

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

**A deficiência de vitamina A induz a deficiência sistêmica de ferro e reduz os níveis de transcrito hepático de Hamp, apesar de aumentar os níveis de transcritos de Hfe2 e Bmp6**

JULIANA FROSSARD RIBEIRO MENDES

Brasília  
2013

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

**A deficiência de vitamina A induz a deficiência sistêmica de ferro e reduz os níveis de transcrito hepático de Hamp, apesar de aumentar os níveis de transcritos de Hfe2 e Bmp6**

JULIANA FROSSARD RIBEIRO MENDES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de doutor em nutrição humana.

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

Brasília  
2013

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

Comunicamos a aprovação da tese de doutorado da aluna **Juliana Frossard Ribeiro Mendes**, intitulada “**A deficiência de vitamina A induz a deficiência sistêmica de ferro e reduz os níveis de transcrito hepático de Hnf1b, apesar de aumentar os níveis de transcritos de Hnf1a e Bmp6**”, submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília.

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

Prof. Dr. João Felipe Mota  
Membro - Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Goiás (UFG)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Amorim Amato  
Membro - Departamento de Ciências Farmacêuticas – 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>. Egle Machado de Almeida Siqueira  
Suplente - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília (UnB)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e oportunidades de crescimento moral e intelectual.

Aos meus pais Julio e Margareth, as minhas irmãs Marina e Laura e ao meu cunhado Ricardo pelo amor, compreensão e apoio.

A minha orientadora profa Dra Sandra F. Arruda pela oportunidade, orientação presente, incentivo e compreensão.

A profa Dra Egle M. A. Siqueira pela oportunidade, incentivo, compreensão e contribuições para o trabalho.

Aos amigos, colegas e servidores do Laboratório de Biofísica da UnB pela amizade, colaboração e convívio. Obrigada Adriana, Alinne, Azadeh, Chiquinho, Douglas, Fabiani, Fernanda, João Gabriel, Leandro, Lívia, Lorena, Luciano, Marcela, Natália, Santinha.

A Marcela e ao João Gabriel pela contribuição nas análises das amostras.

Aos professores, colegas e servidores do Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB, especialmente a profa Dra Marie Togashi por me receber e pelos ensinamentos.

Aos servidores da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana pela ajuda.

Aos profs Dr João Felipe Mota, Dra Angélica Amorim Amato, Dra Nathália Marcolini Pelúcio Pizato Valério, Dra Egle Machado de Almeida Siqueira e Dra Marina Kiyomi Ito por terem aceitado participar da banca de defesa e pela análise crítica do trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	LEGENDA	PÁGINA
<b>Figura 1</b>	Absorção intestinal, transporte e captação celular da vitamina A. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013. SRB1: <i>scavenger receptor class B type 1</i> ; RBP: proteína ligadora de retinol; CRBP: proteína celular ligadora de retinol.	21
<b>Figura 2</b>	Captação celular de retinoides e sinalização intracelular. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013. ATRA: ácido retinóico todo-trans; 9-cis RA: ácido retinóico 9-cis; RBP: proteína ligadora de retinol; CRBP: proteína celular ligadora de retinol; CRABP: proteína celular ligadora de ácido retinóico; RAR, receptor de ácido retinóico; RARE: elemento responsivo ao ácido retinóico; ADH: álcool desidrogenase; RALDH: retinal desidrogenase.	22
<b>Figura 3</b>	Estágios de diferenciação dos eritrócitos. Fonte: Elliott and Sinclair, 2012. Epo: eritropoetina; BFU-E: unidade formadora de “explosão” de eritróide; CFU-E: unidade formadora de colônia de eritróide.	23
<b>Figura 4</b>	Interação entre os receptores nucleares do ácido retinóico com a região promotora do gene alvo através do elemento responsivo ao ácido retinóico. Fonte: adaptado de Collins et al, 2002. RAR: receptor de ácido retinóico; RXR: receptor de retinoides X; LBD: domínio de ligação de ligante; DBD: domínio de ligação ao DNA; bp: pare de bases; RARE: elemento responsivo ao ácido retinóico.	27
<b>Figura 5</b>	Absorção de ferro, utilização e exportação de ferro pelo enterócito. Fonte: Adaptado de Evstatiev and 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.	32
<b>Figura 6</b>	Regulação intracelular da homeostase de ferro pelo sistema IRE/IRP. Fonte: Adaptado de Evstatiev and Gasche, 2012. IRE: elemento responsivo ao ferro; IRP: proteína reguladora de ferro; UTR: seqüências de nucleotídeos não traduzidos; FBXL5: F-box and leucine-rich repeated protein 5; ISC: centro ferro-enxofre; Ub: ubiquitinação.	38
<b>Figura 7</b>	Vias de regulação da expressão de hepcidina. Fonte: adaptado de Anderson et al, 2009. HFE: proteína da hemocromatose; Tfr1: receptor 1 de transferrina; Tfr2: receptor 2 de transferrina; sHJV: hemojuvelina solúvel; HJV: hemojuvelina; BMP: proteína morfogenética do osso; BMPR-1: receptor 1 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> ; SMAD7: <i>small mother against decapentaplegic 7</i> ; IL-6: interleucina-6; JAK1/2: proteína <i>Janus kinase 1/2</i> ; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3.	47

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	LEGENDA	PÁGINA
<b>Figura 8</b>	Concentração de ferro no fígado (A), intestino (B) e baço (C) de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média ± desvio-padrão; * p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; § p < 0,05 comparado ao grupo FeD.	75
<b>Figura 9</b>	Níveis relativos de transcritos (mRNA) da hepcidina, <i>Hamp</i> (A), Hemojuvelina, <i>Hfe2</i> (B), proteína morfogenética do osso 6, <i>Bmp6</i> (C) e SMAD 7, <i>Smad7</i> (D) no fígado normalizados com os valores de $\beta$ -actina, <i>Actb</i> de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média ± desvio-padrão; * p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; § p < 0,05 comparado ao grupo FeD.	77
<b>Figura 10</b>	Níveis relativos de transcritos (mRNA) do receptor de ácido retinóico alfa, <i>Rara</i> (E) e receptor de retinoides X beta, <i>Rxr<math>\beta</math></i> (F) no fígado normalizados com os valores de $\beta$ -actina, <i>Actb</i> de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média ± desvio-padrão; * p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; § p < 0,05 comparado ao grupo FeD.	78
<b>Figura 11</b>	Níveis relativos de transcritos (mRNA) do transportador de metal divalente 1, <i>Dmt1</i> (A), ferroportina 1, <i>Fpn1</i> (B) e proteína morfogenética do osso 6, <i>Bmp6</i> (C) no intestino normalizados com os valores de $\beta$ -actina, <i>Actb</i> de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média ± desvio-padrão; * p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; § p < 0,05 comparado ao grupo FeD.	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA	LEGENDA	PÁGINA
<b>Tabela 1</b>	Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento, gestação e lactação. Fonte: Reeves et al, 1993.	60
<b>Tabela 2</b>	Composição da mistura mineral da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento, gestação e lactação. Fonte: Reeves et al, 1993.	60
<b>Tabela 3</b>	Composição da mistura vitamínica da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento, gestação e lactação. Fonte: Reeves et al, 1993.	61
<b>Tabela 4</b>	Composição das misturas mineral e vitamínica das diferentes dietas de tratamento. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro; AIN-93G (Reeves et al, 1993).	61
<b>Tabela 5</b>	Genes, número de acesso no <i>GenBank</i> e sequência dos primers (5' – 3') utilizados.	69
<b>Tabela 6</b>	Ganho de massa corporal, ingestão dietética, concentração de ferro na dieta e retinol hepático de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. LD: limite de detecção. Média ± desvio-padrão; * p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; § p < 0,05 comparado ao grupo FeD	73
<b>Tabela 7</b>	Parâmetros hematológicos de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média ± desvio-padrão; * p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; § p < 0,05 comparado ao grupo FeD	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD: anemia da doença crônica (*anemia of chronic disease*)

ACO: aconitase

*Actb*: β-actina (β-actin)

ADH: álcool desidrogenase (*alcohol dehydrogenases*)

atRA: ácido retinóico todo-trans (*all-trans retinoic acid*)

BFU-E: unidade formadora de “explosão” de eritróide (*burst forming unit-erythroid*)

BMP 6 / *Bmp6*: proteína morfogenética do osso 6 (*bone morphogenic protein 6*)

BMPR-1: receptor 1 de BMP

BHT: butil-hidroxitolueno

CFU-E: unidade formadora de colônia de eritróide (*colony forming unit-erythroid*)

CRABP: proteína celular ligadora de ácido retinóico (*cellular retinoic acid binding proteins*)

CRBPII: proteína celular ligadora de retinol II (*cellular retinol binding protein II*)

Cp: ceruloplasmina

CT: controle (*control*)

Cu: cobre

DBD: domínio de ligação ao DNA (*DNA-binding domain*)

*Dcytb*: ferredutase duodenal citocromo b (*citocromo b duodenal ferriredutase*)

DMT1 / *Dmt1*: transportador de metal divalente 1 (*divalent metal transporter 1*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (*desoxirribonucleic acid*)

Epo: eritropoietina (*erythropoietin*)

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

EROS: espécies reativas de oxigênio

FBXL5: *F-box and leucine-rich repeated protein 5*

Fe: ferro (*iron*)

FeD: deficiente em ferro (*iron deficient*)



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FLVCR1: *feline leukemia virus subgroup receptor 1*

Fn: ferritina (*ferritin*)

FPN1 / *Fpn1*: ferroportina 1 (*ferroportin 1*)

GDF-15: fator de crescimento e diferenciação 15 (*growth differentiation factor 15*)

HAMP / *Hamp*: hepcidina (*hepcidin*)

HCl: ácido clorídrico

HCP-1: proteína carreadora de heme – 1

HFE: proteína da hemocromatose

*Hfe2*: *hemochromatosis type 2 (juvenile) homolog*

HJV: hemojuvelina

HNO<sub>3</sub>: ácido nítrico

HOX-1: hemoxigenase-1

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

ICP/AES: espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado

IL: interleucina

IRE: elementos responsivos ao ferro (*iron responsive element*)

IRP: proteínas reguladoras de ferro (*iron regulatory protein*)

ISC: centro ferro-enxofre

JAK: proteína janus kinase (*just another kinase*)

KOH: hidróxido de potássio

LBD: domínio de ligação ao ligante (*ligand binding domain*)

LD: limite de detecção.

LEAP1: *liver-expressed antimicrobial peptide 1*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Mn: manganês

mRNA: RNA mensageiro

NaCl: cloreto de sódio

NRAMP1: proteína dos macrófagos de resistência associada 1 (*natural resistance-associated macrophages protein-1*)

RNA: ácido ribonucleico mensageiro (*ribonucleic acid*)

PFL: *pool de ferro lábil*

PPAR: receptor ativado por proliferador de peroxissomo (*peroxisome proliferator-activated receptors*)

qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa em tempo real

RA: ácido retinóico (*retinoic acid*)

RALDH: retinal dehidrogenase (*retinal dehydrogenases*)

RAR / *Rar*: receptor de ácido retinóico (*retinoic acid receptor*)

RARE: elementos responsivo ao ácido retinoico (*retinoic acid response element*)

RBP: proteína ligadora de retinol (*retinol binding protein*)

-RE: elemento responsivo (*responsive element*)

RXR / *Rxr*: receptor de retinoides x (*retinoid x receptor*)

S: enxofre

*Scl11a1*: *solute carrier family 11 member 1*

*Scl11a2*: *solute carrier family 11 member 2*

*Slc40a1*: *solute carrier family 40, member 1*

SHJV: hemojuvelina solúvel (*soluble hemojuvelin*)

SMAD / *Smad*: *small mothers against decapentaplegic*

SOCS3: supressor de sinalização de citocina 3 (*suppressor of cytokine signaling 3*)

ST: saturação da transferrina (*transferrin saturation*)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*

STEAP: *six-transmembrane epithelial antigen of the prostate*

Tf: transferrina

TfR: receptor de transferrina

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformador  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )

TIBC: capacidade total de ligação ao ferro (*total iron binding capacity*)

TMPRSS6: *type II transmembrane serine protease*

TWSG1: *twisted gastrulation protein 1*

Ub: ubiquitinação

UIBC: capacidade latente de ligação ao ferro da transferrina (*unsaturated iron binding capacity*)

UTR: regiões não traduzidas (*untranslated region*)

VAD: deficiente em vitamina A (*vitamin A deficient*)

VAFeD: deficiente em vitamina A e ferro (*vitamin A and iron deficient*)

TTNPB: 4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl]benzoic

Zn: zinco

## SUMÁRIO

ITEM	DESCRIÇÃO	PÁGINA
	<b>RESUMO</b>	14
	<b>ABSTRACT</b>	15
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
<b>2.1</b>	VITAMINA A	18
<b>2.1.1</b>	Vitamina A: deficiência, conceito, fontes dietéticas e metabolismo	18
<b>2.1.2</b>	Vitamina A e eritropoiese	22
<b>2.1.3</b>	A ação genômica dos retinoides e os receptores nucleares	24
<b>2.2</b>	<b>METABOLISMO DO FERRO</b>	29
<b>2.2.1</b>	Ferro: funções, formas dietéticas, absorção intestinal e transporte na corrente sanguínea	29
<b>2.2.2</b>	Mecanismos de regulação intracelular da homeostase do ferro	36
<b>2.2.3</b>	Mecanismos de regulação sistêmica da homeostase do ferro	38
<b>2.2.4</b>	Anemia da doença crônica	49
<b>2.3</b>	INTERAÇÃO ENTRE A VITAMINA A E O METABOLISMO DO FERRO	52
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	56
<b>3.1</b>	OBJETIVO GERAL	56
<b>3.2</b>	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	57
<b>4.1</b>	ANIMAIS	57
<b>4.2</b>	PREPARO E COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS DIETAS	59
<b>4.3</b>	CONCENTRAÇÃO DE RETINOL HEPÁTICO	61
<b>4.4</b>	CONCENTRAÇÃO DE FERRO TECIDUAL E NA DIETA	62
<b>4.5</b>	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS RELACIONADOS AO <i>STATUS</i> DE FERRO	63
<b>4.5.1</b>	Ferro sérico	63
<b>4.5.2</b>	Capacidade latente e total de ligação ao ferro e saturação da transferrina	64
<b>4.6</b>	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITO (mRNA)	65
<b>4.6.1</b>	Extração do RNA total e síntese do cDNA	65
<b>4.6.2</b>	Quantificação dos níveis de transcritos (mRNA) por meio da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	68
<b>4.7</b>	ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	72
<b>5.1</b>	EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NO GANHO DE PESO, NÍVEIS HEPÁTICOS DE RETINOL E <i>STATUS</i> DE FERRO	72

## SUMÁRIO

ITEM	DESCRIÇÃO	PÁGINA
5.2	EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NOS NÍVEIS HEPÁTICOS DE mRNA DE GENES ENVOLVIDAS NA HOMEOSTASE SISTÊMICA DO FERRO: NÍVEIS DE TRANSCRITO DA <i>Hamp</i> , <i>Hfe2</i> , <i>Bmp6</i> e <i>Smad7</i>	75
5.3	EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NOS NÍVEIS HEPÁTICOS DE mRNA DE GENES DOS RECEPTORES NUCLEARES: NÍVEIS DE TRANSCRITO DO <i>Rar<math>\alpha</math></i> e <i>Rxr<math>\beta</math></i>	77
5.4	EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NOS NÍVEIS INTESTINAIS DE mRNA DE GENES ENVOLVIDAS NA HOMEOSTASE SISTÊMICA DO FERRO: NÍVEIS DE TRANSCRITO DO <i>Dmt1</i> , <i>Fpn1</i> e <i>Bmp6</i>	79
6	<b>DISCUSSÃO</b>	81
7	<b>CONCLUSÃO</b>	90
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	92
	<b>ANEXOS</b>	112
	ANEXO I – Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília	113
	ANEXO II – Artigo a ser submetido a periódico indexado para publicação	115

## RESUMO

**Introdução:** As deficiências de vitamina A e ferro são as carências nutricionais mais prevalentes no mundo. Estudos recentes sugerem que existe uma inter-relação entre a vitamina A e o metabolismo do ferro, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão esclarecidos. Os retinoides modulam a expressão de diversos genes por meio da ligação aos receptores nucleares, como os receptores de ácido retinoico e receptores de retinoides X. Considerando que a hepcidina é responsável pela regulação sistêmica da homeostase do ferro e tem a sua expressão regulada em parte através da via de sinalização da hemojuvelina-proteína morfogenética do osso 6 - proteínas SMAD, o presente estudo avaliou o efeito da deficiência de vitamina A nos biomarcadores do *status* de ferro, nos níveis de transcritos de genes envolvidos na via de sinalização HJV-BMP-SMAD, e o possível envolvimento dos receptores nucleares RAR e RXR na manutenção da homeostase de ferro pela vitamina A. **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 com ácido retinoico todo-*trans* (atRA). Os parâmetros hematológicos foram determinados utilizando kits comerciais. O fígado, intestino e baço foram removidos para determinação da concentração de ferro por espectroscopia de emissão atômica. Os níveis hepáticos de retinol foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência. No fígado foram determinados os níveis de mRNA da hepcidina (*Hamp*), hemojuvelina (*Hfe2*), proteína morfogenética do osso 6 (*Bmp6*), SMAD 7 (*Smad7*), receptor de ácido retinóico alfa (*Rarα*), receptor de retinoides X beta (*Rxrβ*), e no intestino os níveis de mRNA do transportador de metal divalente 1 (*Dmt1*) e ferroportina 1 (*Fpn1*), por sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo-real (qRT-PCR). 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) promoveu a redução dos níveis séricos de ferro e da saturação de transferrina, acúmulo de ferro no baço, aumento dos níveis de mRNA da *Bmp6* e *Hfe2* e diminuição de *Hamp*, *Smad7* e *Rarα* no fígado, além da redução dos níveis de mRNA da *Fpn1* no intestino. Os ratos tratados com dieta deficiente em ferro (FeD) apresentaram redução dos níveis séricos de ferro, da saturação de transferrina, da concentração de ferro no fígado, intestino e baço e diminuição dos níveis de mRNA de *Bmp6*, *Hfe2*, *Hamp* e *Smad7* no fígado. A associação das deficiências de vitamina A e ferro (VAFeD) promoveu a redução dos níveis séricos de ferro, da saturação de transferrina, da concentração de ferro no fígado, intestino e baço e dos níveis hepáticos de mRNA da *Hamp* e *Smad7*. A substituição do estér de retinil pelo atRA na dieta promoveu uma redução dos níveis séricos de ferro, aumento da concentração de ferro no fígado e redução no intestino e baço, também apresentaram diminuição dos níveis de mRNA hepáticos de *Hamp* e aumento de *Rarα*, além de reduzir os níveis de mRNA de *Dmt1*, *Fpn1* e aumentar o *Bmp6* no intestino. **Conclusão** Os resultados do presente estudo sugerem que a deficiência dietética de vitamina A promove uma redução da disponibilidade sistêmica de ferro com concomitante acúmulo desse micronutriente no baço. A deficiência sistêmica de ferro promovida pela deficiência de vitamina A, diminui a disponibilidade de ferro para a eritropoiese, sugerindo que o sinal eritróide prevaleça na regulação da expressão de *Hamp*. Os resultados sugerem ainda que a deficiência de vitamina A modula a transcrição da hepcidina no fígado de maneira indireta, não envolvendo o receptor *Rarα*. **Palavras-chave** deficiência de vitamina A, *status* de ferro, hemojuvelina, proteína morfogenética do osso 6, receptor nuclear de ácido retinóico, transcrição.

## ABSTRACT

**Introduction** Vitamin A and iron deficiencies are the most prevalent nutritional deficiencies in the world. Although recent studies suggest that there is an interrelationship between vitamin A and iron metabolism, the mechanisms involved remain unclear. Retinoids modulate the expression of various genes by binding to nuclear receptors such as the retinoic acid receptors and retinoid X receptors. Whereas hepcidin is responsible for regulating systemic iron homeostasis and its expression is regulated in part through the signaling pathway of hemojuvelin-bone morphogenetic protein 6 - SMAD proteins, the present study evaluated the effect of vitamin A deficiency in iron status biomarkers, the transcript levels of genes involved in signaling pathway HJV-BMP-SMAD, and the possible involvement of nuclear receptors, RAR and RXR in the maintenance of iron homeostasis by vitamin A. **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). Hematological parameters were obtained using commercial kits. Liver, intestine and spleen were removed for determination of iron concentration by atomic emission spectroscopy. The retinol hepatic levels were obtained by high performance liquid chromatography. Were determined in liver and intestine, the mRNA levels of hepcidin (*Hamp*), hemojuvelin (*Hfe2*), bone morphogenetic protein 6 (*Bmp6*), SMAD 7 (*Smad7*), retinoic acid receptor alpha (*Rar $\alpha$* ) receptor retinoid X beta (*Rxr $\beta$* ), divalent metal transporter 1 (*Dmt1*) and ferroportin 1 (*Fpn1*), system by polymerase chain reaction in real-time (qRT-PCR). 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** Vitamin A deficiency (VAD) caused a decrease in serum iron and transferrin saturation, spleen iron accumulation, increased of *Bmp6* and *Hfe2* mRNA levels and decreased *Hamp*, *Smad7* and *Rar $\alpha$*  in liver, and the reduction mRNA levels of *Fpn1* in the intestine. The rats treated with iron deficient diet (FeD) decreased serum iron levels, transferrin saturation, iron concentrations in the liver, intestine, and spleen and decreased of *Bmp6*, *Hfe2*, *Hamp* and *Smad7* mRNA levels in liver. The association of vitamin A and iron deficiency (VAFeD) also caused a decrease in serum iron, transferrin saturation, iron concentrations in the liver, intestine and spleen, and *Hamp* and *Smad7* mRNA hepatic levels. The replacement of retinyl ester by atRA in diet (atRA) caused a decrease in serum iron levels, increased iron concentrations in the liver and spleen, decreased iron concentrations in the intestine, lower *Hamp* and increased *Rar $\alpha$*  hepatic mRNA levels and, reduced *Dmt1* and *Fpn1* mRNA levels with increased *Bmp6* in intestine. **Conclusion** The results of this study suggest that dietary vitamin A deficiency promotes a reduction in iron systemic availability with concomitant spleen accumulation. Systemic iron deficiency promoted by vitamin A deficiency, reduces the iron availability for erythropoiesis, suggesting that the erythroid signal prevail in the regulation of *Hamp* transcription. The results suggest that vitamin A deficiency modulates hepcidin expression in the liver in an indirect way, not involving the *Rar $\alpha$* .

**Keywords** vitamin A deficiency, iron status, hemojuvelin, bone morphogenetic protein 6, retinoic acid receptor, transcription.

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência de vitamina A atinge cerca de 250 milhões de pessoas (Strube et al, 2002) e por isso, é considerada juntamente com a deficiência de ferro, a carência nutricional mais prevalente no mundo (Martínez-Navarrete et al, 2002; Brasil, 2007; Assumption et al, 2007). Estudos recentes sugerem que existe uma interação entre a vitamina A e o metabolismo de ferro (Citelli et al, 2012; Jiang et al, 2011; Tsuchiya et al, 2009). Sendo que, em animais com deficiência de vitamina A, tem sido observada uma redução significativa da disponibilidade sistêmica de ferro com concomitante acúmulo desse mineral nos tecidos, principalmente no baço (Arruda et al, 2009; Tsuchiya et al, 2009).

Embora dados preliminares demonstrem que a vitamina A interfere no metabolismo do ferro (Arruda et al, 2009), o mecanismo de ação dos retinoides na expressão de genes e proteínas envolvidos na manutenção da homeostase de ferro não está esclarecido. Diversos processos fisiológicos, como a proliferação, diferenciação, a morfogênese e a apoptose celular, o ciclo visual e a resposta do sistema imune são modulados pelos retinoides, derivados da vitamina A. Sendo que, o ácido retinóico todo-trans (atRA), forma mais ativa dos retinoides, modula a expressão de vários genes em nível transcricional por meio da ligação aos receptores nucleares, receptor de ácido retinóico (RAR) e receptor de retinoides X (RXR), que atuam como fatores de transcrição (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Theosídeo et al, 2010).

A hepcidina, um peptídeo com ação hormonal secretado principalmente pelo fígado, é essencial para a regulação sistêmica da homeostase do ferro. Sua principal função é controlar a entrada de ferro na circulação sanguínea através da interação com a ferroportina, uma proteína exportadora de ferro presente na membrana basolateral dos



enterócitos, macrófagos e hepatócitos, promovendo sua internalização e degradação. Assim, a hepcidina inibe a liberação de ferro dos tecidos e a absorção intestinal do ferro proveniente da dieta quando as reservas corporais estão repletas (Anderson et al, 2009; Hentze et al, 2010).

A expressão da hepcidina é regulada pelas reservas de ferro, eritropoiese e hipóxia (Evstatiev and Gasche, 2012). A via que modula a expressão da hepcidina em resposta ao *status* de ferro parece ser dependente da proteína morfogenética do osso 6 (BMP 6) e da hemojuvelina (HJV). Essa regulação seria iniciada pela ligação da BMP 6 ao seu receptor de membrana que, em seguida, interage com a HJV de membrana, induzindo a fosforilação das proteínas SMAD 1, 5 e 8 que então, se complexa com a proteína SMAD 4, no citoplasma. Esse complexo é translocado para o núcleo, induzindo a expressão do gene da hepcidina (Hentze et al, 2010; Lee et al, 2010; Zhang et al, 2010). A via de sinalização HJV-BMP-SMAD também induz reguladores negativos, como SMAD 7, que através de um mecanismo de *feedback* negativo impede a superexpressão da hepcidina (Evstatiev and Gasche, 2012).

Com o objetivo de explorar como a deficiência de vitamina A altera o metabolismo de ferro, o presente estudo avaliou biomarcadores do *status* de ferro, os níveis de transcritos de genes envolvidos na via de sinalização HJV-BMP-SMAD assim como, o possível envolvimento dos receptores nucleares RAR e RXR na manutenção da homeostase de ferro pela vitamina A.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. VITAMINA A

#### 2.1.1. VITAMINA A: DEFICIÊNCIA, CONCEITO, FONTES DIETÉTICAS E METABOLISMO

A deficiência de vitamina A é um importante problema de saúde pública mundial, que contribui significativamente para a carga global de doenças. Distúrbios associados à deficiência de vitamina A incluem a xerofthalmia, principal causa de cegueira evitável, e o aumento do risco de doenças infecciosas. Os grupos mais atingidos pela deficiência de vitamina A são crianças, mulheres em idade fértil e gestantes. A Organização Mundial de Saúde em 2009 estimou que 5,2 milhões de crianças em idade pré-escolar haviam sido afetadas pela cegueira noturna e 190 milhões apresentavam baixos níveis séricos de retinol. Enquanto, 9,75 milhões de gestantes de áreas de risco tinham cegueira noturna e 19,1 milhões apresentavam baixas concentrações séricas de retinol (WHO, 2009; Sherwin et al, 2012).

A avaliação do *status* de vitamina A em indivíduos é difícil, uma vez que a vitamina A está ligada a uma proteína ligadora de retinol quando estocada no fígado e quando liberada na corrente sanguínea, tornando os métodos de detecção pouco sensíveis. Os níveis séricos de retinol aumentam com a idade e em adultos saudáveis estão entre 1 e 3  $\mu\text{mol/L}$ . Concentrações séricas de retinol abaixo de 1,05  $\mu\text{mol/L}$  indicam risco potencial de um inadequado *status* de vitamina A e abaixo de 0,70  $\mu\text{mol/L}$  indicam deficiência de vitamina A (Conaway et al, 2013), sendo considerada um quadro de hipovitaminose A severa quando esses níveis se encontram abaixo de 0,35  $\mu\text{mol/L}$ . A avaliação da deficiência de vitamina A também pode ser realizada pelos

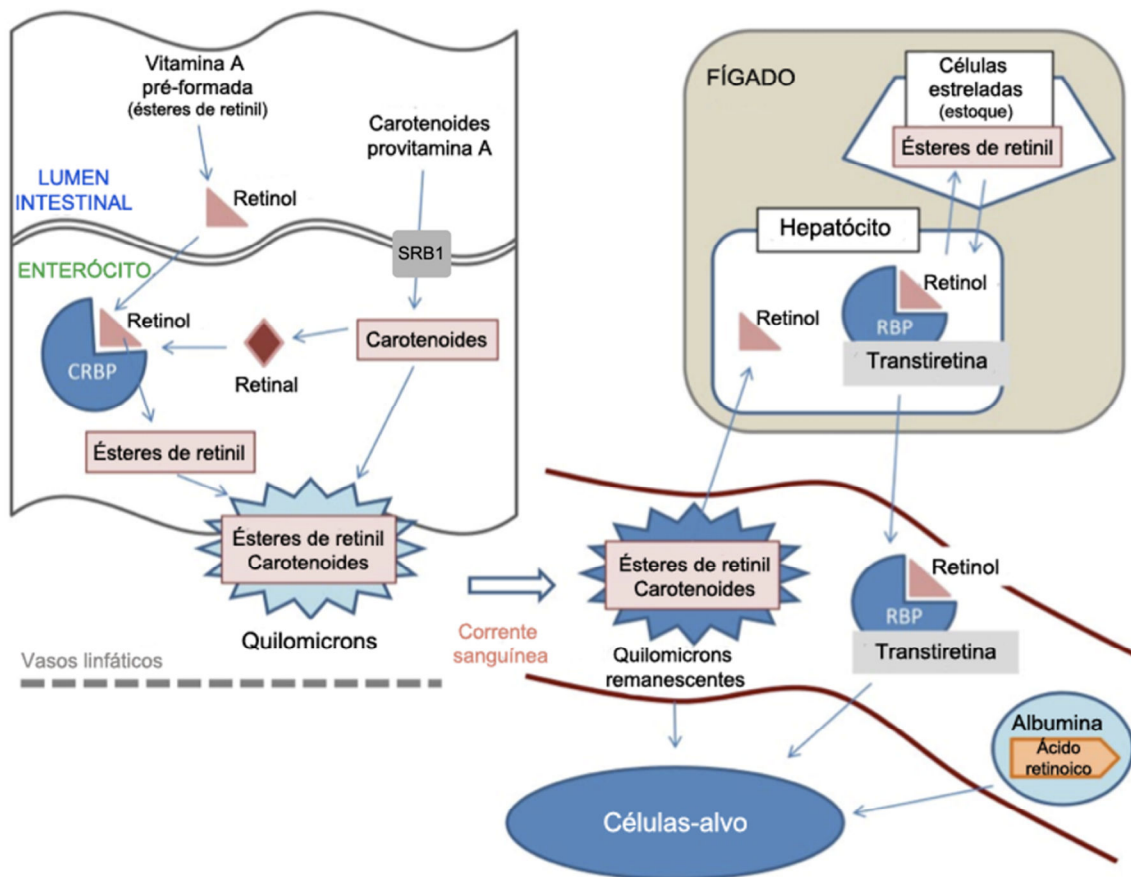
níveis de retinol no fígado, sendo indicativo de deficiência concentrações menores que 0,07  $\mu\text{mol/g}$  de fígado (WHO, 2009; Sherwin et al, 2012). Níveis de retinol no fígado acima de 1  $\mu\text{mol/g}$  de fígado são considerados sub-tóxicos e a partir de 10  $\mu\text{mol/g}$  de fígado, tóxicos (Tanumihardjo, 2011).

