

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA**

***STATUS DE FERRO DURANTE O PROCESSO DE DEPLEÇÃO
HEPÁTICA DE VITAMINA A.***

LUCIANO FERNANDES DE OLIVEIRA

**BRASÍLIA
Distrito Federal - BRASIL**

Outubro-2010

LUCIANO FERNANDES DE OLIVEIRA

***STATUS DE FERRO DURANTE O PROCESSO DE DEPLEÇÃO
HEPÁTICA DE VITAMINA A.***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a.Egle Machado de Almeida Siqueira

Brasília, outubro de 2010

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

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Egle Machado de Almeida Siqueira
Presidente – Departamento de Biologia celular - UnB

Prof^a. Dr^a Elizabeth Maria Talá de Souza
Membro - Departamento de Biologia celular – UnB

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda
Membro - Departamento de Nutrição – UnB

Prof. Dr. Fernando Fortes de Valência
Suplente – Departamento de Biologia celular – UnB

Brasília, outubro de 2010

À minha família, que durante a minha ausência devido a realização deste trabalho, esteve presente me apoiando em todos os momentos com dedicação, amor e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida abençoando os meus passos;
- À minha família, por existirem em minha vida;
- À minha Esposa, pelo amor e carinho dedicado durante os momentos desta jornada;
- À Prof^a. Dr^a.Egle Machado de Almeida Siqueira, pelo exemplo de profissionalismo e de vida e pela orientação neste trabalho;
- À Prof^a. Dr^a. Sandra, por ser acima de tudo uma educadora;
- Ao Prof. Dr. Fernando, que com sua presença nos ensina que é necessário serenidade para resolver os problemas;
- Aos membros da banca de defesa por aceitarem o meu convite;
- À Fabiani, pelos momentos dos capuccinos, tão simples e tão necessários;
- À Silvana, pela parceria agradável nos trabalhos realizados na bancada;
- Ao Douglas, pela a iniciação na bancada;
- À Fernanda, pela contribuição com as análises;
- Ao Chiquinho e Diego, pela dedicação e pelos momentos de descontração;
- À Miriam, pelo seu bom humor contagiante;
- À Cibele, pelo otimismo e contribuição na disciplina de bases;
- Débora e Natália, por compartilharem de emoções semelhantes a que eu vivenciei;
- E a todos os demais integrantes do laboratório e aqueles que de modo direto ou indireto contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
LISTA DE TABELA E FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1.INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Interação entre vitamina A e ferro	20
2.2 Ferro	22
2.2.1 Deficiência	22
2.2.2 Toxicidade	24
2.2.3 Metabolismo do ferro: Principais mecanismos envolvidos	25
2.2.3.1 Aquisição do ferro	26
2.2.3.2 Absorção de ferro hêmico e não hêmico	29
2.2.3.3 Transferência de ferro da membrana apical para dentro do enterócito	30
2.2.3.3.1 DMT1	30
2.2.3.3.2 Dcytb	32
2.2.3.3.3 HCP 1	33
2.2.3.4 Transferência de ferro na membrana basolateral	34
2.2.3.4.1 Ferroportina	34
2.2.4 Transferrina	36
2.2.5 Armazenamento (Ferritina)	38
2.2.6 Regulação celular e sistêmica	41
2.2.6.1 Regulação intracelular	41

2.2.6.2 Regulação sistêmica (Hepcidina)	44
2.2.7 Eritropoiese	47
2.2.7.1 Síntese de hemoglobina	49
2.2.7.1.1 Funções da hemoglobina	51
2.2.7.2 Índices hematimétricos	52
2.2.7.3 Anemia (anemia da doença crônica)	52
2.3. Vitamina A	54
2.3.1 Caracterização molecular	58
2.3.1.1 Retinol	59
2.3.1.2 Éster de retinil	60
2.3.1.3 Retinal	61
2.3.1.4 Ácido retinóico	61
2.3.1.5 Carotenóides	62
2.3.2 Metabolismo (digestão e absorção)	63
2.3.3 Retinóides e eritropoietina	71
3. Objetivos	72
3.1 Objetivo geral	72
3.2 Objetivos específicos	72
4. Metodologia	72
4.1 Animais	72
4.2 Variáveis analisadas	73
4.2.1 Ganho de peso	73
4.2.2 Consumo da dieta	74
4.2.3 Hemograma	74
4.2.4 Ferritina	74

