

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

A deficiência de vitamina A modula o metabolismo de ferro via eritropoiese ineficaz de forma independente da resposta inflamatória

MARCELA DE SÁ BARRETO DA CUNHA

BRASÍLIA

2013

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

A deficiência de vitamina A modula o metabolismo de ferro via eritropoiese ineficaz de forma independente da resposta inflamatória

MARCELA DE SÁ BARRETO DA CUNHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Área de concentração: Bioquímica Nutricional

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Fernandes Arruda

Brasília  
2013

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Comunicamos a aprovação da dissertação de mestrado da aluna **Marcela de Sá Barreto da Cunha**, intitulada “**A deficiência de vitamina A modula o metabolismo de ferro via eritropoiese ineficaz de forma independente da resposta inflamatória**”, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Fernandes Arruda  
Orientadora - Departamento de Nutrição - Universidade de Brasília (UnB)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nathália Marcolini Pelúcio Pizato Valério  
Membro - Departamento de Nutrição - Universidade de Brasília (UnB)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Grace Magalhães  
Membro - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília (UnB)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Egle Machado de Almeida Siqueira  
Suplente - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília (UnB)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter nos dado uma (ou mais uma) chance de estar aqui para fazer algo por nós e pelo mundo.

A minha família, tão pequena e tão grande. A minha vó Mara, de estatura inversamente proporcional a sua fé, por me ensinar coisas que a academia não ensina. A minha mãe Maria do Socorro, pelas conversas, abraços e olhares confortantes. A minha irmã Marina, por sua amizade eterna, mesmo na distância. Ao meu pai Jairo e à Cida, por me incentivarem e apoiarem as minhas escolhas.

À Professora Dra Sandra, minha orientadora, pela dose diária de ética, competência e dedicação, ensinando com humildade como ser um bom professor-pesquisador.

À Professora Dra Egle, por ter acreditado e me proporcionado o início na pesquisa e ter permitido que essa experiência se propagasse.

À tia Ana, por ser a minha pessoa, pelas incansáveis conversas e pela troca de experiências. À Aline, Amanda, Thalita, Sinara, Marina e Flor, pela amizade desde o ensino fundamental. À Lorena, pela amizade e carinho, pelo colo e abraço diários, pelo silêncio e palavras, pelas lágrimas de alegria e outras nem tanto assim. À Sandra, por todas as palavras ditas que me ajudam tanto sem saber, pelo exemplo de pessoa, pelas conversas densas e leves e pelo patins de domingo. À Priscila, Luana, Karina e Ana Paula, as amigas da Nutrição que completam o meu círculo. À Aninha, minha ex-veterana e agora amiga de compartilhar alegrias e aflições.

Ao meu guru, minha terapeuta, que me ajuda a enxergar o mundo como um todo, não como eu quero ver.

Aos meus colegas de laboratório Adriana, Alinne, Azadeh, Douglas, Fabiani, Fernanda, João, Juliana, Leandro, Lorena, Luciano, Marcos e Natália por terem compartilhado experiências, conversas e dias de bancada. Ao Chiquinho, botafoguense gente boa, sempre prestativo e cuidadoso. A dona Santinha, a preguiçosa, sempre tão simpática.

A Professora Maria Sueli Soares Felipe e ao Professor Bergmann Morais Ribeiro, por terem concedido o espaço e utilização de seus laboratórios para a realização de parte dos experimentos.

Às professoras Nathália M. P. Pizato Valério, Kelly Grace Magalhães e Egle M. A. Siqueira por terem aceitado participar da banca de defesa e contribuir com esse trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, pelo apoio nos momentos de correria.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB (DPP-UnB) pela concessão da bolsa de estudos e fomento a pesquisa.

A todos que participaram e contribuíram para que esse projeto acadêmico e de vida se concluísse. Muito obrigada.

“Meu tempo, a posição que atingi, minha aparência externa - tudo isso é secundário. Para um corredor como eu, o que realmente importa é atingir o objetivo a que me propus, com minhas próprias forças. Dou tudo de mim, suporto o que for necessário e sou capaz, a meu próprio modo, de ficar satisfeito. Dos fracassos e alegrias sempre tento sair alcançando uma lição concreta. (Tem de ser concreta, por menor que seja). E espero que, com o tempo, à medida que uma corrida se siga a outra, no fim eu chegue a um lugar em que esteja contente. Ou talvez tenha apenas um vislumbre dele. (Sim, esse é o jeito mais apropriado de ver a coisa).”

Haruki Murakami, escritor e maratonista.

## RESUMO

**Introdução** A vitamina A em suas diferentes formas, os retinoides, regulam a expressão de diversos genes, incluindo genes relacionados à diferenciação celular e à resposta anti-inflamatória. Além disso, os metabolismos da vitamina A e do ferro estão relacionados por um mecanismo ainda não esclarecido, mas sugere-se que a vitamina A module os níveis de mRNA de *Hamp*, que codifica o hormônio hepcidina, peptídeo central na regulação sistêmica de ferro. Considerando que a expressão de hepcidina é regulada por diversos fatores, incluindo o *status* de ferro, a eritropoiese e a inflamação e que a vitamina A pode modular o estado inflamatório e o metabolismo de ferro, o presente estudo investigou o efeito da deficiência de vitamina A nos biomarcadores moleculares do metabolismo de ferro e da resposta inflamatória e a expressão dos genes envolvidos nestes sistemas. **Métodos** Trinta ratos Wistar machos foram tratados por 59 dias com uma das seguintes dietas: dieta Controle; dieta deficiente em vitamina A (VAD); dieta deficiente em ferro (FeD); dieta deficiente em vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta *todo-trans* ácido retinoico (atRA). O fígado, o baço, o intestino, o coração e o rim foram removidos para determinação dos níveis de mRNA de: hepcidina e supressor da sinalização de citocinas 3, no fígado; de heme oxigenase-1, interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) no fígado e no baço; de eritropoietina no rim e de ferroportina no baço, por sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo-real (qPCR). A concentração de ferro nos cinco tecidos estudados foi determinada por espectroscopia de emissão atômica e os parâmetros de ferro sérico foram determinados utilizando kits comerciais. A concentração sérica de IL-6 e IL-1 $\beta$  foi determinada por ELISA e a atividade específica de heme oxigenase-1 foi avaliada por espectrofotometria. As comparações entre os grupos de tratamento foram realizadas utilizando teste t-student para amostras independentes e o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente diferente. **Resultados** A deficiência de vitamina A (VAD) causou diminuição dos parâmetros séricos de ferro; aumentou a concentração de ferro no baço, os níveis de mRNA de IL-6 no fígado e a concentração sérica de IL-6 e IL-1 $\beta$ ; observou-se também redução dos níveis de mRNA de hepcidina hepática e de eritropoietina renal, aumento dos níveis de mRNA de ferroportina no baço e de heme-oxigenase 1 no fígado e no baço, enquanto observou-se redução na atividade específica de heme oxigenase-1, comparado aos ratos Controle. Os ratos deficientes em ferro (FeD) apresentaram redução dos parâmetros séricos de ferro com concomitante redução da concentração de ferro nos cinco tecidos estudados; também apresentaram aumento dos níveis de mRNA de IL-6 no fígado e da concentração sérica de proteína de IL-6 e IL-1 $\beta$ , enquanto apresentaram diminuição dos níveis de mRNA de hepcidina, em relação ao grupo Controle. A associação das deficiências de vitamina A e ferro (VAFeD) também reduziu os parâmetros séricos de ferro e a concentração de ferro nos tecidos, comparado ao Controle, enquanto provocou aumento da concentração sérica de proteína IL-6, diminuição dos níveis de mRNA de hepcidina hepática. A utilização do *todo-trans* ácido retinoico (atRA) como fonte de vitamina A resultou na diminuição de ferro sérico e concentração de transferrina; aumento da concentração de ferro no fígado, diminuição dos níveis de ferro no baço e no intestino, aumento dos níveis séricos de proteína de IL-6 e IL-1 $\beta$  e diminuição do mRNA de hepcidina hepática, em relação ao grupo Controle. **Conclusão** Os resultados sugerem que a deficiência de vitamina A causa uma eritropoiese ineficaz, pela diminuição dos níveis de mRNA de eritropoietina renal, levando a má-formação de eritrócitos e conseqüente acúmulo de grupo heme no baço desses ratos. O grupo heme retido no baço e no fígado leva a uma deficiência sistêmica de ferro nos organismos deficiente em vitamina A. Portanto a deficiência de vitamina A modula indiretamente a homeostase sistêmica de ferro por aumentar a fagocitose de eritrócitos indiferenciados.

**Palavras-chave:** deficiência de vitamina A, *status* de ferro, inflamação, eritropoiese, expressão-gênica, ratos.

## ABSTRACT

**Introduction** The vitamin A in its various forms, the retinoids, regulate the expression of various genes, including genes related to cell differentiation and anti-inflammatory response. Furthermore, the metabolism of iron and vitamin A are interconnected by a mechanism that remains not elucidated, but it is suggested that vitamin A modulates *Hamp* mRNA levels, which encodes the hormone hepcidin, peptide that is central in the systemic regulation of iron metabolism. Whereas the expression of hepcidin is regulated by several factors, including iron status, erythropoiesis and inflammation and that vitamin A may modulate the inflammatory status and iron metabolism, the present study investigated the effect of vitamin A deficiency in molecular biomarkers of iron metabolism and inflammatory response and the expression of the genes involved in these systems. **Methods** Thirty male Wistar rats were treated for 59 days with one of the following diets: Control diet; vitamin A deficient diet (VAD); iron deficient diet (FeD); vitamin A and iron deficient diet (VAFeD) and the all-*trans* retinoic acid diet (atRA). The liver, spleen, gut, heart and kidney were excised to determine the mRNA levels of hepcidin and suppressor of cytokine signaling 3 in liver; heme oxygenase-1, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA levels in liver and spleen; mRNA levels of erythropoietin in kidney and ferroportin in spleen, by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (qPCR). Total iron concentration in the five studied tissues was determined by atomic emission spectrometer and serum iron parameters were determined using commercial kits. The serum concentration of IL-6 and IL-1 $\beta$  was quantified by ELISA assay, and heme oxygenase-1 specific activity was assessed by a colorimetric test. Comparisons among the test groups were done using independent sample test t-test and in all tests, a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. **Results** The vitamin A deficiency (VAD) reduced serum iron parameters, increased the iron concentration of in the spleen, the levels of IL-6 mRNA in liver and serum concentration of IL-6 and IL-1 $\beta$ ; it was also observed a reduction in the mRNA levels of hepatic hepcidin and renal erythropoietin, an increase of mRNA levels of ferroportin in spleen, heme oxygenase-1 in liver and spleen, whereas there was a decrease in the specific activity of heme oxygenase-1 compared to Control rats. The rats iron deficient (FeD) showed decreased serum iron parameters with concomitant reduction of the iron concentration in the five tissues studied; it was observed an increase of IL-6 mRNA levels in liver and serum protein concentration of IL-6 and IL-1 $\beta$ , while showed decreased levels of hepcidin mRNA compared to Control group. The combination of vitamin A and iron deficiencies (VAFeD) also reduced the serum iron and its concentration in tissues, while caused an increase in serum IL-6 protein and decreased of hepatic hepcidin mRNA levels, compared to Control. The utilization of all-*trans* retinoic acid (atRA) as a source of vitamin A resulted in a decrease in serum iron and transferrin concentration, an increase of iron concentration in the liver, reduction iron levels in the spleen and gut, an increase of IL-6 and IL-1 $\beta$  serum levels and a reduction of hepatic hepcidin mRNA, compared to Control group. **Conclusion** In summary, these results suggest that vitamin A deficiency leads to an ineffective erythropoiesis by the down-regulation of renal erythropoietin expression in kidney, resulting in erythrocytes malformation and consequent accumulation of heme group in the spleen. The heme group arrested in spleen and liver leads to a systemic iron deficiency in vitamin A deficient organism. In conclusion, vitamin A deficiency indirectly modulates systemic iron homeostasis by enhancing erythrophagocytosis of undifferentiated erythrocytes.

**Keywords:** vitamin A deficiency, iron status, inflammation, erythropoiesis, gene expression, rats.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Legenda</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Absorção de ferro, utilização e exportação de ferro pelo enterócito. Fonte: Evstatiev e Gasche, 2012. DcytB, citocromo B duodenal; DMT-1, transportador de metal divalente 1; HCP-1, proteína carreadora de heme; HO-1, heme oxigenase-1; Apo-Tf, apo-transferrina; Tf, transferrina.	20
<b>Figura 2.</b>	Captação, reciclagem, utilização e exportação de ferro pelo macrófago. Fonte: Evstatiev e Gasche, 2012. Tf, transferrina; TfR1, receptor de transferrina 1; Apo-Tf, apo-transferrina; Nramp-1, <i>natural resistance-associated macrophage protein-1</i> ; Steap3, antígeno epitelial transmembrana da próstata 3; DMT-1, transportador de metal divalente 1; HO-1, heme oxigenase-1.	22
<b>Figura 3.</b>	Regulação intracelular de ferro por IRP1 e IRP2. Fonte: Hentze et al., 2010.	24
<b>Figura 4.</b>	Vias de regulação da expressão de hepcidina. Fonte: adaptado de Darshan, Frazer e Anderson, 2009. HFE, proteína da hemocromatose; TfR1, receptor 1 de transferrina; TfR2, receptor 2 de transferrina; HIF-1, fator induzível por hipóxia-1; sHJV, hemojuvelina solúvel; HJV, hemojuvelina; BMP, proteína morfogenética do osso; BMPR-1, receptor 1 de BMP; BMPR-II, receptor II de BMP; GDF-15, fator de crescimento e diferenciação 15; TWSG1, <i>twisted gastrulation protein</i> ; SMAD1/5/8, <i>small mother against decapentaplegic 1/5/8</i> ; SMAD4, <i>small mother against decapentaplegic 4</i> ; IL-1 $\beta$ , interleucina-1 $\beta$ ; IL-6, interleucina-6; JAK1/2, proteína <i>Janus kinase 1/2</i> ; STAT3, transdutor e ativador da transcrição; Hamp, gene que codifica hepcidina.	28
<b>Figura 5.</b>	Absorção, transporte e captação da vitamina A e carotenoides. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013.	36
<b>Figura 6.</b>	Captação celular de retinoides e sinalização intracelular. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013	37
<b>Figura 7.</b>	O heterodímero RAR-RXR liga-se a sequências promotoras específicas do gene-alvo nos elemento responsivo ao ácido retinoico (RAREs). LBD, domínio de ligação de ligante; DBD, domínio de ligação ao DNA. Fonte: Collins, 2002.	38

- Figura 8.** Estágios de diferenciação celular na eritropoiese. Fonte: Elliott e Sinclair, 2012. 41
- Figura 9.** Concentração de ferro nos tecidos de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta com todo-*trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média ± desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student). 63
- Figura 10.** Quantificação dos níveis hepáticos e esplênicos de mRNA de Il6 (a e b) e de mRNA de Il1b (c e d) e concentração sérica de proteína IL-6 e IL-1β (e e f) de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta com todo-*trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média ± desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student). 65
- Figura 11.** Quantificação de níveis de mRNA de hepcidina hepática (Hamp; a), de supressor de sinalização de citocinas 3 (Socs3; b), eritropoietina renal (Epo; c) e ferroportina esplênica (Slc40a1; d) de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta com todo-*trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média ± desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student). 67
- Figura 12.** Quantificação dos níveis de mRNA de heme oxigenase-1 (Hmox1) e atividade específica de heme oxigenase-1 (HO-1) no fígado (a e b) e no baço (c e d) de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta com todo-*trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média ± desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student). 69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Legenda</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b>	Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993).	47
<b>Tabela 2.</b>	Composição do Mix Mineral da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993).	48
<b>Tabela 3.</b>	Composição do Mix Vitamínico da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993).	48
<b>Tabela 4.</b>	Sequências de primers utilizados para ensaio de qPCR para os genes Epo, Hmox1, Hamp, Il1b, Il6, Slc40a1, Socs3 e Actb.	55
<b>Tabela 5.</b>	Diluições de cDNA utilizadas para construção das curvas-padrão de cada gene estudado, segundo tecido.	56
<b>Tabela 6.</b>	Consumo de dieta, concentração de ferro na dieta, ganho de peso e concentração de retinol hepático de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. VAD: dieta isenta de vitamina A; FeD: dieta isenta de ferro; VAFeD: dieta isenta de vitamina A e ferro; atRA: dieta com todo- <i>trans</i> ácido retinoico como fonte de vitamina A. Dados apresentados como média ± desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): *Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).	60
<b>Tabela 7.</b>	Parâmetros séricos de ferro de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. VAD: dieta isenta de vitamina A; FeD: dieta isenta de ferro; VAFeD: dieta isenta de vitamina A e ferro; atRA: dieta com todo- <i>trans</i> ácido retinoico como fonte de vitamina A. Dados apresentados como média ± desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): *Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).	61

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- atRA: todo-*trans* ácido retinoico
- BFU-e: unidades formadoras de “*burst*” de eritroides
- BMP: proteína morfogenética do osso
- CFU-e: unidades formadoras de colônias eritroides
- CRABP: proteína celular ligada ao ácido retinoico
- CRBP: celular proteína ligadora de retinol
- Dcytb: citocromo b redutase duodenal
- DMT1: transportador de metal divalente 1
- EPO: eritropoietina
- Epo: gene que codifica eritropoietina
- FBXL5: *F-box and leucine-rich repeat protein 5*
- GDF-15: fator de crescimento e diferenciação 15
- gp 130: glicoproteína 130
- Hamp: gene que codifica hepcidina
- HCP-1: proteína carreadora de heme
- HFE: proteína da hemocromatose
- HIF: fator induzível por hipóxia
- HJV: hemojuvelina
- HO-1: heme oxigenase-1
- IFN- $\beta$ : interferon-beta
- IFN- $\gamma$ : interferon-gama
- IL-1: interleucina-1
- IL-6: interleucina-6

IRE: elementos responsivos ao ferro

IRP: proteínas reguladoras de ferro

JAK: proteína Janus quinase

NK: células *natural killers*

PNDS: Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher

RAR: receptor de ácido retinoico

RARE: elemento responsivo ao ácido retinoico

RBP: proteína ligadora de retinol

ROS: espécies reativas de oxigênio

RXR: receptor X de retinoides

SMAD: *small mother against decapentaplegic*

SOCS: supressores de sinalização de citocinas

SRB1: *scavenger receptor class B type 1*

STAT: sinal transdutor e ativador de transcrição

Tf-Fe<sub>2</sub>: transferrina diférrica

TfR1: receptor de transferrina 1

TfR2: receptor de transferrina 2

TGF-β: fator de transformação do crescimento-β

TNF-α: fator de necrose tumoral-α

T reg: células T reguladoras

TWSG1: *twisted gastrulation protein 1*

WHO: Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
<b>2.1 Ferro</b>	19
<b>2.1.1 Regulação da Homeostase de Ferro</b>	23
<b>2.1.1.1 Regulação Intracelular</b>	23
<b>2.1.1.2 Regulação Sistêmica: Hpcidina</b>	25
<b>2.1.1.2.1 Inflamação e Hpcidina</b>	30
<b>2.2 Vitamina A</b>	31
<b>2.2.1 Deficiência de Vitamina A</b>	33
<b>2.2.2 Metabolismo de Vitamina A</b>	34
<b>2.2.3 Ácido retinoico: ação na regulação da expressão gênica, na diferenciação celular, na resposta imune e na eritropoiese</b>	37
<b>2.3 Interação: Vitamina A e o Ferro</b>	43
<b>3. OBJETIVO</b>	45
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	45
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	45
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
<b>4.1 Animais</b>	46
<b>4.2 Protocolo Experimental</b>	46
<b>4.3 Preparo das Rações</b>	
<b>4.4 Consumo de Dieta e Ganho de Peso</b>	48
<b>4.5 Concentração de Retinol Repático</b>	49
<b>4.6 Concentração de Ferro na Dieta e nos Tecidos</b>	50
<b>4.7 <i>Status</i> de Ferro Sérico</b>	50
<b>4.7.1 Ensaio de Dosagem de Ferro Sérico</b>	50
<b>4.7.2 Ensaio de Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF)</b>	51
<b>4.7.3 Determinação da Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF), Saturação de Transferrina (ST%) e Transferrina</b>	52
<b>4.8 Determinação dos Níveis de Transcritos</b>	52
<b>4.8.1 Extração de RNA Total, Eletroforese, Precipitação com Acetato e Síntese de cDNA</b>	52

4.8.2	Determinação dos Níveis de mRNA dos Genes Relacionados ao Metabolismo de Ferro e à Inflamação	54
4.9	Determinação dos Níveis Séricos de IL-6 e IL-1 $\beta$ por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	57
4.10	Determinação da Atividade Específica de Heme Oxigenase-1 no Fígado e Baço	57
4.11	Análise Estatística	58
5.	RESULTADOS	60
5.1	Ganho de Peso, Consumo da Dieta, Concentração de Ferro na Dieta e Retinol Hepático	60
5.2	<i>Status</i> de Ferro: Parâmetros Séricos de Ferro e Concentração de Ferro nos Tecidos	61
5.3	Resposta Inflamatória: Níveis de mRNA de Il6 e Il1b e Concentração Sérica de Proteínas IL-6 e IL-1 $\beta$	64
5.4	Marcadores Moleculares do Metabolismo de Ferro	66
6.	DISCUSSÃO	70
7.	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS	92
	ANEXO I – Certificado do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA)	92
	ANEXO II – Artigo a ser submetido a periódico indexado	93

## 1. INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento essencial para o organismo humano por participar de inúmeras vias metabólicas como cofator de enzimas (Rouault e Tong, 2005), realizar o transporte de oxigênio (Wilson e Reeder, 2013) e participar da eritropoiese. A deficiência de ferro compromete o desenvolvimento cognitivo, retarda o crescimento, está relacionada à diminuição da resistência imunológica, à mortalidade infantil e à fadiga (Stoltzfus, Mullany e Black, 2005; Lozoff e Georgieff, 2006).

Paradoxalmente, em excesso, o ferro pode participar de reações de geração de radicais livres, como a reação de Fenton (Haliwell e Gutteridge, 2007), e consequentemente promover danos oxidativos a biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. O estresse oxidativo, condição promovida pela perda da homeostase entre agentes oxidantes e antioxidantes, está associado a etiologia de diversas doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (Buijsse et al., 2007 ; Valko et al., 2007).

O ferro pode ser obtido à partir da ingestão de alimentos de origem vegetal como folhosos verdes escuros, leguminosas, ou alimentos de origem animal como fígado e carne vermelha (Evstatiev e Gasche, 2012). A ingestão dietética recomendada de ferro para homens com idade superior a 18 anos é de 8 mg de ferro / dia, enquanto essa recomendação para mulheres de 19 a 50 anos é de 18 mg de ferro / dia e de 8 mg de ferro / dia para mulheres com idade superior a 50 anos (IOM, 2001). Para que não haja efeitos tóxicos no organismo, o limite superior tolerável de ingestão para esse nutriente é de 45 mg de ferro / dia para homens e mulheres com idade superior a 18 anos (IOM, 2001).

Considerando que, tanto a deficiência de ferro quanto o excesso podem comprometer o funcionamento do organismo, a fina regulação dos níveis corporais desse nutriente é essencial (Hentze et al., 2010). A regulação da homeostase sistêmica do ferro é mediada pela hepcidina, peptídeo-hormônio secretado principalmente pelo fígado, que controla a absorção e

disponibilização dos estoques de ferro para o organismo (Ganz e Nemeth, 2011). Diversos fatores regulam a expressão de hepcidina tais como os níveis corporais de ferro, a taxa da eritropoiese, o processo inflamatório e a hipóxia (Nicolas et al., 2002).

Em situações de sobrecarga de ferro duas vias de sinalização sensíveis aos níveis de ferro corporal induzem a transcrição do gene da hepcidina. A indução da expressão da hepcidina por ferro compreende a via mediada pela proteína da hemocromatose (HFE) / receptores de transferrina 1 e 2 (TfR1 e TfR2), que é sensível aos níveis de ferro sérico ligado à transferrina, e a via mediada pela sinalização hemojuvelina (HJV) / proteínas morfogenéticas do osso (BMP), que é sensível aos níveis de ferros nos tecidos (Darshan, Frazer e Anderson, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012).

A literatura descreve que indivíduos portadores de doenças infecciosas ou inflamatórias apresentam níveis séricos da interleucina (IL)-6, uma citocina pró-inflamatória, e de hepcidina aumentados (Nemeth et al., 2004; Basseri et al., 2012). Durante a inflamação ou estados infecciosos, a IL-6 ao se ligar ao seu receptor desencadeia uma sinalização que envolve o fator de transcrição sinal transdutor e ativador da transcrição 3 (STAT3), que migra para o núcleo e induz a expressão da hepcidina (Darshan, Frazer e Anderson, 2009).

Estudos recentes evidenciam que há uma estreita relação entre o metabolismo de vitamina A e ferro. A deficiência de vitamina A está relacionada ao quadro de anemia; diminuição da mobilização de ferro dos tecidos para o plasma sanguíneo com consequente acúmulo de ferro nos tecidos (Roodenburg et al., 2000; Garg et al., 2005; Zimmerman et al., 2006; Mehdad et al., 2010). Embora o mecanismo da interação entre o metabolismo da vitamina A e do ferro não esteja totalmente esclarecido, a literatura demonstra que diversos genes envolvidos em diferentes metabolismos já foram identificados como genes alvo de regulação pelo *todo-trans* ácido retinoico, sugerindo que a vitamina A altere o metabolismo do ferro através da modulação da expressão de genes relacionados ao seu metabolismo

(Schroeder et al., 2007; Tsuchiya et al., 2009; Citelli et al., 2012; Jiang et al., 2012), incluindo a expressão de hepcidina (Tsuchiya et al., 2009; Citelli et al., 2012).

Portanto, considerando que a deficiência de vitamina A constitui um problema de saúde pública e que em algumas regiões do Brasil e do mundo a deficiência de ferro e vitamina A coexistem, é necessário que hajam estudos que elucidem mecanismos de interação destes nutrientes essenciais para o funcionamento fisiológico normal. Assim, o presente estudo investigou o efeito da deficiência de vitamina A em biomarcadores do metabolismo de ferro, resposta inflamatória e eritropoiese e possíveis associações entre esses sistemas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

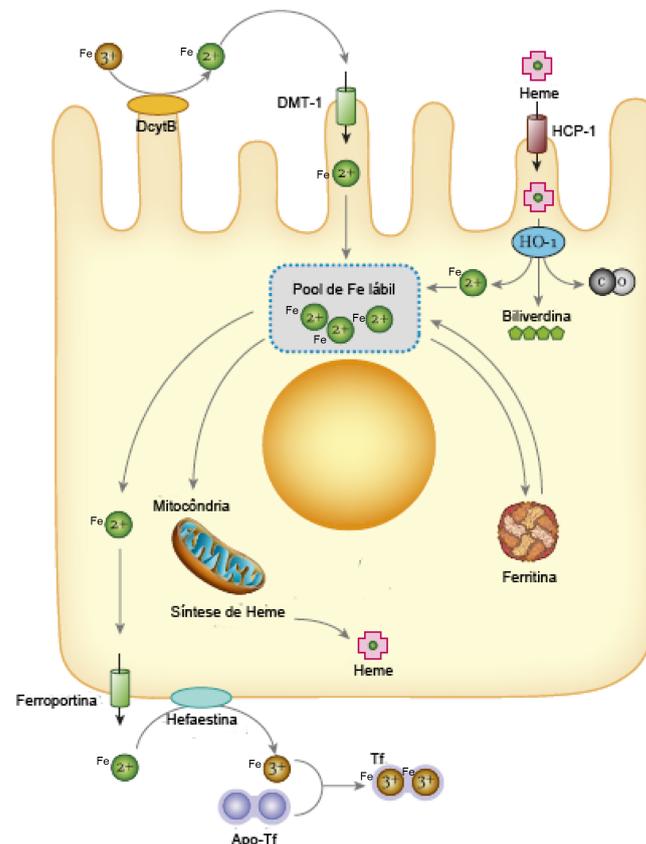
### 2.1 Ferro

O ferro é um elemento fundamental para a maioria dos seres vivos. Esse mineral atua em reações de óxido-redução na cadeia respiratória, como componente de grupos prostéticos de proteínas (centro ferro-enxofre / Fe-S) e enzimas, na regulação da expressão de alguns genes e no transporte de oxigênio quando associado à hemoglobina (Rouault, 2006; Anderson e Vulpe, 2009; Sheftel, Stehling, Lill, 2010).

Na dieta o ferro está presente em alimentos de origem vegetal e animal. Nos alimentos de origem vegetal, como folhosos verdes-escuros e leguminosas, o ferro está presente na forma inorgânica,  $Fe^{+3}$ , enquanto nos alimentos de origem animal, como fígado e carnes vermelhas, o ferro apresenta-se ligado à hemoglobina, sendo denominado de ferro-hêmico encontrado na forma  $Fe^{+2}$ . No duodeno, o ferro inorgânico ( $Fe^{+3}$ ) é reduzido pela enzima citocromo b redutase duodenal (Dcytb) e na forma  $Fe^{+2}$  é absorvido pelos enterócitos pela proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT1; Figura 1; Anderson, Frazer, McLaren, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012). A absorção do ferro-hêmico não está totalmente esclarecida, mas sugere-se que seja mediada por uma proteína carreadora específica, a proteína carreadora de heme-1 (HCP-1; Anderson, Frazer, McLaren, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012). Após a absorção, o ferro-hêmico é dissociado do anel de porfirina pela ação da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) e é liberado na forma  $Fe^{+2}$  (Figura 1; Abraham e Kappas, 2008; Anderson, Frazer, McLaren, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012).

No enterócito, o ferro na forma  $Fe^{+2}$  quando não é imediatamente utilizado pela célula é oxidado novamente a  $Fe^{+3}$  e então estocado associado a ferritina, proteína responsável pelo armazenamento de ferro nas células, ou transportado na forma  $Fe^{+2}$  através da membrana basolateral pela proteína exportadora de ferro, a ferroportina 1 (Figura 1). O transporte através da membrana basolateral é acoplado à oxidação do  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$  pela enzima hephaestina, ou

pode acontecer no plasma, processo que envolve a enzima ceruloplasmina (Darshan, Frazer e Anderson, 2010; Hentze et al, 2010; Evstatiev e Gasche, 2012).