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel essencial para o desenvolvimento embrionário, a reprodução, a visão, a diferenciação, crescimento e apoptose celular, além de modular o sistema imune (Theodosiou et al, 2010). O termo vitamina A é utilizado para qualquer composto que possua atividade biológica de retinol, como os ésteres de retinil, retinol, retinal e ácido retinóico (*retinoic acid* – RA). Em relação à estrutura química, os retinoides se caracterizam por possuírem 4 unidades isoprenóides unidas (Conaway et al, 2013). Sendo que, o grupo funcional caracteriza o retinoide: hidroxil (retinol), aldeído (retinal), ácido carboxílico (ácido retinóico), ou uma molécula de retinol associada a um ácido graxo por uma ligação tipo éster (éster de retinil ou palmitato de retinil).

Os mamíferos obtêm a vitamina A através da ingestão de alimentos de origem animal, na forma de ésteres de retinil e de alimentos de origem vegetal que contenham compostos com atividade pró-vitamina A, como os carotenoides. São fontes dietéticas de vitamina A, de origem animal: o fígado, a manteiga, os queijos, os ovos, o salmão, a cavala e o arenque. E são fontes dietéticas de moléculas precursoras de vitamina A, de origem vegetal: as frutas e hortaliças coloridas, como cenoura, batata doce, vegetais verdes, tomates, laranjas e melão. A vitamina A é armazenada no fígado na forma esterificada e transcricionalmente inativa, e no tecido adiposo (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Amann et al, 2011; Conaway et al, 2013; Cribb et al, 2013).

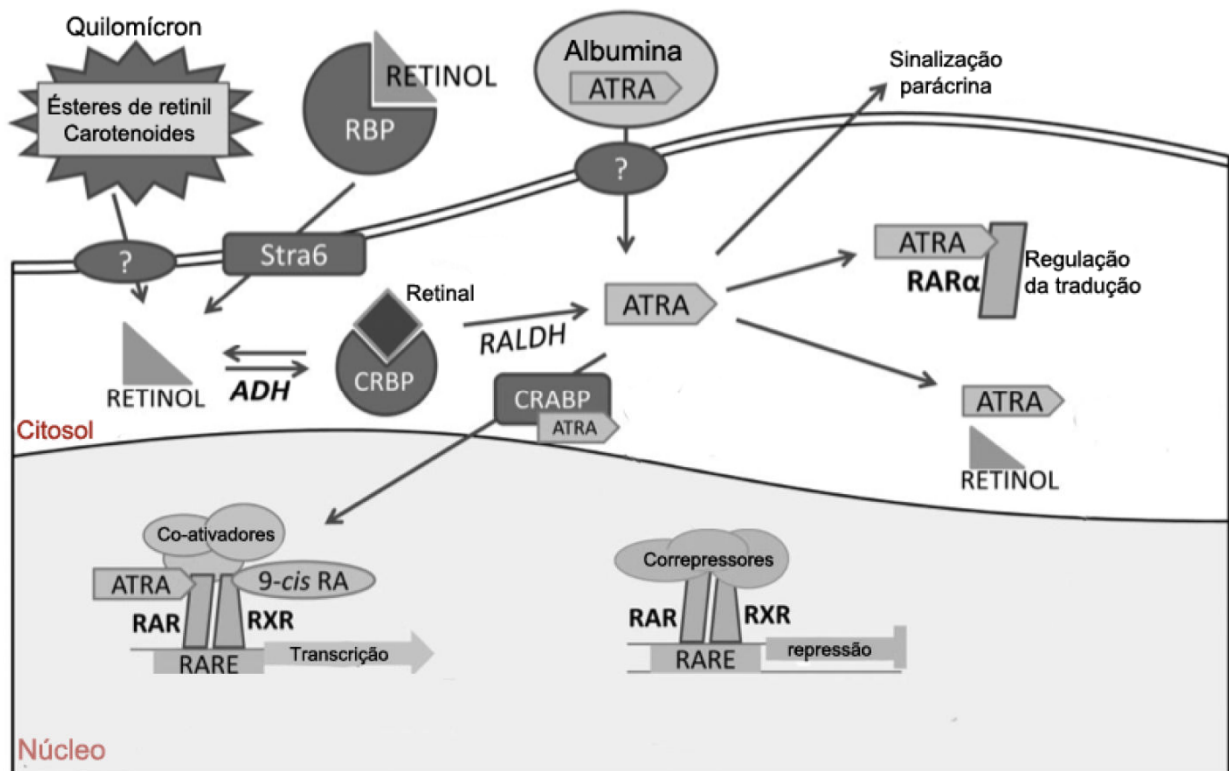
No lúmen intestinal, os ésteres de retinil dietéticos são hidrolisados a retinol por enzimas intestinais e pancreáticas, emulsificados pela bile junto com os ácidos graxos

da dieta e então, absorvidos por difusão passiva pelos enterócitos localizados na porção proximal do intestino delgado. Por ser insolúvel em água, o retinol é ligado a proteína celular ligadora de retinol II (*cellular retinol binding protein II* – CRBP<sub>II</sub>) e então, reesterificada a ésteres de retinil. Esses ésteres de retinil em conjunto com outros lipídios, como triacilgliceróis e colesterol, são incorporados a quilomícrons e transportados pelos vasos linfáticos (D'Ambrosi et al, 2012; Conaway et al, 2013). Os quilomícrons remanescentes, formados após a hidrólise dos quilomícrons pela lipoproteína lipase, chegam à circulação portal e são captados pelos hepatócitos por endocitose mediada por receptor. No hepatócito, os ésteres de retinil são hidrolisados. Se não existir demanda corporal pelo retinol, estes são reesterificados a ésteres de retinil e retidos nas células estreladas do fígado. O fígado é o maior órgão de armazenamento, retendo cerca de 70% da vitamina A presente no organismo na forma de ésteres de retinil. Quando existe demanda fisiológica, os ésteres de retinil estocados nas células estreladas são hidrolisados a retinol e complexados a proteína ligadora de retinol (*retinol binding protein* – RBP), possibilitando seu transporte pela circulação sanguínea, onde se ligam a proteína transtiretina (*transthyretin*) que é sintetizada no fígado e previne que o complexo retinol - RBP seja reciclado nos rins. Os retinoides podem ser captados pelos tecidos extra-hepáticos nas formas: complexo retinol - RBP - transtiretina, retinol todo-trans associado a RBP, diretamente dos quilomícrons remanescentes ou ácido retinóico todo-trans associado a albumina (Figura 1; D'Ambrosi et al, 2012; Conaway et al, 2013).



**FIGURA 1** Absorção intestinal, transporte e captação celular da vitamina A. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013. SRB1: *scavenger receptor class B type 1*; RBP: proteína ligadora de retinol; CRBP: proteína celular ligadora de retinol.

O metabolismo dos retinoides, nas células alvo, envolve variadas e diferentes vias de sinalização, proteínas de ligação e receptores. Após captação celular e conforme a demanda fisiológica, o retinol é oxidado a retinal todo-trans pela enzima citossólica álcool desidrogenase (*alcohol dehydrogenases* – ADH), reação reversível, e ligada a CRBP. Então, o retinal todo-trans é oxidado a ácido retinóico todo-trans, a forma mais ativa biologicamente dos retinoides, pela enzima retinal desidrogenase (*retinal dehydrogenases* – RALDH), sendo essa reação irreversível. No citosol, o ácido retinoico se liga à proteína celular ligadora de ácido retinóico (*cellular retinoic acid binding proteins* – CRABP) que o direciona para o núcleo da célula, onde exercem seus efeitos por meio da ligação aos receptores nucleares (Figura2; D'Ambrosi et al, 2012; Tanumihardjo, 2011; Conaway et al, 2013).

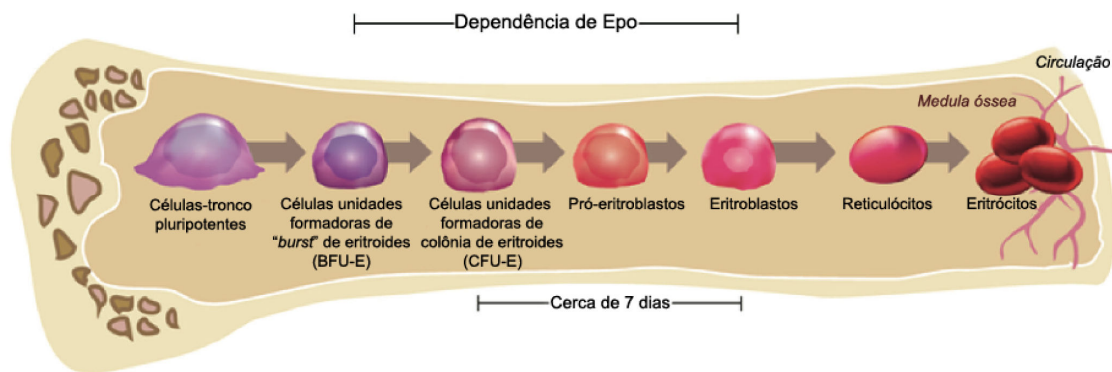


**FIGURA 2** Captação celular de retinoides e sinalização intracelular. Fonte: Conaway, Henning e Lerner, 2013. ATRA: ácido retinóico todo-trans; 9-cis RA: ácido retinóico 9-cis; RBP: proteína ligadora de retinol; CRBP: proteína celular ligadora de retinol; CRABP: proteína celular ligadora de ácido retinóico; RAR, receptor de ácido retinóico; RARE: elemento responsivo ao ácido retinóico; ADH: álcool desidrogenase; RALDH: retinal desidrogenase.

### 2.1.2. VITAMINA A E ERITROPOIESE

A maturação das células vermelhas do sangue ocorre na medula óssea. Proveniente de células tronco pluripotentes, o primeiro precursor das células eritróides é a unidade formadora de “explosão” de eritróide (*burst forming unit-erythroid* – BFU-E), seguida pela unidade formadora de colônia de eritróide (*colony forming unit-erythroid* – CFU-E). Esses precursores não possuem características morfológicas de uma célula hematopoiética primitiva, no entanto, expressam receptores para a eritropoietina (*erythropoietin* – EPO), marcadores na superfície celular, intermediadores de sinalização e fatores de transcrição. As primeiras células precursoras com características morfológicas de células eritróides são os pro-

eritoblastos que se diferenciam sequencialmente em eritoblastos, reticulócitos e eritrócitos, quando são liberados na corrente sanguínea. Os estágios de maturação morfológica incluem a redução gradual do tamanho da célula, condensação do núcleo, acidificação do citoplasma e aumento na concentração de hemoglobina. Após determinado tempo na circulação, os eritrócitos começam a expressar a fosfatidilserina que é reconhecida pelos macrófagos que então degradam os eritrócitos senescentes e reciclam a maioria dos componentes destas células (Figura 3; Ingley et al, 2004; Kalantar-Zadeh et al, 2009; Elliott and Sinclair, 2012).



**FIGURA 3** Estágios de diferenciação dos eritrócitos. Fonte: Elliott and Sinclair, 2012. Epo: eritropoietina; BFU-E: unidade formadora de "explosão" de eritróide; CFU-E: unidade formadora de colônia de eritróide.

A EPO é o principal regulador da maturação das células eritróides, sendo produzida pelo fígado no feto e pelo rim no adulto em resposta a tensão de oxigênio. A EPO é um hormônio que atua por meio da ligação ao receptor de eritropoietina presente na superfície das células eritróides progenitoras. A EPO induz a sobrevivência das células eritróides progenitoras, sua proliferação e diferenciação (Ingley et al, 2004; Elliott and Sinclair, 2012).

Estudos têm demonstrado que ácido retinóico parece interferir na eritropoiese. Yu et al (2010) observaram que o atRA aumenta a geração de células hematopoiéticas

progenitoras a partir de células tronco embrionárias. E ainda, em conjunto com a EPO $\beta$ , o ácido retinóico todo-trans (*all-trans retinoic acid* – atRA) tem sido utilizado no tratamento de anemias de síndromes mielodisplásicas como agente estimulador da eritropoiese (Itzykson et al, 2009).

A literatura demonstra a associação do ácido retinóico à expressão do gene da EPO (*Epo*), sugerindo que esse retinoide interfira na eritropoiese modulando a expressão da *Epo*. Okano et al (1994) observaram que o ácido retinoico foi capaz de aumentar os níveis de mRNA e da proteína EPO em células de hepatoma. Além disso, os autores observaram que a administração de atRA em ratos deficientes em vitamina A elevou os níveis séricos de EPO. Makita et al (2001) identificaram um elemento responsivo ao ácido retinoico (do inglês, retinoic acid response element – RARE) na região promotora da *Epo* e observaram que em ratos *knockout* no receptor nuclear Rxra apresentaram redução significativa dos níveis de mRNA da *Epo*. Esses resultados sugerem que o ácido retinóico atua diretamente sobre a modulação da expressão da *Epo* por meio da ligação ao receptor RXR, interferindo assim na eritropoiese.

Assim, a vitamina A parece atuar sobre a eritropoiese por meio da modulação da expressão da eritropoietina que atua na diferenciação, proliferação e sobrevivência das células da série vermelhas do sangue.

### 2.1.3. A AÇÃO GENÔMICA DOS RETINOIDES E OS RECEPTORES NUCLEARES

Os retinoides compreendem um amplo grupo de compostos derivados da vitamina A com ocorrência natural, de estrutura e/ou atividade biológica análogas ao retinol. Entre os retinoides estão o retinil palmitato, retinol todo-trans, ácido retinoico todo-trans, ácido retinoico 9-cis e ácido retinoico 13-cis. Sendo que, o atRA e o 9-cis

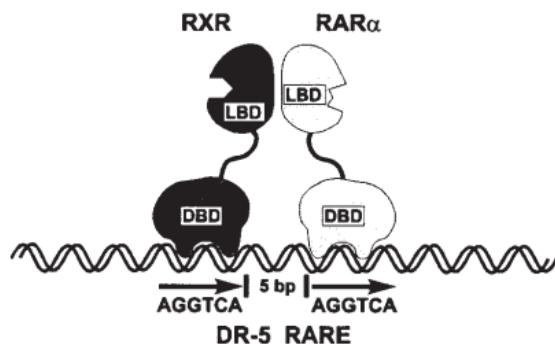


são as formas mais ativas dos retinoides, apresentando atividade regulatória em processos celulares como a diferenciação e crescimento, controle do ciclo, resposta ao dano e apoptose. (Boehm et al, 1995; Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Theodosiou et al, 2010).

A atividade biológica dos retinoides pode ser mediada por efeitos genômicos e não genômicos. Os efeitos genômicos ocorrem através da regulação transcricional de genes alvo por meio da ligação a receptores nucleares (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Theosídeo et al, 2010; Brun et al, 2013). Mais de 500 genes foram identificados como alvos de regulação pelo ácido retinóico (Balmer and Blomhoff, 2002). Já os efeitos não genômicos ocorrem independentemente da regulação transcricional de genes, e podem envolver ou não a ligação a receptores nucleares. São exemplos de efeitos não genômicos dos retinoides: a inibição da tradução de mRNAs através da ligação dos receptores nucleares não associados aos seus ligantes; a alteração dos níveis de cálcio intracelulares mediada pela sinalização fosfolipase C (PLC) e fosfatidil inositol 3 fosfato (IP<sub>3</sub>) ativada pela ligação de RA ao receptor nuclear; e a repressão de fatores de transcrição e ligação direta em sítios de proteínas (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Theosídeo et al, 2010; Brun et al, 2013).

Os receptores de ácido retinoico pertencem a superfamília de receptores nucleares de hormônios esteroides que incluem duas famílias: o receptor de ácido retinoico (*retinoic acid receptor* – RAR) e o receptor de retinoides X (*retinoid X receptor* – RXR; Collins, 2002; Boehm et al, 1995; Amann et al, 2011). As duas famílias de receptores possuem três isoformas cada: RAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; RXR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Essa classificação baseia-se em diferenças de aminoácidos na estrutura, resposta a ligantes naturais e sintéticos e na habilidade de modulação da expressão de genes alvos (Brtko et al, 2007; Boehm et al, 1995).

Os receptores de ácido retinoico possuem um domínio de ligação ao DNA (*DNA-binding domain* – DBD) que é responsável por reconhecer a sequência do DNA e um domínio responsável pelo reconhecimento e ligação ao ligante (*ligand binding domain* – LBD; Amann et al, 2011). O domínio DBD liga-se a sequências específicas do DNA chamadas de RAREs localizados na região promotora de genes alvo (Figura 4). Os RAREs consistem em uma sequência repetida de bases (5' AGGTCA 3') separada por 1 (DR1), 2 (DR2) ou 5 (DR5) pares de base. Na ausência do ligante, os receptores de ácido retinoico encontram-se ligados ao RARE localizado no promotor do gene alvo que está associado ao complexo histona deacetilase. Esse complexo recruta correpressores que inibem a transcrição. A associação do ligante aos receptores promove mudanças conformacionais e consequente dissociação dos correpressores e o recrutamento de coativadores que formam um complexo de ativação que inclui a histona acetiltransferase, a metiltransferase e as quinases. Então, a cromatina é descondensada, permitindo que os receptores recrutem a maquinaria para a transcrição, que incluem a RNA polimerase II e fatores de transcrição que contribuem para a remodelação da cromatina na região promotora do gene. A degradação proteossomal dos receptores, a fosforilação dos correpressores (que inibe a interação dos mesmos com os receptores) e a transrepressão (habilidade do ácido retinóico em inibir a ação de fatores de transcrição) são mecanismos no controle da expressão gênica (Rusten et al, 1996; Collins, 2002; Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Rochette-Egly et al, 2009; Lefebvre et al, 2010; Amann et al, 2011).



**FIGURA 4** Interação entre os receptores nucleares do ácido retinóico com a região promotora do gene alvo através do elemento responsivo ao ácido retinóico. Fonte: adaptado de Collins et al, 2002. RAR: receptor de ácido retinóico; RXR: receptor de retinóides X; LBD: domínio de ligação de ligante; DBD: domínio de ligação ao DNA; bp: pare de bases; RARE: elemento responsivo ao ácido retinóico.

Já foram identificados 3 isoformas do RAR codificados por diferentes genes:  $\alpha$  (*Rar $\alpha$*  ou *Nr1b1*),  $\beta$  (*Rar $\beta$*  ou *Nr1b2*) and  $\gamma$  (*Rar $\gamma$*  ou *Nr1b3*), sendo que existem 2 subtipos, no mínimo, para cada isoforma. Geralmente, esses receptores precisam formar um heterodímero com RXR para reconhecer um RARE. Apesar de menos abundantes, homodímeros com RAR já foram demonstrados. Entre os ligantes dos RARs estão: retinol, atRA (pan-agonista), 9-cis RA, 13-cis RA, TTNPB (4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl]benzoic; acid pan-agonista), Am580 (agonista seletivo RAR $\alpha$ ), BMS209641 (agonista seletivo parcial RAR $\beta$ ), AGN193109 (pan-antagonista RAR), entre outros. No caso do RAR, todos os isômeros do RA são capazes de ligar-se e ativar o RAR *in vitro*. No entanto, o isômero todo-trans é o que apresenta maior afinidade, seguido pelo 9-cis e por último o 13-cis. *In vivo*, a ativação de todas as isoformas desse receptor é mediada pelo atRA (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Kirchmeyer et al, 2008; Rochette-Egly et al, 2009; Alvarez et al, 2011).

O RXR é codificado por 3 genes distintos localizados nos cromossomos humano 9 (*Rxr $\alpha$*  ou *Nr2b1*), 6 (*Rxr $\beta$*  ou *Nr2b2*) e 1 (*Rxr $\gamma$*  ou *Nr2b3*) e nos cromossomos do camundongo 2, 17 e 1, respectivamente, sendo que existe uma grande homologia em suas sequências codificantes. Em camundongos, o *Rxr $\alpha$*  é predominantemente expresso

no fígado, o *Rxrβ* no sistema nervoso central e o *Rxrγ* em partes restritas do sistema nervoso central (glândula pituitária e bulbo olfativo) e músculo esquelético, respectivamente. O 9-cis RA foi identificado como agonista de alta afinidade do RXR *in vitro*. Os RXRs possuem ainda uma grande variedade de ligantes naturais e sintéticos (chamados retinoides x) entre esses: ácido graxos ω-3 insaturados, anti-inflamatórios não esteroides, HX600, HX630, LG268, LG101506 (Lefebvre et al, 2010). O RXR forma heterodímeros com o RAR, o receptor ativado por proliferador de peroxissomo (*peroxisome proliferator-activated receptors* – PPAR), o receptor da vitamina D (*vitamin D receptor* – VDR), receptor do fígado X (*the liver X receptor* – LXR), receptor do hormônio tireoidiano (*thyroid hormone receptor* – TR), e outros (Ziouzenkova and Plutzky, 2008). Os receptores nucleares que fazem heterodímeros com RXR podem ou não ser ativados pelos retinoides x (Lefebvre et al, 2010). Alternativamente, o RXR pode regular a transcrição de genes formando um complexo homodimérico. Na ausência de ligantes, o RXR pode formar homotetrâmeros sendo especulado que dessa forma regularia outros elementos responsivos. Na presença do 9-cis RA, o tetrâmero de RXR se dissocia em homodímeros passando a ter um único efeito transcricional (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Lefebvre et al, 2010).

Recentemente, os resultados de um estudo indicam que o atRA é capaz de modular a expressão de alguns genes envolvidos na regulação do metabolismo de ferro, com possível envolvimento dos receptores de RA, sugerindo a existência de um RARE em alguns desses genes (Tsuchiya et al, 2009).

## 2.2. METABOLISMO DO FERRO

### 2.2.1. FERRO: FUNÇÕES, FORMAS DIETÉTICAS, ABSORÇÃO INTESTINAL E TRANSPORTE NA CORRENTE SANGUÍNEA

O íon ferro (Fe) é essencial para diversas funções metabólicas na maioria dos seres vivos, pois constitui a estrutura molecular de diversas proteínas e enzimas que participam do transporte de oxigênio, de reações redox da cadeia de transporte de elétrons, do metabolismo intermediário, da sinalização celular, da síntese e reparação do DNA e da produção de espécies reativas de oxigênio (Oats, 2007; Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012).

A homeostase do Fe corporal é essencialmente mantida por meio do controle da sua absorção intestinal e liberação das reservas corporais, que são reguladas conforme as necessidades de ferro do organismo, ou seja, conforme o estado corporal de Fe. No rim, uma vez filtrado pelos glomérulos, o ferro é quase completamente reabsorvido nos túbulos proximal e distal, onde é armazenado na ferritina (Fn) e utilizado pelas células do epitélio tubular renal ou exportado através da membrana basolateral das células epiteliais tubulares para o interstício ou circulação (Martines et al, 2013). Por ser reabsorvido no rim para a corrente sanguínea, a absorção intestinal do ferro torna-se um ponto-chave na manutenção de sua homeostase no organismo (Oats, 2007; Martines et al, 2013).

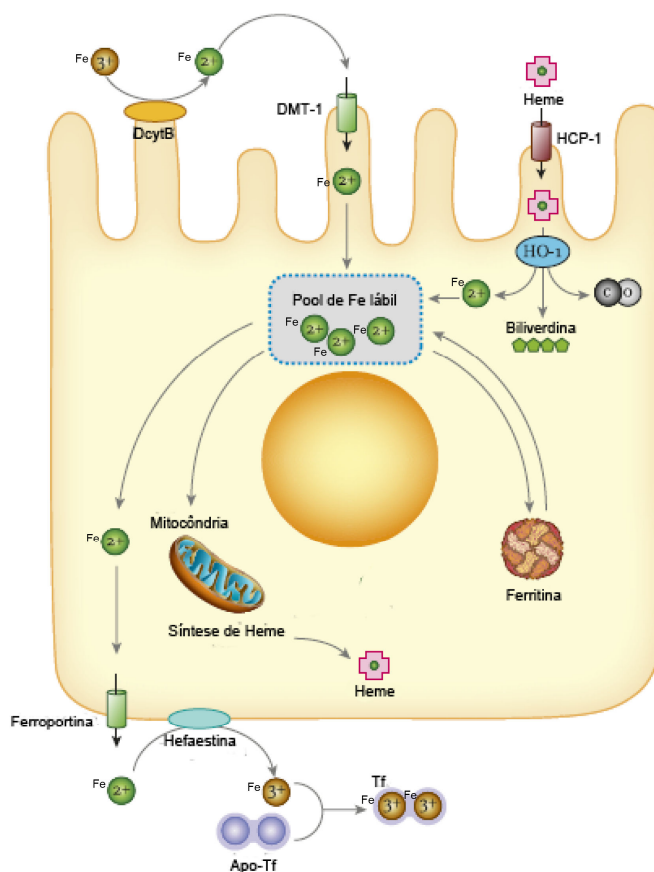
O ferro de origem dietética pode se apresentar na forma de ferro não hêmico, com absorção intestinal entre 2 e 20%, presente em alimentos como leite e seus derivados, ovos e hortaliças, ou na forma de ferro hêmico, com absorção entre 13 e 35%, encontrado na carne vermelha, aves e peixes (Gorczyca et al, 2013). O ferro

presente nos alimentos é a principal fonte desse micronutriente para o organismo humano, sendo o duodeno e a porção superior do jejuno os principais sítios de absorção. Em torno de 1 a 2 mg do Fe dietético são absorvidos diariamente pelos enterócitos para repor o Fe perdido. Entretanto, há uma demanda diária de 20 a 25 mg de Fe para a eritropoiese e demais funções, a qual é suprida endogenamente, por meio da reciclagem do Fe pelos macrófagos, principalmente oriundo das hemoglobinas senis. A síntese de hemoglobina consome cerca de 80% de todo o Fe necessário ao organismo humano. Os hepatócitos possuem uma reserva fisiológica e estratégica de Fe (~ 0,5 a 1 g) mobilizada quando há um desequilíbrio na homeostase desse micronutriente (Oats, 2007; Anderson et al, 2007; Chaston et al, 2008, Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012).

O Fe dietético apresenta-se em duas formas hêmico e não-hêmico ou inorgânico. Embora o Fe hêmico seja a forma mais biodisponível, a forma inorgânica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) está presente em maior concentração na dieta (Van der A et al, 2005; Martínez-Navarrete et al, 2002; Fuqua et al, 2012). No lúmen intestinal, o Fe dietético encontra-se, predominantemente, na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), sendo reduzido à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pela ferredutase duodenal citocromo b (*citocromo b duodenal ferriredutase* – Dcytb), presente na membrana apical em borda-escova dos enterócitos. Após a redução do Fe dietético à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o transportador de metal divalente 1 (*divalent metal transporter 1* – DMT1, codificado pelo gene *Dmt1* ou solute carrier family 11 member 2 – *Scl11a2*), um transportador de membrana dependente de energia que também transporta prótons, facilita o transporte do  $\text{Fe}^{2+}$  e de outros metais divalentes ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) através da membrana apical do enterócito, promovendo sua absorção. O DMT1 também está envolvido na reabsorção do  $\text{Fe}^{2+}$  nos rins e no transporte de Fe no cérebro (Dunn et al 2006; Canonne-Hergaux et al, 2006; Anderson et al, 2009; Evstatiev and Gasche, 2012). O  $\text{Fe}^{2+}$  absorvido pelos enterócitos pode sofrer a ação da hefaestina,

uma proteína cobre-dependente localizada no citoplasma e na membrana basolateral do enterócito, responsável pela oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Ao ser reoxidado, o  $\text{Fe}^{3+}$  é incorporado à molécula de ferritina no citoplasma, forma na qual é armazenado, ou segue na forma de  $\text{Fe}^{2+}$  para a membrana basolateral externa do enterócito onde é exportado para a circulação sanguínea através da proteína ferroportina 1 (*ferroportin 1* – FPN1, codificada pelo gene *Fpn1* ou solute carrier family 40, member 1 – *Slc40a1*; Anderson et al, 2009; Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012). A FPN1 está presente nos enterócitos, hepatócitos, macrófagos, células reticuloendoteliais e placentárias (Rodriguez et al, 2007; Fulqua et al, 2012; Ward and Kaplan, 2012).

Ao entrar na corrente sanguínea, o  $\text{Fe}^{+2}$  é oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  por ação da hefaestina ou da ceruloplasmina e é então captado pela glicoproteína transportadora de ferro no plasma, a transferrina (Tf), que possui 2 sítios de ligação de alta afinidade para o  $\text{Fe}^{3+}$ . A Tf mantém o ferro solúvel e limita a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) no plasma. Por meio de um receptor de transferrina (TfR), todos os demais tecidos corporais captam o Fe da circulação ligado à Tf (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Canonne-Hergaux et al, 2006; Hentze et al, 2010; Szoke et al, 2012). Nas demais células com exceção dos enterócitos, a ceruloplasmina (Cp), proteína dependente de cobre, converte o  $\text{Fe}^{2+}$  exportado do citoplasma em  $\text{Fe}^{3+}$  para ser transportado pela Tf (Petrac et al, 2005; Anderson et al, 2009; Hentze et al, 2010) (Figura 5).



**FIGURA 5** Absorção de ferro, utilização e exportação de ferro pelo enterócito. Fonte: Adaptado de Evstatiev and Gasche, 2012. DcytB: citocromo B duodenal; DMT-1: transportador de metal divalente 1; HCP-1: proteína carreadora de heme; HOX-1: heme oxigenase-1; Apo-Tf: apo-transferrina; Tf: transferrina.

O grupo heme resultante da degradação da mioglobina ou da hemoglobina de origem dietética parece ser internalizado por endocitose pelo receptor denominado proteína carreadora do grupo heme-1 (HCP1), expresso na membrana apical dos enterócitos (Anderson et al, 2009; Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012). O endossomo formado migra até o retículo endoplasmático, onde o  $Fe^{2+}$  é liberado do grupo heme por ação da enzima heme oxigenase-1 (HOX-1) presente na superfície do retículo endoplasmático. Estudos sugerem que a proteína HCP1 seja regulada pós-transcricionalmente pelos estoques de ferro. Na deficiência de ferro, o receptor é expresso na superfície do enterócito e no excesso, se mantém no meio intracelular no



interior do endossomo (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Evstatiev and Gasche, 2012) (Figura 5).

