of glucose tolerance and insulin resistance (Table 3). An increased length of the HFD-feeding period only worsened these parameters (Table 3). In obese mice, leukocyte number was increased in both groups (Table

Table 4. H	Tematological	parameters c	of the	control and	HFD-fec	l mice after	12 and	24 v	vk.
------------	---------------	--------------	--------	-------------	---------	--------------	--------	------	-----

	12	wk	24	wk
_	Control	HFD	Control	HFD
Red blood cells $(10^6/\mu L)$	8.94 ± 0.18	8.71±0.17	9.15±0.23	7.82±0.59*
Hemoglobin (g/dL)	13.3 ± 0.3	13.2 ± 0.2	13.1 ± 0.3	$11.5 \pm 0.8^{*}$
Hematocrit (%)	42.1 ± 1.1	40.6 ± 0.8	41.9 ± 0.9	$34.6 \pm 3.0^{*}$
MCV (f1)	47.1 ± 0.8	46.6 ± 0.2	45.1 ± 1.0	44.1 ± 0.6
MCH (pg/cell)	14.8 ± 0.2	15.3 ± 0.3	14.8 ± 0.2	14.6 ± 0.2
MCHC (g/dL)	31.5 ± 0.2	32.9 ± 0.5	32.9 ± 1.0	33.1 ± 0.2
RDW (%)	14.3 ± 0.3	16.0 ± 1.0	14.0 ± 0.7	14.9 ± 0.4
White blood cells (cells/ μ L)	$2,016\pm241$	$3,120\pm522^*$	$2,025\pm363$	$2,850\pm125^{*}$

Significantly different from the control, p < 0.05 (n = 5-7).

MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width.



Fig. 1. Hepcidin levels in subcutaneous and visceral adipose tissues (A and B) and sera (C) from mice fed a normal (control) or HFD for 12 (A) or 24 (B) wk. Significantly different from the control, *p < 0.05 and **p < 0.01 (n=5).

4). The red blood count, hemoglobin, hematocrit and iron levels were lower in the obese mice compared to the age-matched controls after 24 wk of HFD (Table 4). Food intake was not different between groups at 24 wk (4.6 ± 0.4 and 4.3 ± 0.2 g/d for control and HFD, respectively).

Hepcidin expression in adipose tissue during the development of obesity

The subcutaneous and visceral adipose tissues and sera from mice that were fed a HFD for 12 wk displayed normal hepcidin protein levels. However, we observed a significant increase of hepcidin protein levels in the visceral (epididymal) adipose tissue and serum from the mice that were maintained on the diet for 24 wk (Fig. 1). The expression of *hepcidin-1* but not *hepcidin-2* was higher in the adipose tissue from the 24-wk group compared with the lean group (Table 5). *Hepcidin-1* expression was higher than *hepcidin-2* expression in all of the samples tested (Tables 5 and 7). The use of an additional primer that could amplify both genes (named *hepcidin*) confirmed increased *hepcidin* expression in the visceral adipose tissue of mice fed a HFD for 24 wk (Table 5). In the same group (24 wk on the HFD), the gene and protein levels of IL-6 were significantly increased in the visceral adipose tissue (Table 5: Fig. 2). We also analyzed the expression of several genes related to hepcidin expression in whole adipose tissue. We observed an increase in the expression of *transferrin receptor-2 (TfR2)*

GOTARDO EMF et al.

Table 5. Gene expression in visceral adipose tissue from control or HFD-fed mice at 24 wk.

Table	6.	Hep	ocidin	gene	e expres	sion	in m	acr	oph
(AI	'M)	and	adipo	cytes	isolated	from	visce	eral	adi
tiss	ne f	rom	contro	l or H	FD-fed n	nice a	t 24 w	vk	

Gene	Control (UA)	HFD (UA)
Hepcidin ¹	8.91±0.38	16.3±2.95*
Hepcidin-1 ²	2.43 ± 0.63	$14.7 \pm 4.30^{*}$
Hepcidin-2 ²	0.71 ± 0.44	0.74 ± 0.39
IL-6	2.54 ± 0.77	9.11±2.59*
FERROPORTIN	6.23 ± 1.35	4.25 ± 1.14
TFR 1	11.3 ± 2.75	8.08 ± 2.08
TFR 2	7.85 ± 1.07	$12.8 \pm 1.57^*$
IRP 1	106 ± 19	55±11**
IRP 2	32.9 ± 5.2	28.1 ± 2.11
DMT 1	16.7 ± 1.85	12.6 ± 1.91
FT-HEAVY	$1,474\pm110$	1220 ± 109
BMP 6	15.9 ± 0.98	10.2±1.11**
HIF-1	50.6 ± 0.50	53.2 ± 11.04

ages ipose

	Control (UA)	HFD (UA)
ATM	2.10 ± 1.09	19.2±7.75**
Adipocytes	26.1 ± 12.5	25.2 ± 7.3

Significantly different from the control, **p < 0.01(n=3-4).