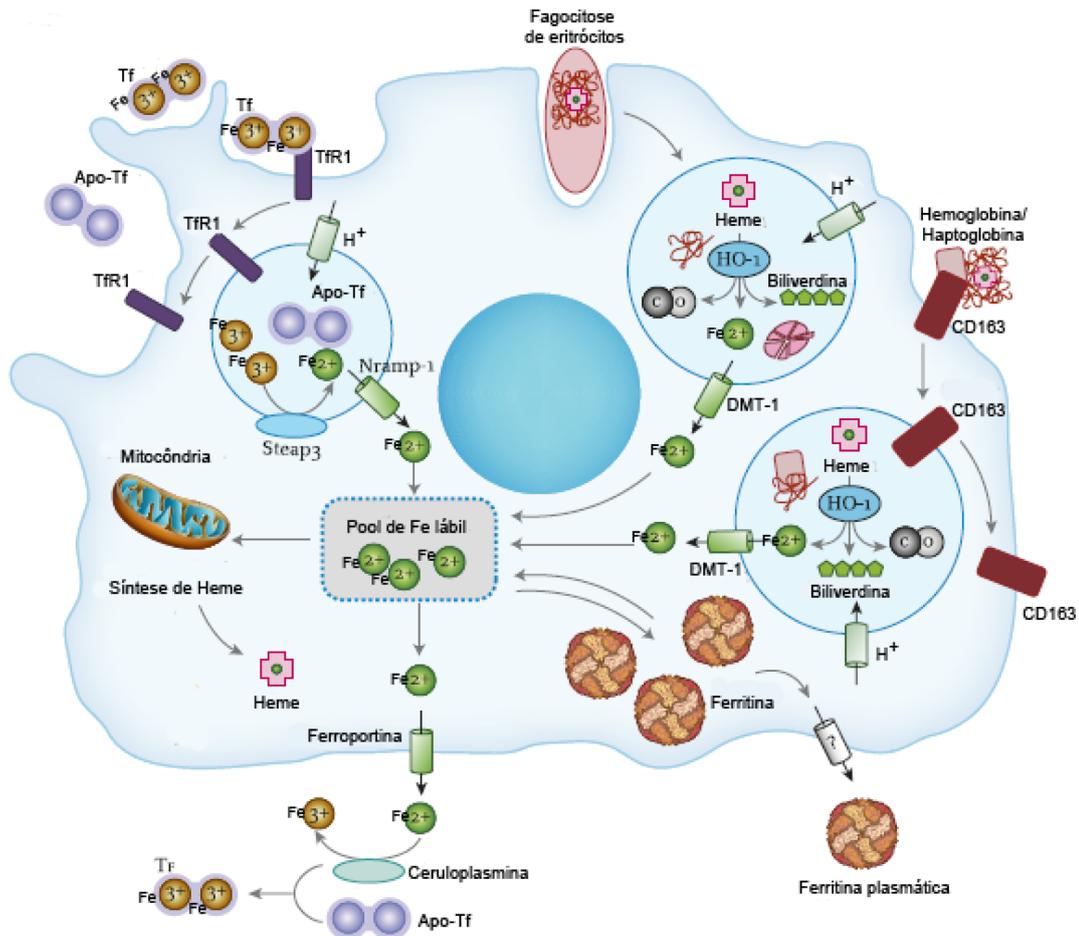
**Figura 1.** Absorção de ferro, utilização e exportação de ferro pelo enterócito. Fonte: Evstatiev e Gasche, 2012. DcytB, citocromo B duodenal; DMT-1, transportador de metal divalente 1; HCP-1, proteína carreadora de heme; HO-1, heme oxigenase-1; Apo-Tf, apo-transferrina; Tf, transferrina.

Uma vez na corrente sanguínea, o  $\text{Fe}^{+3}$  é incorporado a uma proteína sérica, a transferrina (Tf), que é capaz de ligar-se a dois átomos de ferro. A Tf mantém o ferro solúvel e limita a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres no plasma. As células captam o ferro ligado à transferrina pela ligação da transferrina ao seu receptor, o receptor de transferrina 1 (TfR1), por endocitose (Figura 2). No endossoma, o ferro é liberado da transferrina, reduzido a  $\text{Fe}^{+2}$  pela STEAP-3 (antígeno epitelial transmembrana da próstata 3), uma outra enzima redutase, e é liberado no citosol via NRAMP-1, proteína análoga ao

DMT-1. Neste processo, a transferrina e o TfR1 retornam à membrana plasmática para serem utilizados em outros ciclos (Figura 2; Hentze et al., 2010; Evstatiev e Gasche, 2012). No citosol, o ferro pode ser utilizado para executar funções celulares, pode ser armazenado associado à ferritina ou ser liberado no plasma, via ferroportina 1 (Figura 2; Hentze et al., 2010; Evstatiev e Gasche, 2012).

Algumas células como os eritrócitos imaturos apresentam alta expressão de TfR1, em função de sintetizarem altas quantidades de hemoglobina (Darshan, Frazer e Anderson, 2010; Hentze et al, 2010). Desse modo, a maioria das moléculas de transferrina ligada ao ferro na circulação é destinada à produção de eritrócitos na medula óssea. Cerca de 65-70% do ferro corporal é encontrado em eritrócitos e outras células eritropoiéticas (Darshan, Frazer e Anderson, 2010; Hentze et al, 2010).

A média de absorção de ferro diária (1 a 2 mg) é equilibrada pelas perdas de ferro através da descamação de células epiteliais, cabelo, suor e pela menstruação, em mulheres. Como a absorção do ferro dietético não é suficiente para suprir as necessidades da eritropoiese (20 a 25 mg), é necessário que o ferro seja reciclado (Evstatiev e Gasche, 2012). Os eritrócitos senescentes ou danificados são removidos da circulação por fagocitose pelos macrófagos do sistema retículo endotelial do baço. Os eritrócitos fagocitados são degradados nos lisossomos e o ferro ligado ao anel heme é liberado por ação da enzima heme oxigenase-1 (HO-1; Figura 2). Outras formas de captação de ferro pelos macrófagos incluem a captação da hemoglobina livre ligada à haptoglobina através do receptor CD163 e a captação de transferrina mediada pelo TfR1 (Figura 2). O ferro pode então ser utilizado pelo próprio macrófago em processos metabólicos, estocado na ferritina ou liberado novamente à corrente sanguínea pela ferroportina (Figura 2; Darshan, Frazer e Anderson, 2010; Evstatiev e Gasche, 2012).



**Figura 2.** Captação, reciclagem, utilização e exportação de ferro pelo macrófago. Fonte: Evstatiev e Gasche, 2012. Tf, transferrina; TfR1, receptor de transferrina 1; Apo-Tf, apo-transferrina; Nramp-1, *natural resistance-associated macrophage protein-1*; Steap3, antígeno epitelial transmembrana da próstata 3; DMT-1, transportador de metal divalente 1; HO-1, heme oxigenase-1.

Diversos outros tipos celulares também podem captar ferro da circulação via endocitose mediada pelo TfR1, porém em quantidades menores. Esse ferro pode ser utilizado para sintetizar várias proteínas intracelulares que contêm ferro, como os citocromos e proteínas contendo centro ferro-enzofre. Cerca de 10-15% do ferro corporal é encontrado nessas proteínas. O ferro também pode ser encontrado estocado predominantemente no fígado, que corresponde aos 20% de ferro corporal restante (Hentze, 2010; Evstatiev e Gasche, 2012).

Em função do organismo humano não possuir formas de excreção de ferro, associado ao fato do ferro catalisar reações de óxido-redução quando na sua forma livre a homeostase

desse mineral é mantida fundamentalmente pela regulação da absorção e exportação pelos enterócitos, e da liberação do ferro reciclado pelo sistema retículo-endotelial do baço (Hentze, 2010; Evstatiev e Gasche, 2012).

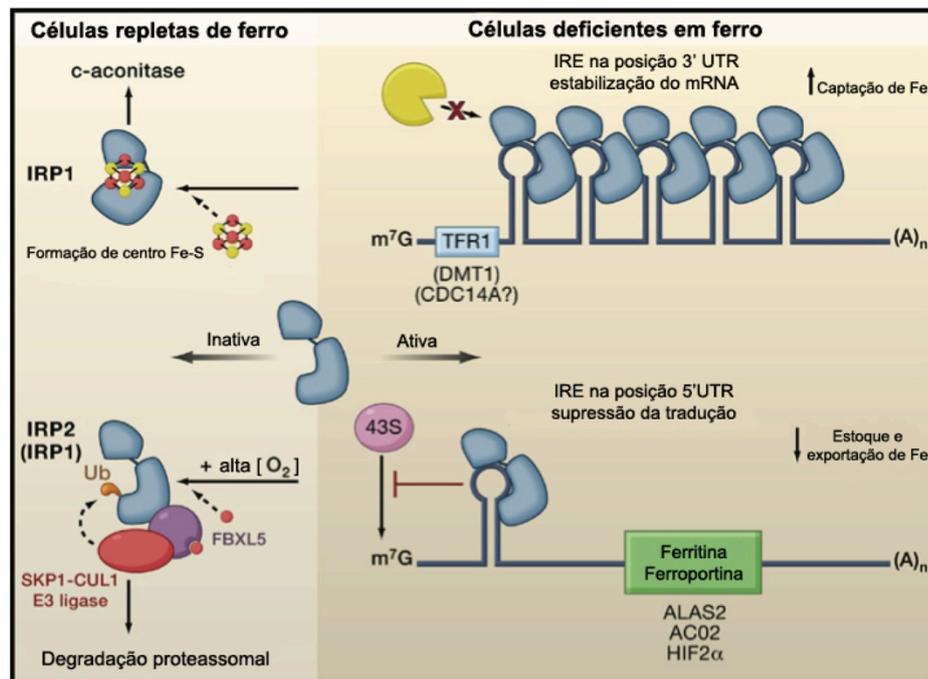
## **2.1.1 Regulação da Homeostase de Ferro**

### **2.1.1.1 Regulação Intracelular**

A concentração de ferro corporal é finamente regulada em nível celular e sistêmico. A regulação intracelular do ferro acontece por mecanismo pós-transcricional, sendo mediada pelas proteínas reguladoras de ferro (IRPs). Essas proteínas interagem com o RNA em regiões altamente conservadas e regulatórias, conhecidas como elementos responsivos ao ferro (IREs), que estão presentes em regiões 5' ou 3' não-traduzidas do mRNA de proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro (Hentze et al., 2010; Wang e Pantopoulos, 2011). Quando a IRP se liga aos IREs localizados na extremidade 5' impedem estericamente a tradução dos respectivos mRNAs, enquanto quando os IREs estão localizados na porção 3' do mRNA a IRP ao ligar-se ao IRE estabiliza as moléculas de mRNA (Rouault, 2006; Hentze et al., 2010; Wang e Pantopoulos, 2011). O sistema IRP-IRE permite que as células ajustem rapidamente às concentrações de ferro disponíveis no citosol e assim otimizem o funcionamento de inúmeros componentes celulares dependentes de ferro (Rouault, 2006).

Quando a concentração de ferro intracelular está adequada ou em excesso, a IRP1 apresenta um núcleo Fe-S com 4 átomos de ferro e 4 átomos de enxofre (4Fe-4S), assumindo papel de aconitase citoplasmática. No entanto, na deficiência de ferro este núcleo apresenta apenas 3 átomos de ferro (3Fe-4S), então a aconitase perde sua atividade catalítica e transforma-se em IRP1. Então, a IRP1 liga-se com alta afinidade aos IREs correspondentes, promovendo a estabilização do mRNA do TfR1 e do DMT1 (posição 3'), e conseqüentemente bloqueia estericamente a tradução do mRNA da ferritina e ferroportina (posição 5' ; Figura 3;

Rouault, 2006; Hentze et al., 2010). Essa resposta resulta no aumento da absorção intestinal e captação de ferro pelos tecidos e diminuição do estoque e da exportação de ferro das células.



**Figura 3.** Regulação intracelular de ferro por IRP1 e IRP2. Fonte: Hentze et al., 2010.

O mecanismo de regulação dos níveis de ferro intracelular pela IRP2 se difere daquele descrito para a IRP1. Em células repletas de ferro, a IRP2 interage com a proteína adaptadora FBXL5 (*F-box and leucine-rich repeat protein 5*) que recruta um complexo SCF (SCKP1-CUL1-F-box) E3 ligase, deflagrando a ubiquitinação da IRP2 e subsequente degradação nos proteassomas (Figura 3). Em células deficientes em ferro, a degradação de IRP2 diminui, havendo estabilização do mRNA do Tfr1 e bloqueio a tradução do mRNA da ferritina (Meyron-Holtz et al., 2004; Rouault, 2006; Hentze et al., 2010). Embora não esteja totalmente esclarecido, sugere-se que um domínio de hemeritina da FBXL5 seja sensor dos níveis intracelulares de ferro, uma vez que na deficiência de ferro ocorre um desdobramento desse domínio da FBXL5, que provavelmente acarreta em sua exposição à ubiquitina-ligase

E3, promovendo posteriormente sua degradação (Hentze et al., 2010; Evstiev e Gasche, 2012).

Assim, baixos níveis intracelulares de ferro induzem a expressão das proteínas DMT-1 e TfR1 com conseqüente aumento da absorção intestinal e da captação de ferro pelos tecidos à partir da transferrina plasmática, respectivamente. Enquanto em células repletas de ferro, as IRPs tornam-se indisponíveis para ligação aos IREs, permitindo a tradução do mRNA da ferritina e ferroportina (Wang e Pantapoulos, 2011), favorecendo o armazenamento do excesso de ferro e a disponibilização de ferro para os tecidos.

#### **2.1.1.2 Regulação Sistêmica: Hepcidina**

A homeostase sistêmica do ferro é modulada pelo hormônio hepcidina, um peptídeo codificado pelo gene *Hamp* (*hepcidin antimicrobial peptide*) e sintetizado predominantemente pelos hepatócitos na forma de pré-pró-hepcidina, um precursor inativo com 84 aminoácidos (Kulaksiz et al., 2004). Esse precursor é processado à forma de pró-hepcidina, com 60 aminoácidos, que posteriormente é clivado à forma biologicamente ativa, com 25 aminoácidos, na forma da hepcidina propriamente dita (Valore e Ganz, 2008). Ambas as formas de pró-hepcidina e de hepcidina ativa são secretadas na circulação (Kulaksiz et al., 2004; Valore e Ganz, 2008).

Estudos *in vivo*, demonstraram que a hepcidina é um regulador negativo do efluxo celular de ferro (Nicolas et al., 2002; Nemeth et al., 2004; Rivera et al., 2005). A hepcidina ao se ligar à ferroportina induz sua internalização e degradação, reduzindo a liberação de ferro do baço e do intestino para o plasma (Nemeth et al., 2004; Rivera et al., 2005, De Domenico et al., 2009). A inibição da exportação promove o acúmulo de ferro intracelular, e conseqüente inibição da síntese da proteína DMT-1, reduzindo a absorção intestinal de ferro. Mecanismo contrário é observado em situações de deficiência de ferro, onde os níveis de

hepcidina são reduzidos, permitindo tanto a absorção e exportação de ferro pelos enterócitos quanto a liberação de ferro dos macrófagos e demais células para o plasma sanguíneo (Ganz e Nemeth, 2011).

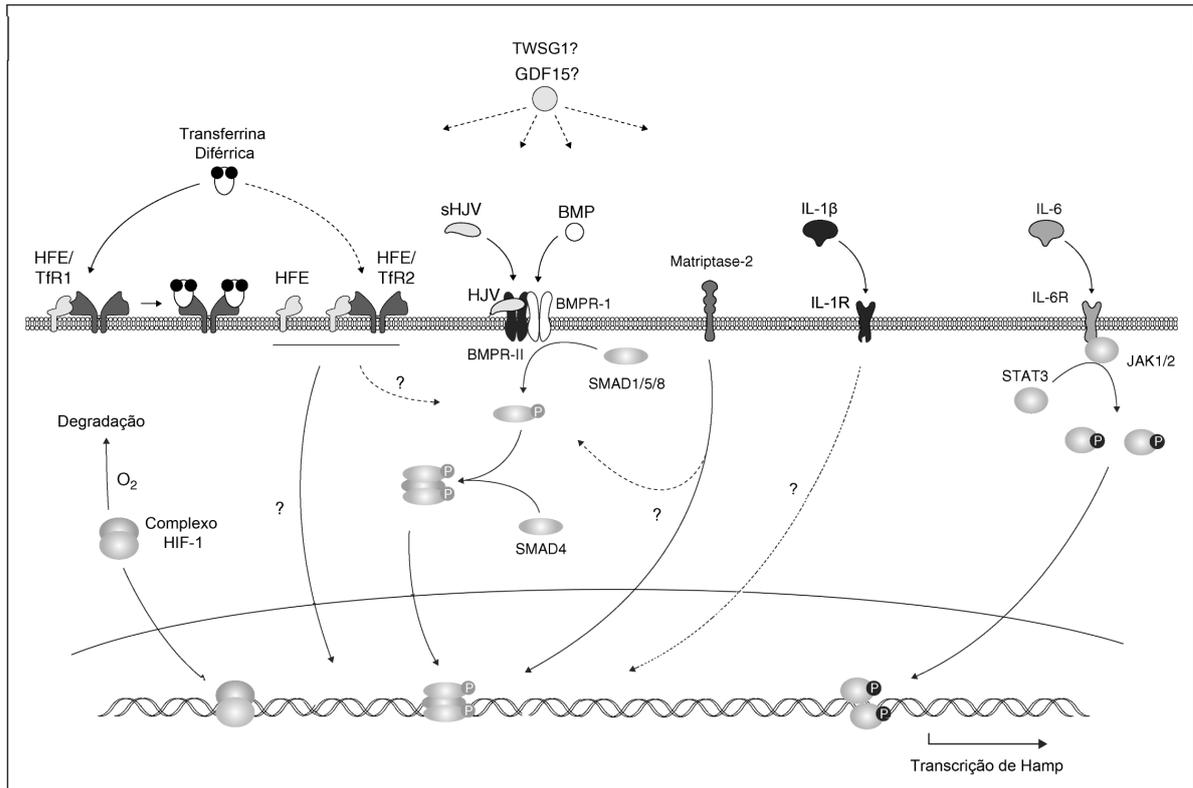
Fatores como os estoques corporais de ferro, a taxa de eritropoiese, inflamação e hipóxia influenciam a absorção do ferro intestinal e sua liberação das células através da regulação da expressão da hepcidina hepática (Darshan, Frazer e Anderson, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012).

A hepcidina tem sua expressão regulada pelos estoques de ferro corporais por duas vias de sinalização distintas: a primeira envolve os níveis de ferro ligado à transferrina presente na circulação, sendo mediada pela proteína da hemocromatose (HFE) / receptores de transferrina 1 e 2 (TfR1 e TfR2); a segunda envolve os estoques de ferro intracelular, e é mediada pela sinalização hemojuvelina (HJV) / proteínas morfogenéticas do osso (BMP; Darshan, Frazer e Anderson, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012).

A HFE é capaz de ligar-se a ambos receptores de transferrina, TfR1 e TfR2, dependendo da concentração de transferrina diférrica (Tf-Fe<sub>2</sub>). Na deficiência de ferro, a concentração de Tf-Fe<sub>2</sub> está diminuída, então a HFE associa-se ao TfR1 e conseqüentemente não há indução da expressão de hepcidina. Entretanto, quando os níveis de Tf-Fe<sub>2</sub> estão aumentados, a Tf-Fe<sub>2</sub> liga-se com maior afinidade ao TfR1, enquanto a HFE parece ligar-se ao TfR2. A ligação HFE-TfR2 induz a transcrição de hepcidina por um mecanismo ainda não esclarecido, mas que parece envolver a via das BMPs, com a formação de um supercomplexo composto pela HFE, TfR2, hemojuvelina e receptores de BMP (Figura 4; Darshan, Frazer e Anderson, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012). Alternativamente, o complexo HFE/TfR2 parece ativar a via Erk (quinase regulada por sinal extracelular), aumentando a fosforilação de fatores de transcrição SMAD (*small mother against decapentaplegic*), que promovem aumento da transcrição de hepcidina (Darshan, Frazer e Anderson, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012).

Uma segunda via de sinalização associada a regulação transcricional da hepcidina de maneira dependente da concentração intracelular de ferro é mediada pelas proteínas hemojuvelina (HJV) e proteínas morfogenéticas do osso (BMP). Indivíduos com mutações no gene HFE2 que codifica a proteína hemojuvelina, apresentam a forma de hemocromatose juvenil, caracterizada pela não produção de hepcidina independente da alta concentração de ferro corporal (Papanikolaou e Pantopoulos, 2005).

As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), membros da superfamília do fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) são essenciais na regulação da transcrição da hepcidina, em especial a BMP-6. Dados da literatura sugerem que a BMP-6 seja positivamente regulada pelo ferro, uma vez que estudos apontam que camundongos *knockout* para BMP-6 apresentaram deficiência de hepcidina e sobrecarga de ferro tecidual (Andriopoulos et al., 2009). O modelo que envolve a via BMP-HJV/SMAD na regulação transcricional da hepcidina propõe que em resposta aos altos níveis de ferro corporal a BMP-6 interaja com a HJV, a qual atua como um co-receptor de membrana, desencadeando uma cascata de sinalização que resulta na fosforilação do fator de transcrição SMAD 1/5/8. O complexo SMAD 1/5/8 fosforilado liga-se à SMAD 4, é translocado para o núcleo e interage com a região promotora do gene da hepcidina promovendo sua transcrição (Figura 4; Darshan, Frazer e Anderson, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012).



**Figura 4.** Vias de regulação da expressão de hepcidina. Fonte: adaptado de Darshan, Frazer e Anderson, 2009. HFE, proteína da hemocromatose; TfR1, receptor 1 de transferrina; TfR2, receptor 2 de transferrina; HIF-1, fator induzível por hipóxia-1; sHJV, hemojuvelina solúvel; HJV, hemojuvelina; BMP, proteína morfogenética do osso; BMPR-1, receptor 1 de BMP; BMPR-II, receptor II de BMP; GDF-15, fator de crescimento e diferenciação 15; TWSG1, *twisted gastrulation protein*; SMAD1/5/8, *small mother against decapentaplegic 1/5/8*; SMAD4, *small mother against decapentaplegic 4*; IL-1 $\beta$ , interleucina-1 $\beta$ ; IL-6, interleucina-6; JAK1/2, proteína *Janus kinase 1/2*; STAT3, transdutor e ativador da transcrição; Hamp, gene que codifica hepcidina.

Além do *status* de ferro corporal, a modulação da hepcidina também é mediada pela resposta inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias, interleucinas (IL) IL-1 $\beta$  e a IL-6 estimulam a expressão de hepcidina durante o processo inflamatório (Figura 4). A primeira citocina descrita como moduladora da expressão de hepcidina foi a IL-6, que induz a expressão de hepcidina *in vitro* e *in vivo* (Nemeth et al., 2003; Nemeth et al., 2004). Embora alguns estudos apontem o envolvimento de IL-1 $\beta$  na ativação da transcrição da hepcidina, esse efeito ainda é controverso (Nemeth et al., 2003; Lee et al., 2005). A IL-6 liga-se ao seu receptor de membrana plasmática contendo uma cadeia de glicoproteína 130 (gp 130). A transdução de sinal envolve a ativação da proteína Janus quinase (JAK), que leva à

fosforilação do fator de transcrição “sinal de transdução e ativador da transcrição” (STAT), mais especificamente, o STAT3 (Heinrich et al., 2003). A fosforilação do STAT3 resulta em sua ativação, translocação nuclear e posterior ligação a um elemento regulador no promotor da hepcidina (Figura 4; Wrighting and Andrews, 2006; Verga Falzacappa et al., 2007, De Domenico et al., 2010).

Por outro lado, a expressão da hepcidina pode ser inibida por diversos outros fatores. Independente do *status* corporal de ferro, em condições de proliferação exacerbada de eritroblastos e de hemólise a hepcidina tem expressão e síntese diminuída, como observado na  $\beta$ -talassemia, doença caracterizada pela síntese deficiente da cadeia beta da hemoglobina. A literatura mais recente propõe que fatores solúveis produzidos por eritroblastos em desenvolvimento exerçam efeitos inibitórios na expressão de Hamp (Anderson, Frazer, McLaren, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012), como o fator de diferenciação do crescimento 15 (GDF-15) e o TWSG1 (*twisted gastrulation protein 1*).

O GDF-15 é membro da superfamília TGF- $\beta$  e é secretado por precursores eritroides em morte celular e durante a maturação de eritroblastos (Tanno et al., 2007; Gardenghi, Grady e Rivella, 2010). Indivíduos com  $\beta$ -talassemia apresentam expansão eritroide aumentada, associada a níveis séricos de GDF-15 aumentados (Tanno et al., 2007). Estudos indicam que o GDF-15 exerce efeitos supressores na expressão de hepcidina, o que estaria relacionado à sobrecarga de ferro observada na  $\beta$ -talassemia e em doenças similares da eritropoiese (Tanno et al., 2007; Tamary et al., 2008; Theurl et al., 2010). Embora pouco estudado, o TWSG1 também é uma proteína sérica altamente expressa em indivíduos com  $\beta$ -talassemia e parece inibir a expressão de hepcidina por interferir da sinalização de BMP (Tanno et al., 2009).

Assim como a eritropoiese, a hipóxia também é outra situação em que a hepcidina é inibida. Embora seja um mecanismo controverso, Liu et al (2012) descreveram em um estudo

*in vivo* que a inibição da expressão de hepcidina na hipóxia está relacionada ao fator induzível por hipóxia (HIF) e ao GDF-15. Em situações de hipóxia, haveria menor tensão de oxigênio, o que estimularia a produção de HIF. Desse modo, o HIF estimularia a eritropoiese e, com o aumento desta haveria estímulo para a liberação de GDF-15, que seria o responsável pela diminuição da expressão de hepcidina.

#### **2.1.1.2.1 Inflamação e Hpcidina**

Lee et al (2005) verificaram que o tratamento de hepatócitos de camundongos *knockout* para IL-6 com 20 ng/mL de IL-1 $\beta$  ou IL-1 $\alpha$  aumentou a expressão de mRNA de hepcidina, efeito que foi completamente bloqueado pela adição de 2  $\mu$ g/mL de anticorpos específicos anti-IL-1 $\beta$  e anti-IL-1 $\alpha$ . Ainda neste estudo, observou-se que a incubação dos hepatócitos com anticorpo anti-IL-6 não alterou a expressão de hepcidina induzida por IL-1 $\beta$  ou IL-1 $\alpha$ , demonstrando que o estímulo da expressão da hepcidina causado por estas duas citocinas é independente de IL-6. Christiansen et al (2007) demonstraram efeito semelhante em seu estudo; hepatócitos irradiados com raio-X e incubados com 500 ng das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 apresentaram maior expressão de mRNA de hepcidina, efeito maior foi observado naquelas culturas em que houve indução por IL-1 $\beta$ , indicando que citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de hepcidina.

Diferentemente do observado para o papel da IL-1 $\beta$  na expressão da hepcidina, o efeito da IL-6 é bem caracterizado (Wrighting e Andrews, 2006; Verga Falzacappa et al., 2007; De Domenico et al., 2010; Theurl et al., 2011). Nemeth et al (2003) verificaram que a excreção urinária de hepcidina foi reduzida consideravelmente em indivíduos com sobrecarga de ferro, infecção ou doenças inflamatórias. Nesse mesmo estudo, ao verificarem se o efeito da inflamação no metabolismo de ferro é mediado pelo eixo IL-6/hepcidina, os autores observaram que o tratamento de hepatócitos humanos com anticorpo anti-IL-6 inibe a

expressão de hepcidina. Ratos *knockout* para IL-6 com inflamação induzida por endotoxina apresentaram maiores níveis séricos de haptoglobina, menor expressão de mRNA de hepcidina e menor concentração de ferro sérico, quando comparados ao grupo controle, sugerindo que a IL-6 é necessária para indução da expressão da hepcidina durante a inflamação. Assim, os autores propuseram que a hepcidina responde a proteínas de fase aguda II (Nemeth et al., 2003).

Wrighting e Andrews (2006) realizaram um estudo a fim de avaliar se a ativação da expressão da hepcidina pela IL-6 era modulada de forma direta. Os autores identificaram uma região altamente conservada na região 5' do mRNA de Hamp de quatro espécies de mamíferos, um possível elemento responsivo à IL-6 no promotor e foi demonstrado que a IL-6 regula a expressão de hepcidina através da ligação da STAT3 a esse promotor. Resultado similar foi encontrado por Verga Falzacappa et al (2007), que evidenciaram que uma região localizada a 165 bp da região proximal do promotor da hepcidina, em células HuH7 (células derivadas de hepatócitos humanos) é necessária para ativação da hepcidina em resposta à administração de IL-6. Também identificaram que a ativação da hepcidina requer a ligação de STAT3 localizada na posição -64/-74 do promotor. Portanto, a hepcidina pode ser regulada através da ativação da STAT3 em um estado inflamatório.

## **2.2 Vitamina A**

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel essencial desde a embriogênese (Clagett-Dame e DeLuca, 2002) à vida adulta (Clagett-Dame e Knustson, 2011), responsável pela formação e manutenção de vários tecidos corporais, assim como no mecanismo da visão, função imune e reprodução (Theodosiou, Laudet, e Schubert, 2010; Kawazoe et al., 2012).

O termo “vitamina A” é um termo genérico que compreende os retinoides e seus metabólitos, os quais contêm um anel de  $\beta$ -ionona e uma cadeia lateral, composta de duplas

ligações carbono-carbono. As duplas ligações podem existir na conformação *cis* ou *trans*. Os retinoides se diferenciam por apresentarem grupos funcionais diferenciados, os quais podem ser: hidroxil (retinol), aldeído (retinal), ácido carboxílico (ácido retinoico), ou uma molécula de retinol associada a um ácido graxo por uma ligação tipo éster (éster de retinil ou palmitato de retinil). Esses compostos são encontrados em alimentos de origem animal, como carnes, laticínios e ovos, sendo mais frequente as formas de retinol e palmitato de retinil (IOM, 2001; Conaway, Henning e Lerner, 2013). Nos alimentos de origem vegetal, como cenoura e folhosos verdes-escuros, essa vitamina está presente na forma de carotenoides provitamina A. Dentre os mais de 600 carotenoides conhecidos, cerca de 10% são potenciais fontes de vitamina A, sendo os principais o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina (IOM, 2001; Conaway, Henning e Lerner, 2013).

As várias funções desempenhadas pela vitamina A são exercidas pelo retinol e seus metabólitos ativos. Dentre esses, o 11-*cis* retinal está presente nas células fotorreceptoras da retina e está ligado ao pigmento responsável pela sensibilidade à luz. O 11-*cis* retinal atua como um cromóforo e liga-se à opsina, formando a rodopsina. Quando há absorção de um fóton, ocorre a isomerização do 11-*cis* retinal a 11-*trans* retinal. O 11-*trans* retinal é, então, liberado da opsina e deve ser regenerado a 11-*cis* retinal para que o ciclo visual volte a acontecer (Kusakabe et al., 2009). A xeroftalmia, popularmente conhecida como cegueira noturna, é um dos principais sintomas da forma subclínica da deficiência de vitamina A (WHO, 2009) e é causada pelo atraso da regeneração de 11-*trans* retinal a 11-*cis* retinal (Kusakabe et al., 2009).

Outro metabólito da vitamina A que apresenta importantes funções é o ácido retinoico. Nas isoformas todo-*trans* ácido retinoico (atRA) e 9-*cis* ácido retinoico são capazes de modular a expressão de vários genes (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

### 2.2.1 Deficiência de Vitamina A

Apesar da vitamina A ser um nutriente encontrado amplamente em fontes alimentares, a deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública (WHO, 2009). A hipovitaminose A é causada por consumo insuficiente de alimentos ricos em vitamina A, infecções recorrentes ou, em menor proporção, por problemas de má-absorção (WHO, 2009). A hipovitaminose A é caracterizada quando as reservas hepáticas de retinol encontram-se reduzidas (menores que 0,07  $\mu\text{mol/g}$  de fígado) e os níveis de retinol sérico são menores que 0,70  $\mu\text{mol/L}$  e é classificada como severa quando os níveis de retinol sérico são menores que 0,35  $\mu\text{mol/L}$  (WHO, 2009).