Os macrófagos podem adquirir ferro de 3 formas distintas: 1) pela fagocitose de eritrócitos senescentes; 2) pela captação do Fe transportado pela Tf por meio do TfR1, 3) pela captação do heme e da hemoglobina provenientes da hemólise de eritrócitos mortos. A hemoglobina complexada a haptoglobina é captada pelo receptor CD163 e entregue as células reticuloendoteliais por endocitose. O heme livre liga-se a hemopexina, e o complexo sofre endocitose. O heme é catabolizado pela hemoxigenase-1 (HOX-1) liberando o ferro que então é exportado da vesícula de fagocitose pela proteína 1 associada a resistência natural do macrófago (*natural resistance-associated macrophages protein-1* – NRAMP1 ou solute carrier family 11 member 1 – *Scl11a1*), um transportador de membrana de metal divalente, homólogo ao DMT-1 ou pelo próprio DMT-1. A proteína FPN1 é responsável pela exportação do ferro dos macrófagos para a corrente sanguínea. O receptor FLVCR1 (*feline leukemia virus subgroup receptor 1*) também tem sido apontado como o exportador celular do heme. O ferro exportado é captado pela medula óssea para ser utilizado na eritropoiese (Weiss, 2009; Hentze et al, 2010; Soe-Lin et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012).

No plasma humano, em condições de normalidade, a Tf encontra-se na concentração de 25 a 50  $\mu\text{mol/L}$  e 30 a 40% saturada com ferro. Saturações abaixo de 16% e acima de 45% indicam deficiência de ferro e sobrecarga, respectivamente, sendo que em saturação acima 60% há acúmulo de ferro livre com consequente danos as células parenquimais (Graham et al, 2007; Hentze et al, 2010; Szoke et al, 2012). A Tf pode apresentar três formas distintas de saturação: diférrica (Tf-Fe<sub>2</sub>), monoférrica (Tf-Fe) e apoférrica (apo-Tf). A proporção entre essas formas no soro dependerá da saturação da transferrina, sendo que quanto menor a saturação, maior a proporção da

forma monoférrica. A proporção entre as formas diférrica e monoférrica é de 1:2 e de 1:5, em saturações de Tf de 30% e 15%, respectivamente. As três formas de Tf podem se ligar ao receptor de transferrina 1 (TfR1) na membrana celular, sendo internalizadas por endocitose. No entanto, a Tf diférrica possui afinidade 30 vezes maior pelo TfR1 quando comparada a Tf monoférrica e 500 vezes maior quando comparada a Tf apoférrica. Assim, a Tf-Fe<sub>2</sub> é mais eficiente na entrega do Fe aos tecidos que a Tf-Fe (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Gkouvatsos et al, 2012). A captação de Fe pelas células de mamíferos tem como principal fonte a Tf-Fe<sub>2</sub> que pela alta afinidade liga-se ao TfR1 formando um complexo que é internalizado por endocitose dependente de clatrina. A subsequente redução do pH endossomal, por ação da bomba de prótons, leva a alteração conformacional da Tf-Fe<sub>2</sub> e do TfR1, proporcionando a liberação do Fe desse complexo. Então, o Fe<sup>3+</sup> é reduzido a Fe<sup>2+</sup> por membros da família das metaloredutases STEAP 3 (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3*) e transportado do endossomo para o citossol pelo DMT1. O TfR1 e a Tf retornam para a superfície celular (Hentze et al, 2010; Gkouvatsos et al, 2012).

A saturação da transferrina pode ser determinada com base na estimativa da capacidade total de ligação ao ferro (*total iron binding capacity* – TIBC) ou pela determinação da concentração da proteína Tf. Apesar de não ser a única proteína de ligação de ferro no sangue, a Tf é a mais importante e a TIBC pode ser utilizada indiretamente para determinar as concentrações séricas de Tf. Na prática, a capacidade latente de ligação ao ferro da transferrina (*unsaturated iron binding capacity* – UIBC) é determinada pela adição de ferro suficiente para saturar de ferro os sítios de ligação das proteínas séricas na amostra, sendo posteriormente o ferro livre quantificado. A diferença entre o total de ferro adicionado e o ferro livre quantificado compreende a

UIBC. A TIBC é a soma das variáveis UIBC e concentração de ferro sérico (Szoke et al, 2012).

Em um adulto saudável, 80% do ferro corporal depositado estão na ferritina presente nos hepatócitos e macrófagos. A ferritina é uma apoproteína com 24 subunidades de cadeias leves e pesadas ao redor de um centro, capaz de ligar até 4.500 átomos de ferro. Ao entrar na célula, o ferro excedente é estocado na forma de ferritina. A ferritina sequestra o Fe do meio intracelular, fixando-o na forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), quimicamente menos reativa, tanto para armazenamento quanto para desintoxicação. A proporção entre as subunidades leve e pesadas na molécula de ferritina é tecido específica, depende do estado fisiológico e da presença ou não de inflamação ou infecção. A subunidade pesada da ferritina possui capacidade catalítica sendo capaz de converter o  $\text{Fe}^{2+}$  internalizado a  $\text{Fe}^{3+}$  para ser armazenado no seu centro. Já a subunidade leve parece auxiliar na liberação do Fe do centro ferroxidase da subunidade leve. Quando a célula necessita de Fe, a ferritina é degradada por meio dos sistemas lisossomo e proteossoma liberando esse mineral (Cozzi et al, 2006; Graham et al, 2007; Bou-Abdallah, 2010). Além da ferritina citossólica, a ferritina mitocondrial é encontrada em tecidos como coração, pâncreas, rins e testículo e sua função parece ser a de proteger essa organela dos possíveis danos oxidativos catalisados por Fe. A ferritina mitocondrial parece não ter sua expressão diretamente controlada pelas proteínas reguladoras de Fe. A sobrecarga e depleção de Fe corporal podem ser diagnosticados através dos níveis séricos ou teciduais de ferritina altos ou baixos, respectivamente. A inflamação, infecções e doenças crônicas podem levar ao aumento desses níveis (Hentze et al, 2010).

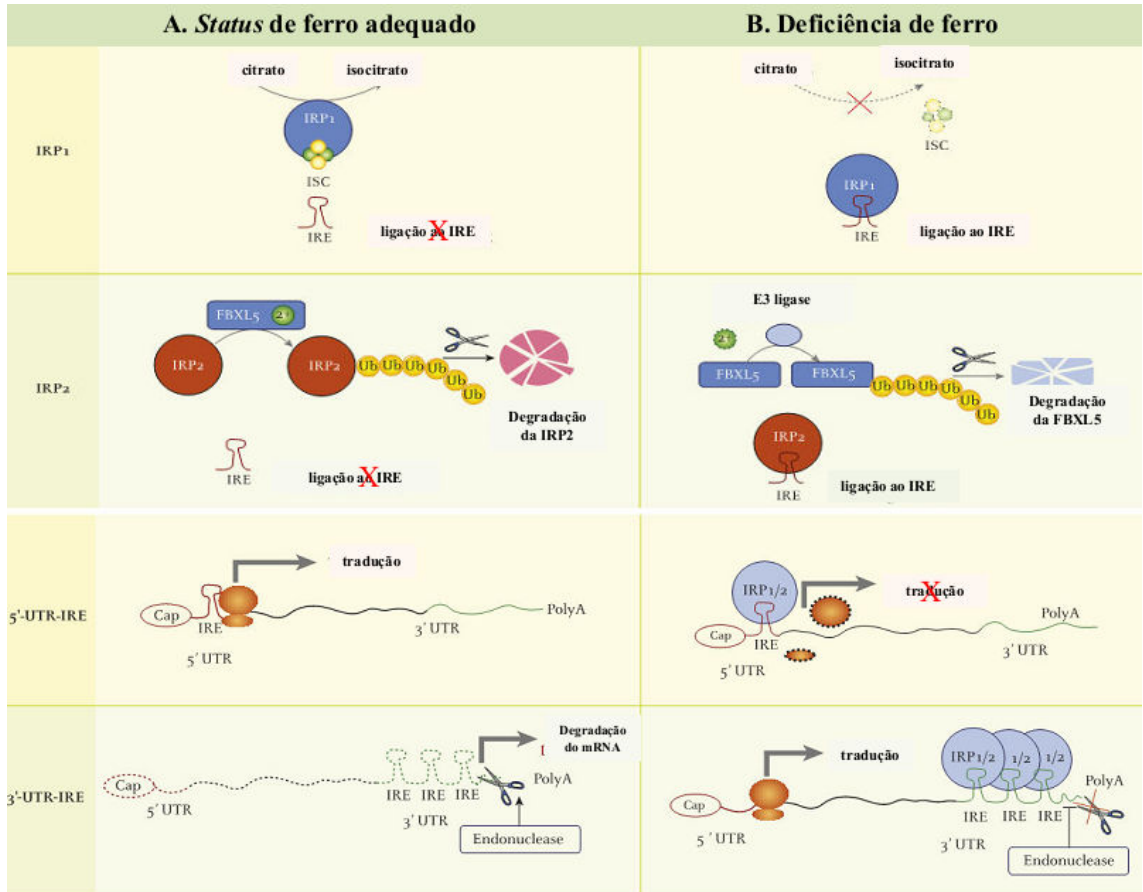
## 2.2.2. MECANISMOS DE REGULAÇÃO INTRACELULAR DA HOMEOSTASE DO FERRO

A homeostase de ferro no organismo é mantida por meio de dois mecanismos regulatórios. Um mecanismo responsável pela manutenção da homeostase sistêmica, modulado pelo peptídeo hepcidina, e outro mecanismo de controle intracelular que envolve o sistema de elementos responsivos ao ferro (*iron responsive elemento* – IRE) / proteínas reguladoras de ferro (*iron regulatory protein* – IRP). Cerca de 3 a 5% do ferro total da célula constituem o denominado “*pool* de ferro lábil” (PFL), constituído pelas duas formas iônicas do ferro ( $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ ), associadas à ligantes de baixa afinidade. Em condições fisiológicas normais, o PFL é mantido em concentrações suficientemente baixas pela ação coordenada das IRPs, cuja síntese depende da disponibilidade de Fe. O PFL regula a expressão de proteínas envolvidas no seu próprio metabolismo como a ferritina, o receptor de transferrina, o DMT-1 e a ferroportina por meio de um eficiente mecanismo de regulação da tradução dos mRNAs dessas proteínas (Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012, Galy et al, 2013).

As extremidades 5' e 3' não traduzidas (*untranslated region* – UTR) destes mRNAs apresentam sequências de nucleotídeos denominadas IRE, as quais formam uma estrutura secundária em forma de grampo. Quando localizadas na extremidade 5', estas reprimem a tradução dos respectivos mRNAs e, quando presentes na porção 3', a regulação ocorre em nível da estabilidade das moléculas de mRNA (Crichton, 2002; Evstatiev and Gasche, 2012). Esse modelo de regulação pós-transcricional responde ao nível de ferro intracelular e é responsável pelo controle da síntese de proteínas envolvidas na captação (TfR1, DMT-1), estoque (ferritina), utilização (succinil desidrogenase, aconitase mitocondrial) e exportação (ferroportina) do ferro. Em várias células de mamíferos foram identificadas duas proteínas citossólicas que se ligam a

estes IREs, a IRP1 (ou ACO1) e a IRP2 (ou IREB2). Quando o status de ferro celular está adequado, a IRP1 apresenta um núcleo Fe-S com 4 átomos de ferro e 4 átomos de enxofre (4Fe-4S), transformando-se na enzima aconitase citoplasmática, porém, na deficiência de ferro, este núcleo é destituído de um átomo de ferro (3Fe-4S) e perde a atividade catalítica, assumindo papel na regulação pós-transcricional como IRP1. Na deficiência de ferro, as IRPs se ligam ao IRE presente na porção 5' do mRNA da ferritina e da ferroportina, inibindo a tradução deste mRNA nas respectivas proteínas; e se ligam ao IRE localizado na porção 3' do mRNA do TfR e do DMT-1, estabilizando seus mRNA que se tornam mais resistentes à degradação por nucleases, favorecendo a síntese das mesmas. Como resultado, na deficiência de ferro, há um aumento da absorção intestinal e captação intracelular do ferro e uma redução da exportação intracelular e o estoque de ferro. O oposto ocorre quando a disponibilidade de ferro aumenta e a tradução dos mRNAs da ferritina e da ferroportina não está inibida, enquanto o DMT-1 e o TfR tornam-se mais suscetíveis à degradação (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012). O mecanismo de regulação da IRP2 é diferente do IRP1. A IRP2 possui uma seqüência denominada domínio de degradação dependente de ferro, quando os níveis de ferro na célula estão altos a IRP2 interage com o FBXL5 (*F-box and leucine-rich repeated protein 5*), proteína adaptadora que recruta o complexo de ligase SCF (*SKP1-CUL1-F-box*) E3, promovendo a ubiquitinação e subsequente degradação nos proteassomas. Enquanto nas células deficientes em ferro, os níveis de FBXL5 diminuem e a IRP2 intacta estabiliza o mRNA do receptor de transferrina e impede a tradução do mRNA da ferritina (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Papanikolaou et al, 2005; Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012; Figura 6). A proteína IRP1 parece ter papel importante apenas na regulação da homeostase do ferro no rim e gordura marrom,

enquanto a IRP2 tem papel importante em todos os tecidos, dominando a regulação pós-transcricional do metabolismo do ferro em mamíferos (Jiang et al, 2011).



**FIGURA 6** Regulação intracelular da homeostase de ferro pelo sistema IRE/IRP. Fonte: Adaptado de Evstatiev and Gasche, 2012. IRE: elemento responsivo ao ferro; IRP: proteína reguladora de ferro; UTR: seqüências de nucleotídeos não traduzidos; FBXL5: F-box and leucine-rich repeated protein 5; ISC: centro ferro-enxofre; Ub: ubiquitinação.

### 2.2.3. MECANISMOS DE REGULAÇÃO SISTÊMICA DA HOMEOSTASE DO FERRO

A sinalização sistêmica mediada pela hepcidina tem sido apontada como o mecanismo pelo qual as células intestinais e esplênicas respondem às necessidades de ferro do organismo. A hepcidina (*antimicrobial peptide* – HAMP ou *liver-expressed antimicrobial peptide 1* – LEAP1, codificada pelo gene *Hamp*) é um peptídeo hormonal, membro da família das denfensinas, cuja estrutura secundária é caracterizada por folhas

$\beta$ -distorcidas com 6 ligações dissulfeto provenientes dos resíduos de cisteína que mantêm a ligação entre as folhas. A forma madura da hepcidina é expressa principalmente no fígado (Chaston et al, 2008, Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012; Lane et al, 2013), sendo também produzida em menor quantidade nas regiões distal e proximal do néfron (Martines et al, 2013) e coração (Lane et al, 2013). A hepcidina circula no plasma ligada a  $\alpha$ 2-macroglobulina, proteína de fase aguda. Além de controlar o fluxo de ferro nos tecidos e na corrente sanguínea, a hepcidina possui atividade antimicrobiana, podendo se ligar a ferro livre, tornando-o indisponível para a proliferação bacteriana e em concentrações elevadas pode causar a lise celular bacteriana (Martines et al, 2013). Sua expressão é regulada por múltiplos fatores, compreendendo o estado corporal de ferro, a eritropoiese, a hipóxia e os estados de inflamação e infecção (Weiss, 2009; Hentze et al, 2010; Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012). Assim, quando os estoques corporais de ferro estão repletos observa-se um aumento na expressão de hepcidina, enquanto na deficiência ferro ocorre uma diminuição.

O mecanismo pelo qual a hepcidina promove a inibição da absorção de ferro pelos enterócitos e liberação desse íon dos tecidos de reserva ou responsáveis pela sua reciclagem envolve sua interação com a proteína FPN1. Após a formação do complexo hepcidina-ferroportina, o resíduo de tirosina de um dos domínios citoplasmáticos da FPN1 é fosforilado pela JAK2 (Janus kinase 2; *just another kinase 2*). Subsequentemente, a FPN1 é internalizada, defosforilada, ubiquitinizada e degradada nos lisossomos, inibindo a exportação do ferro dos enterócitos (Anderson et al, 2009; Lane et al, 2013). Com o acúmulo de ferro no meio intracelular do enterócito, o DMT1 é inibido pelo sistema IRE/IRP, promovendo a redução da absorção de ferro do lúmen intestinal (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson,

2006; Oats, 2007; Chaston et al, 2008; Hentze et al, 2010). Masaratana et al (2013) observaram em camundongos *Hamp*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta deficiente em Fe por 2 semanas maiores níveis de transcrito de *Fpn1*, *Dmt1* e *Dcytb* no duodeno em relação aos animais controle sob o mesmo tratamento.

As principais células alvo da hepcidina são: os enterócitos duodenais (responsáveis pela absorção intestinal do ferro dietético), os fagócitos mononucleares (macrófagos esplênicos e células de Kupffer hepáticas, responsáveis pela reciclagem do ferro proveniente de eritrócitos senescentes e danificados) e estudos têm sugerido que possivelmente os hepatócitos (responsáveis pelo estoque e liberação do ferro corporal; Lane et al, 2013; Pandur et al, 2013). A ativação da expressão da hepcidina leva a redução dos níveis séricos de ferro em aproximadamente 6 horas (Oates, 2007). Chung et al (2009) e Chaston et al (2008) encontraram uma resposta mais rápida a hepcidina nos macrófagos comparado as células intestinais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo uma resposta mais aguda das células envolvidas na reciclagem do ferro hêmico em comparação as células envolvidas na absorção do ferro dietético. O clearance da hepcidina ocorre via rins ou por codegradação com a FPN1 (Hentze et al, 2010). A hemólise e o estímulo para a reticulocitose inibem a produção de hepcidina, levando a um aumento na assimilação do ferro proveniente da dieta. O aumento na expressão da hepcidina é também observado na inflamação e conseqüentemente em algumas doenças crônicas (Chaston et al, 2008).

A regulação da expressão da hepcidina envolve uma via de sinalização mediada por outras três proteínas de membrana, a hemojuvelina (hemojuvelin – HJV, codificada pelo gene *hemochromatosis type 2 (juvenile) homolog – Hfe2*), o receptor de transferrina 2 (TfR2) e a proteína da hemocromatose (HFE) (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Hentze et al, 2010) (Figura 4).



O HFE é uma proteína de membrana que forma um complexo heterodimérico com a  $\beta_2$ -microglobulina. Mutações nessa molécula e na  $\beta_2$ -microglobulina, que interage com o HFE na superfície da célula, leva ao fenótipo da hemocromatose, na qual a expressão da hepcidina está diminuída ou não responsiva ao excesso de ferro dietético (Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Rodriguez et al, 2009; Hentz et al, 2010; Gao et al, 2010). O principal mecanismo de controle da produção de hepcidina parece acontecer através da competição das proteínas transferrina diférrica (Tf-Fe<sub>2</sub>) e HFE pela ligação ao receptor de transferrina 1 (TfR1) no fígado. Com o aumento da absorção ou da disponibilidade de Fe sérico, a transferrina diférrica liga-se preferencialmente ao TfR1, impedindo a ligação HFE/TfR1. Assim, o HFE livre ou ligado ao TfR2, presente na superfície das células, ativaria a transcrição da hepcidina via ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Quando o HFE está ligado ao TfR1, a transmissão desse sinal ao núcleo é interrompida, inibindo a expressão da hepcidina (Frazer and Anderson, 2003; Anderson et al, 2009; Hentz et al, 2010; Gao et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012) (Figura 7).

Nos indivíduos saudáveis, aproximadamente 30% dos sítios de ligação de ferro na Tf estão ocupados e nesse nível de saturação, a maioria dos TfR1 estarão ligados a Tf diférrica, deixando o HFE livre na superfície dos hepatócitos ou disponível para se ligar ao TfR2 e estimular a produção de hepcidina. Com a redução das reservas corporais de ferro, e conseqüente declínio da saturação da transferrina, há um favorecimento da ligação do HFE ao TfR1, e aumento da expressão do TfR1 na superfície do hepatócito. Assim, aumentam as ligações HFE-TfR1 e o sinal para a síntese de hepcidina diminui, levando a uma redução dos níveis de hepcidina sanguíneos e aumento da absorção intestinal de ferro (Frazer and Anderson, 2003; Anderson et al, 2009; Hentz et al, 2010; Gao et al, 2010; Figura 3). Os receptores TfR1 e TfR2 são homólogos em 45%. A

expressão do TfR1 é ubíqua, enquanto a expressão do TfR2 está restrita aos hepatócitos e em menor extensão nos eritrócitos, na cripta das células intestinais, baço, pulmões e músculo (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Gao et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012). A Tf diférrica possui 25 a 30 vezes maior afinidade ao TfR1 comparado ao TfR2. (Frazer and Anderson, 2003; Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Papanikolaou et al, 2005). Gao et al (2010) verificaram que a inserção do gene *Hfe* em hepatócitos de camundongos *Hfe*<sup>-/-</sup> levou a uma redução dos níveis de Fe hepático e saturação da Tf sérica, além do aumento dos níveis de mRNA da *Hamp* e *Hfe*. Resposta similar foi observada nos hepatócitos de camundongos *Tfr2*<sup>-/-</sup> com a inserção do gene *Tfr2*. No entanto, não foram observados esses efeitos nos camundongos *Tfr2*<sup>-/-</sup> com a expressão do *Hfe*, assim como nos camundongos *Hfe*<sup>-/-</sup> com a expressão do *Tfr2*, sugerindo que a interação entre o TfR2 e o HFE é essencial para a viabilização da resposta dessa via ao *status* de ferro. A superexpressão do *Hfe* em camundongos controle foi capaz de aumentar significativamente os níveis de mRNA da *Hamp*, sendo que o mesmo não foi verificado com a superexpressão do *Tfr2*. Esses resultados sugerem que o complexo HFE/TfR2 está envolvido na regulação da expressão da hepcidina e que talvez o HFE seja limitante na formação desse complexo.

Uma segunda via de sinalização associada à regulação transcricional da hepcidina de maneira dependente da concentração intracelular de ferro é mediada pela proteínas morfogenética do osso 6 (*bone morphogenic protein 6* – BMP6, codificada pelo gene *Bmp6*) e proteínas SMAD (*small mothers against decapentaplegic*). Tem sido sugerido que o HFE e possivelmente o TFR2 podem regular a expressão da hepcidina através de uma interação com a via de sinalização BMP6/SMAD. Uma terceira via de sinalização hepática denominada MAPK - ERK1/2 quinases parece também estar

envolvida na regulação transcricional da hepcidina mediada pelo TFR2 e/ou HFE (Corradini et al, 2011).

Outra proteína envolvida na modulação da expressão da hepcidina é a hemojuvelina. A HJV é uma proteína ligada à membrana celular por um resíduo de glicosilfosfatidilinositol, sendo expressa principalmente no fígado, músculo esquelético e cardíaco. Membro da família de proteínas de moléculas de orientação repulsiva (*repulsive guidance molecule* – RGM), a HJV parece ser um correceptor para a BMP. Ao se ligar a BMP, a HJV inicia a sinalização via BMP6/SMAD responsável pela estimulação da expressão da *Hamp* (Rodriguez et al, 2007; Anderson et al, 2009; Hentz et al, 2010; Maxson et al, 2010). A HJV e os receptores BMP (tipo I: Alk1 e Alk2 e tipo II: ACTRIIA) parecem ser capazes de ligar-se aos ligantes BMP 2, 4, 5, 6 e 9 (Lee et al, 2010; Zhang et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012). Estudos indicam que a BMP6 é positivamente regulado pelo Fe tecidual (Corradini et al, 2011; Ens et al, 2013). O BMP6 é produzido pelas células hepáticas e parece atuar de maneira autócrina para induzir a sinalização de estimulação da transcrição da *Hamp* via HJV/BMP/SMAD. A sinalização via BMP é iniciada quando os níveis de ferro intracelular aumentam induzindo a síntese de BMP6. A BMP6 uma vez secretada pelos hepatócitos se liga ao receptor BMP que interagem com a HJV, que atua como um co-receptor, situados na membrana do hepatócito, induzindo a fosforilação dos SMAD 1, 5 e 8 e consequente complexação com a SMAD4 no citoplasma. Esse complexo é translocado para o núcleo, induzindo a expressão do gene da hepcidina (Hentze et al, 2010; Zhang et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012; Figura 7).

A região promotora do gene da hepcidina possui duas sequências, uma proximal denominada BMP-RE1 e outra distal BMP-RE2, envolvidas na modulação da transcrição via HJV-BMP6-SMAD (Hentze et al, 2010; Evstatiev and Gasche, 2012).

Wu et al (2012) demonstraram que a HJV de membrana tem como ligante preferencial o BMP6. Zhang et al (2010) observaram em camundongos *Hjv*<sup>-/-</sup> sobrecarga de ferro severa, supressão da expressão da hepcidina e níveis de transcrito de BMP6 no fígado quatro vezes maior que nos camundongos controles, sendo que quando submetidos a deficiência de Fe, os níveis de mRNA do BMP6 reduziram. A inserção do gene da *Hjv* em hepatócitos de camundongos *Hjv*<sup>-/-</sup> promoveu um aumento dos níveis de mRNA de hepcidina em 65 vezes e de Smad 1/5/8 em 2,5 vezes. Esses resultados indicam que a regulação da expressão do *Bmp6* independe da *Hjv* e que está tem um importante papel na regulação da expressão da *Hamp* potencializando a sinalização mediada pelo BMP. Arndt et al (2010) observaram em camundongos *Bmp6*<sup>-/-</sup> submetidos a dieta suplementada com Fe por 3 semanas, menores níveis de mRNA da hepcidina hepática em relação aos camundongos *Bmp6*<sup>+/+</sup> submetidos a mesma dieta. Além disso, o tratamento de hepatócitos dos camundongos *Bmp6*<sup>-/-</sup> com os BMPs 2, 4, 6 e 9 demonstrou que o BMP6 é o mais potente indutor da expressão do gene da hepcidina.

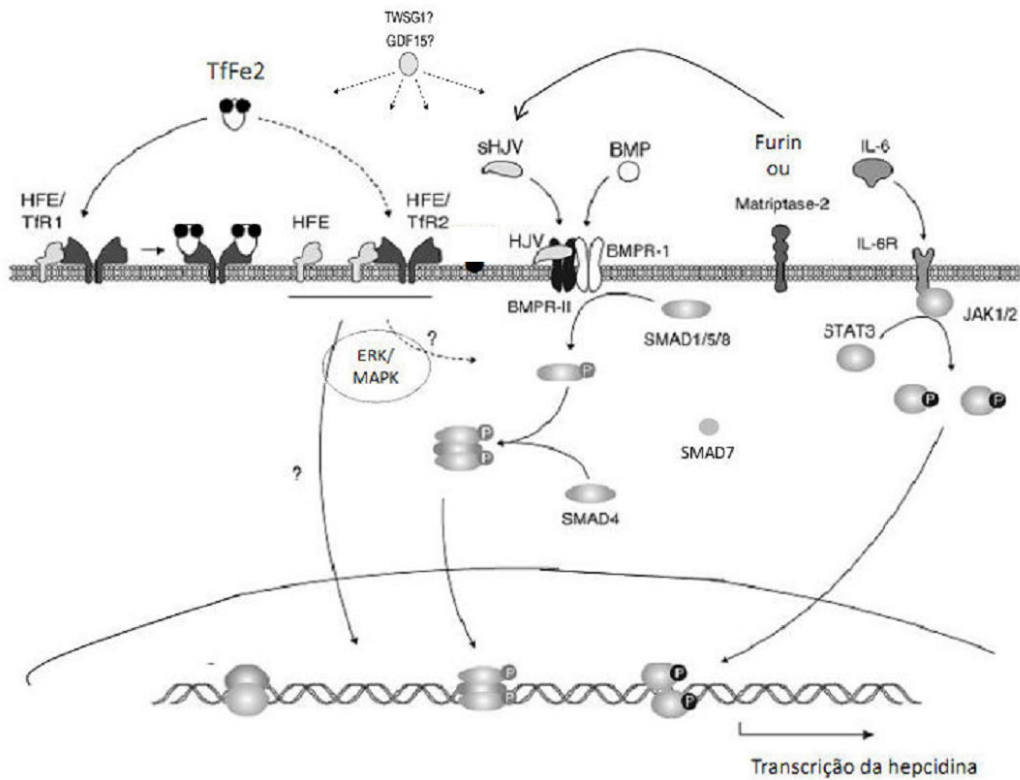
Embora a resposta mediada pela hemojuvelina de membrana resulte na indução da expressão de hepcidina sua clivagem resulta em uma forma não ancorada a membrana e denominada HJV solúvel (*soluble hemojuvelin* – sHJV) que inibe a expressão da hepcidina (Hentz et al, 2010). A clivagem da HJV de membrana gerando a sHJV, é catalisada pela protease denominada Furina, pertencente a família das proteínas convertase. Dois possíveis mecanismos de interação entre essas duas formas da HJV são descritos na literatura, no primeiro, a sHJV competiria com a HJV ligada à membrana celular pelos ligantes do receptor BMP, inibindo a via de sinalização BMP/SMAD responsável pela indução da expressão da hepcidina. Enquanto no segundo mecanismo, a HJV de membrana quando clivada perderia a capacidade de agir como co-receptor para o BMP. Os altos níveis de expressão de HJV no músculo esquelético sugerem que

a sHJV pode ser liberada por esse tecido sinalizando um quadro de deficiência de ferro (Hentz et al, 2010; Lakhali et al, 2010; Maxson et al, 2010). Uma segunda enzima associada a clivagem da HJV de membrana tem sido estudada, uma protease associada à membrana denominada matriptase-2 (codificada pelo gene *Type II transmembrane serine protease – Tmprss6*) e expressa principalmente no fígado. A matriptase-2 parece interagir fisicamente com a HJV ligada à membrana clivando-a, e conseqüentemente inibindo a expressão da hepcidina (Anderson et al, 2009; Hentz et al, 2010; Lakhali et al, 2010; Maxson et al, 2010; Luciani et al, 2011; Nai et al, 2011) (Figura 7). Silvestri et al (2008) demonstraram que a matriptase-2, cotransfectada com a HJV em células hepáticas foi capaz de inibir a ativação da hepcidina em um ensaio com luciferase. Lenoir et al (2010) observaram que os camundongos *Bmp6*<sup>-/-</sup> apresentaram redução dos níveis de mRNA da hepcidina, aumento do teor de ferro hepático e dos níveis de ferro sérico; enquanto os ratos *Tmprss6*<sup>-/-</sup> exibiram um aumento dos níveis de mRNA da hepcidina, redução do teor de ferro hepático e anemia. Já os camundongos *Tmprss6*<sup>+/+</sup> e *Bmp6*<sup>-/-</sup> e os *Tmprss6*<sup>-/-</sup> e *Bmp6*<sup>-/-</sup> apresentaram redução dos níveis de transcrito de hepcidina e aumento dos níveis de ferro hepático e sérico em relação aos camundongos *Tmprss6*<sup>+/+</sup> e *Bmp6*<sup>+/+</sup>. Assim, a presença do *Bmp6* é necessária para o estímulo, enquanto a *Tmprss* inibe a expressão da hepcidina. O estudo de Maxson et al (2010) sugere que a HJV possui diferentes sítios de clivagem para as proteinases matriptase-2 e furina, gerando produtos de tamanhos e capacidade de inibir a expressão da hepcidina distintos.