Table 7. Hepcidin gene expression in the liver from control or HFD-fed mice at 24 wk.

Gene	Control (UA)	HFD (UA)
Hepcidin ¹	$1,123\pm108$	677±165*
Hepcidin-1 ²	916 ± 157	$485 \pm 117^{*}$
Hepcidin-2 ²	25.4 ± 9.14	8.88 ± 2.28

¹Primer designed from a consensus region to amplify both the HEPC1 and HEPC2 genes.

Significantly different from the control, *p < 0.05 and

² Ref. 10).

** p<0.01 (n=4).

Significantly different from the control, p < 0.05 (n=4). ¹Primer designed from a consensus region to amplify both the HEPC1 and HEPC2 genes. ² Ref. 10).



Fig. 2. IL-6 levels in subcutaneous and visceral adipose tissues from mice fed a normal (control) or HFD for 12 (A) or 24 (B) wk. Significantly different from the control, **p < 0.01 (n=5).

and a decrease in the expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP6) and iron regulatory protein-2 (IRP2) in adipose tissues from obese mice (24 wk). The expression levels of TfR1, divalent metal transporter (DMT1), ferritin heavy chain (FT-heavy), Ferroportin, IRP-1 and hypoxia inducible factor (HIF-1) were not altered (Table 5). Adipocytes that were isolated from epididymal adipose tissues from lean and obese mice (24 wk) displayed no significant differences with respect to their hepcidin expression levels (Table 6). However, macrophages isolated from SVF from epididymal adipose tissue from obese mice displayed increased hepcidin levels (Table 6). In the experiment using isolated cells, only the primer (named *hepcidin*) designed from a consensus region common to both genes was employed due the low level of sample obtained.

Hepcidin expression in the liver during obesity

Hepcidin-1 gene expression was significantly lower in the liver of obese mice (24 wk). Hepcidin-2 expression was also reduced, but the reduction was not statistically

significant (p=0.104). These data were consistent with those generated by using hepcidin primer (Table 7). Macrophage infiltration into adipose tissue and Prussian blue reaction in adipose tissue

The maintenance of Swiss mice on a HFD for 24 wk resulted in a dramatic increase in the number of macrophages that infiltrated between the adipocytes (Fig. 3). Sections of the same adipose tissue depot incubated with potassium ferrocyanide in an acidic environment were labeled with small blue dots between the adipocytes (Fig. 3), demonstrating the presence of iron or ferritin. The presence of macrophages with intense blue dots was also more evident in cells from the adipose tissue of obese mice (Fig. 3).

DISCUSSION

Obesity is associated with chronic, low-grade, systemic inflammation that is evidenced by increased plasma and adipose tissue levels of several pro-inflammatory mediators. Although hepcidin expression is

Hepcidin and Adipose Tissue



Fig. 3. Epididymal adipose tissue and isolated macrophages from mice fed a control (A, C and E) or HF diet (B, D and F) for 24 wk. Prussian blue reaction assessing the presence of ferric iron and ferritin (arrow; A and B; E and F). Immuno-histochemistry for F4/80 in paraffin-embedded sections to detect macrophage infiltration (arrow; C and D). Panel A–D: 5.0 μm; magnification: 100×; asterisks indicate adipocytes. Panel E and F: magnification: 1,000×.