Os grupos de maior vulnerabilidade para esta deficiência são mulheres em idade fértil, gestantes e crianças com idade menor que cinco anos. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) estima que globalmente a deficiência de vitamina A (níveis retinol sérico menor que 0,70  $\mu\text{mol/L}$ ) acometa cerca de 190 milhões de crianças em idade pré-escolar e 19,1 milhões de gestantes.

No Brasil, embora não haja muitos estudos epidemiológicos que avaliem a prevalência nacional de deficiência de vitamina A, estudos regionais avaliam que há uma ampla faixa de prevalência de hipovitaminose A, variando de 16 a 74% em crianças em idade pré-escolar, principalmente nas regiões Nordeste, norte de Minas Gerais (Vale do Jequitinhonha e Vale do Murici) e Vale do Ribeira em São Paulo (Ramalho, Flores e Saunders, 2002).

A Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher realizada em 2006 (PNDS; Brasil, 2009), estudo que traçou o perfil da população feminina em idade fértil e das crianças menores de cinco anos no Brasil, verificou que cerca de 17% das crianças e 12% das mulheres apresentavam níveis inadequados de vitamina A. Em crianças, as maiores prevalências da deficiência de vitamina A foram encontradas no Nordeste (19 %) e Sudeste

(22%) do país. Entretanto, a deficiência de vitamina A não é um problema restrito a regiões de extrema pobreza, uma vez que há registros de alta prevalência desta deficiência nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo (Ramalho, Padilha e Saunders 2008).

A xeroftalmia é uma das consequências da deficiência de vitamina A, considerada como indicativo de uma forma subclínica, ou seja, na qual os níveis de retinol sérico não apresentam decréscimo. Estima-se que de 250 a 500 mil crianças desenvolvam cegueira todos os anos, sendo que cerca da metade morrem antes de completar um ano de vida (WHO, 2000).

A deficiência de vitamina A está associada à intensificação da gravidade de doenças infecciosas. Estudos indicam que crianças que apresentam xeroftalmia também sofrem de doenças respiratórias, perda de peso, gastroenterites, quadro que é revertido com a suplementação de vitamina A (Imdad et al., 2010; Darlow e Graham, 2011).

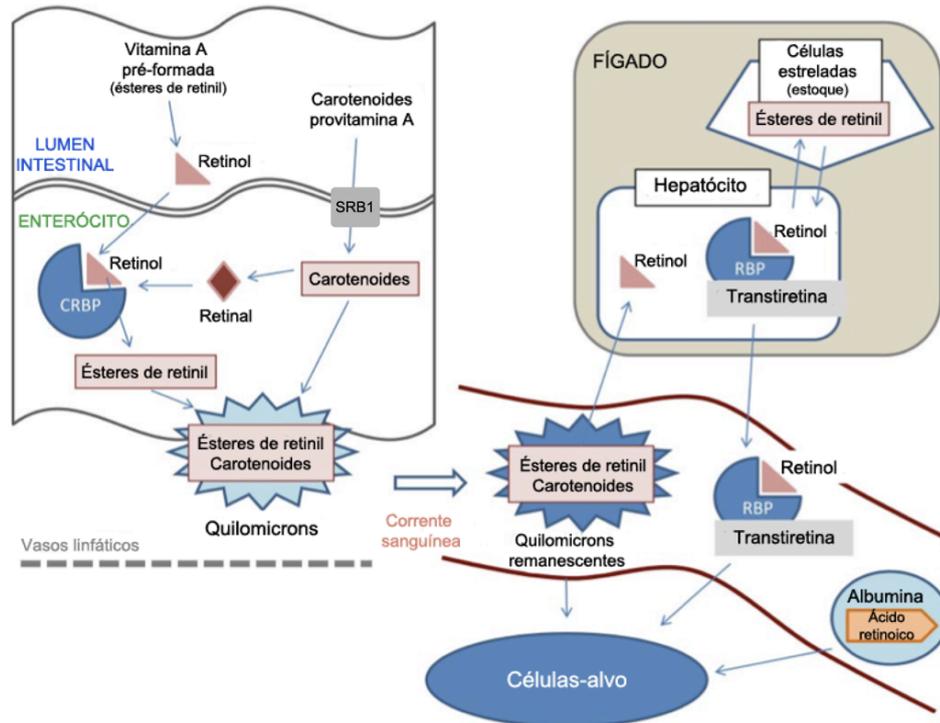
Considerando-se a relação entre vitamina A e mortalidade materno-infantil, organismos internacionais estimularam a instituição de um programa de prevenção desta vitamina. Em 1994 o Brasil institucionalizou a criação do Programa Nacional de Controle das Deficiências de Vitamina A (Brasil, 1994), que atualmente recomenda a distribuição de cápsulas de megadose de vitamina A para crianças de 6 a 59 meses de idade e mulheres no pós-parto imediato e promove ações educativas que estimulem a adoção de hábitos alimentares saudáveis (Brasil, 2005).

### **2.2.2 Metabolismo de Vitamina A**

Durante a digestão, os ésteres de retinil obtidos à partir da dieta são hidrolisados a retinol e grande parte é absorvida pela mucosa intestinal por difusão passiva, junto ao complexo celular proteína ligadora de retinol (CRBP) e posteriormente é reesterificada a ésteres de retinil (Figura 5; D'Ambrosio, Clugston, Blaner, 2012). Já os carotenoides parecem

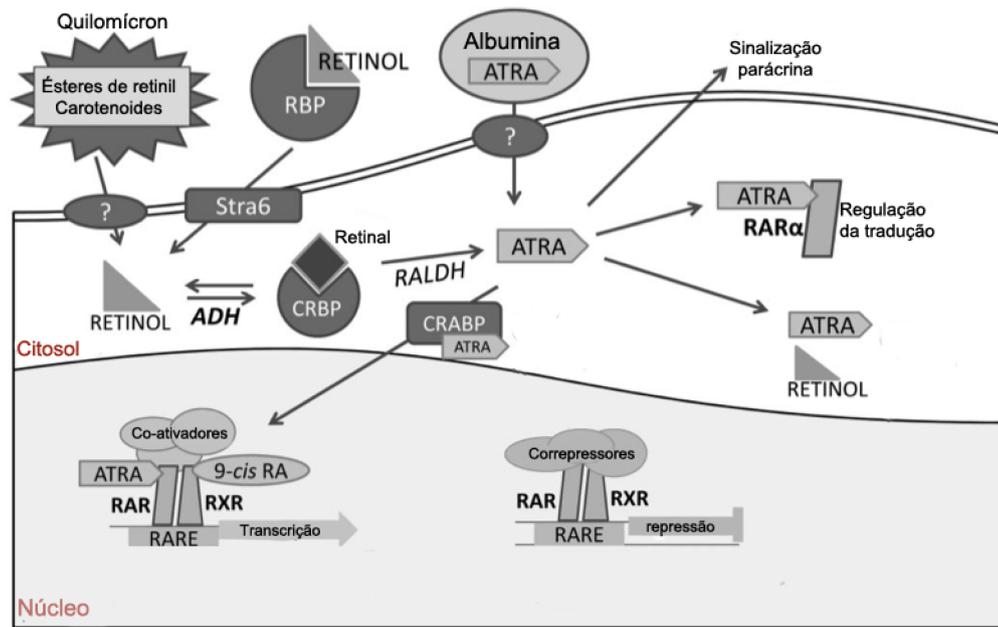
ser absorvidos por receptores do tipo SRB1 (*scavenger receptor class B type 1*) e ainda nos enterócitos podem ser clivados e dar origem a moléculas de retinal, que posteriormente podem ser oxidadas irreversivelmente a todo-*trans* ácido retinoico ou reduzidas a retinol (D'Ambrosio, Clugston, Blaner, 2012; Conaway, Henning e Lerner, 2013).

Na circulação sanguínea, os ésteres de retinil associados aos quilomicrons remanescentes chegam à circulação portal e são captados pelos hepatócitos. Nestas células são hidrolisados à retinol e são ligados à CRBP, que direciona o retinol às células estreladas para serem estocados na forma de ésteres de retinil (Figura 5; D'Ambrosio, Clugston, Blaner, 2012; Conaway, Henning e Lerner, 2013). Em mamíferos, o fígado é o principal órgão responsável pelo estoque de vitamina A. Quando é necessário, os ésteres de retinil são hidrolisados a retinol que então se liga a proteína ligadora de retinol (RBP) para ser transportado na circulação. No sangue, o complexo RBP-retinol associa-se a transtiretina, uma proteína de transporte, e é transportado a tecidos extra-hepáticos (Figura 5; Conaway, Henning e Lerner, 2013). O ácido retinoico pode ser obtido pela dieta em baixa concentração e após sair do intestino é transportado pela albumina até os tecidos-alvo (D'Ambrosio, Clugston, Blaner, 2012).



**Figura 5.** Absorção, transporte e captação da vitamina A e carotenoides. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013.

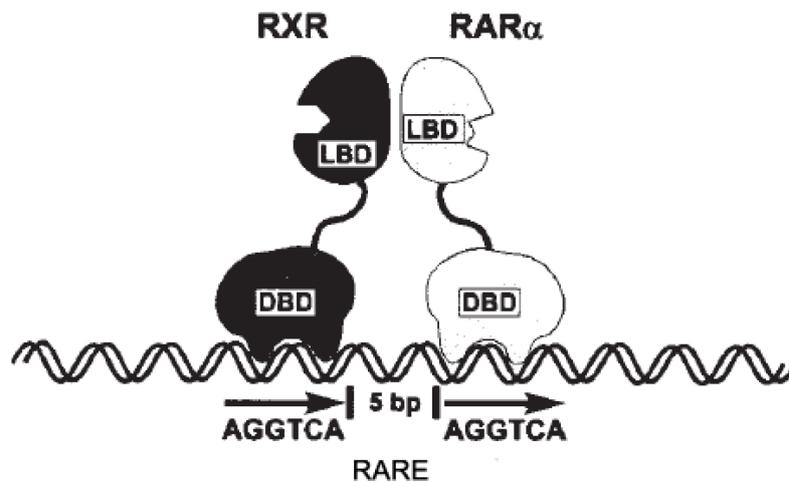
O retinol associado ao complexo RBP-transtiretina é captado pelos tecidos extra-hepáticos e, de acordo com as necessidades da célula, é convertido a retinal, em uma reação reversível e, posteriormente, à ácido retinoico em uma reação irreversível. No citosol, o ácido retinoico liga-se à proteína celular ligadora de ácido retinoico (CRABP), que o direciona para o núcleo da célula (Figura 6; Conaway, Henning e Lerner, 2013).



**Figura 6.** Captação celular de retinoides e sinalização intracelular. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013.

### 2.2.3 Ácido retinoico: ação na regulação da expressão gênica, na diferenciação celular, na resposta imune e na eritropoiese

A literatura descreve que mais de 500 genes são modulados pela vitamina A (Balmer e Bolmhoff, 2002). A forma mais ativa da vitamina A é o *todo-trans* ácido retinico (atRA), o qual atua na modulação de vários genes, envolvidos no crescimento, diferenciação, desenvolvimento e homeostase celular (Al Tanoury, Piskunov, Rochette-Egly, 2013). A modulação da expressão gênica pelo ácido retinoico ocorre de forma direta ou indireta. A regulação direta ocorre através da interação do ácido retinoico com seus receptores nucleares o receptor de ácido retinoico (RAR) e o receptor do retinoide X (RXR), membros da superfamília de receptores nucleares (Collins, 2002; Rhinn e Dollé, 2012). Esse heterodímero liga-se ao promotor do gene-alvo em sequências denominadas elemento responsivo ao ácido retinoico (RAREs; Rhinn e Dollé, 2012), promovendo ou inibindo a transcrição do gene-alvo (figura 7).



**Figura 7.** O heterodímero RAR-RXR liga-se a sequências promotoras específicas do gene-alvo nos elemento responsivo ao ácido retinoico (RAREs). LBD, domínio de ligação de ligante; DBD, domínio de ligação ao DNA. Fonte: Collins, 2002.

A regulação indireta de determinados genes pelo ácido retinoico ocorre através da ativação de fatores de transcrição que são responsáveis pela ativação de genes-alvos. A modulação indireta também está associada à estabilização do mRNA de genes-alvo, à ativação de dímeros de receptores nucleares diferentes de RAR/RXR e à regulação pós-transcricional de alguns genes (Balmer e Blomhoff, 2002; Gudas e Wagner, 2011).

Alguns genes que codificam proteínas que participam do metabolismo dos retinoides apresentam sequências RAREs em seus promotores ou são regulados de maneira indireta pelo próprio ácido retinoico (Balmer e Blomhoff, 2002). Dentre estes genes, a literatura destaca que proteínas como as proteínas ligadoras de retinol (RBP, CRBP), a proteína ligadora de ácido retinoico (CRABPII), a enzima lecitina:retinol acil transferase (LRAT), que converte o retinol em éster retinil, e a enzima citocromo P450 CYP26, que está relacionada à degradação de ácido retinoico em metabólitos polares, tem expressão induzida pelo ácido retinoico (Balmer e Blomhoff, 2002; Ross, 2003).

Pela capacidade de agir como hormônio, modulando a expressão de genes, o ácido retinoico pode estimular a diferenciação celular e inibir o crescimento e proliferação celular.

A literatura descreve que o ácido retinoico aumenta a expressão de fatores de transcrição relacionadas a diferenciação celular, como o homeo box A1 (Hoxa-1), que estimula a diferenciação de células-tronco (Balmer e Blomhoff, 2002; Gudas e Wagner, 2011).

Estudos evidenciam que o ácido retinoico, em especial o *todo-trans* ácido retinoico induz a diferenciação celular de células-tronco, como as células mesenquimais (Anghileri et al., 2008) e as células embrionárias (Erceg et al., 2010, Clemens et al., 2013). Gong et al (2013), em um estudo *ex vivo*, verificaram que células mesenquimais se diferenciavam em células neuronais com o tratamento com atRA (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e que esse processo seria mediado pelo RAR- $\beta$ , uma vez que a incubação destas células com antagonistas do RAR- $\beta$  bloqueava a resposta essa diferenciação celular.

O ácido retinoico parece modular a diferenciação de células do sistema imune (Pino-Lagos, Benson e Noelle, 2008), promovendo um estado pró-inflamatório (Maqsood et al., 2004; Long et al., 2011), caracterizado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo as IL-1 $\beta$  e IL-6, o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ; Kumar, Abbas e Fausto, 2005; Murphy, Travers, e Walport, 2012). Estas citocinas são proteínas secretadas por diversas células e medeiam várias funções celulares, estimulando diferentes respostas da imunidade e inflamação (Abbas, Lichtman, Pober, 2002; Murphy, Travers, e Walport, 2012), incluindo a indução da secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, que deflagram uma resposta inflamatória sistêmica (Feghali e Wright, 1997; Kumar, Abbas e Fausto, 2005).

Na deficiência de vitamina A alguns aspectos da imunidade inata e adaptativa são comprometidos, com conseqüente alteração da função imune. A baixa contagem de linfócitos, o desenvolvimento inadequado de órgãos linfoides acompanhado de um baixo nível de anticorpos e atraso de reações de hipersensibilidade, alteração da toxicidade de células T, B e

*natural killers* (NK) e alterações na produção de citocinas são algumas respostas obtidas na deficiência de vitamina A (Pino-Lagos, Benson e Noelle, 2008).

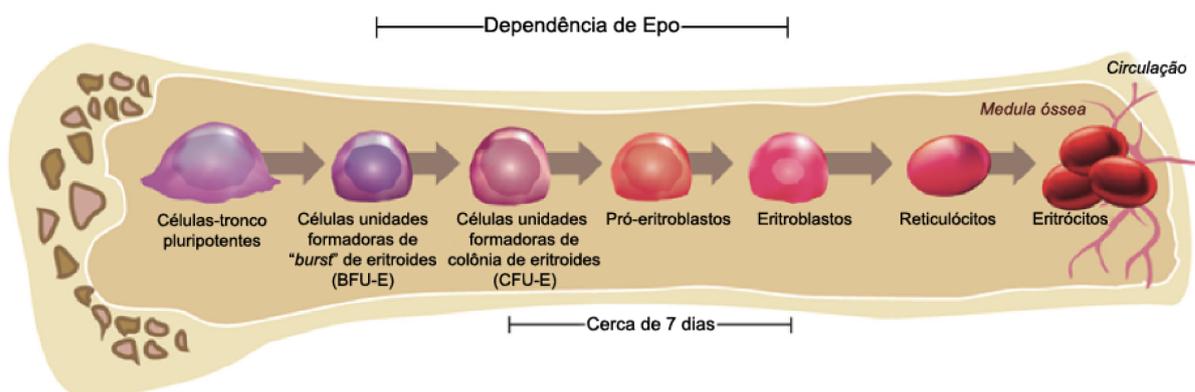
Estudos populacionais evidenciam que os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias são inversamente correlacionados à concentração de retinol sérico (Maqsood et al., 2004). Long et al (2011) observaram que após a suplementação com vitamina A crianças que apresentavam um tipo de gastroenterite apresentaram menor concentração fecal de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6. Outros estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam que o ácido retinoico promove alteração do perfil de diferenciação celular de células T auxiliares ( $T_H$ ). Na presença de ácido retinoico, predomina a diferenciação de células  $T_{H2}$ , que estão associadas a um perfil anti-inflamatório; enquanto na deficiência de vitamina A, predomina a diferenciação de células  $T_{H1}$ , associadas à secreção de citocinas pró-inflamatórias (Iwata, Eshima, Kagechika, 2003; Bai et al., 2009).

Wieringa et al (2004), em um estudo com crianças da Indonésia, observou uma associação entre a deficiência de vitamina A e maior produção de células  $T_{H1}$ . Bai et al (2009), em um modelo animal de camundongos com colite ulcerativa, uma doença inflamatória intestinal, verificou que o tratamento intraperitoneal por sete dias com 30  $\mu$ g de todo-*trans* ácido retinoico diminuiu a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) no colón desses animais comparados ao grupo Controle, sugerindo que os retinoides podem atenuar a resposta inflamatória.

Por outro lado, a vitamina A e o ácido retinoico geralmente promovem a diferenciação de células  $T_{H2}$ . Um estudo realizado por Hoag et al (2002), verificou que células  $T_{H2}$  apresentaram secreção de IL-4 aumentada na presença de todo-*trans* ácido retinoico. Stephensen et al (2002) evidenciaram que células  $T_{H2}$  tratadas com agonista do receptor X de retinoides (e RXR), aumentaram a produção de IL-4 e IL-5, diminuíram a produção de IFN- $\gamma$ , aumentou os níveis de mRNA de genes envolvidos no desenvolvimento

de  $T_H2$ , como IL-4 e o fator de transcrição GATA 3, indicando que o estímulo da via de RXR aumenta o desenvolvimento de  $T_H2$ , ou seja, que os retinoides tem importante papel na reposta anti-inflamatória.

Além disso, estudos demonstram que o ácido retinoico é essencial na diferenciação de linhagem de células vermelhas (Semba e Bloem, 2002; Zimmerman et al., 2006). A eritropoiese é o processo de maturação de progenitores eritroides na medula óssea, que passam por uma série de estágios de diferenciação celular (figura 8). Os progenitores eritroides derivados da célula-pluripotente são as células unidades formadoras de “burst” de eritroides (BFU-E) e as células unidades formadoras de colônias eritroides (CFU-E), que posteriormente serão diferenciados em precursores eritroides, os pró-eritroblastos e eritroblastos. Esses precursores se diferenciam em células maduras que já caem na circulação sanguínea, como os reticulócitos e posteriormente são diferenciadas em eritrócitos maduros (Kalantar-Zadeh et al., 2009; Elliott e Sinclair, 2012).



**Figura 8.** Estágios de diferenciação celular na eritropoiese. Fonte: Elliott e Sinclair, 2012.

Douer e Koeffler (1982) verificaram em um estudo *in vitro* que o ácido retinoico nas formas *trans* ácido retinoico (atRA) e 13-*cis* ácido retinoico (nas concentrações de 30 pmol a 30  $\mu$ mol/L) estimulam a produção dos progenitores eritroides, em particular de BFU-E

de maneira dose-dependente. Correa e Axelrad (1996) demonstraram também em um estudo *in vitro* que o atRA (30 nmol/L) promove aumento da produção de outro progenitor eritroide, os CFU-E.

A modulação da eritropoiese pelo ácido retinoico anteriormente descrita parece estar associada à expressão do gene que codifica o hormônio eritropoietina (Epo). A Epo promove a diferenciação, proliferação e sobrevivência de células da linhagem vermelha, além de ter efeito anti-apoptótico (Elliott e Sinclair, 2012). A Epo durante o desenvolvimento embrionário é um hormônio produzido principalmente pelo fígado fetal e posteriormente passa a ser produzida pelos rins e em menor quantidade pelo fígado (Elliott e Sinclair, 2012; Nairz et al., 2012).

Okano et al (1994) observaram que o tratamento de células de hepatoma com ácido retinoico (0,1 nmol/L – 100 nmol/L) promoveu um aumento nos níveis de mRNA e proteína da eritropoietina. Neste mesmo estudo, ratos tratados com dieta deficiente em vitamina A por 30 dias apresentaram aumento dos níveis séricos de eritropoietina 4h após a administração intragástrica de 100 µg de atRA, sugerindo que o atRA induz a produção de Epo.

Neumcke et al (1999) verificaram que rins de ratos que foram reperfundidos com acetato de retinol (0,5 mg/L) por 3h apresentaram aumento dos níveis de mRNA e da proteína eritropoietina nos rins. Posteriormente, Makita et al (2001) observaram em um estudo *ex vivo* que o gene Epo apresenta um elemento RARE em sua região promotora. Neste mesmo estudo, foi observado que não havia transcrição do gene Epo no fígado fetal de embriões de ratos *knockout* em RXR- $\alpha$ , causando eritropoiese ineficaz nestes embriões. Portanto estes estudos demonstram que a vitamina A, mais especificamente o ácido retinoico, modula a eritropoiese, atuando na expressão de Epo e na diferenciação de células que são dependente deste hormônio.

### 2.3 Interação: Vitamina A e Ferro

Estudos revelam que o metabolismo de vitamina A e ferro apresentam interação (Suharno et al., 1993; Ameny et al., 2002; Zimmerman et al., 2006). Apesar de não estar totalmente esclarecido alguns autores verificaram que a deficiência de vitamina A pode causar anemia (Ameny et al., 2002) e acúmulo de ferro em tecidos (Arruda et al., 2009; Mehdad et al., 2010).

Um dos efeitos da vitamina A parece estar relacionado à eritropoiese. Estudos mostram que a suplementação de vitamina A para indivíduos deficientes aumenta a contagem de eritrócitos, o volume corpuscular médio destas células e promove mobilização de ferro dos estoques de para a eritropoiese (Roodenburg et al., 2000; Garg et al., 2005; Zimmerman et al., 2006). Mwanri et al (2000) observaram que a suplementação de vitamina A concomitante à suplementação de ferro apresentou uma melhor resposta no aumento da taxa de hemoglobina comparado a suplementação separada destes dois nutrientes. Outro estudo demonstrou que crianças que apresentavam baixa concentração de hemoglobina, quando suplementadas com vitamina A, apresentaram melhora desse nível além de apresentarem aumento nos níveis de eritropoietina e redução dos níveis de ferritina e prevalência de anemia (Zimmerman et al., 2006).

A literatura também sugere que a vitamina A esteja associada ao metabolismo de ferro pela regulação da absorção, transporte e mobilização de ferro, por meio da regulação da expressão de alguns genes de proteínas envolvidas no metabolismo deste mineral (Strube, Beard e Ross, 2002; Arruda et al., 2009; Citelli et al., 2012). Em um estudo *in vivo*, Schroeder et al (2007) observaram que em ratos deficientes em ferro as proteínas reguladoras de ferro (IRPs) apresentavam atividade de ligação ao RNA total atenuada com a suplementação oral de atRA (30  $\mu\text{mol/kg}$  de peso) por sete dias. Essa baixa interação da IRP acarretou na redução de cerca de 40% da expressão hepática do receptor de transferrina (TfR1), que sofre a

regulação pós-transcricional pelo mecanismo IRP-IRE, sugerindo que a vitamina A possa modular o metabolismo de ferro pela regulação intracelular de ferro.

Outros estudos sugerem que a vitamina A promova modulação da expressão do peptídeo hepcidina (Tsuchiya et al., 2009; Citelli et al., 2012). Tsuchiya et al (2009) verificaram que células HuH7 (derivadas de hepatócitos humano) tratadas com 0 a 20  $\mu\text{mol/L}$  de atRA por 24h provocava supressão da hepcidina e supressão da expressão de hemojuvelina acompanhado pelo decréscimo da concentração de ferro hepático. Do mesmo modo, Citelli et al (2012), observaram que camundongos tratados por 22 semanas com dieta deficiente em vitamina A apresentavam aumento dos níveis de transcritos de hepcidina e ferritina no fígado.

Assim, considerando que a vitamina A pode modular o estado inflamatório e o metabolismo do ferro, o presente estudo investigou o efeito da deficiência de vitamina A sobre os marcadores moleculares do metabolismo do ferro e da resposta inflamatória, e na expressão dos genes envolvidos nestes sistemas.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito *in vivo* da deficiência de vitamina A sobre os marcadores moleculares do metabolismo do ferro e da resposta inflamatória e na expressão dos genes envolvidos nestes sistemas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os níveis de ferro no fígado, baço, intestino, rim e coração de ratos submetidos a tratamentos com diferentes quantidades ou fontes de vitamina A;
- Avaliar *status* de ferro sérico em ratos submetidos a tratamentos com diferentes quantidades ou fontes de vitamina A;
- Determinar os níveis de mRNA hepático e esplênico e a concentração sérica de proteína das interleucinas 6 e 1 $\beta$  em ratos submetidos a tratamentos com diferentes quantidades ou fontes de vitamina A;
- Determinar os níveis de mRNA dos genes envolvidos na homeostase do ferro, hepcidina hepática (Hamp), heme oxigenase-1 (Hmox1) no fígado e no baço, eritropoietina (Epo) no rim, ferroportina (Slc40a1) no baço e de supressor da sinalização de citocinas 3 (Socs3) no fígado de ratos submetidos a tratamentos com diferentes quantidades ou fontes de vitamina A.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Trinta ratos Wistar machos (Granja GR, São Paulo, Brasil), 21 dias de idade ( $65,7 \pm 5,5$  g), foram alojados em gaiolas individuais, em biotério com ciclos de luz / escuridão de 12/12 h e temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . A dieta era ofertada no período das 16h às 8h, com livre acesso à água. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB, UnBDoc nº 52606/2011.

### 4.2 Protocolo Experimental

Após sete dias de aclimação com dieta padrão para roedores em crescimento, AIN-93G (Reeves et al., 1993), os animais foram alocados em cinco grupos experimentais (seis ratos por grupo) e alimentados com as seguintes dietas:

- **Controle:** dieta AIN-93G, contendo 4000 UI de vitamina A / kg de dieta;
- **Deficiente em vitamina A (VAD):** dieta AIN-93G com mistura vitamínica isenta de vitamina A;
- **Deficiente em ferro (FeD):** dieta AIN-93G com mistura mineral isenta de ferro;
- **Deficiente em vitamina A e ferro (VAFeD):** dieta AIN-93G com mistura vitamínica isenta de vitamina A e com mistura mineral isenta de ferro;
- **Todo-trans ácido retinoico (atRA):** dieta AIN-93G isenta de vitamina A e adicionada de 12 mg de atRA / Kg dieta (Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, EUA) como única fonte de vitamina A. A dose de atRA foi escolhida baseada em estudos que evidenciam esta quantidade não causa danos ao organismo, assemelhando-se ao que se espera no organismo em um estado fisiológico (Martini et al., 1995; White et al., 1998; Cifelli, Green e Green, 2005; See et al., 2008).

Após 59 dias de tratamento, os ratos foram anestesiados com isoflurano 3%, seguido de punção cardíaca para retirada de sangue. O fígado, baço, rim, intestino e coração foram retirados e lavados em solução salina (NaCl 0,9%) a 4° C, imediatamente congelados em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) e estocados a -70° C para posterior análise.

### 4.3 Preparo das Rações

As rações foram preparadas mensalmente à partir das mistura dos ingredientes (Rhooster, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) seguindo a proporção dos ingredientes proposta por Reeves et al (1993), encontradas na Tabela 1. Após o preparo, as rações eram armazenadas a -20° C.

**Tabela 1.** Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993).

<b>Ingrediente</b>	<b>g/Kg de dieta</b>
Amido de milho	397,5
Caseína (proteína > 85%)	200,0
Amido dextrinizado (tetrassacarídeo 90-94%)	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja (sem aditivos)	70,0
Fibra	50,0
Mix mineral	35,0
Mix vitamínico	10,0
L-cistina	3,0
Bitartarato de colina (colina 41,1%)	2,5
Terc-butil hidroquinona	0,014

**Tabela 2.** Composição do Mix Mineral da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993).

<b>Elementos minerais</b>	<b>mg/Kg de dieta</b>
Cálcio	5000,0
Fósforo	1561,0
Potássio	3600,0
Enxofre	300,0
Sódio	1019,0
Cloreto	1571,0
Magnésio	507,0
Ferro	35,0
Zinco	30,0
Manganês	10,0
Cobre	6,0
Iodo	0,2
Modibilênio	0,15
Selênio	0,15

**Tabela 3.** Composição do Mix Vitaminico da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993).

<b>Vitamina</b>	<b>U/Kg de dieta</b>
Niacina (B3), mg	30
Ácido pantotênico (B5), mg	15
Piridoxina (B6), mg	6
Tiamina (B1), mg	5
Riboflavina (B2), mg	6
Ácido Fólico, mg	2
Vitamina K, µg	750
Biotina, µg	200
Vitamina B12, µg	25
Vitamina A, UI	4000
Vitamina D3, UI	1000
Vitamina E, UI	75

#### 4.4 Consumo de Dieta e Ganho de Peso

O consumo de dieta foi obtido diariamente pela diferença entre a quantidade de dieta ofertada e as sobras. Os animais foram pesados semanalmente em balança analítica (Marte, ASF11, São Paulo, SP, Brasil) para a avaliação ponderal, antes de receberem a ração.

#### 4.5 Concentração de Retinol Hepático

A concentração de retinol no fígado foi avaliada pelo método Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, coluna 25 cm Shim-park C18 CLC-ODS, Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando o método descrito por Tanumihardjo and Penniston (2002) e modificado por Mehdad et al (2010). Aproximadamente 0,1 g de fígado foi homogeneizado a 4° C em solução de etanol + butil-hidroxitolueno 1% (BHT; 5 x volume inicial); hidróxido de potássio 50% (KOH; 0,8 x volume inicial) foi adicionado à suspensão e a mesma foi agitada em vortex por 15 s e incubada em banho-maria a 48 °C por 60 min. Durante o período de incubação a amostra foi agitada em vortex a cada 15 min (15 min, 30 min, 45min) por 15 s. Após a saponificação, hexano pureza HPLC (2x volume; Merck, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado à suspensão, e a mesma foi agitada por 30 segundos e centrifugada por 1 min para separação de fases; esse procedimento foi realizado três vezes. A fase menos densa foi transferida para outro tubo, seguido de evaporação do hexano com nitrogênio gasoso. O extrato foi estocado a -70° C, protegido de luz para prevenir a oxidação, para posterior leitura. O extrato seco foi ressuspendido em 1 mL de etanol (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México), filtrado com membrana de nylon (Whatman, Maidstone, Inglaterra) e 50 µL foram injetados em sistema HPLC. Uma mistura de metanol/água (95:5) foi utilizada como fase móvel, em fluxo de 1,0 mL/minu e o retinol foi detectado a 325 nm. As amostras de cada fígado foram analisadas em duplicata.