Alguns reguladores negativos da transcrição da hepcidina hepática foram identificados, entre esses a matriptase-2, a qual cliva em fragmentos a hemojuvelina membrana (Silvestri et al., 2008), SMAD7 (*small mothers against decapentaplegic 7*, codificada pelo gene *Smad7*) que medeia uma resposta de feedback negativo através da

via de BMP (Mleczko-Sanecka et al, 2010.), e o supressor de sinalização de citocina 3 (*suppressor of cytokine signaling 3* – SOCS3), que inibe a transdução de sinal mediada por receptores de citocinas (de Domenico et al., 2010). A SMAD7 é uma proteína SMAD inibidora que antagoniza a sinalização BMP/TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador  $\beta$ ; *transforming growth factor  $\beta$* ) e é induzida por essa mesma via, atuando como um supressor por um mecanismo de *feedback* negativo. A via de sinalização BMP6-SMAD pode ser inibida pela SMAD7, sendo esse um mecanismo de prevenção de respostas exacerbadas da hepcidina que poderiam levar a deficiência de ferro (Evstatiev e Gasche, 2012). A *Smad7* é induzida na presença do BMP7, o fator de crescimento epidérmico, interferon  $\gamma$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$  e pelos níveis dietéticos de ferro. A supressão do TGF- $\beta$  pela SMAD7 é exercida em vários níveis: (1) a SMAD7 aciona a desfosforilação e/ou degradação do TGF- $\beta$  e de receptores de BMP, (2) bloqueia a fosforilação de receptores SMAD envolvidos na via de sinalização TGF- $\beta$ , (3) medeia a degradação da SMAD4, e (4) compete com complexos SMAD pela ligação direta nas mesmas sequências do promotor de genes alvo. A região promotora da *Smad7* contém 4 elementos responsivos ao BMP (BMP-REs), com sequências idênticas às anteriormente identificados no promotor *Hamp*, sugerindo que a ativação de *Smad7* por BMPs ocorre através destes elementos, e que os mecanismos de controle da transcrição que regulam a expressão da *Hamp* e *Smad7* são semelhantes, em parte (Mleczko-Sanecka et al, 2010; Corradini et al, 2011). Mleczko-Sanecka et al (2010) observou em hepatócitos que a expressão da *Hamp* reduziu em 10 vezes com a superexpressão da *Smad7* e ainda que eliminou completamente a ativação da expressão da *Hamp* pelo BMP6, demonstrando que a *Smad7* é um potente inibidor da expressão da *Hamp* pela via de sinalização BMP-SMAD. Corradini et al (2011) em estudo com camundongos demonstraram que tanto o

aumento da concentração de ferro no fígado quanto da saturação de transferrina levaram ao aumento dos níveis de mRNA da *Smad7*.



**FIGURA 7** Vias de regulação da expressão de hepcidina. Fonte: adaptado de Anderson et al, 2009. HFE: proteína da hemocromatose; TfR1: receptor 1 de transferrina; TfR2: receptor 2 de transferrina; sHJV: hemojuvelina solúvel; HJV: hemojuvelina; BMP: proteína morfogenética do osso; BMPR-1: receptor 1 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*; SMAD7: *small mother against decapentaplegic 7*; IL-6: interleucina-6; JAK1/2: proteína *Janus kinase 1/2*; STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*.

Embora a modulação da expressão de hepcidina pelo estado corporal de ferro pareça ser a via predominante na regulação da homeostase do ferro, o processo inflamatório também é capaz de induzir a produção de hepcidina e, portanto, modificar o status de ferro. As citocinas inflamatórias interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e 6 (IL-6) podem ativar a transcrição da hepcidina, promovendo a retenção de ferro nos tecidos e inibição

da absorção. (Hentze, Muckenthaler and Andrews, 2004; Dunn, Rahmanto and Richardson, 2006; Hentz et al, 2010). A redução da disponibilidade de ferro no sistema circulatório desfavorece o crescimento de microrganismos, entretanto, essa estratégia fisiológica pode provocar a anemia observada nos estados inflamatórios, incluindo aqueles associados às doenças crônicas tais como: câncer, doenças auto-imunes, doenças inflamatórias intestinais, doença renal crônica, etc (Weiss, 2009; Hentz et al, 2010). O mecanismo de ação da IL-1 $\beta$  sobre a transcrição da *Hamp* ainda não está elucidado, no entanto a IL-6 ativa a via de sinalização JAK / STAT 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), promovendo a fosforilação e consequente translocação da STAT3 para o núcleo, a qual liga-se ao promotor da hepcidina promovendo sua transcrição (Hentz et al, 2010; Fatih et al, 2010; Figura 7). De acordo com os resultados de Casanovas et al (2009), a via de sinalização BMP6/SMAD também parece ser necessária para uma adequada expressão da hepcidina em resposta a IL-6, sugerindo que possa haver uma comunicação entre as vias BMP e IL-6, uma vez que camundongos com hepatócitos deficientes em *smad* não apresentaram aumento da expressão da *Hamp* em resposta a IL-6.

A eritropoiese também participa da regulação da expressão da *Hamp*. Em condições de aumento da eritropoiese, como a administração de EPO, ocorre a redução da fosforilação da SMAD1/5/8 hepática e dos níveis de mRNA da *Hamp*, sem alteração dos níveis de transcrito de *Bmp6* (Frazer et al, 2012; D'Angelo, 2013). Estudos sugerem que as células precursoras de eritróides produzem os fatores solúveis como o fator de diferenciação do crescimento 15 (*growth differentiation factor 15* – GDF-15) e TWSG1 (*twisted gastrulation protein 1*), que parecem inibir a expressão da *Hamp*. Tem sido proposto que TWSG1 inibe a expressão da *Hamp* interferindo na via de sinalização do BMP indiretamente alterando os níveis circulantes de BMP ou diretamente agindo nos



receptores BMP. Também se especula que o GDF-15 e o TWSG1 tenham efeito inibitório sobre o *Tmprss6* (Evstatiev and Gasche, 2012; Figura 7).

#### 2.2.4. ANEMIA DA DOENÇA CRÔNICA

A anemia da doença crônica (*anemia of chronic disease – ACD*) ou anemia da inflamação é frequentemente observada em pacientes com doenças crônicas que incluem quadros infecciosos, inflamatórios, metabólicos e malignos como infecções agudas e crônicas, doença renal crônica, doenças autoimunes, doenças reumáticas, obesidade e cânceres (Weiss, 2009; Poggiali et al, 2013; D'Angelo et al, 2013). A prevalência da ACD nessas doenças varia entre 8 e 95%, sendo a segunda forma de anemia mais prevalente após a anemia por deficiência de ferro. Ocorre principalmente em pacientes hospitalizados e idosos, podendo agravar a severidade dos sintomas da doença e contribuir para o aumento da morbidade e mortalidade (Sun et al, 2012; Poggiali et al, 2013).

A ACD é uma anemia moderada (níveis de hemoglobina entre 8 e 9,5 g/dL), normocrômica e normocítica, com níveis séricos de ferro baixos, níveis de transferrina e saturação de transferrina normais ou baixos, ferritina normal ou alta e contagem de reticulócitos baixa, associada a distúrbios inflamatórios crônicos (Sun et al, 2012; Poggiali et al, 2013).

A fisiopatologia da ACD é complexa e multifatorial, incluindo 3 mecanismos principais: a redução da sobrevivência/vida média dos eritrócitos, o comprometimento da proliferação das células eritróides progenitoras e o aumento da captação e retenção do ferro pelas células do sistema reticuloendotelial. Estes mecanismos têm como causa principal a inflamação, envolvendo citocinas e proteínas de fase aguda, porém a perda

de sangue crônica, a hemólise e a deficiência de vitaminas podem agravar essa anemia (Weiss, 2009; Poggiali et al, 2013).

O mecanismo envolvido na redução da sobrevivência dos eritrócitos na ACD ainda não está elucidado. Suspeita-se que a maior produção de citocinas inflamatórias pode aumentar a capacidade dos macrófagos de fagocitar e destruir as células vermelhas do sangue (Poggiali et al, 2013). Sato et al (2012) constataram em pacientes com doença renal crônica em hemodiálise que apresentam ACD uma correlação significativa e negativa entre a sobrevivência das células vermelhas e o requerimento de agentes estimuladores da eritropoiese.

Em relação ao comprometimento da proliferação e diferenciação dos precursores eritróides observado na ACD, a redução da produção da eritropoietina e o efeito inibitório das citocinas inflamatórias sobre a medula óssea são apontados como as principais causas. A produção insuficiente de EPO se deve em parte a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelas citocinas inflamatórias. As EROS prejudicam a afinidade de ligação dos fatores de transcrição que induzem a expressão da *Epo* e danificam as células produtoras desse hormônio. Sendo que, a diminuição da atividade da EPO pode promover a retenção de ferro pelas células do sistema reticuloendotelial, além de comprometer a eritropoiese que por sua vez interfere na regulação da hepcidina. Ainda, as citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama) podem inibir o crescimento das unidades formadora de eritróide, BFU-E e CFU-E, e adicionalmente danificá-las por ação direta das EROS (Weiss, 2009; Poggiali et al, 2013). Prince et al (2012) induziram um processo inflamatório crônico em camundongos e observaram, por meio da citometria de fluxo, uma maturação ineficiente e um aumento do estresse oxidativo dos precursores eritróides.

Na ACD é observado um quadro de redução da disponibilidade sistêmica de ferro, ou seja, um quadro de hipoferrinemia acompanhada de reservas de ferro celulares normais ou aumentadas. O aumento da captação e retenção do ferro pelas células do sistema reticuloendotelial limita a disponibilidade de ferro para a eritropoiese. Essas anormalidades no metabolismo do ferro podem ser explicadas pelos efeitos do aumento da regulação da expressão da hepcidina pelas citocinas inflamatórias IL-1 e IL-6 e são responsáveis pelos dois principais aspectos dessa anemia: o sequestro de ferro celular e a restrição de ferro para a eritropoiese (Weiss, 2009; Poggiali et al, 2013). Os mecanismos pelos quais a inflamação e a eritropoiese modulam a expressão do gene da hepcidina foram abordados no tópico anterior dessa revisão bibliográfica. Theurl et al (2011) observaram aumentos dos níveis da proteína SMAD 1/5/8 fosforilada e dos níveis de mRNA da *Hamp* em ratos com ACD. No entanto, os níveis desses mesmos marcadores encontravam-se reduzidos em ratos com ACD associada a anemia por deficiência de ferro. Os autores concluíram que a ACD estimula a transcrição do gene da hepcidina por meio da proteína SMAD 1/5/8 fosforilada, no entanto, o estímulo dessa via pela inflamação é sobrepujado pelo estímulo da deficiência dietética de ferro.

A ACD é a anemia de mais complexa de ser tratada, sendo geralmente resolvida com o tratamento da doença de base. Agentes estimuladores da eritropoiese, a suplementação de ferro e transfusões sanguíneas podem amenizar a anemia, no entanto, um número considerável de pacientes não responde a esses tratamentos. Novas estratégias de tratamento que envolvam a modulação da hepcidina têm sido propostas, uma vez que está desempenha papel central na fisiopatologia da ACD (Sun et al, 2012; Poggiali et al, 2013).

### **2.3. INTERAÇÃO ENTRE A VITAMINA A E O METABOLISMO DO FERRO**

A interação entre os estados nutricionais de vitamina A e Fe tem sido demonstrada, porém o mecanismo de interação entre os metabolismos desses dois nutrientes ainda é pouco conhecido. A deficiência de ferro tem sido associada com baixos níveis plasmáticos de retinol e altas concentrações de ésteres de retinil hepáticos (Strube et al, 2002). Assim como, a deficiência de vitamina A tem sido associada à anemia e ao acúmulo de ferro nos órgãos (Mehdad et al, 2010; Arruda et al, 2009).

Mwanri et al (2000) observaram que crianças anêmicas suplementadas com vitamina A e ferro atingiram melhores valores da concentração de hemoglobina e crescimento quando comparadas a crianças que receberam somente suplementação com ferro. Zimmerman et al (2006) constataram que crianças anêmicas e com deficiência de vitamina A suplementadas com vitamina A evoluíram com aumento da média dos valores plasmáticos de hemoglobina, volume corpuscular médio e eritropoetina e redução dos níveis de ferritina, receptor de transferrina sérica e da prevalência de anemia. O aumento na concentração de hemácias e hemoglobina e acúmulo de ferro no baço de ratos deficientes em vitamina A foi verificado por Mehdad et al (2010).

Alguns estudos avaliaram o efeito dos retinoides no mecanismo de regulação intracelular da homeostase de ferro. Schroeder et al (2007) observaram que a suplementação de atRA em ratos tratados com uma dieta deficiente em Fe promoveu a restauração dos níveis de ferritina hepática e redução da atividade de ligação da IRP ao RNA . O aumento da ferritina tecidual estaria em parte associado a redução da atividade de ligação da IRP ao RNA da ferritina. Os animais suplementados com atRA tiveram uma redução de 40% nos níveis de TfR hepático. Jiang et al (2011) realizaram um estudo com ratos com o objetivo de investigar o efeito da deficiência de vitamina A na

expressão gênica da IRP2. Os autores observaram redução dos níveis de retinol e ferro séricos e aumento dos níveis esplênicos de ferro nos ratos tratados com dieta deficiente em vitamina A. Nos animais deficientes em vitamina A foi observado ainda um aumento dos níveis de mRNA da *Irp2* e *Tfr* e redução dos níveis de mRNA de *Fn*, sugerindo que a deficiência de vitamina A leva à diminuição da mobilização de ferro hepático. Os níveis de mRNA da *Fn*, *Tfr*, and *Irp2* mRNA regulados pelo atRA reverteram com o uso do bloqueador de receptores do ácido retinóico Ro41-5253, similar ao observado in vivo nos animais tratados com dieta deficiente em vitamina A. Esses resultados indicaram que o atRA, atuando em nível de transcrição, através de receptores de ácido retinóico, inibiu a expressão de *Irp2* e, em seguida, induziu a ativação de genes relacionados, afetando a homeostase do ferro. Os resultados destes estudos sugerem que a vitamina A pode ter a regulação intracelular da homeostase do ferro como um dos pontos de interação com o metabolismo de ferro.

Um estudo investigou o efeito da deficiência de vitamina A e dos retinoides na expressão de genes de proteínas envolvidas na regulação sistêmica da homeostase de ferro. Tsuchiya et al (2009) observaram um acúmulo de ferro e um aumento nos níveis de mRNA do *Hfe2* no fígado de ratos que apresentavam uma mutação no receptor *Rarα* que impedia a ligação dos retinoides, sugerindo que a vitamina A altera a expressão da *Hfe2* por meio dos receptores de ácido retinóico. Os autores ainda identificaram dois meios sítios invertidos de RAREs espaçados por sequências de 100 bp na região 5' não traduzida na sequência do gene da hemojuvelina, sugerindo uma possível regulação direta desse gene por retinoides. Ainda nesse estudo, com a realização do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) foi observado que o atRA induz o recrutamento do RAR $\alpha$  e RXR $\beta$ 2, e a dissociação do RXR $\alpha$ . Diante desses resultados, os autores sugerem que os retinoides estão envolvidos no metabolismo hepático do ferro através da

regulação transcricional da hemojuvelina, sendo que a repressão da expressão da hepcidina parece ser mediada pela repressão da expressão do gene da hemojuvelina e não do receptor de transferrina 2.

Um estudo analisou o efeito dos retinoides e da deficiência de vitamina A na transcrição de genes de proteínas envolvidas na absorção e exportação do ferro dietético nos enterócitos. No estudo de Citelli et al (2012), os níveis de transcrito da *Fpn1* em células Caco-2 foi induzida quando tratadas com atRA por 48h, mas nenhum efeito foi observado para o *Dmt1*. Porém, quando avaliada *in vivo*, não houve diferença significativa nos níveis de transcrito destes genes no duodeno entre os grupos de ratos controle e deficiente em vitamina A.

Com base no exposto acima, a literatura mostra evidências de que a vitamina A interfere no metabolismo de ferro, alterando a expressão de genes envolvidos na regulação intracelular e sistêmica da homeostase corporal de ferro. No entanto, muitas lacunas ainda existem para a elucidação dos mecanismos que possibilitam a interação entre esses dois nutrientes. A compreensão dos mecanismos de interação entre a vitamina A e o metabolismo de ferro pode contribuir no esclarecimento da etiologia, na escolha de parâmetros para diagnóstico, na determinação de condutas terapêuticas e no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento dos diferentes tipos de anemia. Ainda, esse conhecimento faz se importante para a adoção e reavaliação de políticas públicas, como a fortificação de alimentos com ferro, que visam combater a anemia por deficiência de ferro, porém não previnem outros tipos de anemia e podem vir a aumentar o risco de doenças crônicas não transmissíveis na população não deficiente em ferro.

O presente estudo teve como hipóteses: 1) a deficiência de vitamina A modula os níveis hepáticos de transcrito da hepcidina por meio da via de sinalização HJV-

BMP-SMAD; 2) a deficiência de vitamina A modula os níveis hepáticos de transcrito da hepcidina por meio dos receptores nucleares de ácido retinóico e de retinoides X.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da deficiência de vitamina A nos biomarcadores do *status* de ferro, nos níveis de transcritos de genes envolvidos na via de sinalização HJV-BMP-SMAD, e o possível envolvimento dos receptores nucleares RAR e RXR na manutenção da homeostase de ferro.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar os níveis de retinol hepático em ratos submetidos a dietas com diferentes quantidades e fontes de vitamina A e ferro;
- Quantificar a concentração de ferro tecidual no fígado, intestino e baço de ratos submetidos a dietas com diferentes quantidades e fontes de vitamina A e ferro;
- Determinar os níveis de parâmetros hematológicos relacionados ao *status* de ferro – ferro sérico, capacidade latente de ligação ao ferro (UIBC), capacidade total de ligação ao ferro (TIBC) e saturação da transferrina (TS%) – em ratos submetidos a dietas com diferentes quantidades e fontes de vitamina A e ferro;
- Determinar os níveis hepáticos de mRNA de genes envolvidos em uma das vias de sinalização da regulação sistêmica da homeostase de ferro – hepcidina (*Hamp*),



hemojuvelina (*Hfe2*), proteína morfogenética do osso 6 (*Bmp6*), SMAD 7 (*Smad7*) – em ratos submetidos a dietas com diferentes quantidades e fontes de vitamina A e ferro;

- Determinar os níveis hepáticos de mRNA dos genes de receptores nucleares – receptor de ácido retinóico alfa (*Rar $\alpha$* ) e receptor de retinoides X beta (*Rxr $\beta$* ) – em ratos submetidos a dietas com diferentes quantidades e fontes de vitamina A e ferro;

- Determinar os níveis intestinais de mRNA dos genes envolvidos em uma das vias de sinalização da regulação sistêmica da homeostase de ferro – transportador de metal divalente 1 (*Dmt1* ou *Scl11a2*), ferroportina 1 (*Fpn1* ou *Slc40a1*) e proteína morfogenética do osso 6 (*Bmp6*) – em ratos submetidos a dietas com diferentes quantidades e fontes de vitamina A e ferro.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Trinta ratos Wistar, machos, com 21 dias de idade, com peso médio de  $65,7 \pm 5,5$  gramas, provenientes da Granja GR (São Paulo, Brasil), foram alojados em gaiolas individuais, em biotério, com ciclos de luz / escuridão de 12 / 12 h e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os animais tiveram livre acesso à água, enquanto o acesso à ração ocorreu somente durante o ciclo de escuridão.

Após sete dias de aclimação com a dieta AIN-93G (Reeves, 1993) – formulada para roedores nas fases de crescimento, gestação e lactação – os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (6 animais/grupo) e tratados durante 59 dias com dietas com diferentes quantidades e fontes de vitamina A e ferro. O grupo controle (CT) foi alimentado com a dieta AIN-93G, o grupo deficiente em vitamina A (VAD) recebeu a dieta AIN-93G com mistura vitamínica isenta de vitamina A, o grupo deficiente em vitamina A e ferro (VAFed) foi alimentado com a dieta AIN-93G com mistura vitamínica isenta de vitamina A e mistura mineral isenta de ferro, o grupo deficiente em ferro (FeD) recebeu a dieta AIN-93G com mistura mineral isenta de ferro e o grupo ácido retinóico todo-trans (atRA) foi alimentado com a dieta AIN-93G com mistura vitamínica isenta de vitamina A e adicionada de 12 mg de atRA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, EUA) / kg dieta, única fonte de vitamina A (Tabela 4). A escolha da dose de atRA a ser acrescentada a dieta foi baseada em estudos com ratos que avaliaram o efeito do atRA no metabolismo da vitamina A ou que utilizaram essa mesma dose em tratamentos dietéticos e observaram efeitos semelhantes ao fisiológico e ausência de sintomas de toxicidade (Cifelli et al, 2005; Martini et al, 1995; White et

al, 1998; See et al, 2008).

Os animais tiveram o peso corporal aferido semanalmente em balança analítica (Marte, ASF11, São Paulo, SP, Brasil), antes de receberem a ração. A avaliação do consumo dietético foi realizada diariamente pela diferença entre o peso da dieta ofertada e da sobra, sendo esses pesos aferidos em balança analítica (Marte, ASF11, São Paulo, SP, Brasil).

Após os 59 dias de tratamento com as dietas experimentais, os animais ficaram sem acesso a ração por 14 horas antes do sacrifício. Os ratos foram anestesiados com isoflurano 3% e então, foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue em tubos contendo ácido etileno-diaminotetraacético 7% (21  $\mu$ L / mL sangue). Fígado, baço e intestino delgado (extensão de 1 cm de comprimento do intestino delgado distal ao piloro e 1 cm proximal à válvula ileocecal) foram removidos para as análises, lavados com solução salina (NaCl 0,9%) a 4°C, seguindo imediatamente para congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a - 70° C. Todos os materiais utilizados para manipular e armazenar os órgãos foram previamente tratados com dimetil pirocarbonato 0,1% (DEPC).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnBDoc 52606/2011).

#### **4.2. PREPARO E COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS DIETAS**

As dietas foram preparadas para consumo em até 30 dias com ingredientes obtidos da empresa Rhoster indústria e comércio Ltda (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) com composição em acordo com Reeves et al (1993) (Tabela 1,2 e 3). Após o preparo, as rações eram acondicionadas em embalagens escuras e armazenadas a - 80 ° C. A

mistura vitamínica contém o palmitato de retinil todo-trans como fonte de vitamina A e a mistura mineral possui o citrato férrico como fonte de ferro (Tabelas 2, 3 e 4).

**TABELA 1** Composição da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento, gestação e lactação. Fonte: 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 da mistura mineral da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento, gestação e lactação. Fonte: 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 da mistura vitamínica da dieta AIN-93G formulada para roedores em crescimento, gestação e lactação. Fonte: 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

**TABELA 4** Composição das misturas mineral e vitamínica das diferentes dietas de tratamento.

	<b>CT</b>	<b>atRA</b>	<b>VAD</b>	<b>FeD</b>	<b>VAFED</b>
<b>Mistura mineral</b>	AIN-93G	AIN-93G	AIN-93G	AIN-93G isenta de citrato de ferro	AIN-93G isenta de citrato de ferro
<b>Mistura Vitamínica</b>	AIN-93G	AIN-93G isenta de palmitato de retinil todo- trans + 12 mg de atRA/kg dieta	AIN-93G isenta de palmitato de retinil todo- trans	AIN-93G	AIN-93G isenta de palmitato de retinil todo- trans

CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFED: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro; AIN-93G (Reeves et al, 1993).

### 4.3. CONCENTRAÇÃO DE RETINOL HEPÁTICO

A concentração de retinol no fígado foi avaliada pelo método de 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 minutos. Durante o período de incubação, a amostra foi agitada em vortex, 3 vezes, por 15 s, em intervalos de 15 minutos. Após a saponificação, foi adicionado hexano pureza HPLC (2x volume; Merck, Darmstadt, Alemanha) à suspensão, e a mesma foi agitada por 30 segundos e centrifugada por 1 min para separação de fases; esse procedimento foi realizado 3 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 ressuscitado 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/min 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 entre 0,0016 e 0,0097 µg / µL. 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,  $y = 3,23352 \cdot 10^{-9} - 0,0003$ ;  $r^2 = 0,999$ .

#### **4.4. CONCENTRAÇÃO DE FERRO TECIDUAL E NA DIETA**

A concentração de ferro no fígado, intestino, baço 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) e de ração (0,5 g) foram digeridas com 5 mL de HNO<sub>3</sub> PA (Sigma Aldrich Co., St

Louis, MO, EUA) e 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) em sistema biodigestor micro-ondas (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 HNO<sub>3</sub> 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 µg 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 nas análises foram lavadas com HCl 10% e posteriormente lavadas com água deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).

#### **4.5. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS RELACIONADOS AO *STATUS* DE FERRO**

##### **4.5.1. FERRO SÉRICO**

A concentração de ferro sérico foi determinada por método colorimétrico utilizando kit comercial (Ref.: 38, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). As análises foram realizadas em duplicata. A 225 µL de soro foram adicionados 900 µL de tampão (250 mmol/L, pH 4, hidroxilamina 144 mmol/L) e realizada a leitura da absorbância a 560 nm em espectrofotômetro de luz ultravioleta visível (modelo UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Em seguida, foram adicionados 25 µL de

ferrozina (28 mmol/L) às amostras e estas foram incubadas em banho-maria a 37° C por 10 min. Realizou-se novamente a leitura da absorbância a 560 nm. A diferença entre as leituras das absorbâncias após e antes a adição de ferrozina foi o valor aplicado à equação da reta da curva-padrão para o cálculo da concentração de ferro sérico. A curva-padrão foi realizada a partir de diluições de padrão de ferro (500 µg/dL) obtendo-se 6 pontos com faixa de variação de concentração entre 50 e 500 µg de ferro/dL, sendo obtida a seguinte equação da reta:  $y = 0,0009 x + 0,0013$ ;  $r^2 = 0,9998$ .

#### 4.5.2. CAPACIDADE LATENTE E TOTAL DE LIGAÇÃO AO FERRO E SATURAÇÃO DA TRANSFERRINA

A capacidade latente de ligação de ferro (UIBC) foi realizada utilizando-se um kit comercial (Ref.: 92, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) de acordo com o protocolo do fabricante. As análises foram realizadas em triplicata. A 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, azida sódica 7,7 mmol/L e surfactante), 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> (Ferrozina  $\geq 10$  mmol/L e ácido ascórbico  $\geq 32,6$  mmol/L), 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 UIBC 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



UIBC das amostras foi calculado à partir da razão entre a absorvância da amostra e do calibrador, multiplicado pelo valor de UIBC do calibrador (eq. II).

$$\text{Absorbância da amostra} = A_2 - A_1 \quad (\text{I})$$

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

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

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

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

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

#### **4.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS (mRNA)**

##### **4.6.1. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO CDNA**

A extração de RNA total do fígado e intestino dos ratos foi realizada utilizando o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Inc., Canada). Brevemente, cerca de 100 mg de tecido foram homogeneizados 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 ressuspendido 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 ressuspendido em 30 µL e 50 µL de água deionizada para o intestino e fígado, respectivamente.

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: Concentração de RNA (µg/ml) =  $A_{260} \times 40 \times$  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 absorbâncias 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) e tampão de corrida TAE 1x, composto por 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<sup>TM</sup> (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 (20  $\mu$ L 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 (qRT-PCR) para verificar ausência de contaminação por DNA genômico.

#### 4.6.2. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS (mRNA) POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE TRANSCRIÇÃO REVERSA QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

Os genes de interesse – hepcidina (*Hamp*), hemojuvelina (*Hfe2*), proteína morfogenética do osso 6 (*Bmp6*), SMAD 7 (*Smad7*), receptor de ácido retinóico alfa (*Rara*), receptor de retinoides X beta (*Rxrβ*), transportador de metal divalente 1 (*Dmt1* ou *Sc11a2*) e ferroportina 1 (*Fpn1* ou *Slc40a1*) – tiveram os níveis de mRNA determinados por meio da amplificação utilizando-se o sistema reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR; 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura). A qRT-PCR foi realizada utilizando 2 µL de cDNA diluído 50 vezes (correspondendo a cerca de 0,02 µg de RNA total) em um volume final de 10 µL, 5 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 10 µmol/L (concentração final) de cada primer.

Os genes, número de acesso no *GenBank* e sequência dos primers (5' – 3') utilizados estão descritos na Tabela 5.

**TABELA 5** Genes, número de acesso no *GenBank* e sequência dos primers (5' – 3') utilizados.

Gene	<i>GenBank</i>	Sequência do primers		
		Forward	Reverse	
Hepcidina ( <i>Hepcidin</i> )	<i>Hamp</i>	NM_053469	tgatgctgaagcgaagga	tgtgtgagaggtcaggac
Hemojuvelina ( <i>Hemochromatosis type 2 (juvenile) homolog</i> )	<i>Hfe2</i>	NM_001012080.1	gtagcatcgggagccaac	tcaaaggctgcaggaagatt
Proteína morfogenética do osso 6 ( <i>bone morphogenetic protein 6</i> )	<i>Bmp6</i>	NM_013107.1	gacagcagagtcgcaatcg	agctcacgtaaagctcatgc
SMAD 7 ( <i>SMAD family member 7</i> )	<i>Smad7</i>	NM_030858.1	agaggctgtgtgctgtg	catcgggtatctggagtaagg
Receptor de ácido retinóico alfa ( <i>retinoic acid receptor alpha</i> )	<i>Rarα</i>	NM_031528.2	accattgccgaccagattacc	aaggtcattgtgtctgtcaggt
Receptor de retinóides X beta ( <i>retinoids x receptor beta</i> )	<i>Rxrβ</i>	NM_206849.3	cttcccagtcacatgtcttcc	ggtggettcacatcttcagg
Transportador de metal divalente 1 ( <i>divalent metal transporter 1</i> )	<i>Dmt1</i>	NM_013173	ctgattacagtctggagcag	cacttcagcaaggtgcaa
Ferroportina 1 ( <i>ferroportin 1</i> )	<i>Fpn1</i>	NM_133315.2	ttccgcacttttcgagatgg	tacagtcgaagcccaggactgt
β-actina ( <i>β-actin</i> )	<i>Actb</i>	NM_031144	gtcgtaccactggcattgtg	ctctcagctgtggtggtgaa

A detecção dos genes 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). A expressão dos genes de interesse foi normalizada com a expressão do gene constitutivo β-actina e as reações foram feitas em triplicata. A amplificação e a especificidade de cada produto foram verificadas a partir da curva de dissociação. A eficiência de amplificação da qRT-PCR foi avaliada através da realização de curvas-padrão para cada fragmento amplificado em nas diluições 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 e 1: 200.