increased in abdominal subcutaneous adipose tissue from obese subjects, this change is not correlated with morbidities such as diabetes and nonalcoholic steatohepatitis (2). Few studies have evaluated hepcidin expression in adipose tissue, and an experimental model that can reproduce hepcidin alterations in obesity will be useful. Swiss mice that were fed a HFD for 24 wk (but not those fed the same diet for 12 wk) displayed high hepcidin levels in both their serum and visceral adipose tissue. The increased hepcidin expression in the adipose tissue was dependent on more than just increased adiposity or metabolic alterations, such as glucose tolerance and insulin resistance, because these alterations were already present after 12 wk on the HFD. However, hepcidin expression clearly correlated with increased quantities of IL-6 in the visceral adipose tissue; these levels were only observed after 24 wk on a HFD. Pini and coworkers (9) reported that C57BL6 mice fed a HFD for 17 wk displayed higher IL-6 levels in the visceral adipose tissue. The authors further demonstrated that these levels were associated with hyperinsulinemia and normoglycemia and that the mice displayed normal hepcidin gene (Hepcidin-1 and 2) expression in adipose tissue. Although only one hepcidin gene is thought to exist in the human genome, the mouse genome seems to contain two hepcidin genes with similar genomic organization schemes $(10). \, {\rm Both \ genes}$ are expressed in a dult tissues, and their expression levels are increased in the liver following iron overload (10). Our protein analysis did not discriminate between mouse hepcidin-1 and 2, and the primer used to perform quantitative RT-PCR in isolated cells was designed from a consensus region

GOTARDO EMF et al.

common to both genes. In the tissue analysis, all of the hepcidin primers were used (hepcidin-1, hepcidin-2 and hepcidin), and the analysis generated similar results to the quantitative RT-PCR analysis. The increased hepcidin protein expression levels in the serum and visceral adipose tissue were only observed after 24 wk of HFD, suggesting that this effect may represent a late event in models of diet-induced obesity. In humans, the hepcidin gene was found to be expressed in both isolated adipocytes and in the SVF (2). The human THP-1 monocyte cell line and rodent macrophage cell lines also express hepcidin, and this expression increased following a LPS stimulus (2, 11). Our findings demonstrate for the first time that CD11b+ cells (macrophages) isolated from the SVF of epididymal adipose tissue express more hepcidin during obesity in mice. Notably, a significant macrophage infiltration into adipose tissue is observed during obesity, and these cells exist in an activated status; they can produce and secrete several adipokines that act locally and systemically. No differences in hepcidin expression were observed in isolated adipocytes during obesity. However, because the amount of adipose tissue is increased in obesity, the adipose tissue itself could contribute to the elevated hepcidin serum levels, anemaia and hypoferremia that were observed in our mice. Interestingly, the hepcidin gene expression level in the liver decreased significantly in the obese mice (24 wk). The same experimental group showed increased hepcidin levels in the serum but decreased hepcidin levels in the liver, which is the primary site of hepcidin production. We hypothesized that hepcidin mRNA reduction in liver could be a response to hypoferremia or due an increase of circulating hepcidin protein detected as a homeostatic response.