Para quantificação foi construída uma curva padrão, utilizando retinol (Fluka Biochemika, Suíça; 99% retinol – HPLC), diluído em etanol, com a faixa de concentração de 0,0016 – 0,0097  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Tendo como base a concentração de retinol e a área do pico obtida no cromatograma para cada diluição, obteve-se então a equação da reta,  $y=3,23352 \cdot 10^{-9} - 0,0003; r^2 = 0,999$ .

#### **4.6 Concentração de Ferro na Dieta e nos Tecidos**

A concentração de ferro no fígado, baço, intestino, rim e coração e nas dietas foi determinada por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado (ICP/AES, Spectro, Kleve, Alemanha), segundo método descrito por Baranowska, Czernicki e Aleksandrowicz (1995), com modificações. Amostras de fígado (0,3 g), de baço (0,1 g), de intestino (0,4 g), de rim (0,4 g), de coração (0,4 g) e de ração (0,5 g) foram digeridas com 5 mL de  $\text{HNO}_3$  PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) e 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) em sistema biodigestor micro-ondas Provecto Analítica (DGT 100 Plus; Provecto Analítica, Jundiaí, São Paulo, Brasil), utilizando-se o seguinte programa: 5 min – 330 W; 6 min – 700 W ; 1 min – 800 W; 20 min – 0 W (resfriamento). Após a digestão, as amostras foram ressuspensas em  $\text{HNO}_3$  0,1 mol/L para um volume final de 25 mL. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por espectrometria de emissão atômica (ICP-AES; Spectro, Kleve, Alemanha), linha 238 nm, utilizando curva de calibração com Fe (Titrisol-Merck) no intervalo de 0 a 10 ppm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de ferro por g de tecido. A exatidão do método para quantificação de ferro foi determinada utilizando uma amostra de referência (Rice Flour, SRM 1658a, United States Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA), analisada em triplicata. Todas as vidrarias utilizadas na análises foram lavadas

com HCl 10% e posteriormente lavadas com água deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation).

#### **4.7 Status de Ferro Sérico**

##### **4.7.1 Ensaio de Dosagem de Ferro Sérico**

A avaliação de ferro sérico foi determinada utilizando-se um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A 225 µL de soro foram adicionados 900 µL de tampão (acetato de sódio 43 g/L, ácido acético 3%, ácido tioglicólico 0,4%), seguido de leitura da absorbância a 560 nm. Posteriormente, 250 µL de Ferrozina<sup>®</sup> foram adicionadas às amostras e estas foram incubadas em banho-maria a 37° C por 10 min e a absorbância determinada a 560 nm. A determinação da concentração de ferro sérico foi feita utilizando uma curva-padrão de seis pontos, com solução padrão de ferro com a faixa de concentração de 50 a 500 µg de ferro/dL ( $y = 0,0009x + 0,0013$ ;  $r^2 = 0,9998$ ). As análises foram realizadas em duplicata.

##### **4.7.2 Ensaio de Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF)**

A capacidade latente de ligação de ferro (CLLF) foi realizada utilizando-se um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, à cada 100 µL de soro foram adicionados 750 µL de tampão (Tris 300 mmol/L; cloreto férrico  $\geq 35$  µmol/L; hidrogenocarbonato de sódio  $\geq 150$  µmol/L), seguido de incubação em banho-maria a 37° C por 5 min. O mesmo foi realizado com a amostra do branco, que continha todos os reagentes descritos acima exceto o soro. Após a incubação, a absorbância (A1) foi determinada a 560 nm. Posteriormente, à cada amostra foram adicionados 200 µL de Ferrozina<sup>®</sup>, seguido de incubação em banho-maria a 37° C por 5 min e determinação da absorbância (A2) a 560 nm. Uma amostra com valor de CLLF conhecido foi utilizada como calibrador (cal). A absorbância das amostras foi determinada à

partir da diferença dos valores de A2 e A1 (eq. I), enquanto o valor de CLLF das amostras foi calculado à partir da razão entre a absorbância da amostra e do calibrador, multiplicado pelo valor de CLLF do calibrador (eq. II).

$$\text{Absorbância da amostra} = A2 - A1 \quad (\text{I})$$

$$\text{CLLF } (\mu\text{g/dL}) = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do calibrador}} \times \text{CLLF calibrador} \quad (\text{II}).$$

#### **4.7.3 Determinação da Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF), Saturação de Transferrina (ST%) e Transferrina**

A capacidade total de ligação de ferro (CTLF) foi obtida à partir da soma dos valores de ferro sérico e CLLF (eq. III), enquanto a saturação de transferrina (%ST) foi determinada a partir da razão dos valores de ferro sérico pelos valores de CTLF e multiplicados por 100 (eq. IV). A concentração de transferrina foi feita à partir da multiplicação do valor de CTLF por 0,70 (eq. V).

$$\text{CTLF } (\mu\text{g/dL}) = \text{Ferro sérico} + \text{CLLF} \quad (\text{III})$$

$$\%ST = \frac{\text{Ferro sérico}}{\text{CTLF}} \times 100 \quad (\text{IV})$$

$$\text{Transferrina } (\text{mg/dL}) = \text{CTLF} \times 0,70 \quad (\text{V}).$$

### **4.8 Determinação dos Níveis de Transcritos**

#### **4.8.1 Extração de RNA Total, Eletroforese, Precipitação com Acetato e Síntese de cDNA**

A extração de RNA total do fígado, baço e rim dos ratos foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Aproximadamente 0,1 g de tecido foi homogeneizado em TRIzol<sup>®</sup> (1 mL para cada 0,1 g de tecido), utilizando homogeneizador elétrico TissueRuptor (QIAGEN, Austin, Texas, EUA) com as amostras imersas em gelo, seguida de centrifugação a 10000 x g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados seguido de incubação por 3 min à temperatura ambiente e posterior centrifugação a 10000 x g a 4°C por 10 min, para separação da fase orgânica e fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e 500 µL de álcool isopropílico (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México) foram adicionados para a precipitação do RNA, seguida de centrifugação a 10000 x g a 4°C por 10 min. O *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL etanol 75% (J. T. Baker, Xalostoc, Edo de Méx, México), para remoção de impurezas, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em água deionizada e estocados a -70° C.

As amostras de RNA foram precipitadas com acetato de sódio anidro 3 mol/L e pH 5,2 (0,1 x volume da amostra) e etanol (2,5 x volume da amostra), incubadas a 4° C por 30 min e centrifugadas a 10000 x g por 30 min a 4° C. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado ao precipitado 1 mL de etanol 75% a 4° C com posterior centrifugação a 10000 x g por 5 min a 4° C e o sobrenadante foi descartado. O material foi seco a temperatura ambiente e posteriormente ressuspensionado em água deionizada.

A concentração do RNA total foi determinada por leitura a 260 nm em espectrofotômetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japão), e dada pela fórmula:

$$\text{Concentração de RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição}$$

Onde,  $A_{260}$  é valor de leitura da amostra a 260 nm, 40 é o coeficiente médio de extinção do RNA (Azevedo et al., 2010).

O grau de pureza das amostras de RNA também foi determinado por espectrofotometria calculando a razão das absorvâncias a  $A_{260}/A_{280}$  nm para verificação de

contaminação com proteínas e  $A_{260}/A_{230}$  nm para verificação de contaminação com compostos fenólicos. Foram considerados como adequados valores das razões maiores ou iguais que 1,8 (Azevedo et al., 2010).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Uma alíquota de 300 ng foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil), tampão de corrida TAE 1x (Tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Bórico: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Ácido Etilenodiaminotetracético: Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e corado com 5  $\mu$ L GelGreen™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). O gel foi analisado utilizando o *software* do sistema de fotodocumentação L – Pix HE Image (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil) para confirmar ausência de material genético degradado.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1  $\mu$ g de RNA total utilizando o kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, EUA). Primers de Oligo(dT) foram adicionados ao RNA total e a reação foi incubada a 70° C por 5 min. A enzima ImProm-II Reverse Transcriptase foi adicionada e as amostras incubadas a 42° C por 50 min, seguida de inativação a 70° C por 15 min e estocados a -20° C. Uma reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa foi realizada para cada amostra como controle negativo. Uma alíquota destas amostras foi submetida a reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) para verificar ausência de contaminação por DNA genômico.

#### **4.8.2 Determinação dos Níveis de mRNA dos Genes Relacionados ao Metabolismo de Ferro e à Inflamação**

As concentrações de mRNA dos genes de interesse, biomarcadores de status de ferro, eritropoietina (Epo), ferroportina (Slc40a1), heme oxigenase-1 (Hmox1), hepcidina (Hamp) e supressor de sinalização de citocinas 3 (Socs3), e do sistema inflamatório, interleucina-6 (Il6) e interleucina-1 beta (Il1b), foram determinadas pela amplificação utilizando-se o sistema de

reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR; 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura). A qPCR foi realizada utilizando 2  $\mu$ L de cDNA (correspondendo a cerca de 0,02  $\mu$ g de RNA total), 5  $\mu$ L de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,2  $\mu$ mol/L (concentração final) de cada primer (tabela 4), com volume final de 10  $\mu$ L. A detecção do gene de interesse foi realizada empregando-se um sistema de reação de 40 ciclos (desnaturação: 95° C por 20 s; hibridação: 95° C por 3 s e 60° C por 30 s; estágio da curva de dissociação: 95° C por 15 s, 60° C por 60 s, 95° C por 15 s e 60° C por 15 s). Todas as reações foram feitas em triplicata e a amplificação e especificidade de cada produto amplificado foi verificada à partir da curva de dissociação.

**Tabela 4.** Sequências de primers utilizados para ensaio de qPCR para os genes Epo, Hmox1, Hamp, Il1b, Il6, Slc40a1, Socs3 e Actb.

Gene	Sequência dos Primers (5' - 3')	Número de acesso no GenBank	Referência
Epo	TACGTAGCCTCACTTCACTGCTT ( <i>forward</i> ) GCAGAAAGTATCCGCTGTGAGTGTTT ( <i>reverso</i> )	NM_017001	Katavetin et al., 2007
Hamp	TGATGCTGAAGCGAAGGA ( <i>forward</i> ) TGTGTTGAGAGGTCAGGAC ( <i>reverso</i> )	NM_053469	Christiansen et al., 2007
Hmox1	ATCGTGCTCGCATGAAC ( <i>forward</i> ) CAGCTCCTCAAACAGCTCAA ( <i>reverso</i> )	NM_012580	Katavetin et al., 2007
Il1b	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG ( <i>forward</i> ) GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC ( <i>reverso</i> )	NW_047658	Peinnequin et al., 2004
Il6	CAAGAGACTTCCAGCCAG ( <i>forward</i> ) CTCCGACTTGTGAAGTGGT ( <i>reverso</i> )	NW_012589	Lima-Rodrigues et al., 2010
Slc40a1	TTCCGCACTTTTCGAGATGG ( <i>forward</i> ) TACAGTCGAAGCCAGGACCGT ( <i>reverso</i> )	NM_133315.2	Christiansen et al., 2007
Socs3	CCTCCAGCATCTTTGTCGGAAGAC ( <i>forward</i> ) TACTGGTCCAGGAACTCCCGAATG ( <i>reverso</i> )	AF075383	Peinnequin et al., 2004
Actb	GTCGTACCACTGGCATTGTG ( <i>forward</i> ) CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA ( <i>reverso</i> )	NM_031144	Wang et al., 2008

A eficiência de amplificação da qPCR foi avaliada através da realização de curvas-padrão para cada fragmento amplificado em diferentes diluições (Tabela 5).

**Tabela 5.** Diluições de cDNA utilizadas para construção das curvas-padrão de cada gene estudado, segundo tecido.

Gene	Tecido	Diluições do cDNA utilizadas na curva de eficiência
<b>Marcadores de inflamação</b>		
Il6	Fígado	1:2,5 , 1:5, 1:10, 1:20, 1:25 e 1:30
Il6	Baço	1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50 e 1:100
Il1b	Fígado	1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 e 1:150
Il1b	Baço	1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50 e 1:100
<b>Marcadores do metabolismo de ferro</b>		
Epo	Rim	1:2,5 , 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:30
Hamp	Fígado	1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 e 1:1000
Hmox1	Fígado	1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500
Hmox1	Baço	1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500
Slc40a1	Baço	1:25, 1:50, 1:100, 1:200; 1:250 e 1:500
Socs3	Fígado	1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 e 1:150

Para determinação da eficiência das reações, curvas-padrão de cada gene de interesse foram construídas a partir do valor do ciclo de amplificação ( $C_T$ ) versus log da concentração de cDNA e a eficiência foi determinada à partir do valor do coeficiente angular da reta, através da equação:

$$E (\%) = (10^{-1/\text{inclinação}} - 1) \times 100$$

Onde, E corresponde à eficiência da reação, e a inclinação corresponde ao valor do coeficiente angular da reta. A eficiência foi da qPCR foi considerada válida entre 90 a 110%.

Outra curva foi construída utilizando-se os valores de  $\Delta C_T$  ( $C_T$  gene de interesse -  $C_T$  gene constitutivo) versus o log das diluições de cDNA em unidades arbitrárias, para cada gene de interesse; para validação destas curvas, foi julgado como válido valor de coeficiente angular da reta menor

ou igual que 0,1. A validação foi realizada segundo o tutorial “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” (Part #: 4371095 Rev B, Applied Biosystems).

A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak e Schmittgen, 2001). A expressão dos genes foi calculada utilizando os valores do  $C_T$  e os resultados de expressão gênica foram expressos como o número de vezes expresso em relação ao controle endógeno. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas e normalizadas em relação ao gene constitutivo  $\beta$ -actina (Actb).

#### **4.9 Determinação dos Níveis séricos de IL-6 e IL-1 $\beta$ por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Os níveis séricos de IL-6 e IL-1 $\beta$  foram avaliados utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA; Bender MedSystems, Vienna, Austria). Microplacas previamente sensibilizadas com anticorpo específico para rato foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (PBS 1x + Tween 20 0,05%). Posteriormente, 100  $\mu$ L de soro e 50  $\mu$ L de biotina-conjugada foram adicionados e as microplacas incubadas em centrífuga de microplaca a 100 x g por 2h (centrífuga Megafuge 16R, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Em seguida, as microplacas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem (PBS 1x + Tween 20 0,05%) e 100  $\mu$ L de estreptavidina conjugada a HRP foram adicionados a cada poço, seguido de incubação em centrífuga de microplaca a 100 x g por 1h. Novamente as microplacas foram lavadas e foram adicionados a cada poço 100  $\mu$ L de substrato (solução de tetrametilbenzidina - TMB), com posterior incubação à temperatura ambiente por cerca de 10 min. A reação foi interrompida com a adição de 100  $\mu$ L de solução de parada ( $H_2SO_4$  1 mol/L) e as absorbâncias das amostras foram determinadas a 450 nm utilizando-se uma leitora de microplaca (SurinseTecan, Seestrasse, Männedorf, Suíça). Para determinação da concentração

de cada citocina foi construída uma curva de calibração de seis pontos com padrões específicos, nas concentrações de 0 a 1000 pg/mL para IL-6 ( $y = 0,0009 x + 0,0403$ ;  $r^2 = 0,9921$ ) e nas concentrações de 0 a 500 pg/mL para IL-1 $\beta$  ( $y = 0,0004 x + 0,0303$ ;  $r^2 = 0,98537$ ).

#### **4.10 Determinação da Atividade Específica de Heme Oxigenase-1 no Fígado e Baço**

A atividade enzimática de heme oxigenase-1 (HO-1) foi determinada segundo Schmidt et al (2007). Cerca de 0,1g de fígado e baço congelados foram homogeneizados com homogeneizador elétrico (TissueRuptor; QIAGEN, Austin, Texas, EUA) em tampão fosfato de K:Na (5:1) 100 mmol/L com MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L (tampão de atividade de HO), na proporção de 4 x (p/v). Após sonicação, o homogeneizado foi centrifugado a 15000 x g por 15 min a 4°C. Para determinar a atividade de heme oxigenase-1, 100  $\mu$ L do sobrenadante do homogeneizado foi utilizado numa reação de volume final de 500  $\mu$ L, contendo 100  $\mu$ L de *liver cytosol* (como fonte de biliverdina redutase), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido 0,8 mmol/L (NADPH, Sigma, Saint Louis, MO, EUA), hemina 20  $\mu$ mol/L (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), glicose-6-fosfato 2 mmol/L (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,002 U/ $\mu$ L (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). A reação foi realizada em banho-maria a 37°C por 1h, no escuro, com interrupção da reação pela adição de 500  $\mu$ L de clorofórmio. Para extração da bilirrubina, os tubos foram agitados, seguidos de centrifugação a 15000 x g por 5 min. A absorbância da fase do clorofórmio (fase menos densa) foi determinada nos comprimentos de 452 nm e 530 nm (interferente). A concentração de bilirrubina foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar 40 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos pela formação de bilirrubina (pmol) por miligrama de proteína, em 1h.

#### **4.11 Análise Estatística**

Para avaliação da normalidade dos dados, foi utilizado teste Kolmogorov-Smirnov, utilizando o software SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e para comparações entre os tratamentos foi utilizado test t-student para amostras independentes, utilizando SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Ganho de Peso, Consumo da Dieta, Concentração de Ferro na Dieta e Retinol

#### Hepático

Apesar do consumo de dieta não ter sido alterado entre os tratamentos, os grupos deficientes em vitamina A (VAD), em ferro (FeD) e o grupo tratado com todo-*trans* ácido retinoico (atRA) apresentaram menor ganho de peso quando comparados ao grupo Controle ( $p = 0,035$ ;  $0,032$  e  $0,029$ , respectivamente; Tabela 6). Devido aos diferentes níveis de contaminação por ferro nos componentes da dieta, a concentração de ferro nas dietas dos grupos VAD e atRA foi menor que a dieta do grupo Controle (Tabela 6), entretanto ambas dietas continham a recomendação de ferro para roedores de acordo com o estabelecido na AIN-93G (Tabela 2). Ao final do tratamento (59 dias), os ratos VAD, FeD e atRA apresentaram níveis de retinol hepático abaixo do limite de detecção do método utilizado (Tabela 6). A deficiência de ferro (FeD) não alterou a concentração de retinol hepático comparada à dieta Controle.

**Tabela 6.** Consumo de dieta, concentração de ferro na dieta, ganho de peso e concentração de retinol hepático de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias.

	Consumo de dieta (g / 59 dias)	[Fe] na dieta ( $\mu\text{g/g}$ )	Ganho de peso (g / 59 dias)	Retinol hepático ( $\mu\text{g / g}$ )
Controle	1110,31 $\pm$ 51,72	44,83 $\pm$ 3,34	274,90 $\pm$ 9,80	60,30 $\pm$ 9,50
VAD	1053,31 $\pm$ 80,79	38,82 $\pm$ 3,54*	226,90 $\pm$ 41,20*	<LD
FeD	1033,19 $\pm$ 71,48	12,71 $\pm$ 1,12*	231,80 $\pm$ 36,20*	59,30 $\pm$ 16,10
VAFED	1045,51 $\pm$ 120,41	12,88 $\pm$ 1,68*†	232,70 $\pm$ 59,00	<LD
atRA	1070,89 $\pm$ 82,20	34,15 $\pm$ 3,68*	232,80 $\pm$ 39,20*	<LD

VAD: dieta isenta de vitamina A; FeD: dieta isenta de ferro; VAFED: dieta isenta de vitamina A e ferro; atRA: dieta com todo-*trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).

## 5.2 Status de Ferro: Parâmetros Séricos de Ferro e Concentração de Ferro nos Tecidos

Em relação ao *status* de ferro sérico (Tabela 7), a deficiência de vitamina A, a deficiência de ferro e a associação de ambas deficiências reduziu os níveis de ferro sérico (VAD, FeD e VAFeD;  $p = 0,009$ ;  $0,003$  e  $0,031$ , respectivamente) e os valores de saturação de transferrina (ST%;  $p = 0,028$ ;  $0,001$  e  $0,003$ , respectivamente) comparados à dieta Controle. Os grupos VAD e FeD apresentaram maior capacidade latente de ligação de ferro (CLLF;  $p = 0,024$  e  $0,012$ , respectivamente), enquanto foi observado um aumento marginal da CLLF no grupo VAFeD ( $p = 0,085$ ) comparado ao grupo Controle. Semelhante ao obtido nos demais grupos de tratamento, o grupo atRA apresentou menores níveis de ferro sérico ( $p = 0,014$ ); no entanto, diferente dos outros tratamentos, o valor de ST% foi marginalmente menor ( $p = 0,068$ ) e os níveis de transferrina foram significativamente menores comparados ao grupo Controle ( $p = 0,004$ ). Os valores de capacidade total de ligação de ferro (CTLF) não tiveram alterações entre os diferentes tratamentos (Tabela 7).

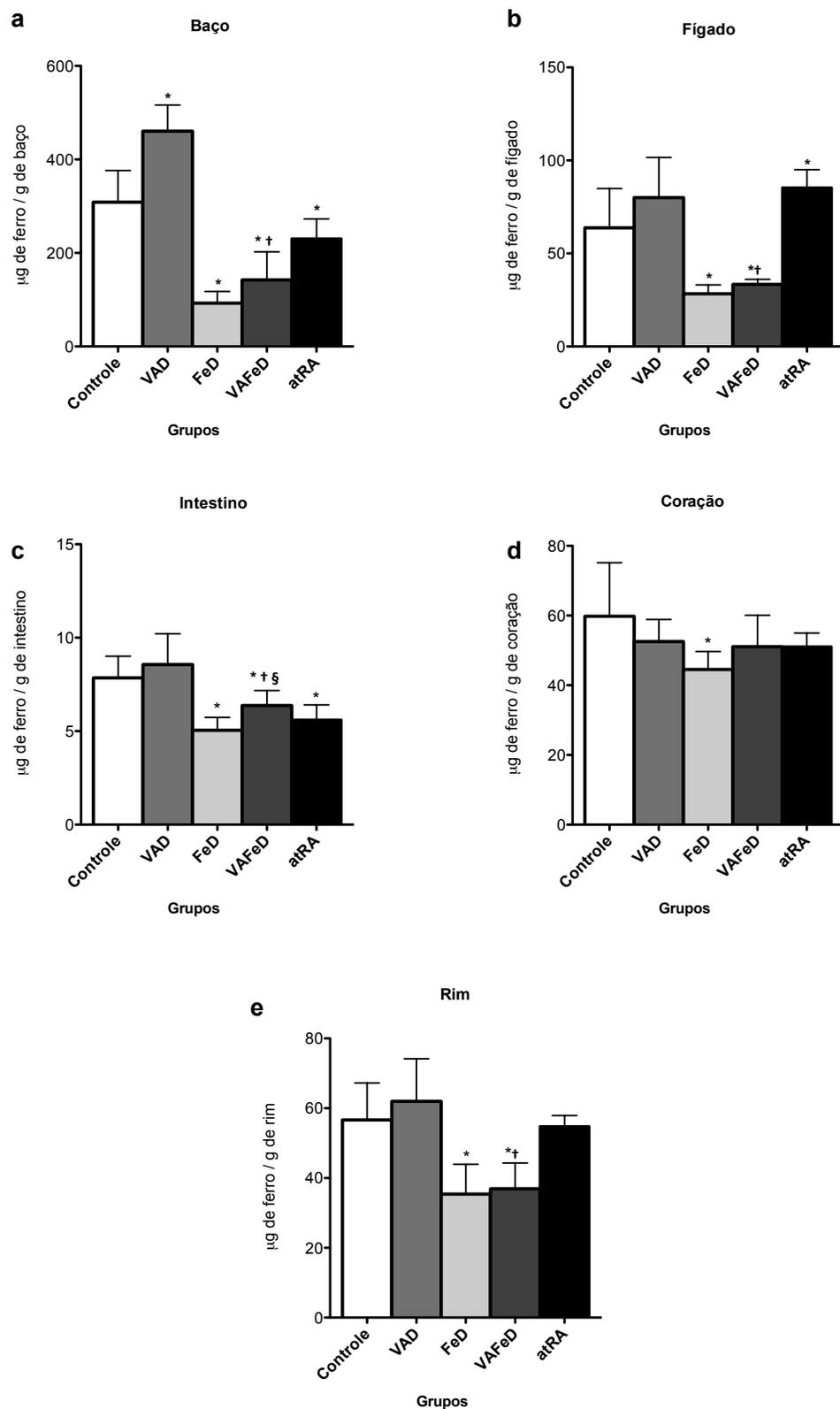
**Tabela 7.** Parâmetros séricos de ferro de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias.

	Ferro sérico ( $\mu\text{g/dL}$ )	CLLF ( $\mu\text{g/dL}$ )	CTLF ( $\mu\text{g/dL}$ )	ST (%)	Transferrina mg/dL
Controle	161,41 $\pm$ 42,01	291,03 $\pm$ 43,68	452,45 $\pm$ 47,73	35,60 $\pm$ 8,05	304,08 $\pm$ 14,10
VAD	93,55 $\pm$ 10,72*	373,74 $\pm$ 49,56*	484,84 $\pm$ 67,09	22,65 $\pm$ 6,46*	339,38 $\pm$ 46,96
FeD	78,53 $\pm$ 22,65*	409,01 $\pm$ 84,36*	487,54 $\pm$ 68,41	16,75 $\pm$ 6,77*	341,28 $\pm$ 47,89
VAFeD	109,53 $\pm$ 28,53*	380,45 $\pm$ 105,77	489,98 $\pm$ 88,28	19,85 $\pm$ 4,51*	342,98 $\pm$ 61,80
atRA	100,11 $\pm$ 28,26*	307,31 $\pm$ 74,16	406,46 $\pm$ 68,12	25,39 $\pm$ 9,19	265,95 $\pm$ 15,94*

VAD: dieta isenta de vitamina A; FeD: dieta isenta de ferro; VAFeD: dieta isenta de vitamina A e ferro; atRA: dieta com todo-*trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).

Aos 59 dias de tratamento, a deficiência de vitamina A aumentou a concentração de ferro no baço ( $p = 0,005$ ; figura 9a), embora não tenha alterado a concentração de ferro nos

outros tecidos, comparado ao grupo Controle. Como esperado, ratos FeD apresentaram níveis de ferro diminuídos nos cinco tecidos estudados ( $p = <0,0001$ ; 0,008;  $<0,0001$ ; 0,043 e 0,003; para baço, fígado, intestino, coração e rim, respectivamente, figura 9). Com exceção do coração, os ratos tratados com dietas deficientes em ferro e vitamina A (VAFeD) também mostraram redução dos níveis de ferro em relação ao grupo Controle ( $p = 0,002$ ; 0,016; 0,050; 0,043 e 0,004; para baço, fígado, intestino e rim, respectivamente, figura 9); entretanto, a concentração de ferro encontrada no intestino dos ratos VAFeD foi menor quando comparada ao grupo FeD ( $p = 0,038$ , figura 9c) e, no fígado, marginalmente maior que o grupo FeD ( $p = 0,066$ , figura 9b). Além disso, a concentração de ferro no baço, fígado, intestino e rim do grupo VAFeD foram menores que aquela obtida no grupo VAD ( $p <0,0001$ ; 0,003; 0,025 e 0,002, respectivamente). A substituição do éster de retinil pelo todo-*trans* ácido retinoico (atRA) na dieta dos ratos aumentou significativamente os níveis de ferro no fígado ( $p = 0,046$ ), e diminuiu simultaneamente a concentração de ferro no baço e no intestino desses ratos comparados aos ratos Controle ( $p = 0,033$  e 0,002, respectivamente).



**Figura 9.** Concentração de ferro nos tecidos de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFed) e dieta com *todo-trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).

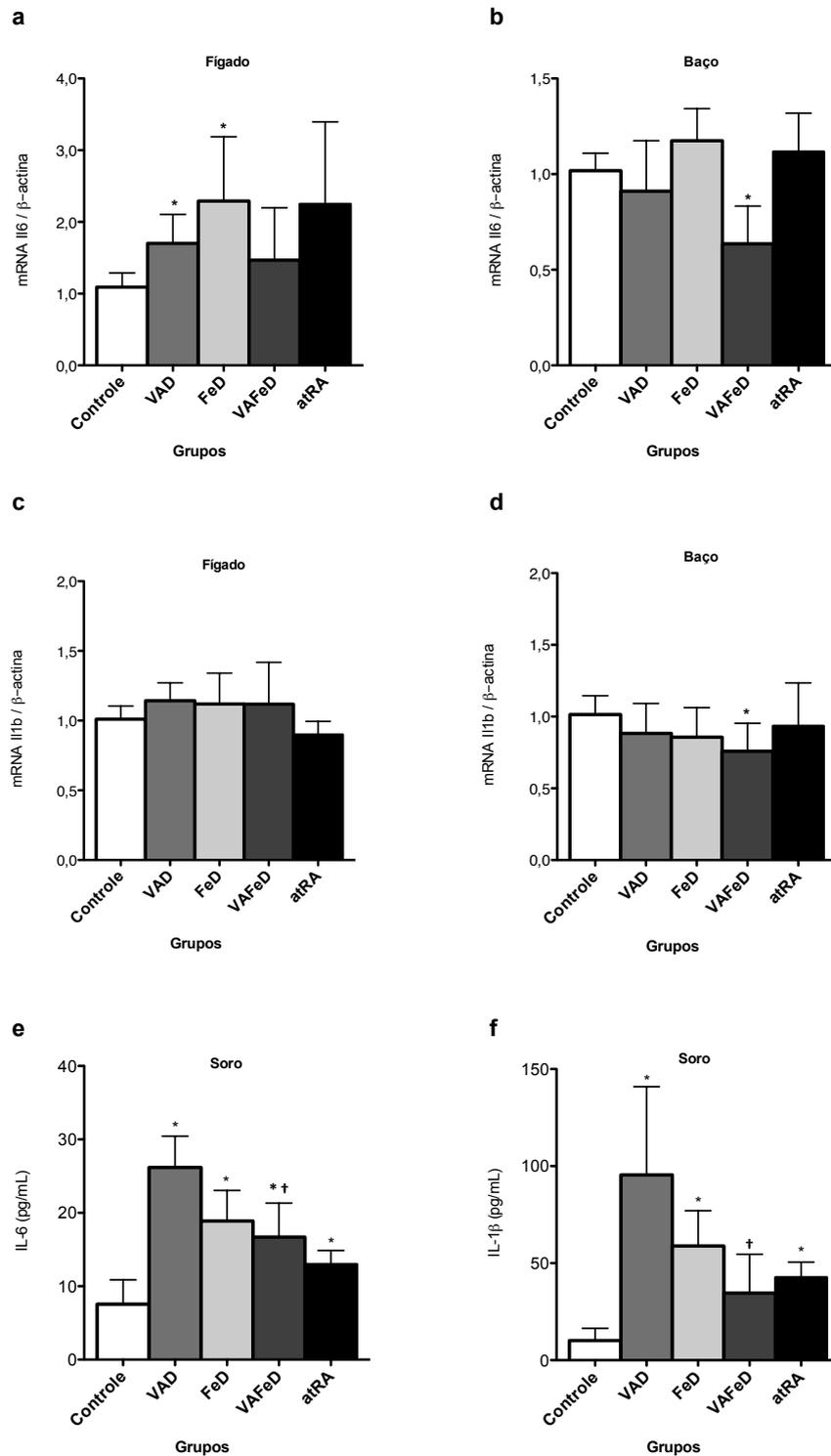
### 5.3 Resposta Inflamatória: Níveis de mRNA de Il6 e Il1b e Concentração Sérica de Proteínas IL-6 e IL-1 $\beta$

A deficiência de vitamina A (VAD) promoveu um aumento dos níveis de mRNA de Il6 no fígado ( $p = 0,013$ ; figura 10a) e de IL-6 sérica ( $p < 0,0001$ ; figura 10e). Em relação a interleucina-1 $\beta$  foi observado no grupo VAD um aumento marginal dos níveis de mRNA hepático de Il1b ( $p = 0,067$ ; figura 10c) e significativo dos níveis séricos de IL-1 $\beta$  ( $p = 0,032$ ; figura 10f) em relação ao grupo Controle.