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, sendo o valor de aproximadamente -3,32 considerado parâmetro para avaliar uma reação eficiente. A eficiência da qRT-PCR esteve entre 102 a 109% para todos os primers. Outra curva foi construída utilizando-se os valores de  $\Delta C_T$  ( $C_{T \text{ gene de interesse}} - C_{T \text{ gene constitutivo}}$ ) 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  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (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.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS (versão 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos de tratamento foram realizadas pelo test t-student para amostras independentes. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significante.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NO GANHO DE MASSA CORPORAL, NÍVEIS HEPÁTICOS DE RETINOL E *STATUS* DE FERRO

Os animais dos grupos deficiente em vitamina A (VAD), deficiente em ferro (FeD) e com todo-trans ácido retinóico (atRA) apresentaram menor ganho de massa corporal em comparação ao grupo controle (CT), embora o consumo dietético tenha sido similar entre esses grupos ( $p = 0,035$ ;  $0,032$  e  $0,029$ ; respectivamente; Tabela 6). Os ratos tratados com dietas deficientes em ferro, FeD e VAFeD, apresentaram menor ingestão de ferro que os animais do grupo CT ( $p = 0,000$  e  $0,000$ ; respectivamente; Tabela 6), resultado esse esperado uma vez que a dieta deficiente em ferro continha teor de ferro 4 vezes menor que a dieta controle. Com exceção das dietas FeD e VAFeD, as demais dietas continham a recomendação de ferro para roedores de acordo com AIN-93G.

Após 59 dias de tratamento, os grupos que receberam dietas deficientes em vitamina A, VAD e VAFeD, e o grupo atRA apresentaram depleção total das reservas de retinol hepático (Tabela 6). Não foi observada diferença entre os grupos CT e FeD em relação a concentração de retinol no fígado, cerca de  $60 \mu\text{g}$  retinol / g de tecido.



**TABELA 6** Ganho de massa corporal, ingestão dietética, concentração de ferro na dieta e retinol hepático de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias.

	<b>Ganho de massa corporal</b> (g/59 dias)	<b>Ingestão dietética</b> (g/59 dias)	<b>Concentração de ferro na dieta</b> (µg/g)	<b>Retinol hepático</b> (µg/g tecido)
<b>CT</b>	274,90 ± 9,80	1.110,31 ± 51,72	44,83 ± 3,34	60,30 ± 9,50
<b>atRA</b>	232,80 ± 39,20*	1.070,89 ± 82,20	34,15 ± 3,68*	< LD
<b>VAD</b>	226,90 ± 41,20*	1.053,31 ± 80,79	38,82 ± 3,54*	< LD
<b>FeD</b>	231,80 ± 36,20*	1.033,19 ± 71,48	12,71 ± 1,12*	59,30 ± 16,10
<b>VAFeD</b>	232,70 ± 59,00	1.045,51 ± 120,41	12,88 ± 1,68*†	< LD

CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro; LD: limite de detecção.

Média ± desvio-padrão. n = 6.

\* p < 0,05 comparado ao grupo CT

† p < 0,05 comparado ao grupo VAD

§ p < 0,05 comparado ao grupo FeD

A deficiência de vitamina A (VAD), ferro (FeD) e a associação de ambas (VAFeD) promoveram uma redução na concentração de ferro sérico (p = 0,009; 0,003 e 0,031; respectivamente; Tabela 7) e na saturação de transferrina (TS%) em relação ao grupo controle (p = 0,028; 0,001 e 0,003; respectivamente; Tabela 7). No entanto, apenas os grupos VAD e FeD apresentaram maior capacidade latente de ligação ao ferro (UIBC; p = 0,024 e 0,012; respectivamente; Tabela 7) comparado ao grupo CT sendo que, no grupo VAFeD o aumento foi marginal (p = 0,085; Tabela 7). Os animais tratados com dieta contendo o atRA apresentaram níveis reduzidos de ferro sérico (p = 0,014; Tabela 7) e uma redução marginal na saturação de transferrina (p = 0,068; Tabela 7) em relação ao grupo controle, não foi observada alteração nos índices UIBC e TIBC.

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

	<b>Ferro sérico</b> (µg/dL)	<b>UIBC</b> (µg/dL)	<b>TIBC</b> (µg/dL)	<b>TS</b> (%)
<b>CT</b>	161,41 ± 42,01	291,03 ± 43,68	452,45 ± 47,73	35,60 ± 8,05
<b>AtRA</b>	100,11 ± 28,26 *	307,31 ± 74,16	406,46 ± 68,12	25,39 ± 9,19
<b>VAD</b>	93,55 ± 10,72 *	373,74 ± 49,56 *	484,84 ± 67,09	22,65 ± 6,46*
<b>FeD</b>	78,53 ± 22,65 *	409,01 ± 84,36 *	487,54 ± 68,41	16,75 ± 6,77*
<b>VAFeD</b>	109,53 ± 28,53*§	380,45 ± 105,77	489,98 ± 88,28	19,85 ± 4,51*

CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro; UIBC: capacidade latente de ligação ao ferro; TIBC: capacidade total de ligação ao ferro; TS: saturação de transferrina.

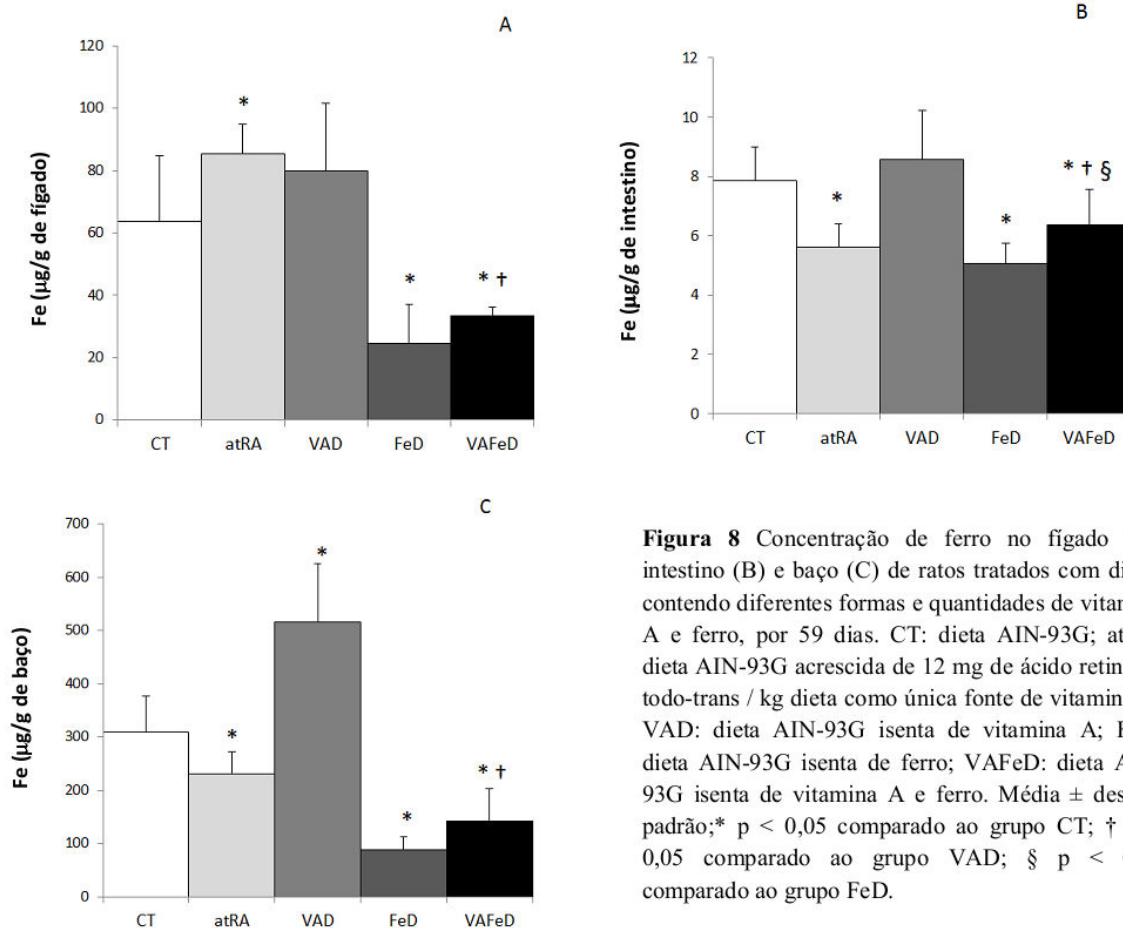
Média ± desvio-padrão n = 6.

\* p < 0,05 comparado ao grupo CT

† p < 0,05 comparado ao grupo VAD

§ p < 0,05 comparado ao grupo FeD

Em relação à concentração de ferro nos tecidos, os ratos deficientes em vitamina A, grupo VAD, apresentaram maiores concentrações no baço ( $p = 0,005$ ), enquanto não foram observadas diferenças no fígado e intestino quando comparados com os ratos do grupo controle. A substituição do éster de retinil pelo atRA na dieta promoveu um aumento na concentração de ferro hepático ( $p = 0,046$ ; Figura 8), seguida de uma redução nos níveis de ferro no baço e intestino ( $p = 0,033$  e  $0,002$ ; respectivamente; Figura 8), em relação ao grupo controle. Os ratos alimentados com dietas deficientes em ferro, FeD e VAFeD, apresentaram menores concentrações de ferro no fígado, baço e intestino ( $p = 0,008$ ;  $<0,0001$  e  $<0,0001$  para o grupo FeD e;  $0,016$ ;  $0,002$  e  $0,053$  para o grupo VAFeD; respectivamente; Figura 8) em relação ao grupo controle. O grupo VAFeD apresentou uma redução significativa na concentração de ferro e um aumento significativo no intestino comparado ao grupo FeD ( $p = 0,066$  e  $0,038$ ; respectivamente; Figura 8). Os animais submetidos a dietas deficientes em ambos os nutrientes (grupo VAFeD) também apresentaram menores concentrações de ferro no fígado, baço e intestino quando comparados aos ratos do grupo VAD ( $p = 0,003$ ;  $< 0,000$  e  $0,025$ ; respectivamente; Figura 8).



**Figura 8** Concentração de ferro no fígado (A), intestino (B) e baço (C) de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média ± desvio-padrão; \* p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; § p < 0,05 comparado ao grupo FeD.

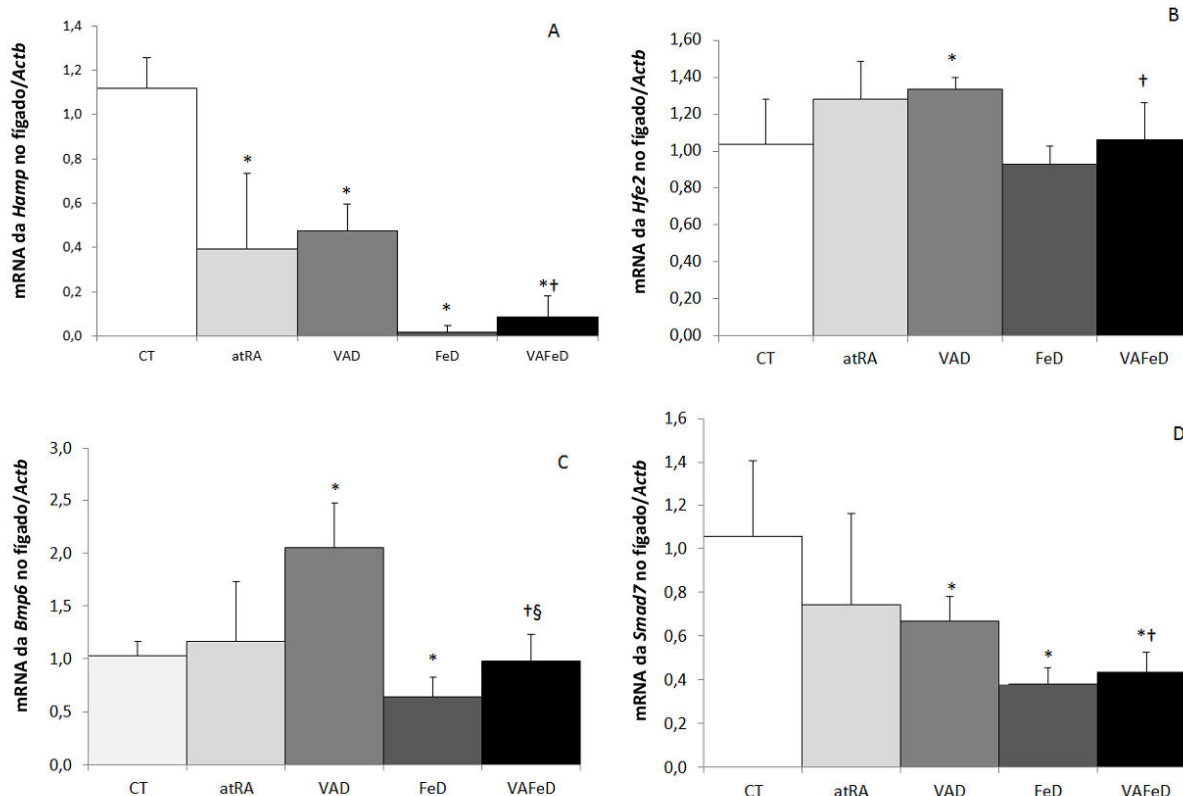
## 5.2. EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NOS NÍVEIS HEPÁTICOS DE mRNA DE GENES ENVOLVIDAS NA HOMEOSTASE SISTÊMICA DO FERRO: NÍVEIS DE TRANSCRITO DA *Hamp*, *Hfe2*, *Bmp6*, *Smad7*.

A Figura 9 apresenta os níveis hepáticos de transcritos (mRNA) de hepcidina (*Hamp*), hemojuvelin de membrana (*Hfe2*), proteína morfogenética do osso 6 (*Bmp6*) e SMAD 7 (*Smad7*), normalizados com os valores do gene constitutivo de  $\beta$ -actina (*Actb*), dos ratos tratados.

As deficiências dietéticas de vitamina A (2,3-vezes; p = 0,000) e ferro (58,7-vezes; p = 0,000) separadamente e quando combinadas (12,6-vezes; p = 0,000) reduziram os níveis de mRNA de *Hamp* em relação ao grupo CT, e a ingestão do atRA

(2,8-vezes;  $p = 0,002$ ) como única fonte de vitamina A não reverteu os efeitos da deficiência da vitamina A (Figura 9).

A deficiência dietética de vitamina A, grupo VAD, promoveu o aumento dos níveis hepáticos de mRNA de *Hfe2* (1,2-vezes;  $p = 0,026$ ) e *Bmp6* (2,0- vezes;  $p = 0,0013$ ), entretanto reduziu os níveis de transcritos de *Smad7* no fígado (1,6- vezes;  $p = 0,027$ ) quando comparado ao grupo controle. O consumo do atRA como única fonte dietética de vitamina A foi capaz de manter os níveis de mRNA de *Hfe2*, *Bmp6* e *Smad7* similares aos observados no grupo CT. Os níveis hepáticos de transcritos de *Bmp6* e *Smad7* apresentaram-se reduzidos nos ratos deficientes em ferro, FeD (1,6-vezes e 2.8-vezes;  $p = 0,002$  e  $0,005$ ; respectivamente). O grupo VAFED apresentou menores níveis hepáticos de mRNA de *Smad7* (2,4-vezes,  $p = 0,006$ ) em relação ao grupo CT. Além disso, a associação das deficiências de vitamina A e ferro, grupo VAFED, reduziu significativamente os níveis de mRNA de *Hamp*, *Hfe2*, *Bmp6* e *Smad7* no fígado quando comparado ao grupo VAD ( $p = 0,035$ ;  $0,0003$  e  $0,002$ ; respectivamente; Figura 9).

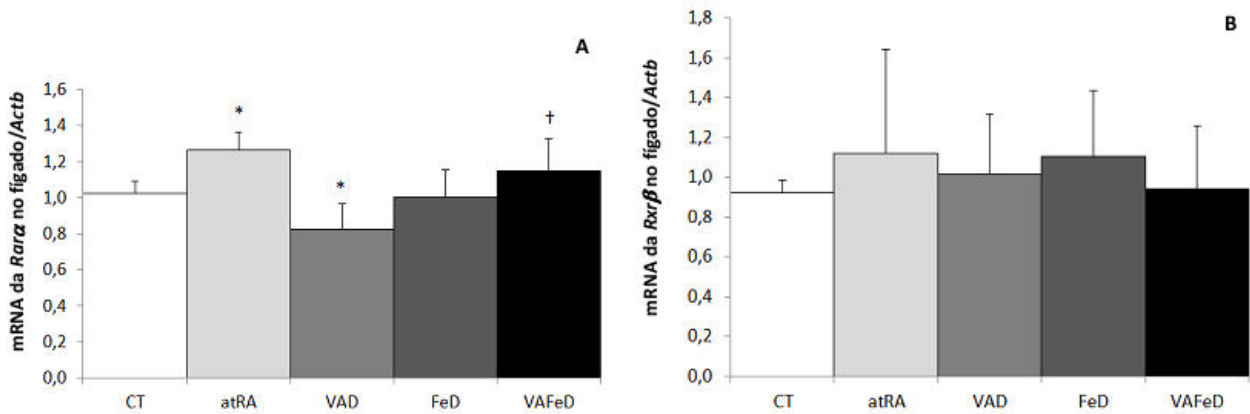


**Figura 9** Níveis relativos de transcritos (mRNA) da hepcidina, *Hamp* (A), Hemojuvelina, *Hfe2* (B), proteína morfogenética do osso 6, *Bmp6* (C) e SMAD 7, *Smad7* (D) no fígado normalizados com os valores de  $\beta$ -actina, *Actb* de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média  $\pm$  desvio-padrão; \* p < 0,05 comparado ao grupo CT; † p < 0,05 comparado ao grupo VAD; ‡ p < 0,05 comparado ao grupo FeD.

### 5.3. EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NOS NÍVEIS HEPÁTICOS DE mRNA DE GENES DOS RECEPTORES NUCLEARES: NÍVEIS DE TRANSCRITO DO *Rar $\alpha$* e *Rxr $\beta$*

A Figura 10 apresenta os níveis hepáticos de transcritos (mRNA) do receptor de ácido retinóico alfa (*Rar $\alpha$* ) e receptor de retinoides X beta (*Rxr $\beta$* ), normalizados com os valores do gene constitutivo de  $\beta$ -actina (*Actb*), dos ratos tratados.

A deficiência de vitamina A reduziu os níveis hepáticos de mRNA do *Rarα* (-1,2-vezes;  $p = 0,001$ ), enquanto nos ratos do grupo tratado com atRA esse valores apresentaram-se aumentados (1,2-vezes;  $p = 0,011$ ) em relação ao grupo CT. A deficiência de ambos os micronutrientes, grupo VAFeD, promoveu aumento nos níveis de transcritos de *Rarα* em relação ao grupo deficiente em vitamina A (VAD). Não foi observada diferença entre os grupos em relação aos níveis hepáticos de mRNA de *Rxrβ* (Figura 10).

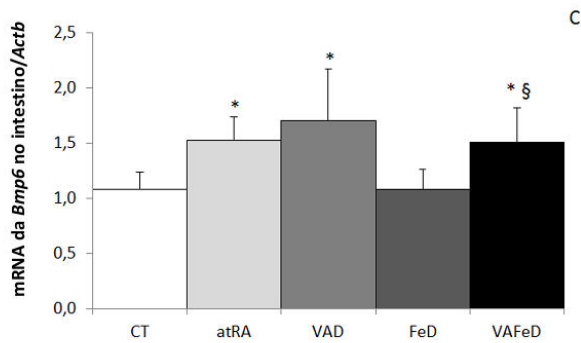
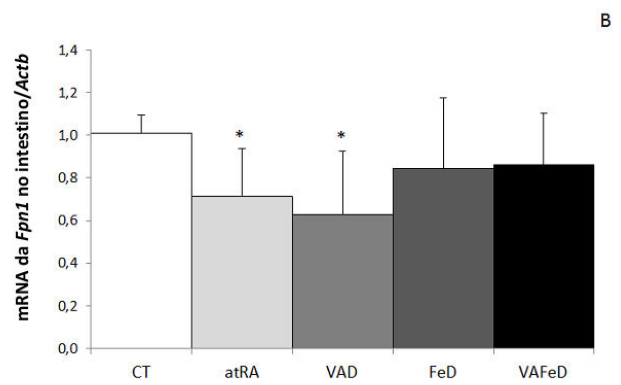
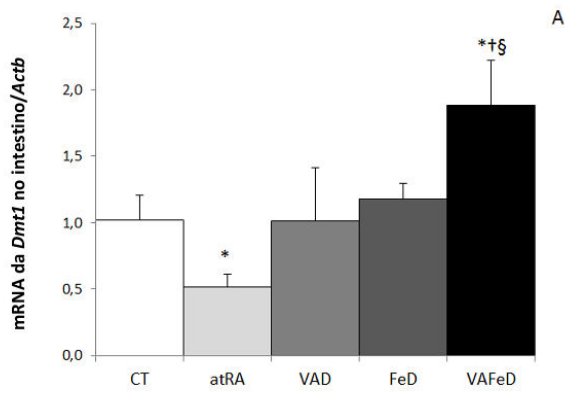


**Figura 10** Níveis relativos de transcritos (mRNA) do receptor de ácido retinóico alfa, *Rarα* (A) e do receptor de retinóides X beta, *Rxrβ* (B) no fígado normalizados com os valores de  $\beta$ -actina, *Actb* de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média  $\pm$  desvio-padrão; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo CT; †  $p < 0,05$  comparado ao grupo VAD; §  $p < 0,05$  comparado ao grupo FeD.

#### 5.4. EFEITO DAS DEFICIÊNCIAS DIETÉTICAS DE VITAMINA A E FERRO E DO ÁCIDO RETINÓICO TODO-TRANS NOS NÍVEIS INTESTINAIS DE mRNA DE GENES ENVOLVIDAS NA HOMEOSTASE SISTÊMICA DO FERRO: NÍVEIS DE TRANSCRITO DO *Dmt1*, *Fpn1* e *Bmp6*

Os níveis intestinais de mRNA de *Dmt1*, *Fpn1* e *Bmp6* são apresentados na Figura 11. Não foram observadas diferenças nos níveis de transcritos de *Dmt1* nos ratos tratados com dietas deficientes em vitamina A ou ferro, grupos VAD e FeD, no entanto, a associação das duas deficiências, grupo VAFeD, promoveu um aumento nos níveis de mRNA de *Dmt1* em relação ao grupo CT (1,8-vezes;  $p = 0,001$ ), um perfil semelhante foi obtido em relação aos grupos VAD (1,8- vezes;  $p = 0,002$ ) e FeD (1,5- vezes;  $p = 0,002$ ). A administração do atRA promoveu uma redução nos níveis de transcrito de *Dmt1* quando comparado ao grupo controle (1,9-vezes;  $p = 0,014$ ; Figura 11).

A deficiência de vitamina A, grupo VAD, promoveu uma redução nos níveis de mRNA de *Fpn1* e um aumento da *Bmp6* e no intestino comparadas ao grupo controle (1,6-vezes;  $p = 0,043$  e  $0,020$ ; respectivamente). Essa resposta não foi revertida pelo todo-trans ácido retinóico como substituto do éster de retinil na dieta, como observado no grupo atRA que apresentou níveis de transcrito aumentados de *Bmp6* e reduzidos de *Fpn1* no intestino, em relação ao grupo CT ( $p = 0,045$  e  $0,020$ ; respectivamente). O grupo VAFeD apresentou maiores níveis de mRNA de *Bmp6* que os grupos CT e FeD ( $p = 0,022$  e  $0,016$ ; Figura 11).



**Figura 11** Níveis relativos de transcritos (mRNA) do transportador de metal divalente 1, *Dmt1* (A), ferroportina 1, *Fpn1* (B) e proteína morfogenética do osso 6, *Bmp6* (C) no intestino normalizados com os valores de  $\beta$ -actina, *Actb* de ratos tratados com dietas contendo diferentes formas e quantidades de vitamina A e ferro, por 59 dias. CT: dieta AIN-93G; atRA: dieta AIN-93G acrescida de 12 mg de ácido retinóico todo-trans / kg dieta como única fonte de vitamina A; VAD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A; FeD: dieta AIN-93G isenta de ferro; VAFeD: dieta AIN-93G isenta de vitamina A e ferro. Média  $\pm$  desvio-padrão; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo CT; †  $p < 0,05$  comparado ao grupo VAD; §  $p < 0,05$  comparado ao grupo FeD.



## 6. DISCUSSÃO

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que ratos alimentados com uma dieta deficiente em vitamina A durante 57 dias apresentaram um menor ganho de massa corporal e maior concentração de hemoglobina em relação ao grupo controle, sugerindo que a vitamina A contribui para a regulação da homeostase do ferro possivelmente modulando a expressão de hepcidina no fígado (Arruda et al, 2009). Com o objetivo de avaliar como a vitamina A modula a expressão de hepcidina e, conseqüentemente, o metabolismo do ferro, o presente estudo avaliou os biomarcadores do *status* de ferro, os níveis de transcritos de genes envolvidos na via de sinalização hemojuvelina - proteína morfogenética do osso 6 – SMAD e o possível envolvimento dos receptores nucleares RAR e RXR. A compreensão dos mecanismos que controlam a expressão do gene da hepcidina constitui um importante aspecto no tratamento da anemia da doença crônica.

No presente estudo, a depleção completa das reservas hepáticas de retinol Nos animais tratados com as dietas isentas em vitamina A (VAD e VAFed) indica que a deficiência desse nutriente foi estabelecida durante o período de tratamento. Ghenimi et al (2009) demonstraram que ratos submetidos a uma dieta deficiente em vitamina A durante três semanas apresentaram menores níveis de vitamina A no soro em comparação com seus controle e, após cinco a seis semanas de tratamento, os níveis séricos de vitamina A foram completamente esgotados. A substituição do éster de retinil por ácido retinóico todo-trans (atRA) na dieta não foi capaz de manter as reservas hepáticas de retinol, um resultado esperado já que o todo-trans ácido retinóico não pode ser convertido em retinol, uma vez que a reação de oxidação do retinal a ácido retinóico é irreversível no meio intracelular (Ross, 2003).

Apesar de os animais tratados com dietas deficientes em vitamina A (VAD) ou ferro (FeD) isoladamente terem apresentado consumo alimentar semelhante ao grupo controle, o ganho de massa corporal foi menor nestes grupos, sugerindo que esses dois nutrientes, por participarem de diversos processos fisiológicos, são essenciais para adequada utilização e metabolização de nutrientes, visto que o ferro participa de reações envolvidas no metabolismo energético (Anzano et al, 1979; Shahbazi et al, 2009) e, a vitamina A tem importante papel na proliferação, diferenciação e morfogênese celular (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Theosídeo et al, 2010). O comprometimento do ganho de massa corporal não foi estatisticamente significativo no grupo submetido a dieta deficiente em ambos os micronutrientes (VAFeD) em relação ao grupo controle, possivelmente devido ao alto desvio-padrão em relação a média do grupo, o que pode ter influenciado o resultado estatístico. Embora alguns estudos sugiram que o atRA melhore o crescimento em ratos com deficiência de vitamina A (Anzano et al, 1979; Moore e Holmes, 1971), no presente estudo, a administração de 12 mg atRA / kg dieta não foi capaz de manter a taxa de ganho de peso semelhante ao do grupo controle. Estes dados sugerem que as outras formas de retinoides, tais como o ácido retinóico 9-cis e 13-cis são importantes para manter um ganho ponderal normal (Blaner, 2001 e Kane, 2012), ou que a administração diária de todo-trans ácido retinóico por um longo período (59 dias) pode ter promovido um efeito tóxico, prejudicando o ganho de peso corporal dos ratos.

Considerando que os metabolismos de vitamina A e ferro são interligados, no presente estudo observou-se que a deficiência de vitamina A (VAD) promoveu uma diminuição da disponibilização de ferro para o organismo, uma vez que o ferro sérico e a saturação de transferrina foram significativamente reduzidos, enquanto a concentração de ferro no baço aumentou em relação ao grupo controle. Um perfil de ferro sérico

semelhante foi observado nos grupos tratados com dietas deficientes em ferro (FeD e VAFed), no entanto, nestes grupos a deficiência de ferro sistêmica foi associada com deficiência de ferro nos tecidos. Estudos anteriores (Jiang et al, 2011; Tsuchiya et al, 2009; Arruda et al, 2009) demonstraram que, durante a deficiência de ferro, a reserva hepática de ferro é mobilizada, refletindo o mecanismo fisiológico de manutenção da homeostase de ferro. Estes resultados sugerem que a deficiência de vitamina A interfere no ajuste sistêmico de absorção, mobilização ou armazenamento de ferro de acordo com as demandas fisiológicas.

A substituição do éster de retinil pelo todo-trans ácido retinóico (atRA) na dieta promoveu uma redução significativa na concentração de ferro no baço e no intestino, apesar dos níveis de mRNA *Fpn1* se apresentarem reduzidos no intestino e mantidos no baço (Cunha et al, 2013).

Os níveis intracelulares de ferro modulam a expressão de hepcidina em nível transcricional através da via de sinalização HJV-BMP6-SMAD. O BMP6 parece estar envolvido no mecanismo de detecção dos níveis de ferro teciduais e, subsequente regulação da produção de hepcidina (Enns et al, 2013; Andriopoulos-Jr et al, 2009). No presente estudo, o grupo deficiente em ferro (FeD) apresentou menor concentração hepática de ferro e conseqüentemente menores níveis de mRNA de *Bmp6*, o que resultou em uma acentuada redução dos níveis de mRNA de *Hamp*, em comparação ao grupo controle. Esses resultados evidenciam que a deficiência de ferro promove a diminuição dos níveis hepáticos de mRNA de hepcidina devido à inibição da via de sinalização HJV-BMP6-SMAD, como consequência da redução dos níveis de transcritos de *Bmp6*, conforme postulado por outros autores (Pagani et al, 2012). Em hepatócitos, a sobrecarga de ferro aumenta a síntese da BMP6, o qual ao interagir com o co-receptor de membrana de BMP, hemojuvelina, desencadeia uma cascata de

sinalização que resulta na fosforilação das proteínas SMAD 1,5,8 que se complexam com a SMAD 4, estimulando a transcrição da hepcidina (Evstatiev e Gasche, 2012). Corradini et al (2011) ao investigar o mecanismo pelo qual os hepatócitos detectam os níveis de ferro e regulam a via BMP6-SMAD e a expressão de hepcidina, sugeriram que a concentração hepática de ferro é o único fator associado aos níveis de mRNA de *Bmp6* e, portanto, seria independente da saturação da transferrina, ferro sérico e concentração de hemoglobina. E ainda os dois fatores, saturação de transferrina e concentração hepática de ferro, modulam os níveis de mRNA de *Hamp* no fígado, porém de maneira independente.