We next analyzed the visceral adipose tissue expression levels of several genes that are potentially related to hepcidin. The stimulatory effect of IL-6 on hepcidin is transcriptional and depends on interactions between STAT3 and a STAT3-binding element in the hepcidin promoter (12). The hepcidin gene is most likely sensitive to IL-6 and other inflammatory stimuli due to the ancestral antimicrobial properties of the peptide. Iron overload can also induce hepcidin expression, which results in a protective effect whereby hepcidin controls iron availability to the tissues, thus preventing the production of free radicals (13). However, hepcidin regulation by iron is not fully understood. Transferrin receptor 2 (TfR2) is a candidate mediator of iron-mediated regulation of hepcidin synthesis in the liver (14). We observed a significant increase in TfR2 expression in the visceral adipose tissue, suggesting that iron may also help to regulate hepcidin expression in adipose tissue during obesity. Moreover, the level of bone morphogenetic protein (BMP)-6 also increases in the liver in response to iron overload (15). However, our results showed a significant reduction in BMP-6 gene expression in adipose tissue, suggesting that this pathway is not involved in obesity-induced changes in hepcidin. Although the suppression of hepcidin expression may be caused by hypoxia, the gene expression of hypoxia inducible factor (HIF)-1 was not up-regulated in the visceral adipose tissue of our obese mice. The production of several proteins involved in iron homeostasis is controlled through the interaction of iron regulatory proteins (IRPs) and iron responsive elements (IREs). When iron enters cells, the conformation of IPR-1 is altered, and IRP-2 is degraded. Therefore, neither protein can interact with IREs, resulting in the degradation of TfR1 and divalent metal transporter (DMT)-1 and the transcription of ferritin (16). The gene expression level of IRP-1 was low, but the expression levels of ferritin heavy chain (FT-HEAVY). TfR1 and DMT-1 were unchanged. These results should be interpreted carefully because these genes are regulated post-transcriptionally. But, the gene expression analyses suggested that the cellular level of iron in the adipose tissue may have increased, and the Prussian blue reaction demonstrated the presence of ferric iron in the adipose tissue sections. Iron localization, which was observed only in the visceral adipose tissues of obese mice, correlated with macrophage infiltration and seemed to exist between the adipocytes. The analysis of Prussian blue reaction in isolated macrophages from adipose tissue confirmed the presence of more ferric iron in these cells during obesity. Adipose tissue macrophages display a peculiar phenotype including the presentation of M2 surface markers, but they can produce cytokines and chemokines like M1 cells (17). M1 macrophages are characterized by increased iron retention, which is generally understood to represent a bacteriostatic mechanism (18). The iron retention in these cells also contributes to their increased ability to produce pro-inflammatory cytokines. Ferrous iron causes the endosomal accumulation of superoxide anions in caveosomes, initiating signaling pathways that induce IKK activation. IKK activation leads to NF-kB activation and the induction of M1 genes, such as $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$, without interfering with M2 anti-inflammatory gene expression (19). However, iron retention also contributes to a reduction of the oxidative stress in the microenvironment. Recent studies have reported that the reduction of iron levels in experimentally induced obesity using deferoxamine ameliorates adipocyte hypertrophy by reducing oxidative stress, inflammatory cytokine levels and macrophage infiltration, thus attenuating the deleterious consequences of obesity (20). Iron can also induce insulin resistance and reduce adiponectin expression in isolated adipocytes (21, 22). Therefore, further studies should be performed to determine whether hepcidin efficiently controls iron availability in adipose tissues during obesity as a protective mechanism or whether iron retention by adipose tissue macrophage contributes to the M1 phenotypes of these cells and their ability to release pro-inflammatory cytokines. Because adipose tissue contained increased levels of iron and IL-6 and because these components putatively participate in signaling that regulates hepcidin expression, future studies should explore whether increased IL-6 is a cause or consequence of the presence of iron. HFD seems to cause iron deficiency also by a hepcidin-independent mechanism through reduction of duodenal absorption (23). In mice fed a HFD for 10 wk, duodenal DMT1 and TFR1 mRNA expressions were higher as compared with normal diet animals, suggesting an enterocyte iron deficiency (23). In the same animals, oxidoreductases Dcyt and hephaestin mRNA expressions were reduced suggesting that the HFD influences directly or indirectly enzymatic activity impairing transport iron across enterocyte membranes (23). In our animals, duodenal DMT1 and TFRI mRNA were also higher in obese mice in agreement with previous described data (not shown). We cannot rule out the possibility that additional mechanisms, i.e. impaired duodenal absorption, could contribute to the hypoferremia observed in our work.

Thus, when Swiss mice were fed a HFD for 24 wk, hepcidin production was increased by the visceral adipose tissue, which caused a systemic (serum and hepatic) alteration in hepcidin levels. Finally, we hypothesized that hepcidin may play a local role in controlling iron availability in adipose tissue during obesity. Future studies can contribute to the understanding of iron's functions in the physiology of adipocytes and in the interactions between macrophages and adipocytes.

Acknowledgments

A. N. dos Santos received a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

- Seltzer CC, Mayer J. 1963. Serum iron and iron-binding capacity in adolescents. II. Comparison of obese and nonobese subjects. *Am J Clin Nutr* 13: 354–361.
- 2) Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, Iannelli A, Staccini-Myx A, Casanova D, Ben Amor I, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Gugenheim J, Srai SK, Tran A, Le Marchand-Brustel Y. 2006. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* **131**: 788–796.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem 276: 7806–7810.
- Ganz T. 2011. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. Blood 117: 4425–4433.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117: 285–297.
- 6) Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* **316**: 129–139.
- 7) Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. J Clin Endocrinol Metab 82: 4196–4200.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Pini M, Rhodes DH, Fantuzzi G. 2011. Hematological and acute-phase responses to diet-induced obesity in IL-6 KO mice. *Cytokine* 56: 708–716.
- 10) Ilyin G, Courselaud B, Troadec MB, Pigeon C, Alizadeh

M, Leroyer P, Brissot P, Loréal O. 2003. Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett* **542**: 22–26.