O tratamento com dieta deficiente em ferro (FeD) aumentou os níveis de mRNA de Il6 no fígado ( $p = 0,003$ ; figura 10a), enquanto no baço esse aumento foi marginal ( $p = 0,072$ ; figuras 10c e 10d). O grupo FeD apresentou ainda um aumento nos níveis séricos de IL-6 e IL-1 $\beta$  em relação ao grupo Controle ( $p = 0,001$  e  $< 0,001$ , respectivamente; figuras 10e e 10f).

Os ratos tratados com dieta deficiente em vitamina A e ferro (VAFeD) apresentaram menores níveis de mRNA de Il6 e Il1b no baço ( $p = 0,024$  e  $0,003$ , respectivamente; figura 10b e 10d) e aumento dos níveis séricos de IL-6 ( $p = 0,017$ ; figura 10e), enquanto os níveis séricos de IL-1 $\beta$  apresentaram apenas um aumento marginal ( $p = 0,088$ ), em relação ao Controle. No grupo VAFeD observou-se diminuição dos níveis séricos de IL-6 e IL-1 $\beta$  em relação ao grupo VAD ( $p = 0,037$  e  $0,05$ , respectivamente; figuras 10e e 10f).

A substituição do éster de retinil por todo-*trans* ácido retinoico na dieta aumentou marginalmente os níveis de mRNA de Il6 no fígado ( $p = 0,056$ ) e, no soro o todo-*trans* ácido retinoico promoveu aumento significativo dos níveis de IL-6 e IL-1 $\beta$  ( $p = 0,023$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente; figuras 10e e 10f) comparado ao grupo Controle.



**Figura 10.** Quantificação dos níveis hepáticos e esplênicos de mRNA de Il6 (A e B) e de mRNA de Il1b (C e D) e concentração sérica de proteína IL-6 e IL-1 $\beta$  de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta com todo-*trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).

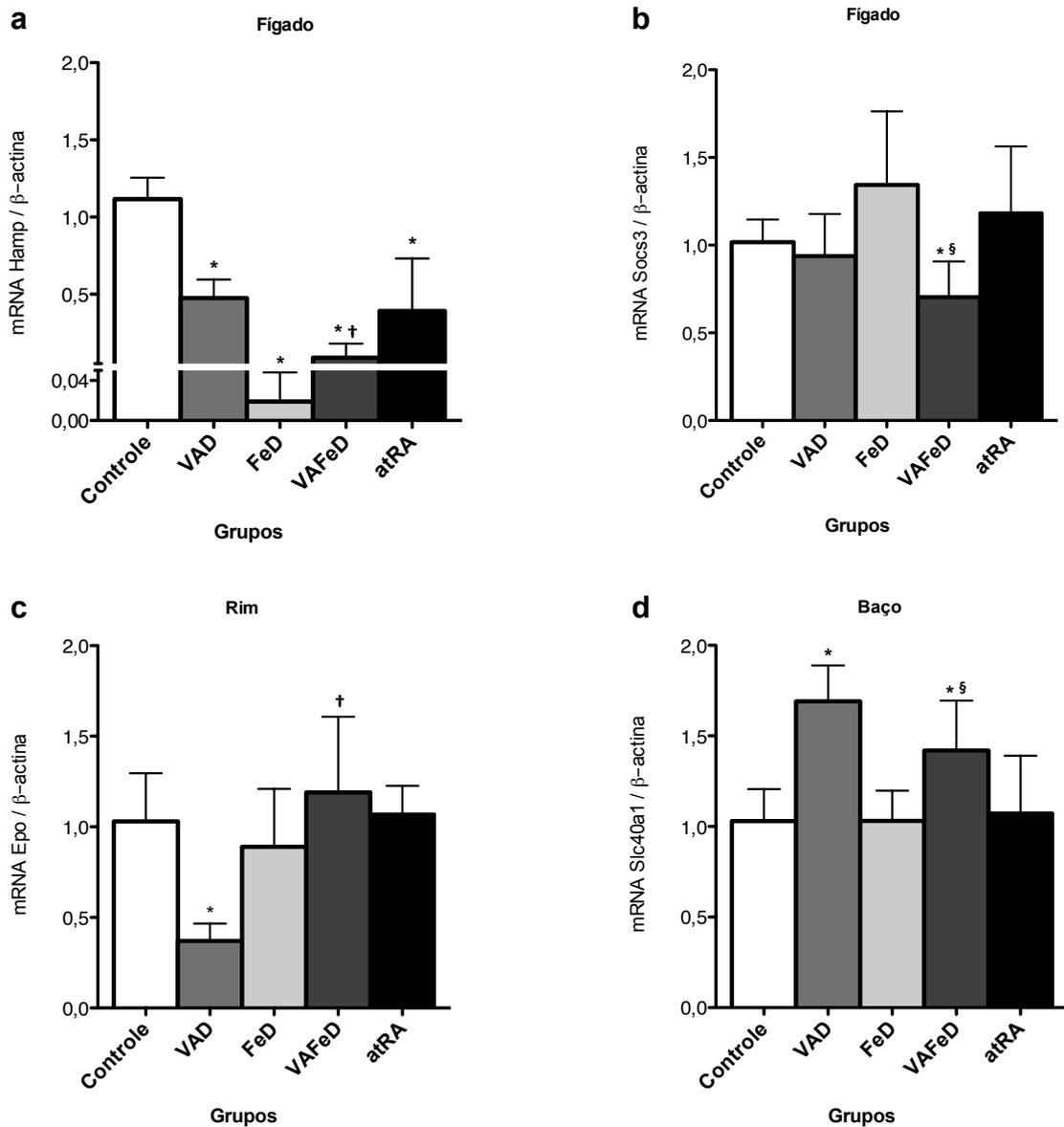
#### 5.4 Marcadores Moleculares do Metabolismo de Ferro

Ao final do período de tratamento, todos os grupos apresentaram menores níveis hepáticos de mRNA de Hamp em relação ao grupo Controle (figura 11a). Os ratos VAD mostraram redução de cerca de 2,3 vezes ( $p < 0,0001$ ) nos níveis de mRNA hepático de Hamp, enquanto o consumo de *todo-trans* ácido retinoico não aumentou esses valores ( $p = 0,002$ ). No grupo FeD os níveis hepáticos de mRNA de Hamp apresentaram-se muito baixos ( $p < 0,0001$ ) e nos ratos VAFeD esses níveis também encontravam-se diminuídos ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo Controle.

Em relação aos níveis de mRNA do fator de transcrição supressor da sinalização de citocinas 3 (Socs3) apenas o grupo VAFeD mostrou redução significativa comparada aos grupos Controle e FeD ( $p = 0,001$  e  $0,007$ , respectivamente; figura 11b).

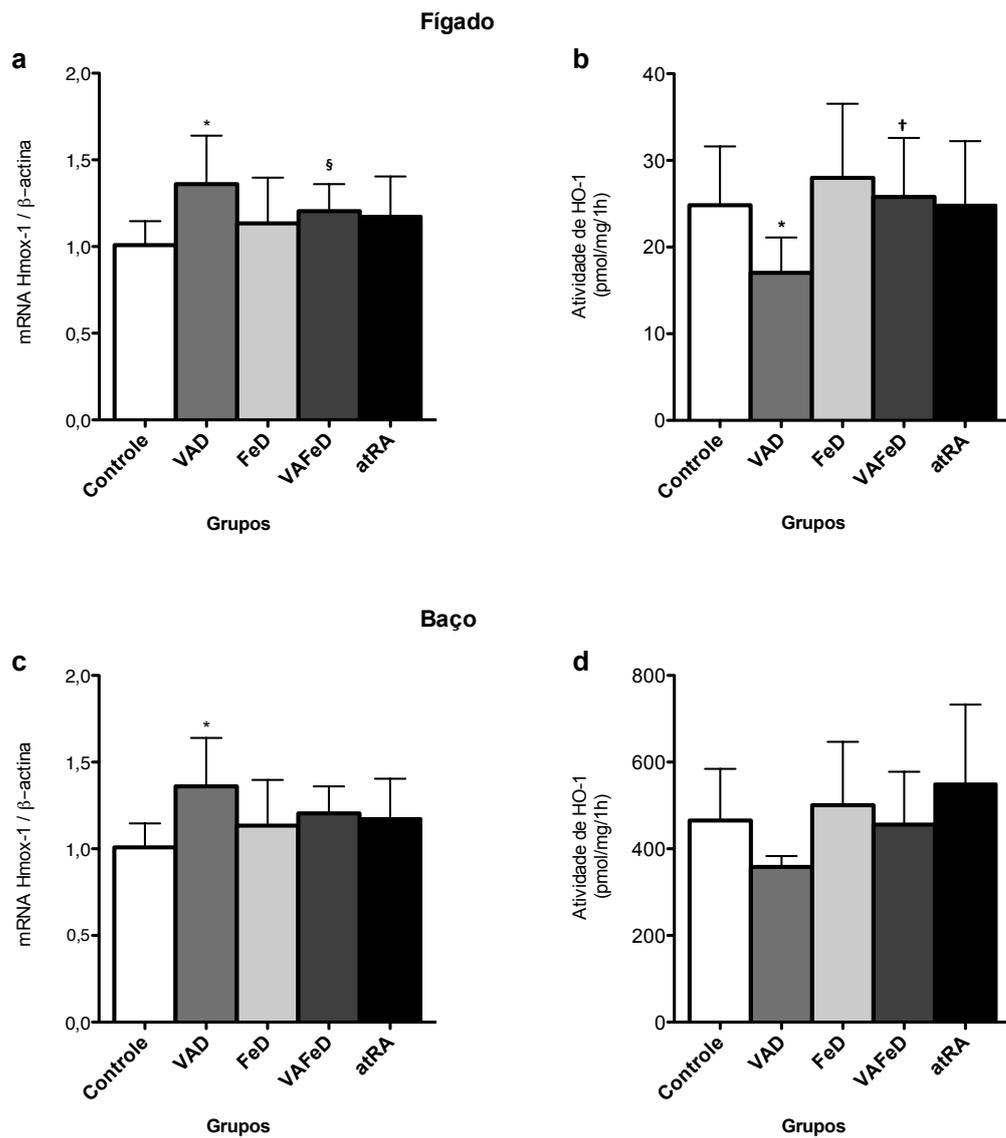
Os níveis de mRNA de eritropoietina (Epo) foram avaliados no rim (figura 11c). A dieta deficiente em vitamina A (VAD) promoveu redução de 2,8 vezes nestes níveis comparados à dieta Controle ( $p < 0,0001$ ). Não foi observada diferença significativa entre os grupos FeD, VAFeD e atRA em relação ao grupo Controle. Entretanto, os ratos VAFeD apresentaram maiores níveis de mRNA de Epo em relação aos ratos VAD ( $p = 0,011$ ).

Ambos grupos tratados com dietas deficiente em vitamina A (VAD e VAFeD) mostraram aumento de 1,6 e 1,4 vezes nos níveis de mRNA de Slc40a1 no baço comparados ao grupo Controle ( $p < 0,0001$  e  $0,015$ , respectivamente, figura 11d). Além disso, o grupo VAFeD apresentou maiores níveis de mRNA de Slc40a1 no baço comparado ao grupo FeD ( $p = 0,014$ ), entretanto, marginalmente menor que o grupo VAD ( $p = 0,071$ ). Não foram observadas diferenças nos níveis de mRNA de Slc40a1 dos grupos atRA e FeD, comparados ao Controle.



**Figura 11.** Quantificação de níveis de mRNA de hepcidina hepática (Hamp; A), de supressor de sinalização de citocinas 3 (Socs3; B), eritropoietina renal (Epo; C) e ferroportina esplênica (Slc40a1; D) de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta com *todo-trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).

A deficiência de vitamina A aumentou a expressão hepática do gene Hmox1 comparado ao grupo Controle ( $p = 0,012$ ; figura 12a), enquanto não foi observada diferença entre os outros tratamentos também em relação ao Controle. Os ratos VAFeD apresentaram maiores níveis de mRNA de Hmox1 comparados ao grupo FeD ( $p = 0,020$ ; figura 12a). Em relação à atividade enzimática, contrário aos níveis de mRNA de Hmox1, a deficiência de vitamina A promoveu redução da atividade específica de HO-1 no fígado comparada ao grupo Controle ( $p = 0,042$ ; figura 12b); enquanto na presença de ambas deficiências (grupo VAFeD) a atividade de HO-1 foi maior que o encontrado no grupo VAD ( $p = 0,026$ ; figura 12b). No baço, os ratos deficientes em vitamina A apresentaram maiores níveis de mRNA de Hmox1 comparados aos ratos Controle ( $p = 0,031$ ; figura 12c), enquanto nos outros grupos não foram observadas diferenças. Similar ao observado no fígado, a atividade de HO-1 no baço do grupo VAD foi marginalmente menor em relação ao grupo Controle ( $p = 0,085$ ; figura 12d).



**Figura 12.** Quantificação dos níveis de mRNA de heme oxigenase-1 (Hmox1) e atividade específica de heme oxigenase-1 (HO-1) no fígado (A e B) e no baço (C e D) de ratos tratados com dieta Controle, dieta isenta de vitamina A (VAD), dieta isenta de ferro (FeD), dieta isenta de vitamina A e ferro (VAFeD) e dieta com *trans* ácido retinoico como fonte de vitamina A (atRA). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 6$ ). Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \*Comparação com grupo Controle; † Comparação com grupo VAD; § Comparação com grupo FeD. (Teste-t Student).

## 6. DISCUSSÃO

Os retinoides são potentes reguladores do crescimento, diferenciação e proliferação celular, modulando a expressão de diversos genes (McGrane, 2007; Brun et al, 2013). Devido a essas propriedades, o ácido retinoico apresenta um papel fundamental na manutenção da imunidade, uma vez que promove a diferenciação de células T em células  $T_{H2}$  e consequente aumento de citocinas  $T_{H2}$ , reduzindo a resposta de células  $T_{H1}$ , promovendo um estado anti-inflamatório no organismo (Ross, 2012). A literatura recente tem demonstrado que a deficiência de vitamina A prejudica o crescimento corporal pela diminuição do ganho de peso (Ghenimi et al., 2009; Esteban-Pretel et al., 2010) e está associada a um *status* de ferro atípico, provavelmente devido ao envolvimento desta vitamina na manutenção da homeostase de ferro (Roodenburg et al., 1996; Strube, Beard e Ross, 2002; Zimmerman et al., 2006).

Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa observou que ratos alimentados com dieta deficiente em vitamina A por 57 dias exibiram menor ganho de peso e maior concentração de hemoglobina e ainda exibiram maior concentração de ferro no baço comparado ao grupo controle, sugerindo que a vitamina A contribui para a manutenção da homeostase de ferro (Arruda et al., 2009). A fim de investigar o efeito da deficiência de vitamina A no metabolismo de ferro e na resposta inflamatória, ratos Wistar machos foram tratados com dietas deficientes em vitamina A (VAD), em ferro (FeD) ou em vitamina A e ferro (VAFeD). Um quarto grupo de ratos foi tratado com todo-*trans* ácido retinoico (atRA), em substituição ao éster de retinil, a fim de avaliar se esse metabólito da vitamina A poderia suprir o papel desta vitamina no organismo de ratos. Os efeitos destes tratamentos no *status* de ferro e no processo inflamatório foram avaliados através da análise dos níveis de biomarcadores e expressão de genes envolvidos na homeostase de ferro e no processo inflamatório.

Neste estudo, embora o consumo de dieta não tenha sido alterado entre os grupos, os ratos deficientes em vitamina A (VAD) e em ferro (FeD) apresentaram menor ganho de peso (tabela 5). Estudos anteriores sugerem que o déficit de crescimento observado em ratos VAD pode ser resultado da utilização ineficiente de nutrientes, resultando em uma ineficiência metabólica e consequente perda de peso (Anzano et al., 1979). Entretanto, considerando o papel essencial do ferro como transportador de oxigênio e co-fator de várias enzimas envolvidas no metabolismo energético (Shahbazi et al., 2009), a ineficiência metabólica e consequente menor ganho de peso também eram esperados nos ratos tratados com dieta deficiente em ferro. De fato, o grupo FeD apresentou redução do ganho de peso, no entanto, os ratos tratados com a dieta deficiente em ambos nutrientes, grupo VAFED, não mostraram redução significativa do peso corporal, em relação ao grupo Controle ( $p = 0,141$ ). Analisando a média dos valores de ganho de peso corporal e o desvio-padrão entre os grupos, pode ser observado que o grupo VAFED mostrou maior valor de desvio-padrão em relação à média do grupo, o que pode ter influenciado na análise estatística deste resultado. Nesse sentido, estudos anteriores mostraram que a associação das deficiências de vitamina A e ferro leva à diminuição do ganho de peso corporal (Strube et al., 2002; Arruda et al., 2009).

Apesar da forma *todo-trans* ácido retinoico (atRA) ser o metabólito mais ativo comparada aos outros retinoides (Kam et al., 2012) e alguns estudos evidenciarem que a administração de atRA pode melhorar o crescimento de ratos deficientes em vitamina A (Moore e Holmes, 1971; Anzano et al., 1979), no presente estudo, a administração de 12 mg de atRA/ kg de dieta não foi capaz de manter o ganho de peso similar ao do grupo Controle. Esses dados sugerem que outras formas de retinoides como o *9-cis* e *13-cis* ácido retinoico são importantes na manutenção do ganho de peso (Blaner, 2001; Kane, 2012), ou ainda que a administração do *todo-trans* ácido retinoico por um período de 59 dias pode ter promovido efeito tóxico, prejudicando o ganho de peso destes ratos.

Ghemini et al (2009) demonstraram que ratos submetidos a uma dieta deficiente em vitamina A por três semanas exibiram menores níveis de retinol sérico comparados a ratos Controle e, após seis semanas, a concentração hepática encontrava-se completamente depletada. No presente estudo, o consumo de dietas deficientes em vitamina A (grupos VAD e VAFeD) por 59 dias resultou na completa depleção dos níveis de retinol hepático (tabela 5) e a substituição de éster de retinil por todo-*trans* ácido retinoico na dieta não preveniu a depleção de retinol hepático. Este último resultado era esperado, uma vez que o todo-*trans* ácido retinoico não pode ser convertido a retinol ou retinal porque a oxidação de retinal a ácido retinoico é uma reação irreversível em células de mamíferos (Ross, 2003).

A literatura descreve que os metabolismos de vitamina A e ferro estão associados (Strube, Beard e Ross, 2002; Arruda et al., 2009; Tsuchiya et al., 2009; Citelli et al., 2012). No presente estudo, a depleção completa de vitamina A hepática resultou na diminuição da mobilização de ferro, uma vez que os níveis de ferro sérico e saturação de transferrina encontravam-se significativamente diminuídos, enquanto a concentração de ferro no baço estava aumentada no grupo VAD. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores (Roodenburg et al., 1996; Arruda et al., 2009; Citelli et al., 2012).

Um perfil de ferro sérico similar (níveis diminuídos de ferro sérico e saturação de transferrina) foi observado nos grupos tratados com dietas deficientes em ferro, FeD e VAFeD; no entanto, diferente do encontrado no grupo deficiente apenas em vitamina A (VAD), na deficiência de ambos nutrientes (VAFeD) a deficiência sistêmica de ferro foi acompanhada de uma deficiência de ferro intracelular. A restrição dietética de ferro diminuiu as concentrações de ferro no baço e no fígado (figuras 9a e 9b), que são os principais tecidos responsáveis pelo estoque de ferro, especialmente quando o ferro dietético é insuficiente (Evstatiev e Gasche, 2012). A deficiência de ferro intracelular também foi observada no intestino e rim de ratos deficientes em ferro (FeD e VAFeD), demonstrando que, ao contrário

da restrição dietética de vitamina A, a restrição de ferro dietético deflagra a regulação da absorção, mobilização e estoques de ferro de acordo com as necessidades fisiológicas.

Considerando o papel do ácido retinoico na homeostase de ferro, o tratamento de ratos com atRA promoveu uma redução significativa na concentração de ferro no baço e no intestino (figuras 9a e 9c), sugerindo que o *todo-trans* ácido retinoico na dose utilizada no presente estudo (12 mg /kg de dieta), melhora a biodisponibilidade de ferro no organismo, aumentando a mobilização do ferro no baço e sua exportação pelo intestino. Esses resultados não devem estar associados à menor ingestão dietética de ferro pelos ratos do grupo atRA pois esses ratos apresentaram aumento da concentração de ferro hepático em comparação ao grupo Controle (figura 9b). Citelli et al (2012) observaram *in vitro* que na presença de *todo-trans* ácido retinoico o gene da ferroportina, proteína exportadora de ferro, apresentava expressão aumentada em células duodenais, confirmando que essa molécula aumenta a mobilização de ferro.

A hepcidina é um peptídeo-hormônio hepático que apresenta expressão diretamente relacionada à concentração de ferro, aumentando sua concentração na suficiência e diminuindo na deficiência de ferro (Anderson et al., 2009). Uma vez secretada na corrente sanguínea, a hepcidina diminui a absorção de ferro intestinal (Frazer et al., 2002; Laftah et al., 2004; Ganz, 2005) e previne sua exportação de macrófagos do baço para a corrente sanguínea (Knutson e Wessling-Resnick, 2003; Ganz, 2005). Além do *status* de ferro corporal, outros processos regulam a expressão de hepcidina hepática (Nicolas et al., 2002). Estudos demonstram que as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL1- $\beta$  induzem a expressão do gene da hepcidina (Hamp; Lee et al., 2005; Wrighting and Andrews, 2006; Christiansen et al., 2007). Portanto, considerando o envolvimento da vitamina A na modulação da resposta inflamatória e as evidências de que a deficiência de vitamina A favorece a produção de citocinas pró-

inflamatórias em detrimento de citocinas anti-inflamatórias, levando a um estado inflamatório (Iwata et al., 2003; Stephensen, Jiang, e Freytag, 2004; Bai et al., 2010).

No presente estudo, a deficiência de vitamina A aumentou o estado inflamatório, caracterizado pelo aumento da concentração sérica de IL-6 e IL1- $\beta$  (figuras 10e e 10f) e níveis hepáticos de mRNA de Il6 (figura 10a). Apesar de ter causado um estado inflamatório, a deficiência de vitamina A inesperadamente também promoveu a redução dos níveis hepáticos de mRNA de Hamp à metade dos níveis encontrados no grupo Controle (figura 11a), ao invés de aumentar a expressão de hepcidina, como relatado pela literatura (Anderson, Frazer, e McLaren, 2009; Evstatiev e Gasche, 2012).

Os ratos deficientes em ferro (FeD) mostraram perfil pró-inflamatório semelhante ao encontrado nos ratos deficientes em vitamina A (VAD), apresentando maiores níveis hepáticos de mRNA de Il6 e maiores níveis séricos de IL-6 e IL1- $\beta$  comparados aos ratos Controle (figuras 10). Além disso, os níveis hepáticos de mRNA de Hamp nos ratos FeD foram praticamente indetectáveis em relação ao grupo Controle (figura 11a).

No caso dos ratos deficientes em ferro (FeD), os níveis reduzidos de hepcidina podem ser explicados por dois mecanismos: em primeiro lugar, o mecanismo de regulação de ferro pela proteína morfogenética do osso 6 (BMP6), que é sensível aos níveis de ferro intracelular. Na sobrecarga de ferro, os hepatócitos aumentam a síntese de BMP6 que interage com seu co-receptor, a hemojuvelina (HJV), desencadeando uma sinalização em cascata que resulta na fosforilação da SMAD 1/5/8. O complexo SMAD 1/5/8 fosforilado interage com a proteína SMAD4 resultando no aumento da transcrição de Hamp (Evstatiev e Gasche, 2012). O segundo mecanismo que envolve a regulação da expressão de Hamp pelos níveis de ferro é mediado pela proteína da hemocromatose (HFE) e pelo receptor de transferrina (TfR), que aumenta a expressão de hepcidina quando há maior concentração de transferrina saturada. Nessas condições, a HFE dissocia-se de TfR1 e, uma vez livre, liga-se à TfR2 induzindo a

transcrição de hepcidina, via que parece envolver a sinalização mediada pelo BMP (Evstatiev e Gasche, 2012). Assim, em situações de baixa concentração de ferro, semelhante ao encontrado no grupo FeD, ambas as vias de regulação da expressão de hepcidina pelos níveis de ferro estão inibidas, o que resulta na redução dos níveis hepáticos de mRNA de Hamp, em relação ao grupo Controle (figura 11a).

No presente estudo, contrário ao esperado, a substituição do éster de retinil por atRA na dieta não tornou os níveis hepáticos de mRNA de Hamp similares aos do grupo Controle, apesar da maior concentração sérica de citocinas. A diminuição da expressão de Hamp também foi demonstrada por Tsuchiya et al (2009), em células HuH7 tratadas com 0–20  $\mu\text{mol/L}$  de *todo-trans* ácido retinoico por 24h. Os autores observaram que o *todo-trans* ácido retinoico diminuía a expressão de Hamp de maneira dose-dependente. No presente estudo, apesar dos níveis de mRNA de ferroportina no baço não terem sido alterados pelo tratamento com *todo-trans* ácido retinoico (figura 11d), a baixa concentração de ferro no baço e no intestino associada à baixa expressão da Hamp hepática encontrada nos ratos atRA, sugere que houve um aumento da mobilização de ferro através da proteína ferroportina, a qual provavelmente não está sendo degradada devido a baixa concentração de hepcidina hepática, e também sugere que esta modulação é independente do estado inflamatório.

Vários reguladores negativos da expressão de hepcidina foram identificados, entre esses a proteína serina-protease ligada à membrana tipo 6 (TMPRSS6), enzima que cliva a proteína hemojuvelina de membrana (Silvestri et al., 2008); a proteína relacionada a Sma e Mad 7 (SMAD 7) que medeia resposta de *feedback* negativo da via de sinalização da BMP (Mleczko-Sanecka et al., 2010); e o supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) que diminui a transdução de sinal via receptores de citocinas (De Domenico et al., 2010). Considerando que os ratos deficientes em vitamina A (VAD) apresentaram níveis elevados de IL-6 e que essa citocina induz a expressão de hepcidina pela via JAK/STAT3 (Evstatiev e

Gasche, 2012), foi sugerido que em um primeiro momento os ratos VAD teriam os níveis de hepcidina aumentados, a hepcidina então se ligaria à ferroportina promovendo sua degradação através da ativação da via JAK2/STAT3, a STAT3 uma vez ativada induziria a transcrição de Socs3. Em um segundo momento, os níveis aumentados de SOCS3 poderiam ser responsáveis pela redução dos níveis hepáticos de mRNA de Hamp encontrados no grupo VAD, em um mecanismo de regulação de *feedback* negativo, como proposto por De Domenico et al (2010). Entretanto, contrário a essa hipótese, não foi observada diferença significativa nos níveis hepáticos de mRNA de Socs3 (figura 11b), sugerindo que a Socs3 não esteja envolvida na supressão da expressão de Hamp em ratos deficientes em vitamina A.

A literatura reporta que o ácido retinoico estimula a expressão do gene da eritropoietina (Epo), um regulador primário da eritropoiese, que se liga à um receptor específico nas células vermelhas imaturas, promovendo a diferenciação e proliferação celular, e inibindo a apoptose (Makita et al., 2001; Gardenghi et al., 2010). Além disso, alguns estudos evidenciam que o estado inflamatório aumentado, observados nos ratos deficientes em vitamina A (VAD), pode causar danos a eritrócitos diminuindo sua meia-vida (Weiss, 2005; Prince et al., 2012), e inibir a produção do mRNA de Epo (Jelkmann, 1998) prejudicando a eritropoiese. No presente estudo, ratos deficientes em vitamina A apresentaram níveis de mRNA de Epo renal diminuídos (figura 11c) e apesar do aumento dos níveis de mRNA de ferroportina no baço (figura 11d), os ratos deficientes em vitamina A mostraram concentração esplênica de ferro aumentada comparado ao grupo Controle (figura 1a). Assim, os baixos níveis de mRNA de Epo no grupo VAD diminuiria a diferenciação de precursores eritroides e aumentaria a má-formação de eritrócitos, os quais tem menor meia-vida (Socolovsky et al., 2001; Gardenghi et al., 2007), o que conseqüentemente, levaria ao aumentada taxa de degradação de eritrócitos resultando no acúmulo de ferro no baço desses ratos. Apesar do alto conteúdo intracelular de ferro induzir a síntese da proteína ferroportina

devido à ausência da ligação da proteína reguladora de ferro (IRP) ao elemento responsivo a ferro (IRE) na posição 5', sugere-se que o ferro acumulado no baço dos ratos VAD esteja predominantemente ligado ao grupo heme e que a tradução da ferroportina esteja inibida. Esses resultados corroboram com a hipótese de que a deficiência de vitamina A prejudica a eritropoiese e o *status* sistêmico de ferro, evidenciando a importância da vitamina A na eritropoiese.

A dieta com *todo-trans* ácido retinoico reverteu a inibição da expressão da eritropoietina em ratos deficientes em vitamina A, uma vez que os níveis de mRNA de Epo nos ratos do grupo atRA foram significativamente maiores que aqueles obtidos nos ratos VAD ( $p < 0,0001$ ; figura 11c). Makita et al (2001) encontraram um elemento responsivo ao ácido retinoico (RARE) na região promotora do gene que codifica a eritropoietina. Assim, esse resultado sugere que o *todo-trans* ácido retinoico é a forma de vitamina A que modula a expressão de Epo, induzindo sua transcrição por interação com o elemento RARE na região promotora deste gene.

No presente estudo, a deficiência de ferro suprimiu a inibição da expressão de Epo em ratos deficiente em vitamina A (VAFeD, figura 11c), sugerindo que a concentração celular de ferro seja determinante na manutenção da modulação da expressão de eritropoietina pela vitamina A. Estudos anteriores com ratos Sprague-Dawley evidenciaram que o fator induzível por hipóxia 2- $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ), um indutor da expressão do gene da eritropoietina, apresentou tradução reprimida em resposta à deficiência dietética de ferro (Davis et al., 2011; Haase, 2013). No presente estudo, a deficiência de ferro (FeD e VAFeD) não alterou os níveis renais de mRNA de Epo comparados ao grupo Controle (figura 11c), sugerindo que a inibição do HIF-2 $\alpha$  relacionada aos baixos níveis de ferro não foi suficiente para diminuir a expressão de mRNA de Epo.