No presente estudo, apesar da redução dos níveis hepáticos de mRNA de *Bmp6* no grupo deficiente em Fe (FeD), os níveis de mRNA de *Hfe2*, proteína que atua como co-receptor de BMP na indução da expressão de hepcidina em hepatócitos (Evstatiev e Gasche, 2012), foram semelhantes ao do grupo controle, sugerindo que a regulação da via de sinalização HJV-BMP6-SMAD pelo ferro, ocorre em nível transcricional para BMP6, e parece ser independente dos níveis de mRNA de Hfe. **Krijt et al (2012)** não observaram alteração dos níveis hepáticos da proteína HJV de membrana em ratos submetidos a sobrecarga e deficiência de ferro, apesar dos níveis de transcritos de *Hamp* e *Bmp6* apresentarem alterações de acordo com os níveis de ferro. Os autores sugerem que alterações substanciais no mRNA da *Hamp* podem ocorrer sem alterações da hemojuvelina de membrana, sugerindo que essa proteína não representa passo limitante no controle da expressão do gene de *Hamp*.

Dentre as diversas proteínas identificadas como inibidores da transcrição de hepcidina está a SMAD 7 que medeia uma resposta de *feedback* negativo através da via de sinalização BMP (Mleczko-Sanecka et al, 2010). Um estudo com camundongos que apresentavam sobrecarga de ferro demonstrou que os genes *Smad7* e *Hamp* no fígado

são co-regulados, por um mecanismo de *feedback* negativo iniciado pelo sinal de ativação (Kautz et al, 2008). No presente estudo, a redução dos níveis hepático de mRNA de *Hamp* observados no grupo FeD foi acompanhada por uma diminuição dos níveis de mRNA de *Smad7* no fígado, corroborando com a idéia de que em uma condição de deficiência de ferro sistêmica e tecidual há uma redução dos níveis de hepcidina e consequente redução da expressão de *Smad7*, que é um inibidor da via BMP-SMAD. Além disso, de acordo com estudos anteriores (Corradini et al, 2011; Vujić Spasić et al, 2012; Kautz et al, 2008) a expressão hepática dos genes *Bmp6* e *Smad7* é inibida na deficiência de ferro e está diretamente relacionada ao teor de ferro no fígado.

Similarmente ao observado no grupo deficiente em Fe (FeD), o grupo tratado com dieta deficiente em vitamina A (VAD) apresentou deficiência sistêmica de ferro (baixa concentração sérica de ferro e baixa saturação de transferrina), no entanto, ao contrário do observado nos grupos que receberam dietas deficiente em ferro (FeD e VAFed), houve um aumento da concentração de ferro no baço, em comparação ao grupo controle. Apesar do acúmulo de ferro no baço e aumento marginal no fígado ( $p = 0,06$ ) e aumento dos níveis de mRNA de *Bmp6* e *Hfe2* no fígado, o grupo VAD apresentou níveis de mRNA de *Hamp* duas vezes menores que o obtido no grupo controle. Esta resposta contraditória observada no grupo VAD pode estar relacionada a uma eritropoiese ineficaz promovida pela deficiência de vitamina A, decorrente da disponibilização insuficiente de ferro para a expansão do tecido eritroide (Evans, 2005). Frazer et al (2012) observaram que a estimulação crônica da eritropoiese, através de uma hemólise induzida por fenilhidrazina, promoveu um aumento na concentração hepática de ferro e dos níveis de mRNA de *Bmp6* e redução dos níveis de mRNA de *Hamp* no fígado. Em um modelo de ratos com talassemia intermédia, caracterizada pela

baixa concentração de hemoglobina e alta concentração de reticulócitos e de ferro no fígado, foi observado uma redução nos níveis de mRNA de *Hamp* apesar dos níveis de mRNA de *Bmp6* estarem aumentados, sugerindo que, quando a eritropoiese está estimulada, a sinalização deflagrada pelo regulador eritróide para diminuir a expressão de hepcidina prevalece em relação a sinalização mediada pelos estoques de ferro para aumentar a expressão de *Hamp* (Frazer et al, 2012). Um perfil semelhante também foi observado em um modelo de anemia hemolítica, que se caracteriza por baixos níveis séricos de ferro e a alta concentração de ferro tecidual. Nesses animais foi observada a redução na níveis de transcrito de *Hamp*, apesar de um aumento dos níveis de mRNA de *Bmp6* (Frazer et al, 2012). A via da BMP6 também induz reguladores negativos da hepcidina, como a SMAD7, de modo que uma resposta de *feedback* negativo para controlar a expressão da hepcidina pode ser estabelecida, mecanismo esse que impede que ocorra uma superexpressão de *Hamp* e consequente deficiência de ferro (Evstatiev e Gasche, 2012; Daba et al, 2013). Os menores níveis de mRNA da *Smad7* no fígado do grupo VAD refletem a inibição da expressão de *Hamp* pela deficiência sistêmica de ferro, uma vez que os níveis da *Smad7* e *Hamp* são co-regulados no fígado. A associação das duas deficiências dietéticas (VAFeD) reduziu a concentração de ferro no fígado, intestino e baço, com consequente redução dos níveis hepáticos de mRNA da *Hamp*, *Hfe2*, *Bmp6* e *Smad7* em comparação com o grupo de VAD. Estes resultados sugerem que o ferro é determinante para a modulação da expressão desses genes.

A forma da proteína hemojuvelina associada à membrana atua como um co-receptor da BMP estimulando a expressão de hepcidina por meio da via de sinalização BMP6-SMAD, no entanto a remoção da âncora de glicosilfosfatidilinositol ligada a membrana (âncora GPI) por ação das proteases furina ou matriptase-2 gera uma forma solúvel de hemojuvelina que por sua vez inibe a expressão de hepcidina (Anderson et al,

2009, Zhang et al, 2010 a; Zhang et al, 2010 b; Silvestre et al, 2008 a). No presente estudo apesar da redução dos níveis hepáticos de mRNA de *Hamp* no grupo VAD, houve um aumento nos níveis de mRNA de *Hfe2* em relação ao grupo controle. É possível que a deficiência sistêmica de ferro (baixos níveis de ferro sérico e saturação da transferrina) induzida pela deficiência de vitamina A, tenha estimulado a clivagem de hemojuvelina ligada à membrana, aumentando a concentração de sHJV, que por sua vez seria reponsável pela inibição da expressão de hepcidina. No organismo, a concentração de hepcidina é dependente da proporção entre as duas formas de hemojuvelina, solúvel e ligada à membrana, sendo que a atividade da protease furina pode ser aumentada por deficiência de ferro e hipóxia (Silvestri et al, 2008 b). Lin et al (2005) propuseram que as duas formas de HJV regulam a expressão de *Hamp* reciprocamente em resposta a alterações na concentração de ferro extracelular. A indução da atividade da matriptase-2 pela deficiência sistêmica de ferro também pode ter sido responsável pela inibição da expressão de hepcidina observada no grupo VAD, uma vez que a supressão da expressão de hepcidina durante a privação de ferro aguda é mediada por um aumento dos níveis da proteína matriptase-2 (Zhang et al, 2011).

O contraditório *status* de ferro observado nos ratos que receberam dietas deficientes em vitamina A, caracterizado por deficiência sistêmica de ferro, ferro hepático normal e uma alta concentração de ferro no baço, é semelhante ao observado em pacientes com anemia de doença crônica. Brasse-Lagnel et al (2010) mostraram que a concentração de hemojuvelina solúvel foi significativamente maior em um grupo de pacientes com anemia da doença crônica quando comparado ao grupo controle, sugerindo que a hemojuvelina sérica pode contribuir para a inibição da expressão de hepcidina hepática. Recentemente, foi demonstrado que pacientes portadores de anemia diseritropoética congênita, um distúrbio das células vermelhas do sangue caracterizado

por uma eritropoiese ineficaz e uma inapropriada inibição de hepcidina, apresentavam níveis elevados de sHJV (Shalev et al, 2012). O músculo esquelético pode ser uma importante fonte de sHJV, uma vez que o gene *Hfe2* é altamente expresso no músculo; o músculo está presente em uma proporção maior em comparação ao fígado; e ainda a protease furina é ubiquamente expressa em todos os tecidos (Lin et al, 2005; Zhang et al, 2010 a). Estes resultados reforçam a hipótese de que, no presente estudo, a sHJV pode estar envolvida na supressão da hepcidina nos ratos deficientes em vitamina A, uma vez que os mesmos apresentaram uma diminuição da disponibilidade de ferro, o que pode ter resultado na redução da quantidade de ferro disponível para a síntese de mioglobina.

Contrariamente ao esperado, a substituição do éster de retinil pelo todo-trans ácido retinoico (atRA) na dieta não tornou os níveis hepáticos de *Hamp* similares ao do grupo de controle. No entanto, a expressão dos genes envolvidos na ativação da expressão de hepcidina hepática através da via de sinalização HJV-BMP6-SMAD foi semelhante à obtida para o grupo controle. A inibição da expressão de *Hamp* foi relatada por Tsuchiya et al (2009) em células HUH7 tratadas com 0-20 µmol/L de atRA durante 24 h, sendo também observado menores níveis de mRNA de *Hfe2* e *Fpn1*. No entanto, os autores verificaram que as células HuH7 não apresentavam aumento nos níveis de mRNA de *Hamp* em resposta a variações somente na concentração de ferro, sugerindo que essas células não apresentam resposta semelhante àquelas observadas nos hepatócitos *in vivo* no que diz respeito à regulação de hepcidina em relação a variação na concentração de ferro. Assim, no presente estudo, postula-se que a deficiência de ferro sistêmica observada no grupo atRA seja responsável pelos menores níveis de mRNA de *Hamp* no fígado em relação ao grupo controle, sendo possível que esta resposta seja mediada por meio da via HFE/TfR2 (Poli et al, 2010; Hentze et al, 2010).



Considerando que ratos RAR-E Tg, os quais apresentam nos hepatócitos a sinalização mediada por retinoides via receptor nuclear de ácido retinóico (RAR) prejudicada, possuem um aumento da expressão de *Hfe2* e de *Hamp* (Tsuchiya et al, 2009), e que a vitamina A modula o metabolismo do ferro, o presente estudo testou a hipótese de que o atRA modularia o metabolismo de ferro hepático por meio da regulação transcricional direta de hepcidina. No entanto, embora o consumo de atRA tenha aumentado e a deficiência de vitamina A tenha reduzido os níveis hepáticos de mRNA de *Rar $\alpha$* , em ambas as situações, os níveis de mRNA de *Hamp* foram diminuídos. Estes resultados sugerem que a deficiência de vitamina A influencia a expressão de hepcidina no fígado de maneira indireta, não envolvendo o receptor *Rar $\alpha$* .

Tendo em vista que a absorção e exportação de ferro no duodeno é alterada drasticamente em resposta a mudanças nos níveis de eritropoietina e nos parâmetros hematológicos, a redução de níveis intestinais de mRNA de *Fpn1* no grupo VAD, observada no presente estudo, pode estar associada à diminuição dos níveis de mRNA de eritropoietina no rim, observada nestes mesmos animais em um outro conjunto de experimentos realizados (Cunha, 2013). A eritropoietina afeta a absorção de ferro, estabilizando a ferroportina duodenal e, conseqüentemente, promovendo o fornecimento de ferro para eritropoiese, de maneira independente dos estoques de ferro (D'Anna e Roque, 2013). Dessa forma, os baixos níveis de eritropoietina obtidos no grupo VAD (Cunha, 2013) poderiam inibir a sinalização eritropoietica e, conseqüentemente, diminuir a absorção intestinal de ferro. Srai et al (2013) demonstraram em um modelo de ratos nefrectomizados e portanto com insuficiência renal crônica uma diminuição do transporte de ferro através do epitélio duodenal em comparação com os animais controle que receberam apenas a simulação do procedimento cirúrgico. Além disso, o tratamento dos ratos nefrectomizados com EPO aumentou significativamente a absorção de ferro, o

que sugere que a EPO tenha uma ação direta nos enterócitos intestinais, regulando a absorção de ferro dietético. Resultados semelhantes foram observados em células Caco-2, as quais quando tratadas com EPO apresentaram maiores níveis de proteína e mRNA de *Dmt1* e *Fpn1*, com conseqüente aumento da captação e efluxo de ferro em comparação com as células não tratadas.

Apesar do ácido retinóico todo-trans ser considerado a forma mais ativa de retinoides, no presente estudo os ratos tratados com atRA em substituição ao éster de retinil na dieta na dose utilizada (12 mg / kg de ração) apresentaram menores níveis de ferro no soro, a despeito da alta concentração hepática de ferro, semelhante ao observado no grupo VAD. Estes resultados sugerem que a deficiência sistêmica de ferro associada a reservas intracelulares de ferro normais devem ter sinalizado aos enterócitos a baixa demanda para a eritropoiese nos ratos do grupo atRA, resultando na redução dos níveis de mRNA de *Dmt1* e *Fpn1*, independente do *status* de ferro intracelular. Assim, esses resultados sugerem que a sinalização desencadeada pela deficiência sistêmica de ferro, sobrepõe-se ao mecanismo de regulação intracelular mediado pelo sistema proteínas reguladoras de ferro (IRP1 ou IRP2) / elemento responsivo ao ferro (IRE) (IRP / IRE; Jiang et al, 2011; Galy et al, 2013; Sangokoya et al, 2013).

## **7. CONCLUSÃO**

Os dados do presente estudo demonstram que a deficiência dietética de vitamina A diminui a disponibilidade sistêmica de ferro, com concomitante acúmulo desse micronutriente no baço. A retenção de ferro nos tecidos deflagrada pela deficiência de vitamina A, promove um aumento dos níveis hepáticos de mRNA de *Bmp6* e *Hfe2* sinalizando a ativação da via de sinalização HJV-BMP6-SMAD. No entanto, a

deficiência sistêmica de ferro promovida pela deficiência de vitamina A, diminui a disponibilidade de ferro para a eritropoiese, fazendo com que o sinal eritróide prevaleça na regulação da expressão de *Hamp*, determinando a redução da expressão hepática de *Hamp*.

A redução dos níveis de mRNA de *Hamp* apesar do aumento dos níveis hepáticos de mRNA da *Hfe2*, sugere que na deficiência de vitamina A, em função da deficiência sistêmica de ferro a forma predominante de hemojuvelina seja a solúvel, determinando a inibição da expressão de *Hamp*.

Os resultados sugerem ainda que a deficiência de vitamina A modula a expressão de hepcidina no fígado de maneira indireta, não envolvendo o receptor *Rar $\alpha$* , uma vez que tanto na deficiência de vitamina A quanto na presença do atRA na dieta, os níveis de mRNA da *Hamp* se mantiveram reduzidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez S, Bourguet W, Gronemeyer H, Lera AR. Retinoic acid receptor modulators: a perspective on recent advances and promises. *Expert Opinion Therapeutic Patents*, 2011; 21(1): 55-63.

Amann PM, Eichmüller SB, Schmidt J, Bazhin AV. Regulation of Gene Expression by Retinoids. *Current Medicinal Chemistry*, 2011; 18(9): 1405-12.

Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*, 2007; 20(3-4): 665-674.

Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2009; 25: 129-135.

Andriopoulos-Jr B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics*, 2009 April; 41 (4): 482-487.

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*, 1979; 109: 1419-31.

Arndt S, Maegdefrau U, Dorn C, Schardt K, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. Iron-induced expression of bone morphogenic protein 6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo. *Gastroenterology*. 2010 Jan;138(1):372-82.

Arruda SF, Siqueira EMA, Valencia FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition*, 2009; 25: 472-78.

Assunção MCF, Santos IS, Barros AJD, Gigante DP, Victora CG. Efeito da fortificação de farinhas com ferro sobre anemia em pré-escolares, Pelotas, RS. *Rev Saúde Pública*, 2007; 41 (4): 539-48.

Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. Técnicas básicas em Biologia Molecular. Editora Universidade de Brasília. Brasília, Brasil, 2010.

Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *Journal of lipid research*. 2002;43:1773-808.

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 *The Science Total Environment*, 1995; 159: 155-162.

Blaner WS. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2001; 45: S129-35.

Boehm MF, Zhang L, Zhi L, McClurg MR, Berger E, Wagoner M, Mais DE, Suto CM, Davies PJA, Heyman RA, Nadzan AM. Design and synthesis of potent retinoid x receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995; 38: 3146-55.

Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochimica Biophysica Acta*, 2010; 1800: 719-31.

Brasil. Ministério da Saúde e Unicef, *Cadernos de atenção básica: Carências de micronutrientes*, Bethsáida de Abreu Soares Schmitz. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Brasse-Lagnel C, Poli M, Lesueur C, Grandchamp B, Lavoinne A, Beaumont C, Bekri S. Immunoassay for human serum hemojuvelin. *Haematologica*, 2010; 95 (12): 2031-2037.

Brun PJ, Yang KJ, Lee SA, Yuen JJ, Blaner WS. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *BioFactors*. 2013; 39: 151-63.

Brtko J, Rock E, Nezbedova P, Krizanova O, Dvorcakova M, Minet-Quinard R, Farges MC, Ribalta J, Winklhofer-Roob BM, Vasson MP, Macejova D. Age-related change in the retinoid X receptor beta gene expression in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers: effect of 13-cis retinoic acid supplementation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2007; 128: 594-600.

Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C, Wang H-J, Gros P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006; 290: G156-63.

Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler UM. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *Journal of Molecular Medicine*, 2009; 87: 471-80.

Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srai SK, Sharp P. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 2008; 57: 374-382.

Chung B, Chaston T, Marks J, Srai SK, Sharp PA. Hepcidin decreases iron transporter expression in vivo in mouse duodenum and spleen and in vitro in THP-1 macrophages and intestinal caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 2009; 139(8): 1457-62

Cifelli CJ, Green JB, Green MH. 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.* 2005 Apr;135(4):746-52.

Citelli M, Bittencourt LL, Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res*, 2012; 149 (1): 64-70.

Collins SJ. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia*, 2002; 16: 1896-1905.

Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocr Rev.* 2013 May 29; 1-35.

Cozzi A, Santambrogio P, Corsi B, Campanella A, Arosio P, Levi S. Characterization of the I-ferritin variant 460InsA responsible of a hereditary ferritinopathy disorder. *Neurobiology of Disease* 2006; 23: 644 - 652.

Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, Babitt JL. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology*, 2011; 54 (1): 273-84.

Cribb VL, Northstone K, Hopkins D, Emmett PM. Sources of vitamin a in the diets of pre-school children in the avon longitudinal study of parents and children (ALSPAC). *Nutrients*, 2013 May 15; 5 (5): 1609-21.

Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002; 91: 9-18.

Cunha MSB. A deficiência de vitamina A modula o metabolismo de ferro via eritropoiese ineficaz de forma independente da resposta inflamatória. *Dissertação de mestrado*. 2013.



Daba A, Gkouvatsos K, Sebastiani G, Pantopoulos K. Differences in activation of mouse hepcidin by dietary iron and parenterally administered iron dextran: compartmentalization is critical for iron sensing. *J Mol Med (Berl)*, 2013 Jan; 91(1): 95-102.

D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*. 2011 Jan;3(1):63-103.

D'Angelo G. Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia. *Blood Res*. 2013 Mar;48(1):10-5.

D'Anna MC, Roque ME. Physiological focus on the erythropoietin–hepcidin–ferroportin axis. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013; 91: 338–345.

De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, Daynes RA, Kushner JP, Li D, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010; 120 (7): 2395–2405.

Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 2006; 17(2): 93-100.

Elliott, S.; Sinclair, A.M. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics*, 2012; 6: 163-89.

Enns CA, Ahmed R, Wang J, Ueno A, Worthen C, Tsukamoto H, Zhang AS. Increased iron loading induces bmp6 expression in the non-parenchymal cells of the liver independent of the bmp-signaling pathway. *Plos one*, 2013 April; 8 (4): e60534.

Evans T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling. *Experimental Hematology*, 2005; 33: 1055-1061.

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

Fatih N, Camberlein E, Island ML, Corlu A, Abgueguen E, Détivaud L, Leroyer P, Brissot P, Loréal O. Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidina expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *Journal of Molecular Medicine*, 2010; 88:477-86.

Frazer DM, Wilkins SJ, Darshan D, Badrick AC, McLaren GD, Anderson GJ. Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression. *British Journal of Haematology*, 2012; 157 (5): 615-26.

Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. Intestinal iron absorption. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2012; 26: 115-119.

Galy B, Ferring-Appel D, Becker C, Gretz N, Grone HJ, Schumann K, Hentze MW. Iron regulatory proteins control a mucosal block to intestinal iron absorption. *Cell Reports*, 2013; Mar 28; 3(3):844-57.

Gao J, Chen J, De Domenico I, Koeller DM, Harding CO, Fleming RE, Koeberl DD, Enns CA. Hepatocyte-targeted HFE and TFR2 control hepcidin expression in mice. *Blood*, 2010; 115(16): 3374-81.

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*, 2009 Apr; 139 (4): 696-702.

Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012; 1820: 188-202.

Gorczyca D, Prescha A, Szeremeta K, Jankowski A. Iron status and dietary iron intake of vegetarian children from Poland. *Ann Nutr Metab*, 2013; 62 (4): 291-7.

Graham RS, Chua ACG, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World J Gastroenterology*, 2007; 13 (35): 4725-36.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to Tango: Regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 2010; 142(9): 24-38.

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

Ingle E, Tilbrook PA, Klinken SP. New insights into the regulation of erythroid cells. , 2004 Apr; 56 (4): 177-84.

Itzykson R, Ayari S, Vassilief D, Berger E, Slama B, Vey N, Suarez F, Beyne-Rauzy O, Guerci A, Cheze S, Thomas X, Stamatoullas A, Gardembas M, Bauduer F, Kolb A, Chaury MC, Legros L, Damaj G, Chermat F, Dreyfus F, Fenaux P, Ades L. Is there a role for all-trans retinoic acid in combination with recombinant erythropoietin in myelodysplastic syndromes? A report on 59 cases. *Leukemia*. 2009 Apr; 23 (4): 673-8.

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.

Kane MA. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochimica et biophysica acta*, 2012;1821:10-20.

Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, Deng C, Vaulont S, Mosser J, Coppin H, Roth MP. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 2008 Aug; 112 (4): 1503-1509.

Kirchmeyer M, Koufany M, Sebillaud S, Netter P, Jouzeau JY, Bianchi A. All-trans retinoic acid suppresses interleukin-6 expression in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts by inhibition of ERK1/2 pathway independently of RAR activation. *Arthritis Research & Therapy*, 2008; 10 (6): R141.

Krijt J, Frýdlová J, Kukačková L, Fujikura Y, Příklad P, Vokurka M, Nečas E. Effect of iron overload and iron deficiency on liver hemojuvelin protein. *PLoS One*, 2012; 7 (5): e37391.

Lakhal S, Schoedel J, Townsend ARM, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. regulation of type ii transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signaling & iron homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011; 286(6): 4090-7.

Lane DJR, Huang MLH, Richardson DR. Heparin, show some self-control! How the hormone of iron metabolism regulates its own expression. *Biochem J*, 2013; 452: e3–e5.

Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y, Xi CX, Mei L, Xiong WC. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood*, 2010; 115(15): 3136-45.

Lefebvre P, Benomar Y, Staels B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2010; 21(11): 676-83.

Lenoir A, Deschemin JC, Kautz L, Ramsay AJ, Roth MP, Lopez-Otin C, Vaulont S, Nicolas G. Iron-deficiency anemia from matriptase-2 inactivation is dependent on the presence of functional Bmp6. *Blood*. 2011 Jan 13; 117 (2): 647-50.

Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood*, 2005; 106: 2884-2889.

Luciani N, Brasse-Lagnel C, Poli M, Anty R, Lesueur C, Cormont M, Laquerriere A, Folope V, LeMarchand-Brustel Y, Gugenheim J, Gual P, Tran A, Bekri S. Hemojuvelin: a new link between obesity and iron homeostasis. *Obesity*, 2011 Aug; 19 (8): 1545-51.

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*, 2001 Apr 1; 15 (7): 889-901.

Martines AMF, Masereeuw R, Tjalsma H, Hoenderop JG, Wetzels JFM, Swinkels DW. Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol*, 2013; 9: 385-398.

Martínez-Navarrete N, Camacho MM, Martínez-Lahuerta J, Martínez-Monzó J, Fito P. Iron deficiency and iron fortified food – a review. *Food Research International* 2002; 35: 225-31.

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*, 1995; 273 (1): 427-34.

Masaratana P, Patel N, Latunde-Dada GO, Vaultont S, Simpson RJ, McKie AT. Regulation of iron metabolism in *Hamp*<sup>-/-</sup> mice in response to iron-deficient diet. *Eur J Nutr*, 2013; 52: 135-143.

Maxson JE, Chen J, Enns CA, Zhang AS. Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010; 285(50): 39021-28.

Mehdad A, Siqueira EMA, Arruda SF. Effect of vitamin a deficiency on iron bioavailability. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2010; 57: 35-39.

Mleczko-Sanecka K, Casanovas G, Ragab A, et al. SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood*, 2010; 115: 2657-65.

Moore T, Holmes PD. The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Laboratory animals*, 1971; 5: 239-50.

Mwanri L, Worsley A, Ryan P, Masika J. Supplemental vitamin A improves anemia and growth in anemic school children in Tanzânia. *Journal of Nutrition*, 2000; 130: 2691-96.

Nai A, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, Traglia M, Toniolo D, Camaschella C. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood*. 2011 Oct 20; 118 (16): 4459-62.

Oats PS. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. *Histology and Histopathology* 2007; 22: 791- 804.

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*, 1994; 349 (2): 229-33.

Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C, La S. Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood*. 2011; 118 (3): 736-746.

Pandur E, Sipos K, Grama L, Nagy J, Poór VS, Sétáló G, Miseta A, Fekete Z. Prohepcidin binds to the HAMP promoter and autoregulates its own expression. *Biochem J*, 2013 Apr 15; 451 (2): 301-11.

Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 202: 199-211.

Petrak J, Vyoral D. Hephaestin a ferroxidase of cellular iron export. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37: 1173-78.



Poggiali E, Migone De Amicis M, Motta I. Anemia of chronic disease: A unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. *Eur J Intern Med*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2013.07.011>

Poli M, Luscieti S, Gandini V, Maccarinelli F, Finazzi D, Silvestri L, Roetto A, Arosio P. Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica*, 2010; 95 (11): 1832-1840.

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*, 2012 Nov; 97 (11): 1648-56.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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. *Journal of Nutrition*, 1993; 123: 1939-51.

Rochette-Egly C, Germain P. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nuclear Receptor Signaling*, 2009; 8(7); e005.

Rodriguez A, Hilvo M, Kytömäki L, Fleming RE, Britton RS, Bacon BR, Parkkila S. Effects of iron loading on muscle: genome-wide mRNA expression profiling in the mouse. *BMC Genomics* 2007, 8:379.

Rodriguez A, Luukkaala T, Fleming RE, Britton RS, Bacon BR, Parkkila S. Global transcriptional response to hfe deficiency and dietary iron overload in mouse liver and duodenum. PLoS ONE 2009; 4(9): e7212.

Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation. J Nutr, 2003; 133: 291S-6S.

Rusten LS, Dybedal I, Blomhoff HK, Blomhoff R, Smeland EB, Jacobsen SE. The RAR-RXR as well as the RXR-RXR pathway is involved in signaling growth inhibition of human CD34+ erythroid progenitor cells. Blood, 1996; 87(5):1728-36.

Sangokoya C, Doss JF, Chi JT. Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin. Plos Genetic 2013 Apr; 9(4): e1003408.

Sato Y, Mizuguchi T, Shigenaga S, Yoshikawa E, Chujo K, Minakuchi J, Kawashima S. Shortened red blood cell lifespan is related to the dose of erythropoiesis-stimulating agents requirement in patients on hemodialysis. Ther Apher Dial, 2012 Dec; 16 (6): 522-8.

Schroeder SE, Reddy MB, Schalinske KL. Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the rna-binding activity of iron regulatory proteins. The Journal of Nutrition, 2007; 137: 2686-90.

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*, 2008 15; 316(2): 171-90.

Shahbazi M, Naghdi N, Tahmasebi S, Sheikh M, Namvar Asl N, Kazemnejad A. The effect of iron and zinc dietary restriction of pregnant rats on physical growth of litters. *Biological trace element research*, 2009; 128: 232-8.

Shalev H, Perez-Avraham G, Kapelushnik J, Levi I, Rabinovich A, Swinkels DW, Brasse-Lagnel C, Tamary H. High levels of soluble serum hemojuvelin in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *European Journal of Haematology*, 2012; 90: 31–36.

Sherwin JC, Reacher MH, Dean WH, Ngondi J. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2012 Apr; 106 (4): 205-14.

Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metabolism*, 2008 December; 8 (3): 502–511. (a)

Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*, 2008; 111: 924–931. (b)

Soe-Lin S, Apteb SS, Mikhael MR, Kayembek LK, Nied G, Ponka P. Both Nramp1 and DMT1 are necessary for efficient macrophage iron recycling. *Experimental Hematology*, 2010; 38: 609-17.

Srai SK, Chung B, Marks J, Pourvali K, Solanky N, Rapisarda C, Chaston TB, Hanif R, Unwin RJ, Debnam ES, Sharp PA. Erythropoietin regulates intestinal iron absorption in a rat model of chronic renal failure. *Kidney International*, 2010; 78: 660–667.

Strube YNJ, Beard JL, Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin a deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *The Journal of Nutrition*, 2002; 132: 3607-15.

Szoke D and Panteghini M. Diagnostic value of transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 2012; 413: 1184-1189.

Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010; 67: 1423-45.

Theurl I, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Theurl M, Sonnweber T, Kulaksiz H, Weiss G. Pathways for the regulation of hepcidin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in vivo. *Haematologica*, 2011 Dec; 96 (12): 1761-9.

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*, 2009; 136: 341-50.

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

Tanumihardjo SA. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *Am J Clin Nutr*, 2011 Aug; 94 (2): 658S-65S.

Van der A DL, Peeters PHM, Grobbee DE, Marx JJM, Van der Schouw YT. Dietary haem iron and coronary heart disease in women. *European Heart Journal*, 2005; 26: 257-62.

Vujić Spasić M, Sparla R, Mleczko-Sanecka K, Migas MC, Breitkopf-Heinlein K, Dooley S, Vaulont S, Fleming RE, Muckenthaler MU. Smad6 and Smad7 are co-regulated with hepcidin in mouse models of iron overload. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1832(1):76-84.