- 11) Liu XB, Nguyen NB, Marquess KD, Yang F, Haile DJ. 2005. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells Mol Dis* 35: 47–56.
- Wrighting DM, Andrews NC. 2006. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. Blood 108: 3204–3209.
- 13) Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. J Biol Chem 276: 7811–7819.
- 14) Gehrke SG, Kulaksiz H. Herrmann T. Riedel HD, Bents K, Veltkamp C, Stremmel W. 2003. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood* **102**: 371–376.
- 15) Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. 2009. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. Nat Genet 41: 482–487.
- Wang J, Pantopoulos K. 2011. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 434: 365–381.
- 17) Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. 2007. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes* **31**: 1420–1428.
- 18) Recalcati S, Locati M, Gammella E, Invernizzi P, Cairo G. 2012. Iron levels in polarized macrophages: regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 11: 883–889.
- 19) Zhong S, Xu J, Li P, Tsukamoto H. 2012. Caveosomal oxidative stress causes Src-p21ras activation and lysine 63 TRAF6 protein polyubiquitination in iron-induced M1 hepatic macrophage activation. J Biol Chem 287: 32078–32084.
- 20) Tajima S, Ikeda Y, Sawada K, Yamano N, Horinouchi Y, Kihira Y, Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tsuchiya K, Tamaki T. 2012. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAy mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 302: E77–E86.
- 21) Green A, Basile R, Rumberger JM. 2006. Transferrin and iron induce insulin resistance of glucose transport in adipocytes. *Metabolism* 55: 1042–1045.
- 22) Gabrielsen JS, Gao Y, Simcox JA, Huang J, Thorup D, Jones D, Cooksey RC, Gabrielsen D, Adams TD, Hunt SC, Hopkins PN, Cefalu WT, McClain DA. 2012. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. J Clin Invest 122: 3529–3540.
- 23) Sonnweber T, Ress C, Nairz M, Theurl I, Schroll A, Murphy AT, Wroblewski V, Witcher DR, Moser P, Ebenbichler CF, Kaser S, Weiss G. 2012. High-fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption. *J Nutr Biochem* 23: 1600–1608.

8.3 Effects of iron supplementation in mice with hypoferremia induced by obesity

Experimental Biology and Medicine

EFFECTS OF IRON SUPPLEMENTATION IN MICE WITH HYPOFERREMIA INDUCED BY OBESITY.

Journal:	Experimental Biology and Medicine
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gotardo, Érica; São Francisco University, Clinical pharmacology and gastroenterology unit Caria, Cintia; São Francisco University, Clinical pharmacology and gastroenterology unit DeOliveira, Caroline; São Francisco University, Clinical pharmacology and gastroenterology unit Rocha, Thalita; São Francisco University, Clinical pharmacology and gastroenterology unit Ribeiro, Marcelo; São Francisco University, Clinical pharmacology and gastroenterology unit Gambero, Alessandra; São Francisco University, Clinical pharmacology and gastroenterology unit
Keywords:	hepcidin, ADIPOSE, adipokine, adipose tissue macrophage, iron, hypoferremia
Abstract:	Iron is an important micronutrient, but it can also act as a dangerous element by interfering with glucose homeostasis and inflammation, two features that are already disturbed in obese subjects. We investigated the effects of systemic iron supplementation on metabolic and inflammatory responses in mice with hypoferremia induced by obesity to better characterize whether iron worsens the parameters that are already altered after 24 weeks of a high-fat diet (HFD). Male Swiss mice were maintained on a control diet or a HFD for 24 weeks and received iron-III polymaltose (50 mg/kg/every 2 days) during the last two weeks. Glucose homeostasis (basal glucose and insulin test tolerance) and systemic and visceral adipose tissue (VAT) inflammation were assessed. Serum iron levels were measured using a colorimetric assay. The Prussian blue reaction was used in isolated macrophages or VAT to detect iron deposition. Iron supplementation resulted in an increased number of VAT macrophages that were positive for Prussian blue staining as well as increased serum iron levels. Systemic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), leptin, resistin and hepcidin levels were not altered by iron supplementation. Local adipose tissue inflammation was also not made worse by iron supplementation because the levels of interleukin (IL)-6, MCP-1, leptin and hepcidin were not altered. Leukocytosis and WAT levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were reduced, but insulin resistance was not altered after iron supplementation. In conclusion, systemic iron supplementation in mice with hypoferremia induced by obesity did not worsen inflammatory marker or adipose tissue inflammation or the metabolic status established by obesity. Iron deposition was observed in adipose tissue, mainly in macrophages,

https://mc.manuscriptcentral.com/ebm