O fator de crescimento e diferenciação 15 (GDF 15) e a proteína TWSG1 (*twisted gastrulation protein homolog 1*) são membros da família do fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), proteínas que controlam a proliferação, diferenciação e apoptose em diferentes tipos celulares. O GDF 15 é secretado por precursores eritroides imaturos em morte celular sendo capaz de inibir a proliferação de progenitores hematopoiéticos (Gardenghi et al., 2010). Estudos recentes observaram que a expressão de hepcidina é inibida pelo GDF 15 em pacientes que apresentam eritropoiese ineficiente, sugerindo que esse fator pode ser responsável pela sobrecarga de ferro observada nestes indivíduos, devido à supressão de hepcidina (Tanno et al., 2007; Gardenghi et al., 2007; Tanno et al., 2010). No presente estudo, a deficiência de vitamina A promoveu diminuição do *status* de ferro sérico e aumento da concentração de ferro no baço, associada a baixos níveis de mRNA renal de Epo. Assim, esses resultados sugerem que a deficiência de vitamina A causa uma eritropoiese ineficaz, que poderia ser responsável pelo aumento da secreção de GDF 15 por precursores eritroides e consequente redução da hepcidina hepática (Tanno et al., 2007).

A eritropoiese ineficaz está associada a um aumento da taxa de eritrofagocitose pelos macrófagos do sistema do retículo endotelial. A heme oxigenase-1, enzima ancorada ao retículo endoplasmático dos macrófagos, é responsável pela degradação do grupo heme e liberação do ferro inorgânico, que pode ser estocado associado à ferritina ou exportado para corrente sanguínea pela ferroportina (Abraham e Kappas, 2008; Kovtunovych et al., 2010). Portanto, a alta concentração de ferro no baço dos ratos deficientes em vitamina A (grupo VAD) estar relacionada ao aumento da eritrofagocitose de um grande número de eritrócitos imaturos ou malformados produzidos pelos baixos níveis de Epo (figura 11c).

A alta concentração de ferro no baço associada ao aumento da expressão da ferroportina (figura 11d) sugere que esse ferro acumulado nos ratos deficientes em vitamina A não esteja disponível para que ser exportado. Marro et al (2010) observaram em macrófagos

que a transcrição do gene da heme oxigenase-1 (Hmox1) e da ferroportina é induzida por hemoglobina e por hemina (uma porfirina contendo ferro). No presente estudo, os elevados níveis de mRNA de Hmox1 no fígado e baço de ratos deficientes em vitamina A (figura 12) corroboram com os resultados de Marro et al (2010). Portanto, esses resultados sugerem que a deficiência de vitamina A promove sobrecarga de grupo heme no baço, sendo essa concentração de heme provavelmente superior à saturação da heme oxigenase-1, resultando em uma baixa dissociação do ferro da hemoglobina. A redução marginal da atividade de heme oxigenase-1 observada no baço do grupo VAD (figura 12d) causou acúmulo e retenção de grupo heme e conseqüentemente ferro no baço, apesar dos altos níveis de mRNA de ferroportina.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados corroboram com a hipótese de que a vitamina A altera o metabolismo de ferro, a inflamação e a eritropoiese. A deficiência de vitamina A causou deficiência sistêmica de ferro, com acúmulo de ferro no baço destes ratos. Observou-se que o tratamento com dieta deficiente em vitamina A provoca aumento do estado inflamatório, caracterizados pelo aumento dos níveis de mRNA de Il6 no fígado e da secreção das proteínas IL-6 e IL-1 $\beta$  no soro.

Apesar do estado inflamatório, da deficiência sistêmica e do acúmulo de ferro no baço, os níveis de mRNA de Hamp encontravam-se diminuídos, na deficiência de vitamina A. Esses dados sugerem que a deficiência de vitamina A resulta em uma eritropoiese ineficaz pela diminuição da expressão renal de eritropoietina.

A fagocitose de eritrócitos malformados ou imaturos promove aumento da concentração de grupo heme no baço sendo esse superior ao nível de saturação da atividade de heme oxigenase-1, resultando na inibição da atividade desta enzima, favorecendo o acúmulo de ferro hêmico. O grupo heme retém o ferro no baço e fígado, conduzindo à deficiência sistêmica de ferro em organismos deficientes em vitamina A, que, por sua vez, reduz os níveis de mRNA de hepcidina hepática.

## REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*, 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. 544p.
- Abraham, N.G.; Kappas, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev.* 60(1):79-127, 2008.
- Al Tanoury, Z.; Piskunov, A.; Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *J Lipid Res.* 54(7):1761-75, 2013.
- Ameny, M.A.; Raila, J.; Walzel, E.; et al. Effect of iron and/or vitamin A re-supplementation on vitamin A and iron status of rats after a dietary deficiency of both components. *J Trace Elem Med Biol.* 16(3):175-8, 2002.
- Anderson, G.J.; Frazer, D.M.; McLaren, G.D. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol.* 25(2):129-35, 2009.
- Anderson, G.J.; Vulpe, C.D. Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci.* 66(20):3241-61, 2009.
- Andriopoulos-Jr, B.; Corradini, E.; Xia, Y.; et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics.* 41(4): 482-87, 2009.
- Anghileri, E.; Marconi, S.; Pignatelli, A.; et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17(5):909-16, 2008.
- Anzano, M.A.; Lamb, A.J.; Olson, J.A. Growth, appetite, sequence of pathological signs and survival following the induction of rapid, synchronous vitamin A deficiency in the rat. *J Nutr.* 109:1419-31, 1979.
- Arruda, S.F.; Siqueira, E.M.A; Valencia, F.F. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition.* 25: 472-78, 2009.
- Azevedo, M.O.; Felipe, M.S.S.; Brígido, M.M.; et al. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. Editora Universidade de Brasília. Brasília, Brasil, 2010.
- Bai, A.; Lu, N.; Guo, Y.; et al. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol.* 86(4):959-69, 2009.
- Bai, A.; Lu, N.; Zeng, H.; et al. All-trans retinoic acid ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by shifting Th1 to Th2 profile. *J Interferon Cytokine Res.* 30(6):399-406, 2010.
- Balmer, J.E.; Blomhoff, R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 43(11):1773-808, 2002.

Baranowska, I.; Czernicki K, Aleksandrowicz R. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. *Sci Total Environ.* 159(2-3):155-62, 1995.

Basseri, R.J.; Nemeth, E.; Vassilaki, M.E.; et al. Hepcidin is a key mediator of anemia of inflammation in Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* pii: S1873-9946(12)00450-3, 2012.

Blaner, W.S. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol.* 45(5):S129-35, 2001.

Blomhoff, R.; Blomhoff, H.K. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 66(7):606-30, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher - PNDS 2006: dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança. Brasília: MS; 2009. [acesso 15 de abril de 2013]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds\\_crianca\\_mulher.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf)

Brasil. Portaria no. 2.160, de 23 de dezembro de 1994. Cria, no Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição, o Programa Nacional de Controle das Deficiências de Vitamina A e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 1994; 30 dez.

Brasil. Portaria no. 729, de 13 de maio de 2005. Institui o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 2005; 16 mai.

Brun, P.J.; Yang, K.J.; Lee, S.A.; et al. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors.* 39(2):151-63, 2013.

Buijsse, B.; Feskens, E.J.; Moschandreas, J.; et al. Oxidative stress, and iron and antioxidant status in elderly men: differences between the Mediterranean south (Crete) and northern Europe (Zutphen). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 14:495–500. 2007.

Christiansen, H.; Sheikh, N.; Saile, B.; et al. x-Irradiation in rat liver: consequent upregulation of hepcidin and downregulation of hemojuvelin and ferroportin-1 gene expression. *Radiology.* 242(1):189-97, 2007.

Cifelli, C.J.; Green, J.B.; Green, M.H. Dietary retinoic acid alters vitamin A kinetics in both the whole body and in specific organs of rats with low vitamin A status. *J Nutr.* 135(4):746-52, 2005.

Citelli, M.; Bittencourt, L.L.; da Silva S.V.; et al. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 149(1):64-70, 2012.

Clagett-Dame, M.; DeLuca, H.F. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr.* 22:347-81, 2002.

Clagett-Dame, M.; Knutson, D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients.* 3(4):385-428, 2011.

- Clemens, G.; Flower, K.R.; Henderson, A.P.; et al. The action of all-trans-retinoic acid (ATRA) and synthetic retinoid analogues (EC19 and EC23) on human pluripotent stem cells differentiation investigated using single cell infrared microspectroscopy. *Mol Biosyst.* 9(4):677-92, 2013.
- Collins, S.J. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia.* 16(10):1896-905, 2002.
- Conaway, H.H.; Henning, P.; Lerner, U.H. Vitamin A Metabolism, Action, And Role In Skeletal Homeostasis. *Endocr Rev.* 2013 May 29. doi: 10.1210/er.2012-1071
- Conaway, H.H.; Henning, P.; Lerner, U.H. Vitamin A Metabolism, Action, And Role In Skeletal Homeostasis. *Endocr Rev.* 2013 May 29. doi: 10.1210/er.2012-1071.
- Correa, P.N.; Axelrad, A.A. Retinyl acetate and all-trans-retinoic acid enhance erythroid colony formation in vitro by circulating human progenitors in an improved serum-free medium. *Int. J. Cell Cloning* 10, 286 – 291, 1992.
- D'Ambrosio, D.N.; Clugston, R.D.; Blaner, W.S. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients.* 3(1):63-103, 2011.
- Darlow, B.A.; Graham, P.J. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* (10):CD000501, 2011.
- Darshan, D.; Frazer, D.M.; Anderson, G.J. Molecular basis of iron-loading disorders. *Expert Rev Mol Med.* 8;12:e36, 2010.
- Davis, M.R.; Shawron, K.M.; Rendina, E.; et al. Hypoxia inducible factor-2  $\alpha$  is translationally repressed in response to dietary iron deficiency in Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 141(9):1590-6, 2011.
- De Domenico, I.; Lo, E.; Ward, D.M.; et al. Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(10):3800-5, 2009.
- De Domenico, I.; Zhang, T.Y.; Koenig, C.L.; et al. Heparin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest.* 120(7):2395-405, 2010.
- Douer, D.; Koeffler, H.P. Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 69, 1039 – 1041, 1982.
- Elliott, S.; Sinclair, A.M. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics.* 6:163-89, 2012.
- Erceg, S.; Ronaghi, M.; Oria, M.; et al. Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells.* 28(9):1541-9, 2010.

- Esteban-Pretel G, Marín MP, Cabezuelo F, Moreno V, Renau-Piqueras J, Timoneda J, Barber T. Vitamin A deficiency increases protein catabolism and induces urea cycle enzymes in rats. *J Nutr.* 140(4):792-8, 2010.
- Evstatiev, R.; Gasche, C. Iron sensing and signalling. *Gut.* 61(6):933-52, 2012.
- Feghali, C.A.; Wright, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1;2:d12-26, 1997.
- Freire, C.M.; Azevedo, P.S.; Minicucci, M.F.; et al. Influence of different doses of retinoic acid on cardiac remodeling. *Nutrition.* 27(7-8):824-8, 2011.
- Ganz, T. Heparin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res ClinHaematol.* 18(2):171-82, 2005.
- Ganz, T.; Nemeth, E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med.* 18(62):347-60, 2011.
- Gardenghi, S.; Marongiu, M.F.; Ramos, P.; et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood.* 1;109(11):5027-35; 2007.
- Garg, A.; Abrol, P.; Tewari, A.; et al. Effect of vitamin A supplementation on hematopoiesis in children with anemia. *Indian J Clin Biochem.* 20(1):85-6, 2005.
- Ghenimi, N.; Beauvieux, M.C. ; Biran, M. ; et al. Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders. *J Nutr.* 139(4):696-702, 2009.
- Gong, M.; Bi, Y.; Jiang, W.; et al. Retinoic acid receptor beta mediates all-trans retinoic acid facilitation of mesenchymal stem cells neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol.* 45(4):866-75, 2013.
- Gudas, L.J.; Wagner, J.A. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol.* 226(2):322-30, 2011.
- Haase, V.H. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 27(1):41-53, 2013.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 4<sup>a</sup> edição. Nova Iorque, NY, EUA, 2007.
- Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Haan, S.; et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 374(Pt 1):1-20, 2003.
- Hentze, M.W.; Muckenthaler, M.U.; Galy, B.; et al. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell.* 142(1):24-38, 2010.

Hoag, K.A.; Nashold, F.E.; Goverman, J.; Hayes, C.E. Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells. *J Nutr.* 132(12):3736-9, 2002.

Imdad, A.; Herzer, K.; Mayo-Wilson, E.; et al. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from 6 months to 5 years of age. *Cochrane Database Syst Rev.* (12):CD008524, 2010.

Institute of Medicine, (IOM) Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academy Press. Washington, DC, USA. p 82-161 and 290-393, 2001.

Iwata, M.; Eshima, Y.; Kagechika, H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol.* 15(8):1017-25, 2003.

Jelkmann, W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res.* 18(8):555-9, 1998.

Jiang, S.; Wang, C.X.; Lan, L.; et al. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition.* 28(3):281-7, 2012.

Kalantar-Zadeh, K.; Streja, E.; Miller, J.E.; et al. Intravenous iron versus erythropoiesis-stimulating agents: friends or foes in treating chronic kidney disease anemia? *Adv Chronic Kidney Dis.* 16(2):143-51, 2009.

Kam, R.K.T.; Deng, Y.; Chen, Y.; et al. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell Biosci.* 2:11, 2012.

Kane, M.A. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1821(1):10-20, 2012.

Katavetin, P.; Inagi, R.; Miyata, T.; et al. Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 10;359(4):928-34, 2007.

Kawazoe, Y.; Sugita, S.; Keino, H.; et al. Retinoic acid from retinal pigment epithelium induces T regulatory cells. *Exp Eye Res.* 94(1):32-40, 2012.

Knutson, M.; Wessling-Resnick, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev BiochemMol Biol.* 38(1):61-88, 2003.

Kovtunovych, G.; Eckhaus, M.A.; Ghosh, M.C.; et al. Dysfunction of the heme recycling system in hemoxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood.* 23;116(26):6054-62, 2010.

Kulaksiz, H.; Gehrke, S.G.; Janetzko, A.; et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 53, 735–743, 2004.

Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. *Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. Trad de Maria da Conceição Zacarias et. al. da 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p.

Kusakabe, T.G.; Takimoto, N.; Jin, M.; et al. Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364(1531):2897-910, 2009.

Lee, P.; Peng, H.; Gelbart, T.; et al. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:1906 –1910, 2005.

Lima-Rodrigues, M.; Lamas, N.; Valle-Fernandes, A.; et al. The selective COX-2 inhibitor Etoricoxib reduces acute inflammatory markers in a model of neurogenic laryngitis but loses its efficacy with prolonged treatment. *Inflamm Res.* 59(9):743-53, 2010.

Liu, Q.; Davidoff, O.; Niss, K.; et al. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest.* 122(12): 4635-44, 2012.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4):402-8, 2001.

Long, K.Z.; Garcia, C.; Ko, G.; et al. Vitamin A modifies the intestinal chemokine and cytokine responses to norovirus infection in Mexican children. *J Nutr.* 141(5):957-63, 2011.

Lozoff, B.; Georgieff, M.K. Iron deficiency and brain development. *Semin Pediatr Neurol* 13(3):158–165, 2006.

Makita, T.; Hernandez-Hoyos, G.; Chen, T.H.; et al. A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev.* 15(7):889-901, 2001.

Maqsood, M.; Dancheck, B.; Gamble, M.V.; Palafox, N.A.; et al. Vitamin A deficiency and inflammatory markers among preschool children in the Republic of the Marshall Islands. *Nutr J.* 3:21-6, 2004.

Marro, S.; Chiabrando, D.; Messana, E.; et al. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica.* 95(8):1261-8, 2010.

Martini, R.; Butler, A.M.; Jiang, X.M. et al. Pretranslational down regulation of cytochrome P450 2C11 in vitamin A-deficient male rat liver: prevention by dietary inclusion of retinoic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 273(1):427-34, 1995.

- McGrane, M.M. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18:497–508, 2007.
- Mehdad, A.; Siqueira, E.M.; Arruda, S.F. Effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability. *Ann Nutr Metab.* 57(1):35-9, 2010.
- Meyron-Holtz, E.G.; Ghosh, M.C.; Iwai, K.; et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J.* 23(2):386-95, 2004.
- Mleczko-Sanecka, K.; Casanovas, G.; Ragab, A.; et al. SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood* 115:2657e65, 2010.
- Moore, T.; Holmes, P.D. The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Lab Anim.* 5(2):239-50, 1971.
- Murphy, K.P.; Travers, P.; Walport, M. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science, 2012. 892p.
- Mwanri, L.; Worsley, A.; Ryan, P.; et al. Supplemental vitamin A improves anemia and growth in anemic school children in Tanzania. *J Nutr.* 130(11):2691-6, 2000.
- Nairz, M.; Sonnweber, T.; Schroll, A.; et al. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 14(3):238-46, 2012.
- Nemeth, E.; Tuttle, M.S.; Powelson, J.; et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-93, 2004.
- Nemeth, E.; Valore, E.V.; Territo, M.; et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 101(7):2461-3, 2003.
- Neumcke, I.; Schneider, B.; Fandrey, J.; et al. Effects of pro- and antioxidative compounds on renal production of erythropoietin. *Endocrinology.* 140(2):641-5, 1999.
- Nicolas, G.; Chauvet, C.; Viatte, L.; et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 110(7):1037-44, 2002.
- Okano, M.; Masuda, S.; Narita, H.; et al. Retinoic acid up-regulates erythropoietin production in hepatoma cells and in vitamin A-depleted rats. *FEBS Lett.* 349(2):229-33, 1994.
- Papanikolaou, G.; Pantopoulos, K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202: 199-211, 2005.
- Peinnequin, A.; Mouret, C.; Birot, O.; et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 5;5:3, 2004.

Pino-Lagos, K.; Benson, M.J.; Noelle, R.J. Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 1143:170-87, 2008.

Prince, O.D.; Langdon, J.M.; Layman, A.J.; et al. Late stage erythroid precursor production is impaired in mice with chronic inflammation. *Haematologica.* 97(11):1648-56, 2012.

Ramalho, A.; Padilha, P.; Saunders, C. Análise crítica de estudos brasileiros sobre deficiência de vitamina A no grupo materno-infantil. *Rev Paul. Pediatr.* [online]. vol.26(4):392-399, 2008.

Ramalho, R.A.; Flores, H.; Saunders, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Rev Panam Salud Publica.* 12:117-22, 2002.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123(11):1939-51, 1993.

Rhinn, M.; Dollé, P. Retinoic acid signalling during development. *Development.* 139(5):843-58, 2012.

Rivera, S.; Nemeth, E.; Gabayan, V.; et al. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood.* 106(6):2196-9, 2005.

Roodenburg, A.J.; West, C.E.; Beguin, Y.; et al. Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency. *J Nutr Biochem.* 11(4):223-30, 2000.

Roodenburg, A.J.C.; West, C. E.; Hovenier, R.; et al. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br. J. Nutr.* 75: 623–636, 1996.

Ross, A.C. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation. *J Nutr.* 133(1):291S-296S, 2003.

Ross, A.C. Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. *Am J Clin Nutr.*;96(5):1166S-72S, 2012.

Rouault, T.A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* 2(8):406-14, 2006.

Rouault, T.A.; Tong, W.H. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(4):345-51, 2005.

See, A.W.; Kaiser, M.E.; White, J.C.; Clagett-Dame, M. A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. *Dev Biol.* 15;316(2):171-90, 2008.

- Schmidt, R.; Tritschler, E.; Hoetzel, A.; et al. Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg.* 245(6):931-42, 2007.
- Schroeder, S.E.; Reddy, M.B.; Schalinske, K.L. Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory proteins. *J Nutr.* 137(12):2686-90, 2007.
- Semba, R.D.; Bloem, M.W. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *Eur J Clin Nutr.* 56(4):271-81, 2002.
- Shahbazi, M.; Naghdi, N.; Tahmasebi, S.; et al. The effect of iron and zinc dietary restriction of pregnant rats on physical growth of litters. *Biol Trace Elem Res.* 128(3):232-8, 2009.
- Sheftel, A.; Stehling, O.; Lill, R. Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab.* 21(5):302-14, 2010.
- Silvestri, L.; Pagani, A.; Nai, A.; et al. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 8:502e11, 2008.
- Socolovsky, M.; Nam, H.; Fleming, M.D.; et al. Ineffective erythropoiesis in *Stat5a(-/-)5b(-/-)* mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood.* 1;98(12):3261-73, 2001.
- Stephensen, C.B.; Jiang, X.; Freytag, T. Vitamin A deficiency increases the in vivo development of IL-10-positive Th2 cells and decreases development of Th1 cells in mice. *J Nutr.* 134(10):2660-6, 2004.
- Stephensen CB, Rasooly R, Jiang X, Ceddia MA, Weaver CT, Chandraratna RA, Bucy RP. Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway. *J Immunol.* 168(9):4495-503, 2002.
- Stoltzfus, R.; Mullany, L.; Black, R.E. Iron deficiency anaemia. In: Ezzati M, Lopez A, Rodgers A, Murray CJL, eds. *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors.* Geneva, World Health Organization, 163–210, 2004.
- Strube, Y.N.; Beard, J.L.; Ross, A.C. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *J Nutr.* 132(12):3607-15, 2002.
- Suharno, D.; West, C.E.; Karyadi, D.; et al. Supplementation with vitamin A and iron for nutritional anaemia in pregnant women in West Java, Indonesia. *Lancet.* 342(8883):1325-8, 1993.
- Tamary, H.; Shalev, H.; Perez-Avraham, G.; et al. Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood.* 112:5241e4, 2008.

- Tanno, T.; Bhanu, N.V.; Oneal, P.A.; et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 13:1096e101, 2007.
- Tanno, T.; Porayette, P.; Sripichai, O.; et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 114:181e6, 2009.
- Tanumihardjo, S.A.; Penniston, K.L. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J Lipid Res.* 43(2):350-5, 2002.
- Theodosiou, M.; Laudet, V.; Schubert, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci.* 67(9):1423-45, 2010.
- Theurl, I.; Finkenstedt, A.; Schroll, A.; et al. Growth differentiation factor 15 in anaemia of chronic disease, iron deficiency anaemia and mixed type anaemia. *Br J Haematol.* 148(3):449-55, 2010.
- Theurl, I.; Schroll, A.; Nairz, M.; et al. Pathways for the regulation of hepcidin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in vivo. *Haematologica.* 96(12):1761-9, 2011.
- Tsuchiya, H.; Akechi, Y.; Ikeda, R.; et al. Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver. *Gastroenterology.* 136(1):341-350.e8, 2009.
- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1– 40, 2006.
- Valore, E.V.; Ganz, T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells, Mol., Dis.* 40, 132–138, 2008.
- Verga Falzacappa, M.V.; Vujic, S.M.; Kessler, R.; et al. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 109(1):353-358, 2007.
- Wang, J.; Pantopoulos, K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* 15;434(3):365-81, 2011.
- Wang, Q.; Du, F.; Qian, Z.M.; et al. Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain. *Endocrinology* 149: 3920–3925, 2008.
- Weiss, G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract Res ClinHaematol.* 18(2):183-201, 2005.
- White, J.C.; Shankar, V.N.; Highland, M.; et al. Defects in embryonic hindbrain development and fetal resorption resulting from vitamin A deficiency in the rat are prevented by feeding pharmacological levels of all-trans-retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10;95(23):13459-64, 1998.

Wieringa, F.T.; Dijkhuizen, M.A.; West, C.E.; et al. Reduced production of immunoregulatory cytokines in vitamin A- and zinc-deficient Indonesian infants. *Eur J Clin Nutr.* 58(11):1498-504, 2004.

Wilson, M.T.; Reeder, B.J. Oxygen-binding haem proteins. *Exp Physiol.* 93(1):128-32, 2008.

World Health Organization (WHO). Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva, World Health Organization, 2009.

World Health Organization (WHO). Nutrition for Health and Development: A global agenda for combating malnutrition. Progress Report. France: WHO; 2000.

Wrighting, D.M.; Andrews, N.C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 108(9):3204-9, 2006.

Zimmermann, M.B.; Biebinger, R.; Rohner, F.; et al. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am J Clin Nutr.* 84(3):580-6, 2006.

## ANEXOS

## ANEXO I – Certificado do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA)



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

**DECLARAÇÃO**

Brasília, 30 de junho de 2011.




Declaramos que o projeto intitulado **“MECANISMO DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO METABOLISMO DE FERRO MEDIADO PELA VITAMINA A”**, UnBDOC n.º 52606/2011, sob responsabilidade da Profa. Sandra Fernandes Arruda, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA

**ANEXO II**

**ARTIGO A SER SUBMETIDO A PERIÓDICO INDEXADO**

## **Vitamin A deficiency leads to an ineffective erythropoiesis by down regulation of renal erythropoietin expression**

### **INTRODUCTION**

The effects of vitamin A deficiency on iron metabolism have been widely reported (Roodenburg et al., 1996; Strube et al., 2002; Arruda et al., 2009; Citelli et al., 2012). Recent studies suggest that vitamin A modulates the levels of the *Hamp* mRNA, which encodes the hepcidin hormone, an antimicrobial peptide that regulates systemic iron homeostasis (Arruda et al., 2009; Citelli et al., 2012). Hepcidin acts as a repressor of iron absorption in the enterocytes and iron recycling by reticuloendothelial macrophages, reducing iron mobility in the body (Anderson et al., 2009). Hepcidin orchestrates systemic iron homeostasis by binding to the ferroportin (FPN1), an iron exporter protein located on the cell surface, triggering its internalization, ubiquitination and subsequent lysosomal degradation (Nemeth et al., 2004; Hentze et al., 2010). This mechanism impairs the iron release from enterocytes and splenic macrophages, reducing iron intestinal absorption and iron recycling from senescent red blood cells in the reticuloendothelial cells (Mebius and Kraal, 2005; Anderson et al., 2009). The levels of the duodenal divalent metal transporter 1 (*Dmt1*) mRNA, seems to be also negatively modulated by hepcidin, most likely through intracellular iron-dependent mechanisms that are mediated by the iron regulatory protein 1 (IRP-1) and the iron regulatory elements (IRE) (Galy et al., 2008).

Also, retinoids play major role in many physiological pathways, such as in cell proliferation and differentiation, morphogenesis and inflammation (Manicassamy and Pulendran, 2009). In the last twenty-five years, more than 500 genes have been identified as the regulatory targets of retinoic acid (RA), which acts in a hormone-like manner by inducing or repressing expression of several genes. RA directly regulates genes expression by binding to the retinoic acid receptor (RAR) or retinoid X receptor (RXR) in cell nucleus, promoting a dimeric molecule formation that associates with specific RA responsive elements (RAREs) in the DNA promoter. RA can also indirectly modulate gene expression through regulation of transcription factors, such as the homeo box A1 (*Hoxa-1*) that stimulates to stem-cells differentiation (Balmer and Blomhoff, 2002; McClinticka et al., 2006; Gudas and Wagner, 2011).

A key role of RA on the homeostasis of immunity system has been widely reported. RA induces T cells differentiation into T helper cells 2 (Th2), promoting an anti-inflammatory

response in the body (Ross, 2012). Thus, vitamin A deficiency increases susceptibility to infections and impairs immune response (Imdad et al., 2010; Darlow and Graham, 2011), characterized by an increase of proinflammatory cytokines, such as interleukins IL-6 and IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; Stephensen et al., 2001; Wieringa et al., 2004).

Hepcidin expression is modulated by several systemic cues including iron status, hypoxia, erythropoiesis and also by inflammatory processes (Nicolas et al., 2002; Anderson et al., 2009). The pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  are well recognized to modulate hepcidin expression (Lee et al., 2005; Wrighting and Andrews, 2006; Christiansen et al., 2007). The cytokines IL-6 induces Hamp gene expression through the Janus Kinase/signal transducers and the activators of transcription 3 (JAK-STAT3) pathway. IL-6 binds to the protein JAK, triggers its auto-phosphorylation and activation, resulting in the phosphorylation of the transcription factor STAT3, which in turn, is translocated to the nucleus and binds to a responsive element in hepcidin promoter, activating its transcription (Wrighting and Andrews, 2006; Verga Falzacappa et al., 2007).

Thus, considering that vitamin A may modulates inflammatory status, iron metabolism and erythropoiesis, the present study investigated the effect of vitamin A deficiency on molecular biomarkers of iron metabolism, inflammatory response and erythropoietic system, using serum iron, transferrin saturation and tissue iron concentration as iron status biomarkers, and mRNA levels of the interleukin 1 $\beta$  (Il1b) and 6 (Il6) and their serum protein levels as an inflammatory markers. The transcripts levels of peptide hormone hepcidin (Hamp), heme oxygenase-1 (Hmox1), erythropoietin (Epo) and iron exporter protein ferroportin (Slc40a1) were analyzed as makers of iron homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Thirty male Wistar rats (Granja GR, São Paulo, Brazil), 21 days old ( $65.7 \pm 5.5$ g), were housed individually in stainless-steel cages, under a 12-h light cycle, at a room temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Animals had free access to water and food access was allowed only during dark cycle. The institutional Animal Care and Use Committee of University of Brasília approved the experimental protocol (UnBDoc 52606/2011). After seven days of acclimatization, animals were randomly assigned into five experimental groups (six rats per group). The control group (**Control**) was fed with the AIN-93G diet (Reeves et al, 1993) containing 4,000 IU of vitamin A / kg; the all-trans retinoic acid group (**atRA**) received the AIN-93G diet with 12 mg atRA/Kg of diet (Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA) replacing all-trans-retinylpalmitate; the vitamin A-deficient group (**VAD**) received the AIN-93G diet without any source of vitamin A; the iron deficient group (**FeD**) was fed with the AIN-93G diet without any source of iron; and the vitamin A and iron deficient group (**VAFED**) received the AIN-93G diet depleted of any source of vitamin A and iron. The animals were weighed weekly and food intake was recorded daily. After 59 days of treatment, the rats were anesthetized with isoflurane 3% followed by blood collection by cardiac puncture. The liver, spleen, gut, heart and kidney were excised, washed in cold 0.9% NaCl, frozen in liquid nitrogen ( $\text{N}_2$ ) and the tissues were stored at  $-70^\circ\text{C}$ .

### Retinol assay

The concentration of retinol in the liver was measured with high performance liquid chromatography (25 cm Shim-park C18 CLC-ODS column, Shimadzu, Kyoto, Japan) using methods described by Tanumihardjo and Penniston and modified by Mehdad et al. (2010). A 0.1 g sample of liver was homogenized at  $4^\circ\text{C}$  in ethanol (1.5 x initial volume) and 50% KOH (0.8 x initial volume); the sample was vortexed for 15 s and was placed in a water bath at  $50^\circ\text{C}$  for 30 min. After the saponification process, the retinol was extracted three times with hexane (2 x sample volume) by vortexing for 30 s and centrifuging for 3 min to separate the phases. The organic layer was removed to a test tube and subjected to evaporation under nitrogen. The residue was dissolved in 2 mL ethanol and 20  $\mu\text{L}$  of this solution was injected in into the HPLC system. The samples were eluted at a flow rate of 1.0 mL/min using a 95:5 methanol/water (v/v) as the mobile phase. The wavelength for retinol detection was set at 325 nm. An external standardization was performed using standard solutions of all-trans-retinol

(FlukaBiochemika, retinol 99% - HPLC) in the concentration range of 0.0016 - 0.0097  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $y=3.23352\text{E}-09x - 0.0003$ ;  $r^2 = 0.999$ ).