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. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006; 84: 580-6.

Ziouzenkova O, Plutzky J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR–RXR complex. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2008; 582: 32-38.

Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metabolism*, 2009 May; 6 (9): 461-473.

Zhang AS, Gao J, Koeberl DD, Enns CA. The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010; 285 (22): 16416-23. (a)

Zhang AS. Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Advances in Nutrition*, 2010 Nov; 1 (1): 38-45. (b)

Zhang AS, Anderson SA, Wang J, Yang F, DeMaster K, Ahmed R, Nizzi CP, Eisenstein RS, Tsukamoto H, Enns CA. Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood* February 2011; 117 (5): 1687-1699.

Yu C, Liu Y, Miao Z, Yin M, Lu W, Lv Y, Ding M, Deng H. Retinoic acid enhances the generation of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cell-derived hemato-vascular precursors. *Blood*, 2010 Dec 2; 116 (23): 4786-94.

Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: Expression and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012; 1823: 1426-1433.

Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta*, 2009 Jul; 1790 (7): 682-93.

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.

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.

## **ANEXOS**



## **ANEXO I**

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DE USO  
DE ANIMAIS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 30 de junho de 2011.



### DECLARAÇÃO

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 PARA PUBLICAÇÃO

## Vitamin A deficiency induces systemic iron deficiency and decreases hepatic *Hamp* transcripts levels, despite increases *Hfe2* and *Bmp6* transcripts levels

### Abstract

**Introduction** Vitamin A and iron deficiencies are the most prevalent nutritional deficiencies in the world. Although recent studies suggest that there is an interrelationship between vitamin A and iron metabolism, the mechanisms involved remain unclear. Retinoids modulate the expression of various genes by binding to nuclear receptors such as the retinoic acid receptors and retinoid X receptors. Whereas hepcidin is responsible for regulating systemic iron homeostasis and its expression is regulated in part through the signaling pathway of hemojuvelin-bone morphogenetic protein 6 - SMAD proteins, the present study evaluated the effect of vitamin A deficiency in iron status biomarkers, the transcript levels of genes involved in signaling pathway HJV-BMP-SMAD, and the possible involvement of nuclear receptors, RAR and RXR in the maintenance of iron homeostasis by vitamin A. **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). Hematological parameters were obtained using commercial kits. Liver, intestine and spleen were removed for determination of iron concentration by atomic emission spectroscopy. The retinol hepatic levels were obtained by high performance liquid chromatography. Were determined in liver and intestine, the mRNA levels of hepcidin (*Hamp*), hemojuvelin (*Hfe2*), bone morphogenetic protein 6 (*Bmp6*), SMAD 7 (*Smad7*), retinoic acid receptor alpha (*Rar $\alpha$* ) receptor retinoid X beta (*Rxr $\beta$* ), divalent metal transporter 1 (*Dmt1*) and ferroportin 1 (*Fpn1*), system by polymerase chain reaction in real-time (qRT-PCR). 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** Vitamin A deficiency (VAD) caused a decrease in serum iron and transferrin saturation, spleen iron accumulation, increased of *Bmp6* and *Hfe2* mRNA levels and decreased *Hamp*, *Smad7* and *Rar $\alpha$*  in liver, and the reduction mRNA levels of *Fpn1* in the intestine. The rats treated with iron deficient diet (FeD) decreased serum iron levels, transferrin saturation, iron concentrations in the liver, intestine, and spleen and decreased of *Bmp6*, *Hfe2*, *Hamp* and *Smad7* mRNA levels in liver. The association of vitamin A and iron deficiency (VAFeD) also caused a decrease in serum iron, transferrin saturation, iron concentrations in the liver, intestine and spleen, and *Hamp* and *Smad7* mRNA hepatic levels. The replacement of retinyl ester by atRA in diet (atRA) caused a decrease in serum iron levels, increased iron concentrations in the liver and spleen, decreased iron concentrations in the intestine, lower *Hamp* and increased *Rar $\alpha$*  hepatic mRNA levels and, reduced *Dmt1* and *Fpn1* mRNA levels with increased *Bmp6* in intestine. **Conclusion** The results of this study suggest that dietary vitamin A deficiency promotes a reduction in iron systemic availability with concomitant spleen accumulation. Systemic iron deficiency promoted by vitamin A deficiency, reduces the iron availability for erythropoiesis, suggesting that the erythroid signal prevail in the regulation of *Hamp* transcription. The results suggest that vitamin A deficiency modulates hepcidin expression in the liver in an indirect way, not involving the *Rar $\alpha$* .

**Keywords** vitamin A deficiency, iron status, hemojuvelin, bone morphogenetic protein 6, retinoic acid receptor, transcription.

## Introduction

Vitamin A deficiency affects about 250 million people worldwide (Strube et al, 2002) and is considered together with iron deficiency the most prevalent nutritional deficiencies in the world (Martínez-Navarrete et al, 2002; Brazil, 2007; Assumption et al, 2007). Recent studies suggest that the metabolism of vitamin A and iron have an interrelationship (Citelli et al, 2012; Jiang et al, 2011; Tsuchiya et al, 2009). In vitamin A deficient organisms, systemic iron availability seems to be significantly reduced, followed by iron accumulation in tissues, mainly in the spleen (Arruda et al, 2009; Tsuchiya et al, 2009).

Although preliminary data clearly show that vitamin A affect iron homeostasis (Arruda et al, 2009) the mechanism by which retinoids modulate systemic iron homeostasis is still unclear. Several physiological processes, such as cell proliferation and differentiation, are modulated by retinoids. The all-trans retinoic acid (atRA), the most active form of retinoids, modulates the expression of several genes at the transcriptional level by binding to nuclear receptors, the retinoic acid receptor (RAR) and the retinoid X receptor (RXR), which are transcription factors (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Theosídeo et al, 2010).

Hepcidin, a peptide hormone secreted by the liver, is essential for regulation of systemic iron homeostasis. Its main role is to control the amount of iron released into circulation by binding to ferroportin, an iron exporter protein located in the enterocytes basolateral membrane and in macrophages. Once bound to hepcidin, ferroportina is internalized and degraded. Hepcidin gene expression and secretion are regulated by several factors, among than, iron body overload induces hepatic hepcidin. Therefore,

hepcidin inhibits the iron mobilization from tissues and iron absorption from the diet when body iron stores are filled (Anderson et al, 2009; Hentze et al, 2010).

Besides body iron stores, hepcidin expression is also regulated erythropoiesis and hypoxia (Evstatiev and Gasche, 2012). The pathway that modulates hepcidin expression in response to iron status appears to be dependent of hemojuvelin protein (HJV) and bone morphogenetic protein-6 (BMP-6). In response to intracellular iron accumulation, BMP-6 binding to hemojuvelin which form a complex with the BMP receptor and HJV, inducing the SMAD 1/5/8 phosphorylation, a cytoplasmic protein, which form a complex with SMAD-4. This complex is translocated into the nucleus, where it induces the hepcidin gene expression and consequent iron tissue retention (Corradini et al, 2011; Hentze et al, 2010; Lee et al, 2010; Zhang et al, 2010 a; Zhang et al, 2010 b). The BMP6 pathway also induces negative regulators of hepcidin, such as SMAD7, so that a negative feedback loop controlling hepcidin expression may be established, a mechanism that prevents overshooting hepcidin and iron deficiency (Evstatiev and Gasche, 2012).

In order to explore how vitamin A deficiency alters iron metabolism, the present study evaluated the expression of genes involved in the hemojuvelin - bone morphogenetic protein - SMAD signaling pathway; as well as the possible involvement of retinoic acid and retinoid x nuclear receptors in the maintenance of iron homeostasis mediated by vitamin A.

## Materials and Methods

### Animals

Thirty male Wistar rats, 21 days old ( $65.7 \pm 5.5$  g), were housed individually in stainless-steel cages maintained under a 12 hours light cycle at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . The animals had free access to water and food access was allowed only during the dark cycle.

After seven days of acclimatization, rats were randomly assigned to five groups (6 rats per group). The Control group (CT) were fed with AIN-93G diet (Reeves, 1993), the vitamin A-deficient group (VAD) were fed with AIN-93G diet without any source of vitamin A, the vitamin A and iron-deficient group (VAFeD) were fed with AIN-93G diet without any source of vitamin A and iron, the iron-deficient group (FeD) were fed with AIN-93G diet without any source of iron and the retinoic acid group (atRA) were fed with AIN-93G diet with 12 mg de ATRA/kg diet as the only source of vitamin A. The atRA dose to be added in the diet was based on studies with rats that assessed the atRA effect on biomarkers of vitamin A metabolism or that use the same dose in dietary treatment and observed no signs of toxicity (Cifelli et al, 2005; Martini et al, 1995; White et al, 1998; See et al, 2008). The animals were weighed weekly, and food intake was recorded daily. After 59 days of feeding the experimental diets, the animals were denied food for 14 h and were sacrificed after being anesthetized with 3% isoflurane. Blood was collected by cardiac puncture into tubes containing 7.0% ethylenediaminetetraacetic acid (21  $\mu\text{L}/\text{mL}$  of blood). The liver, spleen and small-intestine (1-cm length of small intestine distal to the pylorus and 1-cm proximal to the ileocecal valve was excised and the lumen was rinsed with saline) were excised washed in cold 0.9% NaCl, frozen in liquid nitrogen ( $\text{N}_2$ ) and the samples were stored at  $-70^\circ\text{C}$ .

## Ethics Statement

The Animal Care and Use Committee from the University of Brasília approved the experimental protocol (UnBDoc 52606/2011).

## Retinol assay

The concentration of retinol in the liver was measured with high performance liquid chromatography (HPLC) (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 °C in a solution of ethanol and butyl-hydroxytoluene 1% (5 x initial volume). The suspension was added of 50% KOH (0.8 x initial volume) and the sample was vortexed for 15 s and was placed in a water bath at 48 °C for 60 min. During the incubation period the sample was vortexed every 15 minutes for 15 s. After the saponification process, the sample was extracted three times with hexane (2 x sample volume) by vortexing for 30 s and centrifuging for 1 min to separate the phases. This procedure was performed three times. The organic layer was removed into a test tube and was evaporated under nitrogen. The residue was redissolved in 1 mL of ethanol and 50 µL were injected 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) mobile phase. The wavelength for retinol detection was set at 325 nm. An external standardization was performed using standard solutions of all-trans-retinol (Fluka Biochemika, retinol 99% - HPLC) in the concentration range of 0.0016 - 0.0097 µg/µL ( $y=3.23352E-09x + 0.0003$ ,  $r^2=0.999$ ).



## Iron tissue and diet determination

The concentration of iron in the liver, small intestine and diet was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Spectro, Kleve, Germany) as described by Baranowska et al [14]. 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, total iron binding capacity (TIBC) and transferrin saturation

The serum iron concentration and the TIBC were determined colorimetrically using commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The absorbance of samples was read at 560 nm on a spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The transferrin saturation and TIBC were subsequently calculated using the following equations: Transferrin saturation % = serum Fe concentration ( $\mu\text{g/dL}$ )/TIBC ( $\mu\text{g/dL}$ )  $\times$  100 and TIBC ( $\mu\text{g/dL}$ ) = unsaturable iron-binding capacity (UIBC) ( $\mu\text{g/dL}$ ) + serum Fe concentration ( $\mu\text{g/dL}$ ).

## RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (qRT-PCR).

The extraction of total RNA from the liver and small intestine was performed using TRIzol reagent (Invitrogen Inc., Canada). Briefly, 100 mg of tissue was homogenized in 1 mL of TRIzol using an Tissuerrupter (Qiagen instruments, Switzerland). After a chloroform extraction, RNA from the aqueous phase was precipitated using isopropyl alcohol and 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), incubated at 4°C overnight and

were centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C. Ethanol (1 mL) was added to the pellet and the pellet was centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4°C, dried at room temperature and was diluted to 30 µL for small-intestine samples and 50 µL for liver samples using deionized water. The RNA samples were quantified by measuring their absorbance at 260 nm and purity was assessed by calculating the absorbance ratio at 260/280 nm and at 230/260 nm. The integrity of the RNA was assessed by electrophoretic profile on 1% agarose, 1,000 x GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, California, USA), and Tris/Boric acid/Ethylenediamine tetraacetic acid buffer solution 1x gels (Sigma, St. Louis, MO, USA). Total RNA (1 µg) was used for the cDNA synthesis reactions (20 µL final volume) using an ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, USA). Oligo(dT) primers were added to the total RNA and denaturation was at 70°C for 5 min. ImProm-II Reverse Transcriptase was added, and the samples were incubated at 42°C for 50 min, followed by inactivation at 70°C for 15 min.

Quantitative 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 diluted 50 times (corresponding to 0,02 µg of total RNA) in a final volume of 10 µL, 5 µL Fast SYBR Green Master Mix and 10 µmol/L (final concentration) of each primer. The following primers were used: hepcidin, *Hamp* tgatgctgaagcgaagga (forward) and tgtgtgagaggtcaggac (reverse), hemochromatosis type 2 (juvenile) homolog, *Hfe2* gtagcatcgggagccaac (forward) and tcaaaggctgcaggaagatt (reverse); bone morphogenetic protein 6, *Bmp6* gacagcagagtcgcaatcg (forward) and agctcacgtaaagctcatgc (reverse); SMAD family member 7, *Smad7* agaggctgtgtgctgtg (forward) and catcgggtatctggagtaagg (reverse); retinoic acid receptor alpha, *Rarα* accattgccgaccagattacc (forward) and aaggctattgtgtcttgcaggt (reverse); retinoids

x receptor beta, *Rxrβ* ctceccagtcacagttctcc (forward) and ggtggettcacatcttcagg (reverse); divalent metal transporter 1, *Dmt1* or solute carrier family 11 member 2, *Slc11a2* ctgattacagtctggagcag (forward) and cacttcagcaaggtgcaa (reverse); ferroportin 1, *Fpn1* or solute carrier family 40 member 1, *Slc40a1* ttccgcacttttcgagatgg (forward) and tacagtcgaagcccaggactgt (reverse), β-actin, *Actb* gtcgtaccactggcattgtg (forward) and ctctcagctgtggtgggaa (reverse). Quantitative PCR was performed using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Cingapura) for 40 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 3 s and 60°C for 20 s. The expression of all genes was normalized to the expression of the housekeeping gene β-actin and the reactions were run in triplicate. The amplification efficiency was determined from the slope obtained from the standard curve relating log [transcribed mRNA] and variation threshold cycle ( $C_T$ ) with the equation  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$  and a slope value of the regression line plot of  $C_T$  values vs. log of input nucleic acid of approximately -3.32 was considered an efficient reaction. PCR efficiency was between 102 and 109% for all primers. A standard curve was plotted for each gene studied that correlated the  $\Delta C_T$  ( $C_T$  target -  $C_T$  reference) versus the log of the cDNA amount and a slope value of the regression line plot of  $\Delta C_T$  values vs. log of input nucleic acid of less than 0.1 was used as a general criterion to accept the validation of the experiment. From the data obtained previously, it had been determined to use a 1:50 dilution of cDNA to analyze qRT-PCR where the efficiency obtained was higher than 99%. Melting curve analysis was used to examine the specificity of the products generated for each primer set. The comparative  $C_T$  method was used to quantitate the abundance of target gene mRNA and is given by  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . 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).

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software (version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The normality of data distribution was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between treatment groups were tested by independent sample t-test. In all tests, a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### **Vitamin A deficiency impairs rats weight gain and induces systemic iron deficiency**

Food intake was similar among all groups, however, the VAD, FeD and all-trans retinoic acid (atRA) groups showed lower body weight gain compared to the Control group, although the food intake was similar among these groups ( $p = 0.035$ ,  $0.032$  and  $0.029$ , respectively; Table 1). The VAD and atRA diets showed lower iron concentration compared to Control group, however both diets had the iron recommendation for rodents according to AIN-93G. This difference must be related to the different levels of contamination of diet ingredients.

After 59 days of treatment, the vitamin A deficient rats, VAD and VAFED groups, and the atRA group showed a complete depletion of hepatic retinol (Table 1). No difference was observed in the hepatic retinol concentration between Control and FeD groups.

**Table 1** Weight gain, dietary intake, dietary iron content and hepatic retinol of rats treated with diets containing different sources and amounts of vitamin A and iron, for 59 days

	<b>Weight gain</b>	<b>Dietary intake</b>	<b>Dietary iron content</b>	<b>Hepatic retinol</b>
	(g/59 days)	(g/59 days)	(µg/g)	(µg/g tissue)
<b>CT</b>	274.90 ± 9.80	1,110.31 ± 51.72	44.83 ± 3.34	60.30 ± 9.50
<b>atRA</b>	232.80 ± 39.20*	1,070.89 ± 82.20	34.15 ± 3.68*	< DL
<b>VAD</b>	226.90 ± 41.20*	1,053.31 ± 80.79	38,82 ± 3,54*	< DL
<b>FeD</b>	231.80 ± 36.20*	1,033.19 ± 71.48	12.71 ± 1.12*	59.30 ± 16.10
<b>VAFeD</b>	232.70 ± 59.0	1,045.51 ± 120.41	12.88 ± 1.68*†	< DL

CT: AIN-93G diet; atRA: AIN-93G diet with 12 mg de ATRA/kg diet as the only source of vitamin A; VAD: AIN-93G diet without any source of vitamin A; FeD: AIN-93G diet without any source of iron; VAFeD: AIN-93G diet without any source of vitamin A and iron. DL: below detection limit.

Mean ± standard deviation. n = 6

\* p < 0.05 versus CT group

† p < 0.05 versus VAD group

§ p < 0.05 versus FeD group

The vitamin A deficiency (VAD), the iron deficiency (FeD) as well the association of both deficiencies (VAFeD) promoted a decrease in serum iron concentration ( $p = 0.009$ ,  $0.003$  and  $0.031$ , respectively) and in transferrin saturation (TS%) in relation to the Control group ( $p = 0.028$ ,  $0.001$  and  $0.003$ , respectively; Table 2). However, only VAD and FeD groups showed significant higher unsaturated iron binding capacity (UIBC;  $p = 0.024$  e  $0.012$ , respectively) compared to Control group, in the VAFeD group the increase was marginal ( $p = 0.085$ ). The atRA group showed low serum iron levels ( $p = 0.014$ ) and a marginal reduction in transferrin saturation ( $p = 0.068$ ) in relation to Control group, no difference was observed in the UIBC and TIBC indexes between the atRA and the Control group (Table 2).

**Table 2** Haematological parameters of rats treated with diets containing different sources and amounts of vitamin A and iron, for 59 days

	<b>Serum iron</b> (µg/dL)	<b>UIBC</b> (µg/dL)	<b>TIBC</b> (µg/dL)	<b>TS</b> (%)
<b>CT</b>	161.41 ± 42.01	291.03 ± 43.68	452.45 ± 47.73	35.60 ± 8.05
<b>AtRA</b>	100.11 ± 28.26 *	307.31 ± 74.16	406.46 ± 68.12	25.39 ± 9.19
<b>VAD</b>	93.55 ± 10.72 *	373.74 ± 49.56 *	484.84 ± 67.09	22.65 ± 6.46*
<b>FeD</b>	78.53 ± 22.65 *	409.01 ± 84.36 *	487.54 ± 68.41	16.75 ± 6.77*
<b>VAFeD</b>	109.53 ± 28.53*§	380.45 ± 105.77	489.98 ± 88.28	19.85 ± 4.51*

UIBC: unsaturable iron-binding capacity; TIBC: total iron binding capacity; TS: transferrin saturation.

CT: AIN-93G diet; atRA: AIN-93G diet with 12 mg de ATRA/kg diet as the only source of vitamin A; VAD: AIN-93G diet without any source of vitamin A; FeD: AIN-93G diet without any source of iron; VAFeD: AIN-93G diet without any source of vitamin A and iron.

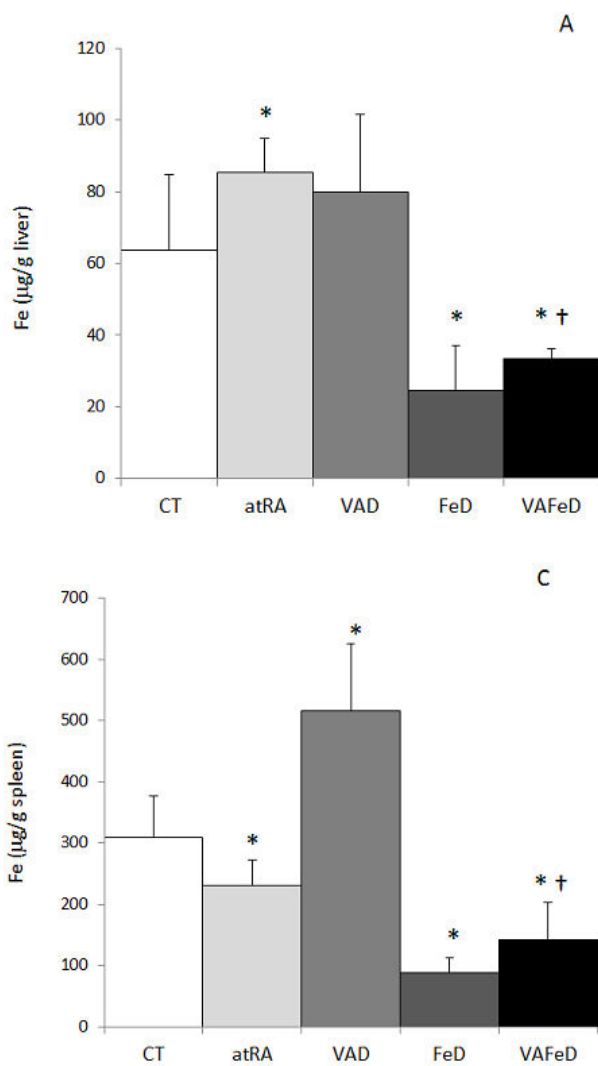
Mean ± standard deviation. n = 6.

\* p < 0.05 versus CT group

† p < 0.05 versus VAD group

§ p < 0.05 versus FeD group

In relation to tissues iron concentration, the vitamin A deficient rats showed higher iron concentration in spleen ( $p = 0.005$ ), while no difference was obtained in liver and intestine, compared to the Control rats. The replacement of retinyl ester by atRA in the rat's diet promoted an increase of hepatic iron concentration ( $p = 0.046$ ), followed by a iron levels reduction in splenic and intestinal ( $p = 0.033$  and  $0.002$ , respectively), relative to the Control group. The rats fed with iron deficient diets, FeD and VAFeD, showed lower iron concentration in the liver, spleen and intestine compared to the Control rats ( $p = 0.008$ ,  $<0.0001$ ,  $<0.0001$  for FeD group and  $0.016$ ,  $0.002$  and  $0.053$  for VAFeD group respectively). The VAFeD group showed a marginal increase in liver iron levels and a higher intestinal iron concentration than FeD group ( $p = 0.066$  and  $0.038$  respectively; Figure 1). The rats simultaneously deficient in both nutrients (VAFeD group) also showed lower iron concentration in the liver, spleen and intestine compared to the VAD rats ( $p = 0.003$ ,  $< 0.000$  and  $0.025$ , respectively).



**Figure 1** Iron concentration in liver (A), small intestine (B) and spleen (C) of rats treated with diets containing different sources and amount of vitamin A and iron, for 59 days. CT: AIN-93G diet; atRA: AIN-93G diet with 12 mg de ATRA/kg diet as the only source of vitamin A; VAD: AIN-93G diet without any source of vitamin A; FeD: AIN-93G diet without any source of iron; VAFeD: AIN-93G diet without any source of vitamin A and iron. Mean  $\pm$  standard deviation, \*  $p < 0.05$  versus CT group, †  $p < 0.05$  versus VAD group, §  $p < 0.05$  versus FeD group.

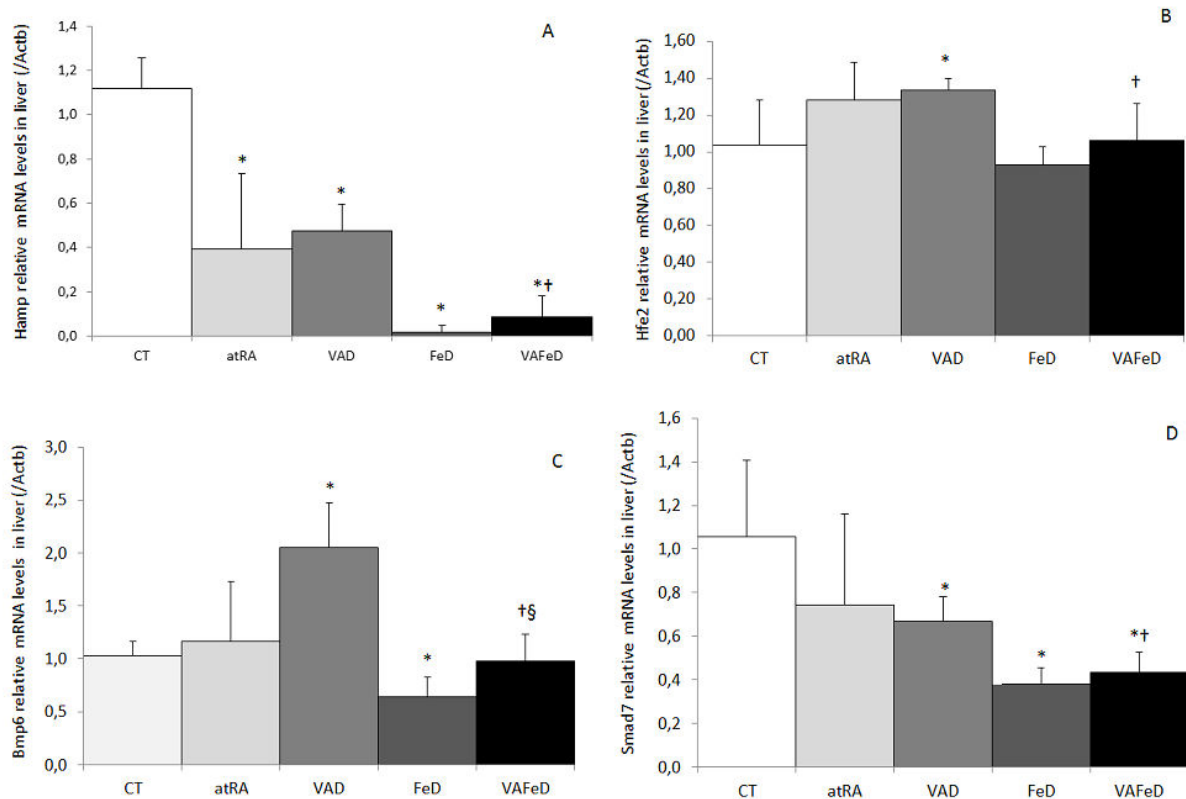
**Vitamin A deficiency down-regulated Hamp and Smad7 transcripts levels, despite up-regulation of Hfe2 and Bmp6 transcripts levels, and AtRA consumption did not supresse Hamp down-regulation induced by vitamin A deficiency**

Figure 2 shows the relative transcripts levels of hepcidin (Hamp), hemochromatosis type 2 (juvenile) homolog (Hfe2), bone morphogenetic protein 6 (Bmp6) and SMAD family member 7 (Smad7) in rat liver normalized to  $\beta$ -actin (Actb) values. Dietary vitamin A (2.3-fold,  $p = 0.000$ ) or iron deficiency (58.7-fold,  $p = 0.000$ ) or both deficiencies (12.6-fold,  $p = 0.000$ ) down-regulated Hamp mRNA levels

compared to the Control group, and the atRA consumption (2.8-fold,  $p = 0.002$ ) failed to reverse the effect of vitamin A deficiency.

The dietary vitamin A deficiency up-regulated hepatic Hfe2 (1.2-fold,  $p = 0.026$ ) and Bmp6 mRNA levels (2.0-fold,  $p = 0.0013$ ), while down-regulated Smad7 mRNA levels in liver (1.6-fold,  $p = 0.027$ ) compared to the Control group. The replacement of vitamin A by atRA as the only source of dietary vitamin A maintained the mRNA levels of Hfe2, Bmp6 and Smad7 similar to the levels observed for the Control group. The hepatic Bmp6 and Smad7 mRNA levels were down-regulated in rats fed iron-deficient diet, FeD (1.6-fold and 2.8-fold;  $p = 0.002$  and  $0.005$ , respectively). The VAFeD group showed lower hepatic Smad7 mRNA levels (2.4-fold,  $p = 0.006$ ) relative to Control group. In addition the association of the two deficiencies, VAFeD group, significantly reduced hepatic Hamp, Hfe2, Bmp6 and Smad7 mRNA levels compared to the VAD group ( $p = 0.035$ ,  $0.0003$  and  $0.002$ , respectively; Figure 2).

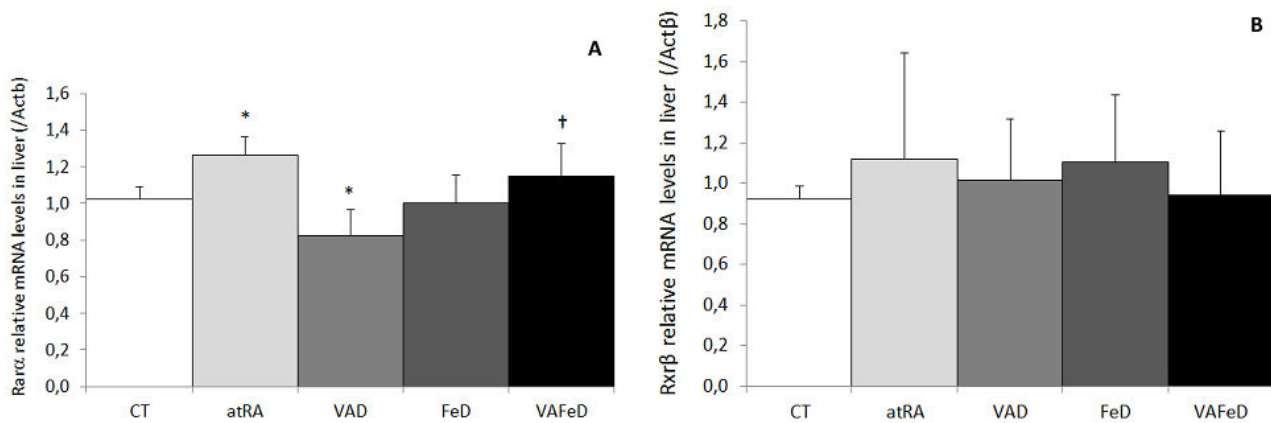




**Figure 2** Relative transcripts levels of hepcidin, *Hamp* (A), hemochromatosis type 2 (juvenile) homolog, *Hfe2* (B) and bone morphogenetic protein 6, *Bmp6* (C) and SMAD family member 7, *Smad7* (D) in liver normalized to  $\beta$ -actin, Actb values of rats treated with diets containing different sources and amount of vitamin A and iron, for 59 days. CT: AIN-93G diet; atRA: AIN-93G diet with 12 mg de ATRA/kg diet as the only source of vitamin A; VAD: AIN-93G diet without any source of vitamin A; FeD: AIN-93G diet without any source of iron; VAFED: AIN-93G diet without any source of vitamin A and iron. Mean  $\pm$  standard deviation, \*  $p < 0.05$  versus CT group, †  $p < 0.05$  versus VAD group, §  $p < 0.05$  versus FeD group.