#### Iron tissue determination

The iron concentration in liver, spleen, gut, heart and kidney was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Spectro, Kleve, Germany) as described by Baranowska et al (1995). A six-point standard curve for iron was generated using standard mineral solutions (Titrizol, Merck, Darmstadt, Germany) in a concentration range of 0–10 ppm.

#### Serum iron status

The measurement of serum iron was determined using a commercial kit (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). Briefly, 900  $\mu\text{L}$  of buffer 250 mmol/L (sodium acetate 43 g/L, acetic acid 3%, thioglycolic acid 0,4%) was added to 225  $\mu\text{L}$  of serum and the absorbance measured at 560 nm (blank solution). Afterwards, 250  $\mu\text{L}$  of Ferrozine<sup>®</sup> was added and the samples were incubated in water bath at 37° C for 10 min, followed by absorbance measurement at 560 nm. A six point standard curve was generated using a standard iron solution (lyophilized bovine serum - 500  $\mu\text{g}$  of iron/dL) in a concentration range of 50 to 500  $\mu\text{g}/\text{dL}$  ( $y = 0.0009 x + 0.0013$ ;  $R^2 = 0.9998$ ). Unsaturated iron binding capacity (UIBC) was also performed using a commercial kit (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil), following the assay protocol fabricant. Initially, in each sample, 750  $\mu\text{L}$  of buffer (Tris 300 mmol/L; ferric chloride  $\geq 35 \mu\text{mol}/\text{L}$ ; sodium hydrogencarbonate  $\geq 150 \mu\text{mol}/\text{L}$ ) was added to 100  $\mu\text{L}$  of serum, followed by 5 min incubation in water bath at 37° C. The same was done to a blank sample containing all reagents described above but without serum. The first absorbance was determined at 560 nm (A1). Subsequently, 200  $\mu\text{L}$  of Ferrozine<sup>®</sup> was added and the samples were incubated in water bath at 37° C for 5 min and then determined the absorbance at 560 nm (A2). A sample with a known unsaturated iron binding capacity was utilized as a calibrator (cal). The absorbance of samples was calculated as the difference between A1 and A2 ( $\text{sample}_{\text{abs}}$ ). UIBC concentration was determined by the ratio between sample absorbance and calibrator absorbance, multiplied by the calibrator UIBC concentration ( $\text{UIBC} = \text{sample}_{\text{abs}}/\text{cal}_{\text{abs}} \times [\text{Cal}]$ ). Total iron binding capacity (TIBC) was obtained by the sum of serum iron and UIBC values. Transferrin saturation (%TS) was estimated using the values of serum iron divided by the TIBC values, multiplied by 100.

Determination of the mRNA levels of the genes hepcidin (Hamp), ferroportin (Slc40a1), suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3), interleukin-1 beta (Il1b), interleukin-6 (Il6), erythropoietin (Epo) and heme oxygenase-1 (Hmox1)

The extraction of total RNA from the liver, spleen and kidney was performed using TRIzol reagent (Invitrogen Inc., Canada). Briefly, 100 µg of tissue was homogenized in 1 mL of TRIzol using a TissueRuptor (QIAGEN, Austin, Texas, USA). After a chloroform extraction, RNA from the aqueous phase was precipitated using isopropyl alcohol and then it was dissolved in diethylpyrocarbonate-treated water. The RNA samples were precipitated using 3 mol/L pH 5.2 sodium acetate (0.1 x sample volume) and ethanol (2.5 x sample volume), and this mixture was incubated at 4°C for 30 min and then centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C. Ethanol (1 mL) was added to the pellet and it was centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4°C, dried at room temperature and then it was diluted to 20 µL using deionized water. The RNA samples were quantified by measuring their absorbance at 260 nm and their purity was assessed by calculating the absorbance ratio at 260/280 nm and at 260/230 nm (Azevedo et al., 2010). The integrity of the RNA was assessed by the electrophoretic profile, on 1% agarose, 1,000 x GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, California, USA), and Tris/Boric acid/Ethylenediaminetetraacetic acid buffer solution 1x gel (Sigma, St. Louis, MO, USA). Total RNA (1 µg) was used for cDNA synthesis reactions (20 µL final volume) using an ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, USA). Oligo(dT) primers were added to the total RNA and denaturation reaction carried out at 70°C for 5 min. Improm-II Reverse Transcriptase was added, and the samples were incubated at 42°C for 50 min, followed by inactivation at 70°C for 15 min.

The mRNA concentrations of the hepcidin (Hamp), ferroportin (Slc40a1), suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3), interleukin-1 beta (Il1b), interleukin-6 (Il6), erythropoietin (Epo) and heme (Hmox1) were quantified using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Real-time PCR was carried out using the Fast SYBR Green Master Mix 2x reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 2.0 µL of cDNA (corresponding to 0.02 µg of total RNA) in a final volume of 10 µL, 5.0 µL Fast SYBR Green Master Mix and 0.2 µmol/L (final concentration) of each primer (Table 1). Quantitative PCR was performed using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for 40 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 3 s and 60°C for 20 s. The amplification specificity of each amplified product was verified using a melting curve. The PCR amplification efficiency was evaluated by running standard curves for each amplicon in different template dilutions. A

standard curve was plotted for each studied gene correlating the  $\Delta C_T$  (CT target – CT reference) versus the log of the cDNA dilutions in arbitrary units. A slope value of the regression line plot of  $\Delta C_T$  values vs. log of input nucleic acid  $< 0.1$  was used as a general criterion to accept the validation of the experiment, and a slope value of the regression line plot of  $C_T$  values vs. log of input nucleic acid  $\sim -3.32$  was considered as an efficient reaction. This method was performed as described in the tutorial “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” (Part #: 4371095 Rev B, Applied Biosystems).

Relative gene expressions were calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). The results were normalized to the endogenous control and fold change of the gene expression was calculated using threshold cycle (Ct) values. All samples were assayed in triplicates and were normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -actin (Actb).

#### Serum IL-1 $\beta$ and IL-6 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Serum IL-6 and IL-1 $\beta$  levels were measured by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the assay protocol fabricant (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Microplates previously sensitized with specific rat antibody were washed two times with wash buffer. 100  $\mu$ L of serum and 50  $\mu$ L of biotin-conjugate were added to the microplates and incubated at room temperature for 2 h. Then, microplates were washed six times and 100  $\mu$ L of streptavidin-HRP was added, followed by incubation at room temperature for 1 h. Microplates were washed again and 100  $\mu$ L of tetramethylbenzidine (TMB) the substrate solution was added to the microplates and it was incubated at room temperature for 10 min. The reaction was stopped with the addition of 100  $\mu$ L of stop solution and the absorbance 450nm was determined by using a microplate reader (SurinseTecan, Seestrasse, Männedorf, Switzerland).

#### Determination of Heme Oxygenase Enzyme Activity

The enzymatic activity of heme oxygenase-1 (HO-1) was measured according to Schmidt et al (2007). Briefly, frozen liver and spleen tissues were homogenized (TissueRuptor; QIAGEN, Austin, Texas, USA) at 4°C in 4 volumes of 5:1 K:Na 100 mmol/L phosphate buffer with 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (HO activity buffer). After sonication, the homogenate was centrifuged at 16,000 x g for 15 min. One hundred microliters of the

supernatant were used to determine HO-1 enzymatic activity in a reaction volume of 500  $\mu$ L, containing 100  $\mu$ L liver cytosol (source of biliverdin reductase), 0.8 mmol/L nicotinamide dinucleotide phosphate, 20  $\mu$ mol/L hemin, 2 mmol/L glucose-6-phosphate, and 0.002 U/ $\mu$ L glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction was performed at 37°C for 1 h in the dark and stopped by the addition of 500  $\mu$ L chloroform. For the extraction of bilirubin, the tubes were mixed thoroughly followed by centrifugation at 16,000 x g for 5 min. The absorbance of chloroform fraction (lower phase) was determined at 452 nm and 530 nm (background absorbance). The results were expressed as the formation of bilirubin (pmol) per milligram of protein within 1 h.

#### Statistical Analysis

Comparisons among treatments were tested using independent sample test t-test for equality of means using SPSS version 17 software (SPSS Inc., Chicago, USA). The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . All values are expressed as the mean  $\pm$  SD.

## RESULTS

### **Effect of vitamin A on body weight gain, food intake, iron intake and liver retinol.**

In spite of unchanged diet consumption among the groups, the vitamin A deficient (VAD), the iron deficient (FeD) and the all-trans retinoic acid (atRA) groups showed lower body weight gain compared with Control ( $p = 0.035$ ,  $0.032$  and  $0.029$ , respectively; Table 2). Due to the different level of iron contamination in the diet components, the diet iron content was lower in VAD and atRA groups compared to the Control group (Table 2), however both diets contained the iron recommendation for rodents according to AIN-93G (Control diet). At the end of the treatment (59 days), the VAD, VAFeD and atRA, rats showed the liver completely depleted of vitamin A (hepatic retinol content was below to the detection limit; Table 2). Iron deficiency (FeD) did not alter hepatic retinol concentration compared with the Control diet.

### **Effect of vitamin A deficiency on serum iron status**

Regarding the serum iron status (Table 3), both deficiencies, vitamin A and/or iron deficiency reduced the levels of serum iron (VAD, FeD and VAFeD;  $p = 0.009$ ,  $0.003$  and  $0.031$ , respectively) and transferrin saturation (TS%;  $p = 0.028$ ,  $0.001$  and  $0.003$ , respectively) compared to Control diet. The groups VAD and FeD also showed higher unsaturated iron binding capacity (UIBC;  $p = 0.024$  and  $0.012$ , respectively) while a marginal increase of UIBC was observed in the group VAFeD ( $p = 0.085$ ). As the other test groups, lower level of serum iron was found in the atRA group ( $p = 0.014$ ), however, different from the other groups, the value of TS % did not significantly differed ( $p = 0.068$ ) from the Control group and the transferrin value was also lower ( $p = 0.004$ ). The UIBC value did not change in the group atRA. The values of TIBC did not change among all treatments (Table 3).

### **Effect of vitamin A deficiency on iron concentration in the tissues.**

At 59 days of treatment, the vitamin A deficiency significantly increased iron spleen concentration ( $p = 0.005$ ; figure 1a). The replacement of retinyl ester by atRA in the rat's diet significantly increased iron liver concentration ( $p = 0.046$ ) but it simultaneously decreased iron concentration in spleen and in gut relative to the Control group ( $p = 0.033$  and  $0.002$ , respectively). As expected, the FeD rats showed lower values of iron in the five studied tissues ( $p = 0.008$ ,  $< 0.0001$ ,  $< 0.0001$ ,  $0.043$  and  $0.003$ ; for liver, spleen, gut, heart and kidney, respectively; figure 1). With the exception of heart, the rats fed with vitamin A and

iron depleted diet (VAFeD) also showed reduced iron levels in the tissues relative to the Control group, however, the levels of iron found in the gut of the rats from the VAFeD group were higher than the FeD group ( $p = 0.038$ ) and, in liver, it was slightly higher than the FeD group ( $p = 0.066$ ). Moreover, the level of iron concentration on the liver, spleen, gut and kidney of the VAFeD group was lower than the VAD group ( $p = 0.003$ ,  $<0.0001$ ,  $0.025$  and  $0.002$ , respectively; figure 1).

### **Effect of vitamin A deficiency on the levels of mRNA and proteins of cytokines involved in inflammatory response**

The vitamin A depleted diet increased Il6 mRNA in the liver ( $p = 0.013$ ) and serum protein levels ( $p < 0.0001$ ) and it also increased the levels of serum IL-1 $\beta$  relative to the Control diet ( $p = 0.032$ ; Figures 2a, 2d and 3b). Iron depleted diet increased Il6 mRNA level in liver ( $p = 0.003$ ) while in spleen it marginally increased ( $p = 0.072$ ; Figures 2a and 2b). The FeD group also showed an increase of serum IL-6 and IL-1 $\beta$  protein levels compared to the Control group ( $p = 0.001$  and  $< 0.001$ , respectively; Figures 3a and 3b). The rats fed with vitamin A and iron depleted diet (VAFeD) showed a reduction of the mRNA level of the cytokines Il6 and Il1 $\beta$  in spleen and an increase of the serum IL-6 protein level, while only a marginal increase for IL-1  $\beta$  in the serum ( $p = 0.088$ ; Figure 3b), in relation to the Control group. The levels of serum cytokine IL-6 in the group VAFeD were lower than the VAD group ( $p = 0.037$ ; Figure 3a) and there was no difference on the levels of the serum protein IL-1 $\beta$  between the VAFeD and Control group, however, this value in VAFeD group was lower than the level found in VAD group ( $p = 0.05$ ; Figure 3b). The replacement of retinyl ester by all-trans retinoic acid in the diet of rats slightly increased the level of IL-6 mRNA in liver ( $p = 0.056$ ) and, in the serum, all-trans retinoic acid promoted a significant increase in levels of the IL-6 ( $p = 0.023$ ) and IL-1 $\beta$  ( $p < 0.0001$ ; Figure 3a and 3b).

### **Effect of vitamin A deficiency on the levels of mRNA of proteins involved in body iron homeostasis: Hamp, Slc40a1, Socs3, Epo and Hmox1.**

At the end of the experimental period, all tests groups presented lower hepatic Hamp mRNA levels compared with Control group (figure 3a). The VAD rats showed a reduction of 2.3-fold ( $p < 0.0001$ ) on the level of hepatic mRNA Hamp and the consumption of all-trans retinoic acid diet did not restore this value ( $p = 0.002$ ). The hepatic Hamp mRNA levels were almost undetectable in FeD group ( $p < 0.0001$ ), and in VAFeD rats these levels were also diminished ( $p < 0.0001$ ), compared to Control. The hepatic Hamp mRNA level found in

VAFeD group was lower compared with VAD ( $p < 0.0001$ ), however it was marginally higher than the value found in FeD group ( $p = 0.068$ ).

Among the test groups, the hepatic mRNA levels of suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3) varied only in the VAFeD group, which showed a significant reduction compared to the Control and FeD groups ( $p = 0.001$  and  $0.007$ , respectively; Figure 3b).

The erythropoietin (Epo) mRNA levels were assessed in the kidney (figure 3c). Vitamin A deficient diet promoted a 2.8-fold reduction in kidney Epo mRNA levels compared with Control diet ( $p < 0.0001$ ). No significant difference was observed among the FeD, VAFeD and atRA, groups in relation to Control group. However the VAFeD rats showed higher Epo mRNA levels than the VAD rats ( $p = 0.011$ ).

Both groups that were treated with diets depleted in vitamin A (VAD and VAFeD) showed an increase of 1.6 and 1.4-fold in spleen Slc40a1 mRNA levels compared with Control group, ( $p < 0.0001$  and  $0.015$ , respectively; Figure 3d). In addition, the VAFeD group showed higher Slc40a1 mRNA levels than the FeD group and this value was marginally lower than the VAD group ( $p = 0.014$  and  $0.071$ , respectively). There was no difference in spleen Slc40a1 mRNA levels of atRA and FeD groups compared to Control group.

Vitamin A deficiency upregulated the hepatic Hmox1 gene compared to Control ( $p = 0.012$ ; figure 4a), while no difference was observed among the other treatments relative to the Control group. The VAFeD rats presented higher Hmox1 mRNA levels compared to FeD group ( $p = 0.020$ ; figure 4a). Regarding the enzymatic activity, in contrast with the liver Hmox1 mRNA levels, vitamin A deficiency caused a reduction on the liver HO-1 specific activity relative to the Control ( $p = 0.042$ ; figure 4b); and in the presence of both deficiencies (VAFeD group) the HO-1 activity was higher than the value found in VAD ( $p = 0.026$ ; figure 4b). In spleen, the vitamin A deficient rats presented higher Hmox1 mRNA levels compared to the Control ( $p = 0.031$ ; figure 4c), while no difference was observed in others groups. Similar to that observed in the liver, HO-1 activity in spleen was marginally decreased in vitamin A deficient rats (VAD), compared to Control ( $p = 0.085$ ; figure 4d).

## DISCUSSION

Retinoids are potent regulators of cellular growth, proliferation and differentiation, modulating the expression of several target genes (McGrane, 2007; Brun et al, 2013). Due to these properties, retinoic acid (RA) has a key role in the maintenance of immunity, once it promotes T cells differentiation into Th2 cells and consequent increase of the Th2 cytokines, reducing Th1 cell response, which gives an anti-inflammatory profile in organism (Ross, 2012). Early studies have shown that vitamin A deficiency impairs growth by lowering body weight gain (Ghenimi et al., 2009; Esteban-Pretel et al., 2010), and it is associated with abnormal iron status probably due to the involvement of vitamin A on the maintenance of iron homeostasis (Roodenburg et al., 1996; Strube et al., 2002; Zimmerman et al., 2006).

Previous studies from this laboratory showed that rats fed a diet deficient in vitamin A for 57 days exhibited a lower body weight gain and higher hemoglobin concentration, and they also exhibited a higher spleen iron concentration compared to a control group, suggesting that vitamin A contributes to the maintenance of iron homeostasis (Arruda et al., 2009). In order to investigate the effect of vitamin A deficiency on iron metabolism and inflammatory response, male Wistar rats were treated with diets deficient in vitamin A (VAD) or in iron (FeD) or a diet deficient in both vitamin A and iron (VAFeD). A fourth group of rats was treated with retinoic acid (atRA) replacing retinyl ester to verify if this vitamin A metabolic product can supply the vitamin A role in the rats organism. The effects of these treatments on iron status and inflammatory process were verified by assaying the level of the biomarkers and of the expression of genes involved in the maintenance of iron homeostasis and inflammation process.

In this study, although the food intake did not change among all groups, the vitamin A deficient rats (VAD) and iron deficient rats (FeD) presented lower body weight gain (Table 2). Previous study suggested that impaired growth observed in vitamin A deficient rats may be a result of inefficient nutrients utilization, resulting in a metabolic inefficiency and consequent weight loss (Anzano et al. 1979). In the other hand, considering the essential role of iron as an oxygen transport and as co-factor of many enzymes involved in the energetic metabolism (Shahbazi et al., 2009), a metabolic inefficiency and lower weight gain were also expected in the rats treated with iron depleted diet. In fact, the FeD group showed similar reduction on the body weight gain, but, surprisingly, the rats simultaneously depleted in vitamin A and iron, the VAFeD group, did not show significant reduction in body weight gain relative to the control group ( $p = 0.141$ ). By analyzing the mean of the body weight gain values and standard deviation among the groups we can observe that the VAFeD group

showed the largest standard deviation value relative to the mean value of this group, which should influenced this statistic result. In agreement with this explanation, early studies have showed that the association of the vitamin A and iron deficiencies, lead to a diminished weight gain (Strube et al., 2002; Arruda et al., 2009).

In spite of highest bioactivity of all trans retinoic acid (atRA) relative to the other retinoids forms (Kam et al., 2012) and the early finds showing that the administration of atRA can improve growth in vitamin A deficient rats (Moore and Holmes, 1971; Anzano et al., 1979), in the present study the administration of 12 mg atRA / kg diet did not maintain the rate of body weight gain similar to the Control group. These data suggest that other forms of retinoids such as 9-cis and 13-cis retinoic acid are important to maintain normal body weight gain (Blaner, 2001; Kane, 2012). The administration of all-trans-retinoic acid for a long period of 59 days may have promoted a toxic effect impairing rats' body weight gain.

Ghenimi et al (2009) demonstrated that rats subjected to a diet deficient in vitamin A for three weeks exhibited lower levels of vitamin A in their serum compared with Control rats, and after five to six weeks, the serum concentrations of vitamin A were completely depleted. In the present study, the consumption of a vitamin A deficient diet (VAD and VAFeD groups) for 59 days resulted in the complete depletion of hepatic retinol store (Table 2) and the replacement of vitamin A by retinoic acid did not prevent the liver vitamin A depletion. This result was expected since all-trans retinoic acid could not be converted into retinol or retinal because the oxidation of retinal to retinoic acid is an irreversible reaction in cellular environmental (Ross, 2003).

It is widely reported that vitamin A and iron metabolisms are close associated (Strube et al., 2002; Arruda et al., 2009; Tsuchiya et al., 2009; Citelli et al., 2012). In the present study, the complete depletion of liver vitamin A store resulted in diminished iron mobilization, once the serum iron and the transferrin saturation were significantly reduced while the iron level of spleen was increased in VAD group. These results are in agreement with other finds observed by others authors (Roodenburg et al., 1996; Arruda et al., 2009; Citelli et al., 2012).

A similar serum iron profile (serum iron and transferrin saturation decreased) was observed in the groups treated with iron deficient diets, FeD and VAFeD, however, differently from that observed in the vitamin A deficient group (VAD), in both iron deficient groups, the systemic iron deficiency was accompanied by a cellular iron deficiency. Diet iron restriction decreased iron concentration in liver and spleen (Figures 1a and 1b), which are the major tissues responsible for the body iron store, especially when dietary iron content is

insufficient (Evstatiev and Gasche, 2012). The intracellular iron deficiency was also observed in gut and kidney of iron deficient rats (FeD and VAFED), these results demonstrate that, contrary to diet vitamin A restriction, diet iron restriction leads to a systemic adjusting of iron absorption, mobilization and store in accordance with physiological requirements.

Regarding the role of retinoic acid on iron homeostasis, the treatment of rats with atRA in order to replace retinyl ester on diet, promoted a significant reduction on iron concentration in spleen and gut suggesting that all-trans retinoic acid, in the dose used in the present study (12 mg/kg diet), improves iron bioavailability in the organism, increasing iron mobilization from spleen and iron exportation from gut. These results should not be associated to the lower iron intake of the atRA rats because they showed iron overload in liver compared to the Control group (Figure 1 a and c). Citelli et al (2012) observed *in vitro* that in the presence of all-trans retinoic acid ferroportin gene was up regulated in duodenal cells, corroborating that this molecule improves iron mobilization.

Hepcidin is a hepatic peptide hormone which expression is directly related to body iron content, increasing in iron sufficiency and decreasing in iron deficiency (Anderson et al., 2009). Once secreted into the bloodstream, hepcidin reduces intestinal iron absorption (Frazer et al., 2002; Laftah et al., 2004; Ganz, 2005) and prevents iron exportation from macrophages of the spleen to the bloodstream (Knutson and Wessling-Resnick, 2003; Ganz, 2005). Beyond the status of iron in the body, several processes regulate the expression of liver hepcidin (Nicolas et al., 2002). Early studies have shown that the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  induce expression of Hamp gene (Lee et al., 2005; Wrighting and Andrews, 2006; Christiansen et al., 2007). Thus, considering the involvement of vitamin A on the modulation of inflammatory response, and the evidences that vitamin A deficiency favors the production of proinflammatory rather anti-inflammatory cytokines, leading to an inflammatory state (Iwata et al., 2003; Stephensen et al., 2004; Bai et al., 2010), in the present study we analyzed the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL1- $\beta$  in the vitamin A deficient rats to investigate the relationship between expression of Hamp gene and the level of inflammatory marker

In the present study, vitamin A deficiency indeed enhanced inflammatory state, by increasing IL-1 $\beta$  and IL-6 serum levels and hepatic Il6 mRNA levels, however, it also promoted the reduction of hepatic Hamp mRNA levels to half of the control level, rather than the expected upregulation of Hamp gene expression by the proinflammatory cytokines early reported (Evstatiev and Gasche, 2012; Anderson et al 2009).

Iron deficient rats (FeD) showed the same pro-inflammatory profile as the vitamin A deficient rats. They had higher levels of hepatic Il6 mRNA, and higher IL-6 and IL-1 $\beta$  serum protein levels compared to the Control rats (Figures 2a, 2b and 2e). Moreover, also similar to the results obtained in vitamin A deficient rats (VAD), the hepatic Hamp mRNA levels found in FeD rats were lower than the Control group, it was almost undetectable (Figure 3a).

In the case of iron-deficient rats, the reduced levels of hepcidin mRNA can be explained by at least two mechanisms: firstly, the iron regulatory mechanism mediated by hepatic bone morphogenetic protein 6 (BMP6), which is sensible to the intracellular iron level. Iron overload in hepatocytes increase bone morphogenetic protein 6 (BMP 6) synthesis which interacts with the membrane BMP co-receptor hemojuvelin (HJV) triggering a signaling cascade that results in phosphorylation of the SMAD 1,5,8. The complex SMAD 1,5,8 phosphorylated interacts with SMAD 4 resulting in the up regulation of hepcidin transcription (Evstatiev and Gasche, 2012). A second regulatory mechanism of iron in body is mediated by haemochromatosis protein (HFE)-transferrin receptor (TfR) which up regulates hepcidin in iron-loaded transferrin status. In iron overload condition, the (HFE) dissociates from the TfR1 and, once free, it binds to TfR2 leading to the induction of hepcidin transcription. This pathway seems also to involve the BMP signaling (Evstatiev and Gasche, 2012). Thus, in a low iron concentration condition, similar to that observed in the FeD group, these both iron regulatory pathways are turn off, which result in a reduction of hepatic Hamp mRNA levels relative to the control group (Figure 3).

In the present study, contrary to our expectations, the replacement of retinyl ester by atRA in the diet, despite of the elevated serum cytokines concentration, did not restore the level of hepatic Hamp mRNA in atRA group to that level obtained for Control group. Down-regulation of Hamp expression was also reported by Tsuchiya et al (2009), in HuH7 cells treated with 0–20  $\mu$ mol/L of all-*trans* retinoic acid for 24 h. The authors observed that all-*trans* retinoic acid down-regulated Hamp expression in a dose dependent manner. In spite of the ferroportin mRNA levels did not change with the consumption of all-*trans* retinoic acid (Figure 3d), the low iron concentration in gut and spleen associated with the down-regulation of hepatic Hamp expression found in the atRA rats, suggest an increase of iron mobilization through ferroportin protein, which is protected against degradation by hepcidin and also that this modulation is independent of the inflammatory status.

Several negative regulators of hepatic hepcidin transcription has been identified, among than, the transmembrane protease serine 6 (TMPRSS6), cleaves the membrane hemojuvelin (HJV), a protein that up-regulator Hamp expression, into fragments (Silvestri et

al., 2008); Sma and Mad- related protein 7 (SMAD7) mediates a negative feedback response through the BMP pathway (Mleczo-Sanecka et al., 2010), and the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) that dampens signal transduction via cytokine receptors (De Domenico et al., 2010). Considering that vitamin A deficient rats (VAD) showed enhanced serum levels of IL-6 and that this cytokine activates hepcidin expression by JAK/STAT3 pathway (for review see Evstatiev and Gasche, 2012), we hypothesized that in a first moment VAD rats had increased hepcidin levels, which binds to ferroportin promoting its degradation and the activation of JAK2/STAT3 pathway and, therefore, increasing Socs3 transcription. On a second moment, the increased levels of SOCS3 could be responsible by the reduction of Hamp mRNA levels obtained in VAD group, in a mechanism of negative feedback regulation as proposed by De Domenico et al (2010). However, contrary to this hypothesis, no difference was obtained in the Socs3 mRNA levels in liver (Figure 3b), suggesting that Socs3 is not involved in hepcidin suppression in vitamin A deficient rats.

It is well reported that retinoic acid stimulates erythropoietin gene expression (Epo), a primary regulator of erythropoiesis, which binds to a specific receptor of immature red cells promoting anti-apoptotic, proliferative and differentiation signals (Makita et al., 2001; Gardenghi et al., 2010). Moreover, some studies show that high inflammatory status, observed in the present study in vitamin A deficient rats (VAD), can damage erythrocytes reducing its lifespan (Weiss, 2005; Prince et al., 2012); and inhibits Epo mRNA production (Jelkmann, 1998) impairing the erythropoiesis. In the present study vitamin A deficient rats presented very low levels of kidney Epo mRNA (Figure 3c) and in spite of the enhanced level of spleen ferroportin, the VAD rats showed higher splenic iron concentration compared to Control group (Figure 1b). Thus, the low Epo mRNA levels in the VAD group could lead to a reduced differentiation of the erythroids precursors, increasing erythrocytes malformation, which have a short lifespan (Socolovsky et al., 2001; Gardenghi et al., 2007), and consequently, enhances the rate of erythrocytes degradation resulting in the spleen iron accumulation, in these rats.

These results corroborate with the hypothesis that vitamin A deficiency impairs the erythropoiesis and the systemic iron status. Although cells with high iron content must synthesize ferroportin protein due to the lack of IRP binding to the 5' IREs, it is possible that the iron accumulated in the spleen of VAD rats is predominantly bound to heme group and the ferroportin translation is inhibited.

Retinoic acid also suppressed the down-regulation of erythropoietin in vitamin A deficient rats. Makita and collaborates (2001) found a retinoic acid responsive element

(RARE) in the promoter region of the gene that encoded erythropoietin hormone. Together, these results suggest that vitamin A modulates erythropoietin gene expression through the RARE in its promoter region.

In the present study, the down-regulation of erythropoietin expression by vitamin A deficiency was suppressed in the iron deficiency (VAFeD group, Figure 3c), suggesting that cellular iron content is determinant in the maintenance of erythropoietin modulation by vitamin A. Early study carried on Sprague-Dawley rats showed that the hypoxia inducible factor-2  $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ), an inducer of erythropoietin gene expression, was translationally repressed in response to dietary iron deficiency (Davis et al., 2011; Haase, 2013). In the present study iron deficiency (FeD and VAFeD) did not alter the kidney erythropoietin mRNA levels compared to Control group (Figure 3c), suggesting that inhibition of HIF-2 $\alpha$  associated to the low levels of iron avoid erythropoietin and consequent erythropoiesis stimulation.

The growth differentiation factor 15 (GDF 15) and the twisted gastrulation protein homolog (TWSG1) are members of the transforming growth factor- $\beta$  family proteins that control proliferation, differentiation and apoptosis in different cell types. The GDF15, secreted by erythroid precursors inhibits proliferation of immature hematopoietic progenitors undergoing immature cell death (Gardenghi et al., 2010). Recent reports described that hepcidin expression is suppressed by GDF15 in patients with ineffective erythropoiesis, suggesting that this erythroblast-expressed factor may be responsible by iron overloading observed in these patients due to hepcidin suppression (Tanno et al., 2007; Gardenghi et al., 2007; Tanno et al., 2010). In the present study, vitamin A deficiency promoted low serum iron status, high spleen iron concentration and a trend towards greater hepatic iron concentration associated to low levels of kidney Epo mRNA. Taken all together, the results suggest that vitamin A deficiency leads to an ineffective erythropoiesis, which could be responsible for an increase of GDF 15 secretion by erythroid precursors and consequent reduced hepatic hepcidin expression (Tanno et al., 2007).

Ineffective erythropoiesis is associated to an increased rate of erythrophagocytosis by the macrophages of the reticulum endothelial system. The heme oxygenase-1, an enzyme anchored in the endoplasmatic reticulum of macrophages, is responsible by heme degradation and inorganic iron release, which in turn is stored in the ferritin protein or is exported through the ferroportin to the bloodstream (Abraham and Kappas, 2008; Kovtunovych et al., 2010). The high iron content obtained in the spleen of vitamin A deficient rats (VAD group) could be

a consequence of the erythrophagocytosis enhanced due to higher number of immature or malformed erythrocytes produced under low levels of EPO (Figure 3c).