### Vitamin A deficiency down-regulated while atRA up-regulated *Rar $\alpha$* transcripts levels

Figure 3 shows the relative transcripts levels of retinoic acid receptor alpha (*Rar $\alpha$* ) and retinoids X receptor beta (*Rxr $\beta$* ) in rat liver normalized to  $\beta$ -actin (Actb) values. Vitamin A deficiency reduced the levels of hepatic *Rar $\alpha$*  mRNA (-1.2 fold,  $p = 0.001$ ), while in atRA rats this value was higher (1.2 fold,  $p = 0.011$ ) than the Control rats. The association of vitamin A and iron deficiency (VAFED) leads to higher hepatic *Rar $\alpha$*  mRNA levels compared with vitamin A deficiency (VAD). No differences were observed in hepatic *Rxr $\beta$*  mRNA levels among all groups (Figure 3).

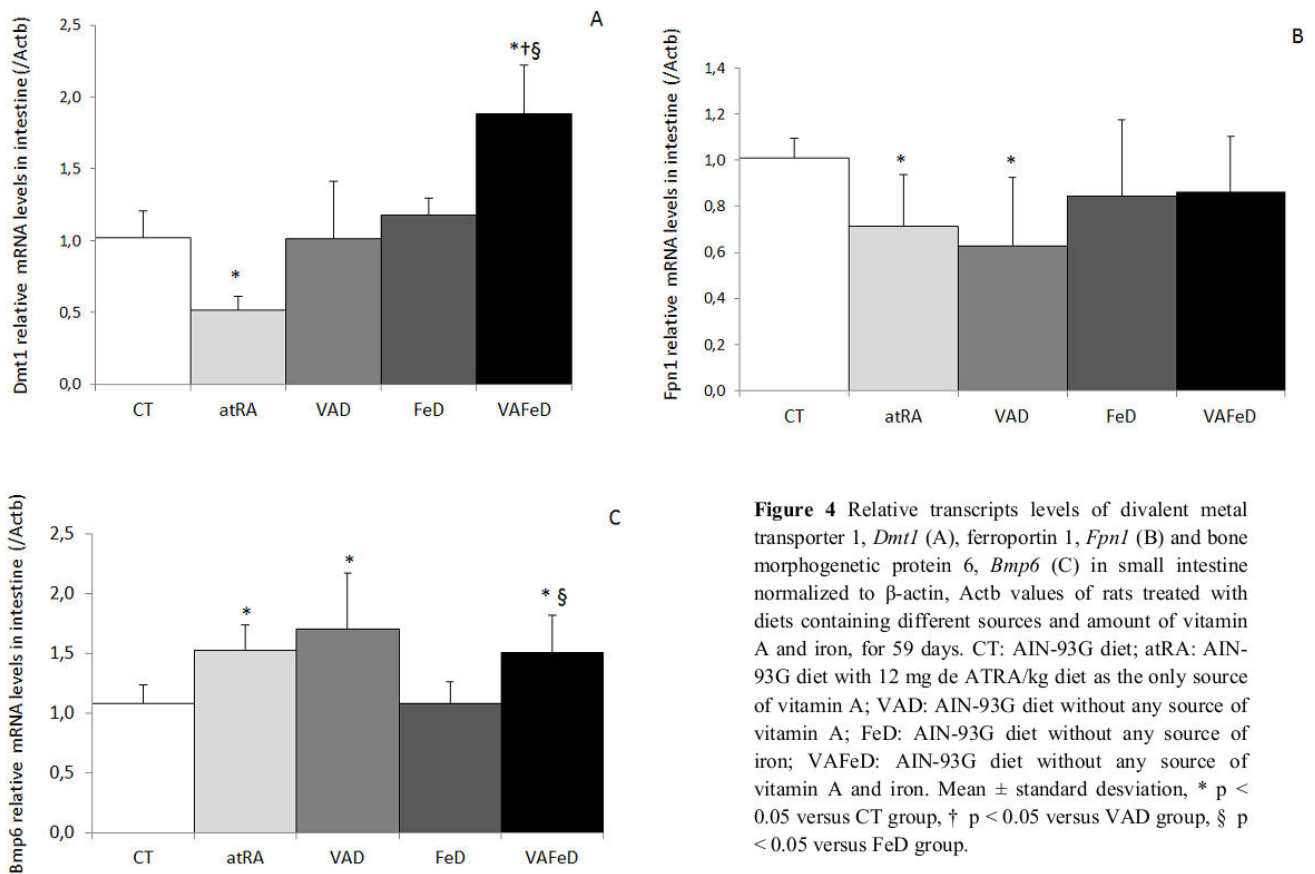


**Figure 3** Relative transcripts levels of retinoic acid receptor alpha, *Rarα* (A) and retinoid x receptor beta, *Rxrβ* (B) in liver normalized to  $\beta$ -actin, *Actb* values of rats treated with diets containing different sources and amount of vitamin A and iron, for 59 days. CT: AIN-93G diet; atRA: AIN-93G diet with 12 mg de ATRA/kg diet as the only source of vitamin A; VAD: AIN-93G diet without any source of vitamin A; FeD: AIN-93G diet without any source of iron; VAFed: AIN-93G diet without any source of vitamin A and iron. Mean  $\pm$  standard desviation, \*  $p < 0.05$  versus CT group, †  $p < 0.05$  versus VAD group, §  $p < 0.05$  versus FeD group.

### Vitamin A deficiency down-regulated *Fpn1* transcripts levels in intestine

Intestinal *Dmt1*, *Fpn1* and *Bmp6* relative mRNA levels are presented in Figure 4. No difference was observed in the *Dmt1* mRNA levels in vitamin A or iron deficient rats, VAD and FeD groups, however, the association of the two deficiencies, VAFed group, up-regulated *Dmt1* mRNA levels compared to the Control group (1.8-fold;  $p = 0.001$ ), a similar profile was obtained in relation to the VAD (1.8-fold,  $p = 0.002$ ) and FeD groups (1.5-fold,  $p = 0.002$ ). The administration of all-trans retinoic acid promoted a down-regulation of intestinal *Dmt1* mRNA levels compared to the Control group (1.9-fold,  $p = 0.014$ ). Vitamin A deficiency promoted a decrease in *Fpn1* mRNA levels and an increase in intestinal *Bmp6* mRNA levels compared to the Control group (1.6-fold,  $p = 0.043$  and  $0.020$ , respectively). This response was not reversed when retinyl ester was replaced by all-trans retinoic acid in diet, as atRA group also showed up-regulation of *Bmp6* mRNA and down-regulation of *Fpn1* mRNA in the intestine, in relation to Control group ( $p = 0.045$  and  $0.020$ , respectively). The VAFed group showed higher

Dmt1 and Bmp6 mRNA levels than the Control and the FeD groups ( $p = 0.022$  and  $0.016$ ).



**Figure 4** Relative transcripts levels of divalent metal transporter 1, *Dmt1* (A), ferroportin 1, *Fpn1* (B) and bone morphogenetic protein 6, *Bmp6* (C) in small intestine normalized to  $\beta$ -actin, Actb values of rats treated with diets containing different sources and amount of vitamin A and iron, for 59 days. CT: AIN-93G diet; atRA: AIN-93G diet with 12 mg de ATRA/kg diet as the only source of vitamin A; VAD: AIN-93G diet without any source of vitamin A; FeD: AIN-93G diet without any source of iron; VAFed: AIN-93G diet without any source of vitamin A and iron. Mean  $\pm$  standard deviation, \*  $p < 0.05$  versus CT group, †  $p < 0.05$  versus VAD group, §  $p < 0.05$  versus FeD group.

## Discussion

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 a higher hemoglobin concentration than the Control group, suggesting that vitamin A contributes to the regulation of iron homeostasis possible by modulation of liver Hamp expression (Arruda et al, 2009). To explore how vitamin A deficiency alters hepcidin expression and consequently iron metabolism the present study evaluated the expression of genes involved in the hemojuvelin/bone morphogenetic protein signaling pathway, and the

possible involvement of nuclear receptors RAR and RXR. Understanding the mechanisms controlling hepcidin gene expression is an important goal in the treatment of anemias.

In the present study, the complete depletion of liver retinol store observed in VAD and VAFeD groups indicates that vitamin A depletion was successfully achieved during the treatment period. 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 replacement of retinyl ester by atRA did not prevent retinol store depletion. This result was expected since all-trans retinoic acid can not be converted into retinol or retinal because the oxidation of retinal to retinoic acid is an irreversible reaction in cellular environment (Ross, 2003).

Despite the similar food intake compared to the Control group, the animals treated with diets deficient in vitamin A (VAD) and iron (FeD) alone showed lower body weight gain, which confirms the essentiality of iron in nutrients metabolism, since it participates in reactions involved in energy metabolism (Anzano et al, 1979; Shahbazi et al, 2009) and, vitamin A plays an important role in cell proliferation, differentiation and morphogenesis (Ziouzenkova and Plutzky, 2008; Theosídeo et al, 2010). Impaired weight gain was not statistically significant in the group undergoing diet deficient in both micronutrients (VAFeD) compared to the control group, possibly due to the high standard deviation presented in relation to weight gain in this group. Although some studies suggest that atRA can improve growth in vitamin A deficient rats (Anzano et al, 1979; Moore and Holmes, 1971) in our study the administration of 12 mg atRA/kg diet did not restore 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 may be essential to maintain normal body weight gain (Blaner, 2001 and Kane, 2012). Another possibility could be the toxic effect of daily administration of all-trans retinoic acid for a long period of 59 days impairing rats' growth.

In the present study, we observed that vitamin A deficiency (VAD) impaired iron availability to the body, since the serum iron and the transferrin saturation were significantly reduced while the iron level of spleen was increased in this group. A similar serum iron profile was observed in iron deficient groups (FeD and VAFeD), however in these groups systemic iron deficiency was associated with cellular iron deficiency. Previous studies (Jiang et al, 2011; Tsuchiya et al, 2009; Arruda et al, 2009) demonstrated that during iron deficiency hepatic iron store is mobilized, reflecting the physiological mechanism of iron homeostasis maintenance. These results demonstrated that vitamin A deficiency disrupts the systemic adjusting of the iron absorption, mobilization and storage in accordance with physiological requirements.

The replacement of retinyl ester by all-trans retinoic acid (atRA) in the diet promotes a significant reduction on iron concentration in the spleen and intestine, although *Fpn1* mRNA levels were decreased in the intestine and maintained in the spleen (Cunha et al, 2013).

In the present study, the iron deficient group (FeD) showed lower hepatic iron concentration and consequent lower *Bmp6* mRNA levels, which results in strongly down-regulation of *Hamp* mRNA levels compared to Control group, in accordance with others (Pagani et al, 2012). Corradini et al (2011) investigating the mechanism by which hepatocytes detect iron levels, regulate BMP6-SMAD pathway and the hepcidin expression, suggest that the hepatic iron concentration is the only factor associated with *BMP6* mRNA levels, independent of transferrin saturation, serum iron and hemoglobin concentration. And also that both transferrin saturation and hepatic iron concentration

modulate hepatic Hamp mRNA levels, but in an independent manner. Despite the reduced hepatic Bmp6 mRNA levels in the iron deficient group (FeD), the Hfe2 mRNA levels, which acts as a co-receptor of BMP in the induction of hepatic hepcidin expression (Evstatiev and Gashe, 2012), were similar to the control group, suggesting that regulation of the SMAD HJV-BMP signaling pathway by iron occurs at the transcriptional level for BMP6, and appears to be independent of Hfe mRNA levels. Krijt et al (2012) observed no changes of membrane HJV protein levels in rats liver subjected to iron overload and deficiency, despite Hamp and Bmp6 transcript levels changes according to iron levels. The authors suggest that substantial changes in the Hamp mRNA can occur without changes in membrane hemojuvelin, suggesting that this protein is not limiting step in the control of Hamp gene expression.

Different proteins were identified as negative regulators of hepcidin transcription such as matriptase-2 that cleaves the membrane hemojuvelin into fragments (Zhang et al, 2010 a; Zhang et al, 2010 b); the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (De Domenico et al, 2010) and the small mothers against decapentaplegic protein 7 (SMAD 7) that all mediate a negative feedback response through the BMP pathway (Mleczo-Sanecka et al, 2010). Smad 7 and Hamp are coregulated in the liver of iron-loaded mice, identifying a negative feedback loop that is initiated by activating signals (Kautz et al, 2008). In agreement with the coregulation proposed in the literature, in the present study the lower levels of hepcidin mRNA levels found in FeD group was accompanied by down-regulation of hepatic Smad 7 mRNA levels, corroborating that a condition of systemic and tissue iron deficiency that leads to low hepcidin concentration and consequently decrease Smad7 expression, the inhibitor of BMP pathway. Also, consistent with previous observations (Corradini et al, 2011; Vujić Spasić et al, 2012; Kautz et al, 2008) the hepatic expression of Bmp6 and Smad7 genes is down-regulated

in iron deficiency and is directly related to liver iron content. In our study the association of the two deficiencies, VAFeD group, reduced iron concentration in liver, intestine and spleen which induced the down-regulation of *Hamp*, *Hfe2*, *Bmp6* and *Smad7* hepatic mRNA levels compared to the VAD group. These results suggest that iron is determinant in the modulation of these genes expression.

A similar systemic iron deficiency (lower serum iron concentration and transferrin saturation) was observed in the vitamin A deficient group (VAD), however contrary to that observed in iron deficient groups (FeD and VAFeD), iron concentration was increased in spleen and marginally similar in liver ( $p = 0.06$ ), compared to Control group. Despite the accumulation of iron in spleen and consequently up-regulation of hepatic *Bmp6* and *Hfe2* mRNA levels, the VA group showed a down-regulation of hepatic *Hamp* mRNA levels, half of that obtained to the Control group. This contradictory response observed in VAD group can be related to an inadequate erythropoiesis promoted by the vitamin A deficiency, in an extent that the body cannot supply enough iron to expand erythroid tissue (Evans, 2005; Frazer et al, 2012). Frazer et al (2012) observed that a chronic stimulated erythropoiesis led to an increase in liver iron and *Bmp6* mRNA levels and a consequently decrease in hepatic *Hamp* mRNA levels. A mouse model of thalassemia intermedia, which has lower hemoglobin concentration and higher reticulocytes and liver iron concentration, exhibited a down regulation of *Hamp* expression despite the up-regulation of *Bmp6* gene expression, suggesting that when erythropoiesis is stimulated, the signal from the erythroid regulator to decrease hepcidin expression is stronger than the signal from the stores regulator to increase hepcidin levels (Frazer et al, 2012). A similar profile was also observed in a model of haemolytic anemia, low serum iron status and high tissue iron concentration, where a reduction in hepcidin expression occurs despite an increase in

Bmp6 expression (Frazer 2012). The BMP6 pathway also induces negative regulators of hepcidin, such as SMAD7, so that a negative feedback loop controlling hepcidin expression may be established, a mechanism that prevents overshooting hepcidin and iron deficiency (Evstatiev and Gasche, 2012; Daba et al, 2013). The down-regulation of hepatic Smad7 mRNA levels in the VAD group reflects the inhibition of hepcidin by the systemic iron deficiency, once the levels of Smad7 and Hamp are coregulated in the liver.

The membrane associated form of HJV acts as a BMP co-receptor to stimulates hepcidin expression through BMP-SMAD signaling pathway, while the removal of the glycosylphosphatidylinositol-linked membrane anchor (GPI-anchor) by the proteases furin or matriptase-2 (TMPRSS6) generates a soluble form of hemojuvelin (sHJV) which in turn inhibits hepcidin expression (Anderson et al, 2009; Zhang et al, 2010 a; Zhang et al, 2010 b; Silvestre et al, 2008 a). The induction of systemic iron deficiency (low transferrin saturation and serum iron concentration) by vitamin A deficiency, observed in the present study, could induce the cleavage of membrane-bound hemojuvelin increasing the amount of soluble form of hemojuvelin (sHJV) which in turn inhibits hepcidin expression. Hepcidin concentration is dependent on the ratio of soluble hemojuvelin to membrane-bound hemojuvelin, and the protease furin activity can be increased by iron deficiency and hypoxia (Silvestri et al, 2008 b). Lin et al (2005) proposed that soluble and cell associated hemojuvelin reciprocally regulate hepcidin expression in response to changes in extracellular iron concentration. An induction of the transmembrane serine protease matriptase-2 activity by systemic iron deficiency may also had been responsible by the inhibition of hepcidin expression observed in VAD group, since suppression of hepcidin expression during acute iron deprivation is mediated by an increase in matriptase-2 protein levels (Zhang et al 2011).



The contradictory iron status observed in the vitamin A deficient rats (systemic iron deficiency; normal hepatic iron and high spleen iron concentration) is similar to that observed in patients with anemia of chronic disease. Brasse-Lagnel et al (2010) showed that soluble hemojuvelin concentration in a group of patients with anemia of chronic disease was significantly higher than in the control group, suggesting that serum hemojuvelin may contribute to inhibition of hepatic hepcidin expression. Recently, it was demonstrated that patients with congenital dyserythropoietic anemia, a red blood cell disorders with ineffective erythropoiesis and an inappropriate suppression of hepcidin, had high levels of sHJV (Shalev et al, 2012). It is reported that skeletal muscle may be a major source of sHJV, once Hfe2 is highly expressed in muscle; this tissue has a large mass compared to the liver and that the protease furin is ubiquitously expressed in all tissues (Lin et al, 2005; Zhang, 2010 a). These findings reinforces the hypothesis that in the present study, the sHJV must be involved in hepcidin suppression in the vitamin A deficient rats, as they presented an impaired of iron availability which may result in a reduction of iron supply for myoglobin synthesis.

In the present study, contrary to our expectations, the replacement of retinyl ester by atRA in the diet did not restore the level of hepatic Hamp mRNA in atRA group to that level obtained for Control group. However the expression of the others genes involved in the activation of hepatic hepcidin expression through BMP-SMAD-HJV pathway was similar to that obtained for Control. Down-regulation of Hamp expression was reported by Tsuchiya et al (2009) in HuH7 cells treated with 0–20  $\mu\text{mol/L}$  of all-*trans* retinoic acid for 24 h, but they also observed down-regulation of Hfe2 and Fpn mRNA levels. However the authors observed that HuH7 cells did not increase their Hamp mRNA expression in response to iron alone, suggesting that HuH7 cells do not respond to iron with respect to hepcidin regulation in the same manner that

hepatocytes *in vivo*. Thus in the present study we postulate that the low systemic iron status of atRA group was responsible by the lower Hamp mRNA levels in the liver, this response may be mediated through HFE/TfR2 hepcidin regulatory pathway (Poli et al, 2010; Hentze et al, 2010).

Considering that a mouse model in which retinoid signaling through the nuclear retinoic acid receptor is impaired specifically in hepatocytes (RAR-E Tg) that show an increased expression of hemojuvelin and hepcidin (Tsuchiya et al, 2009), associated to the evidences that vitamin A modulates iron metabolism, in the present study we test the hypothesis that atRA are involved in hepatic iron metabolism through transcriptional regulation of hepcidin. However, in our study, although the consumption of atRA up-regulated and the vitamin A deficiency diet down-regulated hepatic retinoic acid receptor ( $Rar\alpha$ ) mRNA levels, in both situations, presence and absence of retinoids (atRA and VAD groups), Hamp mRNA levels were decreased. These results suggest that vitamin A deficiency influences hepcidin expression in an indirect way, which does not involves hepatic  $Rar\alpha$  receptor.

In view that duodenal iron absorption and exportation is altered dramatically in response to changes in erythropoietic (Epo) signal and hematological parameters, the decrease of intestinal ferroportin mRNA levels in vitamin A deficient group, observed in the present study, may be associated to the decreased of kidney Epo mRNA levels obtained in another set of experiments accomplished in these same animals (Cunha, 2013). Erythropoietin affects iron absorption by stabilizing duodenal ferroportin, allowing iron supply to erythropoiesis independently of store size (D'Anna and Roque, 2013). Thus the low erythropoietin of VAD group could lead to reduced erythropoietic signal and consequently reduce iron absorption. Srail et al, 2013 showed that a nephrectomy rat model of chronic renal failure had decreased iron transport across the

duodenal epithelium compared with sham-operated controls, and that the treatment of these rats with Epo, significantly increase iron absorption, suggesting that Epo act directly on intestinal enterocytes to regulate dietary absorption. Similar results were observed in Caco-2 cells, where cells treated with Epo showed higher protein and mRNA levels of intestinal DMT-1 and FPN, and consequent increased iron uptake and efflux compared to the control one.

Despite all-trans retinoic acid (atRA) be considered the most active form of retinoids, rats treated with atRA in order to replacing retinyl ester on the diet, in the dose used in the present study (12 mg/kg diet), also presented low serum iron, in spite of their high liver iron store, similar to that observed in VAD group. These results suggest that systemic iron deficiency coupled to normal intracellular iron store should have signaled to enterocytes the low demand for erythropoiesis in atRA rats, resulting in the down-regulating of intestinal Dmt1 and Fpn1 mRNA levels, independent of intracellular iron status. Thereby, these results suggest that the signaling triggered by systemic iron deficiency, overlaps the intracellular regulatory mechanism mediated by iron regulatory proteins (IRP1 or IRP2) / iron responsive element (IRE) system (IRP/IRE) (Jiang et al, 2011; Galy et al, 2013; Sangokoya et al, 2013)

## **Conclusion**

The hypothesis of interaction between vitamin A and iron metabolism is supported by the results of this study. It has been shown that vitamin A dietary deficiency caused a decrease in systemic availability of iron with a concomitant accumulation of this nutrient in the spleen of mice subjected to this treatment.

Interference of vitamin A deficiency, on a transcriptional level, in the signaling pathway BMP6-HJV-SMAD and subsequently in hepcidin expression was also

observed in the present study. The vitamin A dietary deficiency promoted an increase of mRNA levels of Bmp6 and Hfe2 and a reduction in mRNA levels of Smad7 and Hamp in the liver. Possibly, these effects observed are due to the iron low systemic availability, caused by a vitamin A deficiency, for erythropoiesis that through erythroid signaling inhibits signaling pathway HJV-BMP6-SMAD, and consequently the expression of hepcidin. Another possible explanation for the reduced Hamp transcript levels in animals with vitamin A deficiency would be the induction of the activity of proteases furin and matriptase-2 by iron deficiency leading to increased systemic levels of soluble hemojuvelin that has been suggested as a suppressor of hepcidin. Furthermore, our results suggest that vitamin A deficiency affects the expression of liver hepcidin indirectly, without involving the Rar $\alpha$ , since both in vitamin A deficiency and in presence of atRA on the diet, the level of mRNA Hamp remained low.

Finally, it was observed that vitamin A deficiency promoted a decrease in the Fpn1 transcript levels in the intestine. This result may be a consequence of the reduced erythropoietin mRNA levels observed in those rats (Cunha, 2013), since erythropoietin stabilizes ferroportin protecting from degradation. Also, there was a reduction in Dmt1 and Fpn1 mRNA levels in rats treated with ATRA, possibly as a consequence of the iron low systemic availability and high iron stores in the liver, indicating the enterocytes a low demand of iron for erythropoiesis.

Future studies are needed to investigate the influence of erythropoiesis in the signaling pathways responsible for modulating the expression of hepcidin.

## References

Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2009; 25: 129-135.

Andriopoulos-Jr B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics*, 2009 April; 41 (4): 482-487.

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*, 1979; 109: 1419-31.

Arruda SF, Siqueira EMA, Valencia FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition*, 2009; 25: 472-78.

Assunção MCF, Santos IS, Barros AJD, Gigante DP, Victora CG. Efeito da fortificação de farinhas com ferro sobre anemia em pré-escolares, Pelotas, RS. *Rev Saúde Pública*, 2007; 41 (4): 539-48.

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. *The Science Total Environment*, 1995; 159: 155-162.

Blaner WS. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2001; 45: S129-35.

Brasil. Ministério da Saúde e Unicef, *Cadernos de atenção básica: Carências de micronutrientes*, Bethsáida de Abreu Soares Schmitz. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Brasse-Lagnel C, Poli M, Lesueur C, Grandchamp B, Lavoinne A, Beaumont C, Bekri S. Immunoassay for human serum hemojuvelin. *Haematologica*, 2010; 95 (12): 2031-2037.

Cifelli CJ, Green JB, Green MH. 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*. 2005 Apr;135(4):746-52.

Citelli M, Bittencourt LL, Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res*, 2012; 149 (1): 64-70.

Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, Babitt JL. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology*, 2011; 54 (1): 273-84.

Cunha MSB. A deficiência de vitamina A modula o metabolismo de ferro via eritropoiese ineficaz de forma independente da resposta inflamatória. Dissertação de mestrado. 2013.

Daba A, Gkouvatsos K, Sebastiani G, Pantopoulos K. Differences in activation of mouse hepcidin by dietary iron and parenterally administered iron dextran: compartmentalization is critical for iron sensing. *J Mol Med (Berl)*, 2013 Jan; 91(1): 95-102.

D'Anna MC, Roque ME. Physiological focus on the erythropoietin–hepcidin–ferroportin axis. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013; 91: 338–345.

De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, Daynes RA, Kushner JP, Li D, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010; 120 (7): 2395–2405.

Enns CA, Ahmed R, Wang J, Ueno A, Worthen C, Tsukamoto H, Zhang AS. Increased iron loading induces *bmp6* expression in the non-parenchymal cells of the liver independent of the *bmp*-signaling pathway. *Plos one*, 2013 April; 8 (4): e60534.

Evans T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling. *Experimental Hematology*, 2005; 33: 1055-1061.

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

Frazer DM, Wilkins SJ, Darshan D, Badrick AC, McLaren GD, Anderson GJ. Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morpho-genetic protein 6 expression. *British Journal of Haematology*, 2012; 157 (5): 615-26.

Galy B, Ferring-Appel D, Becker C, Gretz N, Grone HJ, Schumann K, Hentze MW. Iron regulatory proteins control a mucosal block to intestinal iron absorption. *Cell Reports*, 2013; Mar 28; 3(3):844-57.

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*, 2009 Apr; 139 (4): 696-702.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to Tango: Regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 2010; 142(9): 24-38.

Kane MA. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochimica et biophysica acta*, 2012;1821:10-20.

Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, Deng C, Vaultont S, Mosser J, Coppin H, Roth MP. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 2008 Aug; 112 (4): 1503-1509.



Krijt J, Frýdlová J, Kukačková L, Fujikura Y, Příkryl P, Vokurka M, Nečas E. Effect of iron overload and iron deficiency on liver hemojuvelin protein. *PLoS One*, 2012; 7 (5): e37391.

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

Lane DJR, Huang MLH, Richardson DR. Heparin, show some self-control! How the hormone of iron metabolism regulates its own expression. *Biochem J*, 2013; 452: e3–e5.

Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y, Xi CX, Mei L, Xiong WC. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood*, 2010; 115(15): 3136-45.

Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood*, 2005; 106: 2884-2889.

Martínez-Navarrete N, Camacho MM, Martínez-Lahuerta J, Martínez-Monzó J, Fito P. Iron deficiency and iron fortified food – a review. *Food Research International* 2002; 35: 225-31.

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*, 1995; 273 (1): 427-34.

McClintick JN, DW Crabb, Tian H, Pinaire J, Smith JR, Jerome RE, Edenberg HJ. Global effects of vitamin A deficiency on gene expression in rat liver: evidence for hypoandrogenism. *J Nutr Biochem*, 2006 May; 17(5): 345-55.

Mehdad A, Siqueira EMA, Arruda SF. Effect of vitamin a deficiency on iron bioavailability. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2010; 57: 35-39.

Mleczko-Sanecka K, Casanovas G, Ragab A, et al. SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood*, 2010; 115: 2657-65.

Moore T, Holmes PD. The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Laboratory animals*, 1971; 5: 239-50.

Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C, La S. Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood*. 2011; 118 (3): 736-746

Poli M, Lusciati S, Gandini V, Maccarinelli F, Finazzi D, Silvestri L, Roetto A, Arosio P. Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling.

Implications for transfer iron-dependent hepcidin regulation. *Haematologica*, 2010; 95 (11): 1832-1840.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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. *Journal of Nutrition*, 1993; 123: 1939-51.

Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *J Nutr*, 2003; 133: 291S-6S.

Sangokoya C, Doss JF, Chi JT. Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin. *Plos Genetic* 2013 Apr; 9(4): e1003408.

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*, 2008 15; 316(2): 171-90.

Schroeder SE, Reddy MB, Schalinske KL. Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory proteins. *The Journal of Nutrition*, 2007; 137: 2686-90.

Shahbazi M, Naghdi N, Tahmasebi S, Sheikh M, Namvar Asl N, Kazemnejad A. The effect of iron and zinc dietary restriction of pregnant rats on physical growth of litters. *Biological trace element research*, 2009; 128: 232-8.

Shalev H, Perez-Avraham G, Kapelushnik J, Levi I, Rabinovich A, Swinkels DW, Brasse-Lagnel C, Tamary H. High levels of soluble serum hemojuvelin in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *European Journal of Haematology*, 2012; 90: 31–36.

Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metabolism*, 2008 December; 8 (3): 502–511. (a)

Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*, 2008; 111: 924–931. (b)

Srai SK, Chung B, Marks J, Pourvali K, Solanky N, Rapisarda C, Chaston TB, Hanif R, Unwin RJ, Debnam ES, Sharp PA. Erythropoietin regulates intestinal iron absorption in a rat model of chronic renal failure. *Kidney International*, 2010; 78: 660–667.

Strube YNJ, Beard JL, Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin a deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *The Journal of Nutrition*, 2002; 132: 3607-15.

Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010; 67: 1423-45.

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*, 2009; 136: 341-50.

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

Ziouzenkova O, Plutzky J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR–RXR complex. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2008; 582: 32-38.

Zhang AS, Gao J, Koeberl DD, Enns CA. The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010; 285 (22): 16416-23. (a)

Zhang AS. Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Advances in Nutrition*, 2010 Nov; 1 (1): 38-45. (b)

Zhang AS, Anderson SA, Wang J, Yang F, DeMaster K, Ahmed R, Nizzi CP, Eisenstein RS, Tsukamoto H, Enns CA. Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood* February 2011; 117 (5): 1687-1699.

Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009; 1790: 682-693.

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.