The spleen iron accumulation associated to the up regulation of ferroportin (Figure 3d) suggests that iron accumulated in spleen of vitamin A deficient rats is not available to be exported. Marro et al (2010) observed that both Hmox1 and ferroportin transcription were induced by hemoglobin and hemin in macrophages cells. In the present study, the increase of the heme oxygenase-1 mRNA found in the vitamin A deficient rats (Figure 4c) corroborates with this find. All together, these results suggest that the vitamin A deficiency promotes an overload of heme group in the spleen, which concentration should be higher than the level of the heme oxygenase-1 saturation, resulting in a low iron free content in spleen. The marginal reduction on the activity of heme oxygenase-1 observed in VAD group (Figure 4d) enhances the accumulation of heme group in the spleen, which is arrested in spleen, in spite of the high level of ferroportin.

In summary, the data suggest that vitamin A deficiency results in an ineffective erythropoiesis by down-regulation of renal erythropoietin expression in kidney. Phagocytosis of malformed or undifferentiated erythrocytes leads to an increase of heme concentration in spleen and liver, which is higher than the heme oxygenase-1 saturation level, resulting in an inhibition of the enzyme activity favoring the heme iron accumulation. Heme group arrested in the spleen and liver leads to a systemic iron deficiency in vitamin A deficient organism, which in turn, reduces the levels of hepatic hepcidin mRNA. In conclusion, vitamin A deficiency indirectly modulates systemic iron homeostasis by enhancing erythrophagocytosis of undifferentiated erythrocytes.

**REFERENCES**

- Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of hemoxygenase. *Pharmacol Rev.* 60(1):79-127, 2008.
- Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol* 25: 129–135, 2009.
- Anzano MA, Lamb AJ, Olson JA. Growth, appetite, sequence of pathological signs and survival following the induction of rapid, synchronous vitamin A deficiency in the rat. *J Nutr.* 109:1419-31, 1979.
- Arruda SF, Siqueira EMA, Valencia FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition.* 25: 472-78, 2009.
- Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. *Técnicas básicas em Biologia Molecular.* Editora Universidade de Brasília. Brasília, Brasil, 2010.
- Bai A, Lu N, Zeng H, Li Z, Zhou X, Chen J, Liu P, Peng Z, Guo Y. All-transretinoic acid ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis by shifting Th1 to Th2 profile. *J Interferon Cytokine Res.* 30(6):399-406, 2010.
- Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43: 1773-1808, 2002.
- Baranowska I, Czernicki K, Aleksandrowicz R. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. *Sci Total Environ.* 159(2-3):155-62, 1995.
- Brun PJ, Yang KJ, Lee SA, Yuen JJ, Blaner WS. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors.* 39(2):151-63, 2013.
- Christiansen H, Sheikh N, Saile B, Reuter F, Rave-Fränk M, Hermann RM, Dudas J, Hille A, Hess CF, Ramadori G. x-Irradiation in rat liver: consequent upregulation of hepcidin and downregulation of hemojuvelin and ferroportin-1 gene expression. *Radiology.* 242(1):189-97, 2007.
- Citelli M, Bittencourt LL, da Silva SV, Pierucci AP, Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 149(1):64-70, 2012.

Darlow BA, Graham PJ. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 5;(10), 2011.

Davis MR, Shawron KM, Rendina E, Peterson SK, Lucas EA, Smith BJ, Clarke SL. Hypoxia inducible factor-2  $\alpha$  is translationally repressed in response to dietary iron deficiency in Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 141(9):1590-6, 2011.

De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, Daynes RA, Kushner JP, Li D, Ward DM, Kaplan J. Heparin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest.* 120(7):2395-405, 2010.

Esteban-Pretel G, Marín MP, Cabezuelo F, Moreno V, Renau-Piqueras J, Timoneda J, Barber T. Vitamin A deficiency increases protein catabolism and induces urea cycle enzymes in rats. *J Nutr.* 140(4):792-8, 2010.

Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut.* 61(6):933-52, 2012.

Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ. Heparin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology.* 123(3):835-44, 2002.

Galy B, Ferring-Appel D, Kaden S, Grone HJ, Hentze MW. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metabolism* 7: 79-85, 2008.

Ganz T. Heparin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res ClinHaematol.* 18(2):171-82, 2005.

Gardenghi S, Grady RW, Rivella S. Anemia, ineffective erythropoiesis, and heparin: interacting factors in abnormal iron metabolism leading to iron overload in  $\beta$ -thalassemia. *HematolOncolClin North Am.* 24(6):1089-107, 2010.

Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A, Liu Y, Amariglio N, Rechavi G, Rachmilewitz EA, Breuer W, Cabantchik ZI, Wrighting DM, Andrews NC, de Sousa M, Giardina PJ, Grady RW, Rivella S. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of heparin and up-regulation of ferroportin. *Blood.* 1;109(11):5027-35; 2007.

Ghenimi N, Beauvieux MC, Biran M, Pallet V, Higuieret P, Gallis JL. Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders. *J Nutr.* 139(4):696-702, 2009.

Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 27(1):41-53, 2013.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to Tango: Regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 142: 24-38, 2010.

Imdad A, Herzer K, Mayo-Wilson E, Yakoob MY, BhuttaZA. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from 6 months to 5 years of age. *Cochrane Database Syst Rev.* 8;(12):CD008524, 2010.

Ingleby E, Tilbrook PA, Klinken SP. New Insights into the Regulation of Erythroid Cells. *IUBMB Life.* 56(4): 177–184, 2004.

Iwata M, Eshima Y, Kagechika H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *IntImmunol.* 15(8):1017-25, 2003.

Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res.* 18(8):555-9, 1998.

Kam RKT, Deng Y, Chen Y, Zhao H. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell Biosci.* 2:11, 2012.

Knutson M, Wessling-Resnick M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev BiochemMol Biol.* 38(1):61-88, 2003.

Kovtunovych G, Eckhaus MA, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Rouault TA. Dysfunction of the heme recycling system in hemoxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood.* 23;116(26):6054-62, 2010.

Laftah AH, Ramesh B, Simpson RJ, Solanky N, Bahram S, Schümann K, Debnam ES, Srail SK. Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood.* 15;103(10):3940-4, 2004.

Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *ProcNatlAcadSci USA* 102:1906 –1910, 2005.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-8, 2001.
- Makita T, Hernandez-Hoyos G, Chen TH, Wu H, Rothenberg EV, Sucov HM. A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev*. 1;15(7):889-901, 2001.
- Manicassamy S, Pulendran B. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol* **21**: 22-27, 2009.
- Marro S, Chiabrando D, Messana E, Stolte J, Turco E, Tolosano E, Muckenthaler MU. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica*. 95(8):1261-8, 2010.
- McClinticka JN, Crabbb DW, Tianb H, Pinaire J, Smith JR, et al. Global effects of vitamin A deficiency on gene expression in rat liver: evidence for hypoandrogenism. *J Nutr Biochem* **17**: 345-355, 2006.
- McGrane MM. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18;497-508, 2007.
- Mebius RE, KraalG. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**: 606-16, 2005.
- Mehdad A, Siqueira EM, Arruda SF. Effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability. *Ann Nutr Metab*. 57(1):35-9, 2010.
- Mleczko-Sanecka K, Casanovas G, Ragab A, et al. SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood* 115:2657e65, 2010.
- Moore T, Holmes PD. The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Lab Anim*. 5(2):239-50, 1971.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-93, 2004.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 110(7):1037-44, 2002.

Prince OD, Langdon JM, Layman AJ, Prince IC, Sabogal M, Mak HH, Berger AE, Cheadle C, Chrest FJ, Yu Q, Andrews NC, Xue QL, Civin CI, Walston JD, Roy CN. Late stage erythroid precursor production is impaired in mice with chronic inflammation. *Haematologica*. 97(11):1648-56, 2012.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 123(11):1939-51, 1993.

Roodenburg, A.J.C., West, C. E., Hovenier, R. & Beynen, A. C. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br. J. Nutr*. 75: 623–636, 1996.

Ross AC. Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. *Am J Clin Nutr*.;96(5):1166S-72S, 2012.

Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, Loop T, Humar M, Halverscheid L, Geiger KK, Pannen BH. Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg*. 245(6):931-42, 2007.

Shahbazi M, Naghdi N, Tahmasebi S, Sheikh M, NamvarAsl N, Kazemnejad A. The effect of iron and zinc dietary restriction of pregnant rats on physical growth of litters. *Biol Trace Elem Res*. 128(3):232-8, 2009.

Silvestri L, Pagani A, Nai A, et al. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 8:502e11, 2008.

Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 1;98(12):3261-73, 2001.

Stephensen CB, Jiang X, Freytag T. Vitamin A deficiency increases the in vivo development of IL-10-positive Th2 cells and decreases development of Th1 cells in mice. *J Nutr*. 134(10):2660-6, 2004.

Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr*. 21:167-92, 2001.

Strube YN, Beard JL, Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *J Nutr.* 132(12):3607-15, 2002.

Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 13:1096e101, 2007.

Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol.* 17(3):184-90, 2010.

Tanumihardjo SA, Penniston KL. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J Lipid Res.* 43(2):350-5, 2002.

Tsuchiya H, Akechi Y, Ikeda R, Nishio R, Sakabe T, Terabayashi K, Matsumi Y, Ashla AA, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Suzuki T, Ishibashi N, Yanagida S, Shiota G. Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver. *Gastroenterology.* 136(1):341-350.e8, 2009.

Verga Falzacappa MV, VujicSpasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood.* 109(1):353-8, 2007.

Weiss G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Haematol.* 18(2):183-201, 2005.

Wieringa FT, Dijkhuizen MA, West CE, van der Ven-Jongekrijg J, van der Meer JW; Muhilal. Reduced production of immunoregulatory cytokines in vitamin A- and zinc-deficient Indonesian infants. *Eur J Clin Nutr.* 58(11):1498-504, 2004.

Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 1;108(9):3204-9, 2006.

Zimmermann MB, Biebinger R, Rohner F, Dib A, Zeder C, Hurrell RF, Chaouki N. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am J Clin Nutr.* 84(3):580-6, 2006.

**Table 1.** Primer sequences used for Epo, Hamp, Hmox1, Il1b, Il6, Slc40a1, Socs3 and Actb real-time PCR assays.

Gene	Primer sequence (5'- 3')	5' end (bp)	Amplicon (bp)	Genbank accession number
Epo	TACGTAGCCTCACTTCACTGCTT (forward)	405	88	NM_017001
	GCAGAAAGTATCCGCTGTGAGTGTTT (reverse)	492		
Hamp	TGATGCTGAAGCGAAGGA (forward)	179	135	NM_053469
	TGTGTTGAGAGGTCAGGAC (reverse)	313		
Hmox1	ATCGTGCTCGCATGAAC (forward)	661	88	NM_012580
	CAGCTCCTCAAACAGCTCAA (reverse)	748		
Il1b	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG (forward)	773	59	NW_047658
	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC (reverse)	831		
Il6	CAAGAGACTTCCAGCCAG (forward)	81	124	NW_012589
	CTCCGACTTGTGAAGTGGT (reverse)	204		
Slc40a1	TTCCGCACTTTTCGAGATGG (forward)	1,11	106	NM_133315.2
	TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT (reverse)	1,215		
Socs3	CCTCCAGCATCTTTGTCGGAAGAC (forward)	581	76	AF075383
	TACTGGTCCAGGAACTCCCGAATG (reverse)	656		
Actb	GTCGTACCACTGGCATTGTG (forward)	518	181	NM_031144
	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA (reverse)	698		

**Table 2:** Food intake, iron intake, iron concentration in diet, body weight gain and hepatic retinol of rats treated with different types and quantity of vitamin A and iron diets, for 59 days.

	<b>Food intake (g / 59 days)</b>	<b>[Fe] in diet (µg/g)</b>	<b>Body weight gain (g / 59 days)</b>	<b>Hepatic retinol (µg / g)</b>
<b>Control</b>	1,110.31 ± 51.72	44.83 ± 3.34	274.90 ± 9.80	60.30 ± 9.50
<b>VAD</b>	1,053.31 ± 80.79	38.82 ± 3.54*	226.90 ± 41.20*	<DL
<b>FeD</b>	1,033.19 ± 71.48	12.71 ± 1.12*	231.80 ± 36.20*	59.30 ± 16.10
<b>VAFeD</b>	1,045.51 ± 120.41	12.88 ± 1.68*†	232.70 ± 59.00	<DL
<b>atRA</b>	1,070.89 ± 82.20	34.15 ± 3.68*	232.80 ± 39.20*	<DL

VAD: vitamin A free diet; FeD: iron deficient diet; VAFeD: vitamin A free and iron deficient diet; atRA: diet with all-trans retinoic acid as only source of vitamin A.

\* Comparison with Control group.

† Comparison with VAD group.

§ Comparison with FeD group.

**Table 3:** Serum iron concentration; unsaturated iron binding capacity concentration (UIBC); total iron binding capacity (TIBC) transferrin saturation (TS) and serum transferrin concentration in rats treated with different types and quantity of vitamin A and iron diets, for 59 days.

	<b>Serum iron</b> <b>(µg/dL)</b>	<b>UIBC</b> <b>(µg/dL)</b>	<b>TIBC</b> <b>(µg/dL)</b>	<b>TS</b> <b>(%)</b>	<b>Transferrin</b> <b>mg/dL</b>
<b>Control</b>	161.41 ± 42.01	291.03 ± 43.68	452.45 ± 47.73	35.60 ± 8.05	304.08 ± 14.10
<b>VAD</b>	93.55 ± 10.72*	373.74 ± 49.56*	484.84 ± 67.09	22.65 ± 6.46*	339.38 ± 46.96
<b>FeD</b>	78.53 ± 22.65*	409.01 ± 84.36*	487.54 ± 68.41	16.75 ± 6.77*	341.28 ± 47.89
<b>VAFED</b>	109.53 ± 28.53*	380.45 ± 105.77	489.98 ± 88.28	19.85 ± 4.51*	342.98 ± 61.80
<b>atRA</b>	100.11 ± 28.26*	307.31 ± 74.16	406.46 ± 68.12	25.39 ± 9.19	265.95 ± 15.94*

UIBC: unsaturated iron binding capacity; TIBC: total iron binding capacity; TS: transferrin saturation. VAD: vitamin A free diet; FeD: iron deficient diet; VAFED: vitamin A free and iron deficient diet; atRA: diet with all-trans retinoic acid as only source of vitamin A.

\* Comparison with Control group.

† Comparison with VAD group.

§ Comparison with FeD group.

**Figure 1. Iron concentration in the tissues of rats treated with Control diet, vitamin A deficient diet (VAD), iron deficient diet (FeD), vitamin A and iron deficient diet (VAFeD) and all-trans retinoic acid diet (atRA).** Data are means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Statistical differences ( $p < 0.05$ ): \*Comparison with Control group; † Comparison with VAD group; § Comparison with FeD group. (Student's t-test).

**Figure 2. Quantification of the hepatic and the splenic mRNA levels of Il6 (A and B) and Il1b (C and D) and protein concentration of IL-6 and IL-1 $\beta$  in serum (D and E) of rats treated with Control diet, vitamin A deficient diet (VAD), iron deficient diet (FeD), vitamin A and iron deficient diet (VAFeD) and all-trans retinoic acid diet (atRA).** Data are means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Statistical differences ( $p < 0.05$ ): \*Comparison with Control group; † Comparison with VAD group; § Comparison with FeD group. (Student's t-test).

**Figure 3. Quantification of the mRNA levels of hepatic hepcidin (Hamp; A), the hepatic suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3; B), the renal erythropoietin (Epo; C) and the splenic ferroportin (Slc40a1; D) of rats treated with Control diet, vitamin A deficient diet (VAD), iron deficient diet (FeD), vitamin A and iron deficient diet (VAFeD) and all-trans retinoic acid diet (atRA).** Data are means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Statistical differences ( $p < 0.05$ ): \*Comparison with Control group; † Comparison with VAD group; § Comparison with FeD group. (Student's t-test).

**Figure 4. Quantification of the mRNA levels of heme oxygenase-1 (Hmox1) and its catalytic activity in liver (A) and spleen (B) of rats treated with Control diet, vitamin A deficient diet (VAD), iron deficient diet (FeD), vitamin A and iron deficient diet (VAFeD) and all-trans retinoic acid diet (atRA).** Data are means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Statistical differences ( $p < 0.05$ ): \*Comparison with Control group; † Comparison with VAD group; § Comparison with FeD group. (Student's t-test).

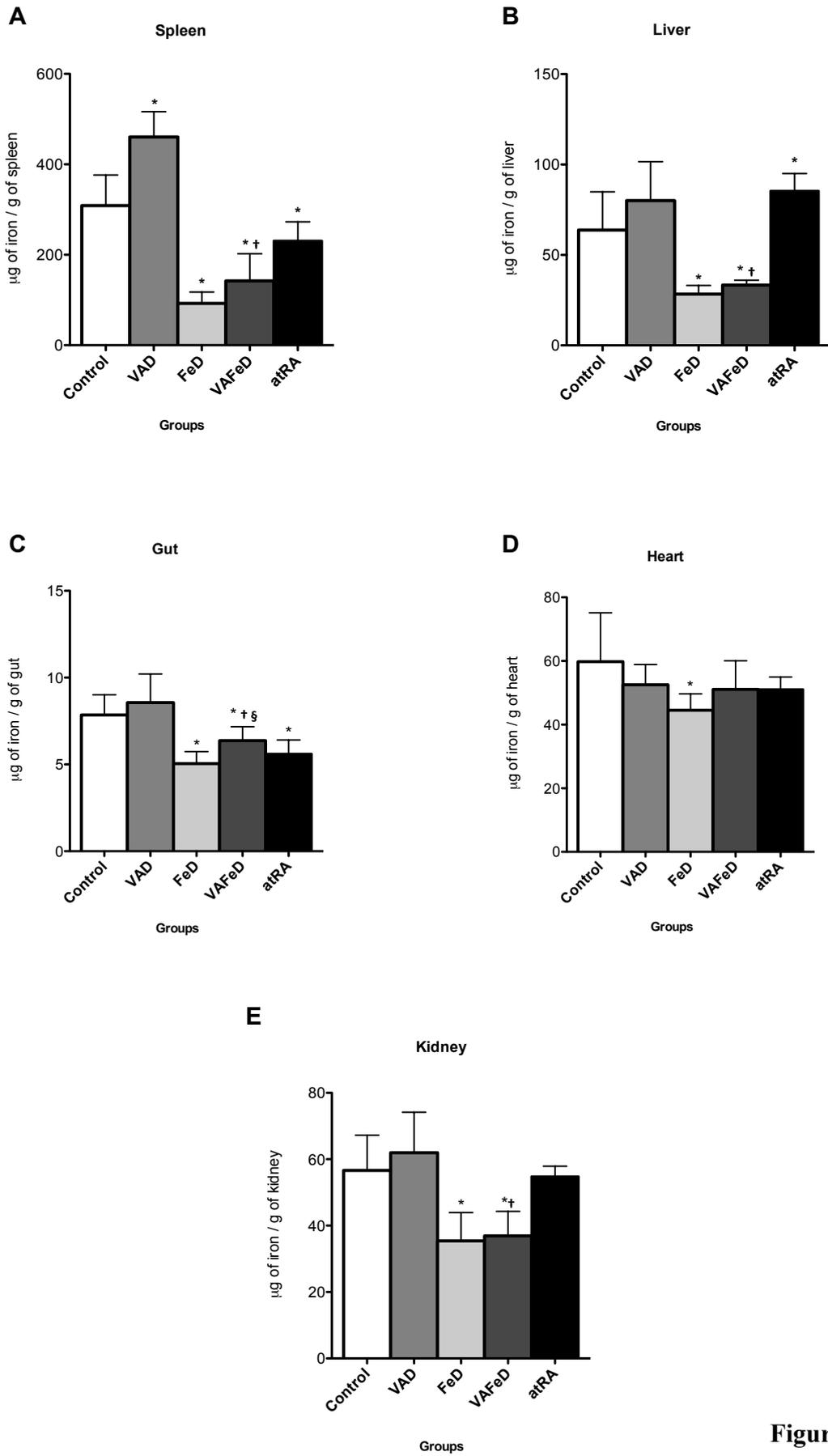


Figure 1

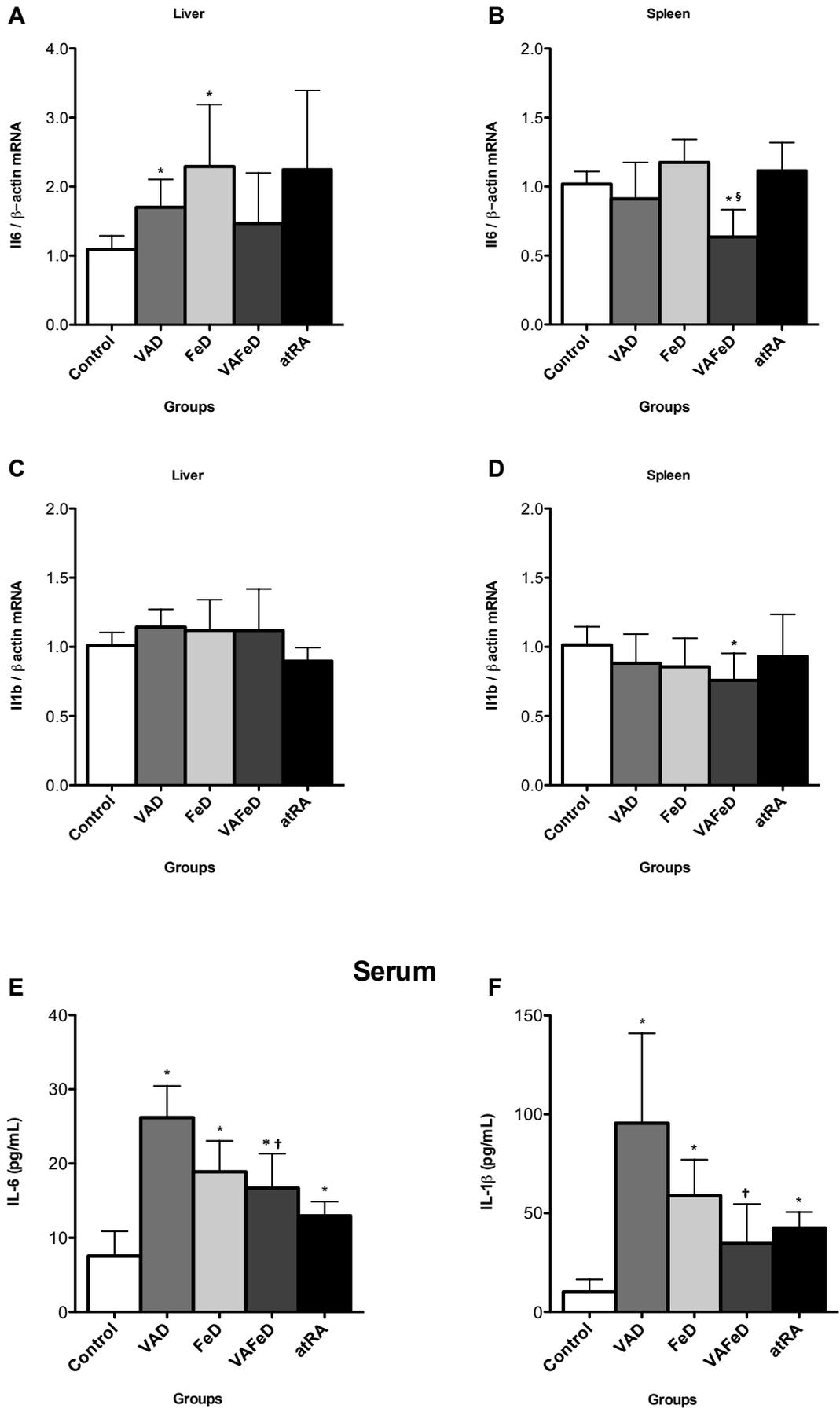


Figure 2

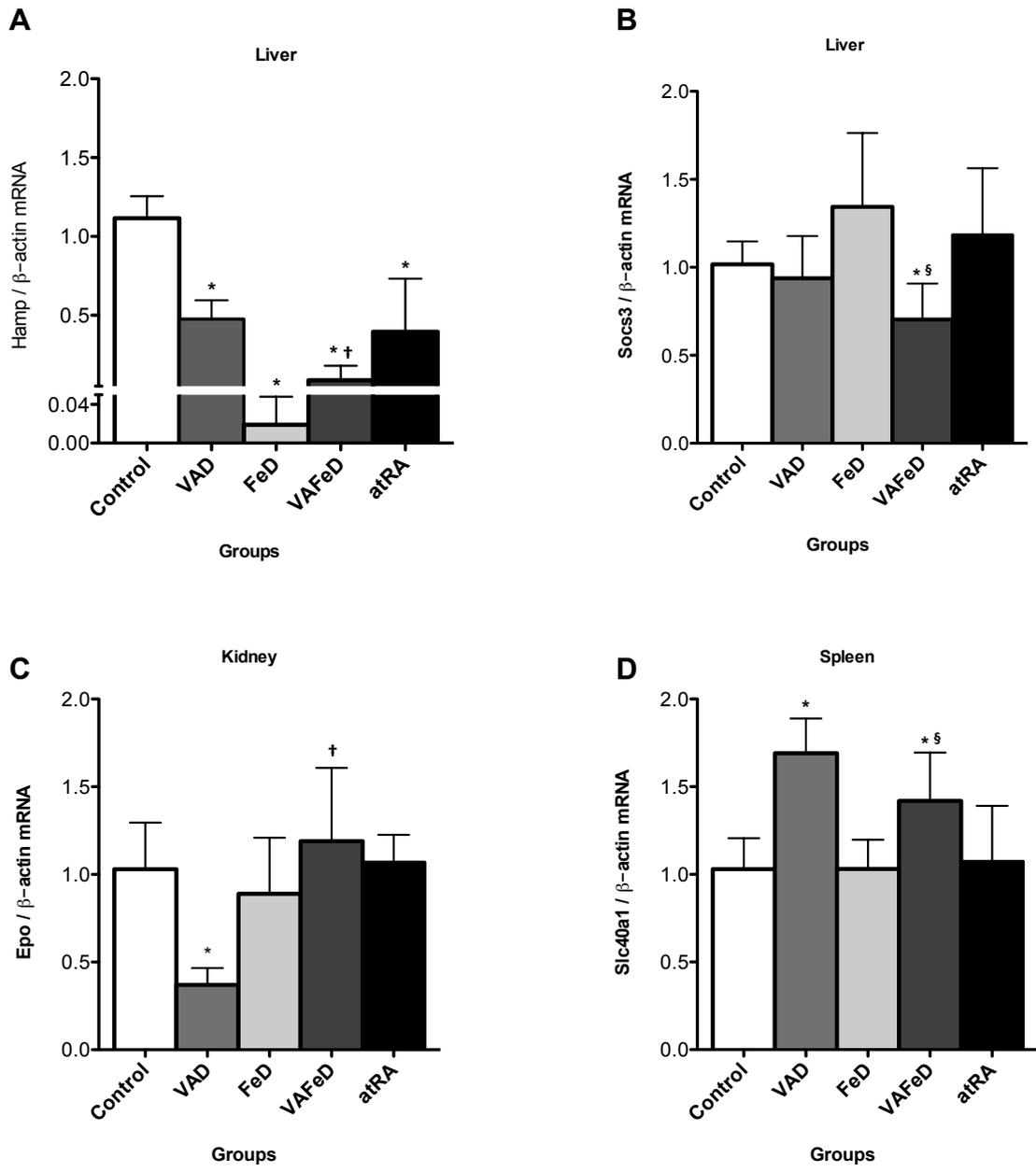
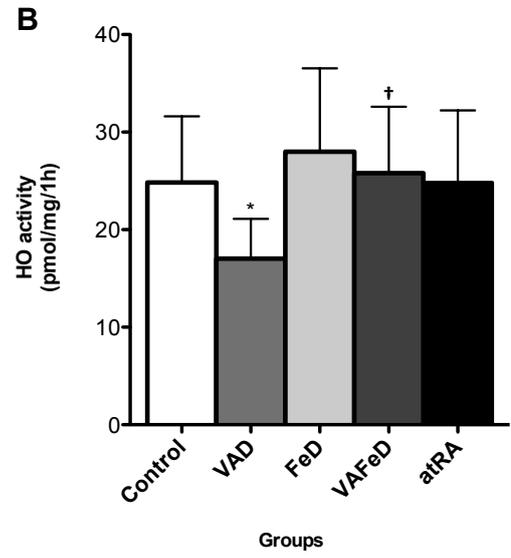
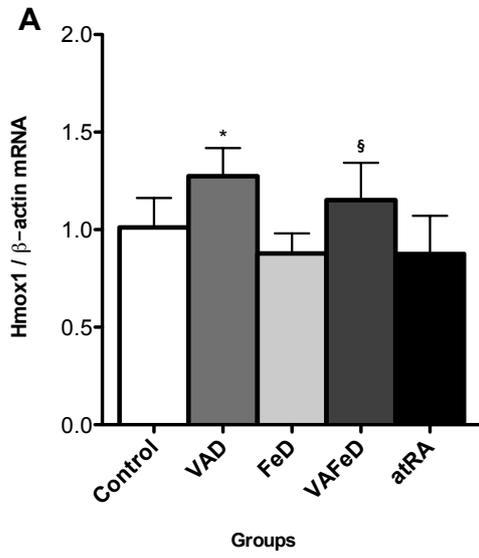


Figure 3

### Liver



### Spleen

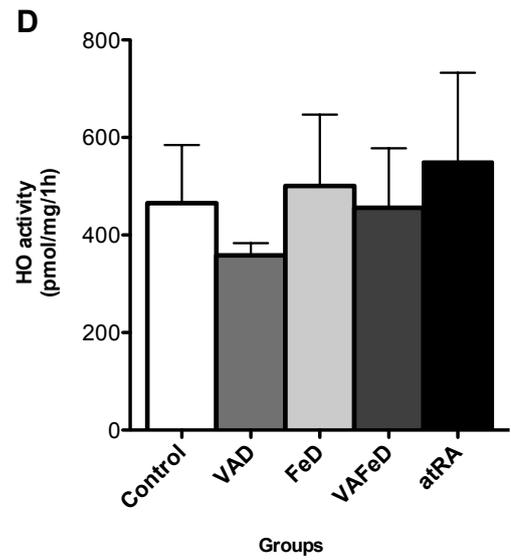
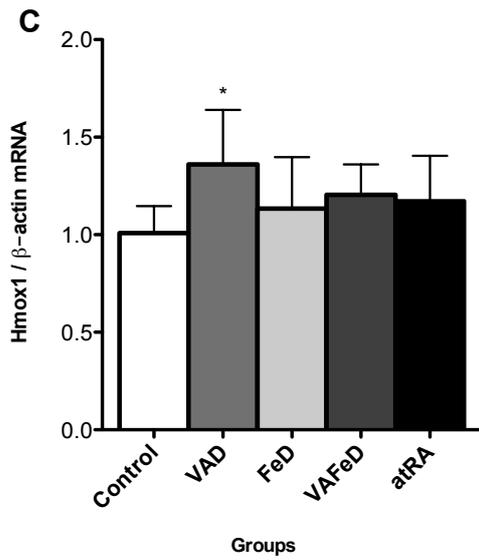


Figure 4