4.2.5 Determinação da concentração de retinol hepático	74
4.2.6 Concentração de ferro nos tecidos	76
4.3. Análise estatística	77
5. Resultados	78
6. Discussão	88
7. Conclusão	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AR	Ácido retinóico
ARAT	Acil CoA: Retinol Acil Transferase
CN	Cegueira noturna
CT	Grupo Controle
Dcytb	Citocromo b redutase
dL	Decilitro
DFe	Deficiência de Ferro
DMT1	Proteína transportadora de metal divalente
DVA	Grupo deficiente em vitamina A
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
IRE	Elemento responsivo ao ferro
EPO	Eritropoietina
ERO	Espécie reativa oxigênio
ER	Éster de retinil
Fe	Ferro
Fe II	Ferro ferroso
Fe III	Ferro férrico
FPN	Ferroportina
g	grama
Hb	Hemoglobina
Htc	Hematócrito
HER	Hidrolase de éster de retinil
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICP-AES	Espectroscopia de Emissão Atômica com plasma indutivamente acoplado
LRAT	Lecitina retinol-acil transferase
NADPH reduzida	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

*OH	Radical hidroxil
IRP	Proteína reguladora do ferro
pro-VA	Pró-vitamina A
Quilomícron	QM
RAR; RXR	Receptor de ácido retinóico
RARE	Elemento responsivo ao ácido retinóico
RBP	Proteína ligante de retinol
RL	Radical Livre
mRNA	RNA mensageiro
Tf	Transferrina
TfR	Receptor transferrina
T0	Tempo inicial (basal)
T15	Tempo 15 dias de tratamento
T30	Tempo 30 dias de tratamento
T45	Tempo 45 dias de tratamento
VCM	Volume corpuscular médio
VA	Vitamina A

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela e figuras	Página
Tabela 1: Ganho de peso, ingestão total de dieta dos ratos dos grupos CT e DVA, nos tempos T0, T15, T30 e T45 dias de tratamento	79
Figura 1: reação de Fenton	24
Figura 2: Curva de solubilidade do Fe III, II e Hêmico	27
Figura 3: Distribuição de ferro em um adulto	29
Figura 4: Representação da absorção e exportação de ferro pelo enterócito	35
Figura 5: Representação do transporte de Fe para dentro da célula acoplado à Tf	37
Figura 6 a: Representação da ferritina	39
Figura 6 b: Representação da ferritina	40
Figura 7: Representação da aconitase	43
Figura 8: Ação da hepcidina no metabolismo do Fe	45
Figura 9: Modelo de regulação da expressão de hepcidina	47
Figura 10 a: Representação do heme	50
Figura 10 b: Representação da hemoglobina	51
Figura 11: Estrutura química da Vitamina A	59
Figura 12: Estrutura química do todo-trans-retinol	59
Figura 13: Estrutura química do palmitado de retinil	60
Figura 14: Estrutura do 11-cis-retinal	60
Figura15 a,b: Estrutura química do todo-trans-ácido retinóico, 9-cis- ácido retinóico	61
Figura15 c: Estrutura química do 13-cis-ácido retinóico	62
Figura 16: Interação do ácido retinóico com seus receptores levando a regulação da transcrição	62

Figura 17: conversão do β - caroteno em retinol	63
Figura 18: Representação da absorção do β-caroteno e do retinol pelos enterócitos	65
Figura 19: Representação do quilomícron	67
Figura 20 a: Morfologia da célula estrelada	67
Figura 20 b: Morfologia da célula estrelada	67
Figura 21: Ação nos tecidos extra-hepáticos e armazenamento da VA adquirida da dieta.	68
Figura 22: Absorção e estoque do retinol e proteína ligadora de retinol (RBP) pelas células estreladas	70
Figura 23: Concentração hepática de retinol ($\mu\text{g/g}$) dos ratos (CT) e (DVA), durante os 45 dias de tratamento	78
Figura 24 a, b: Efeito da deficiência em vitamina A na Hb e Htc	80
Figura 24 c, d: Efeito da deficiência em vitamina A no VCM e HCM respectivamente	81
Figura 24 e, f: Efeito da deficiência em vitamina A no CHCM e eritrócitos respectivamente	82
Figura 24 g ,h: Efeito da deficiência em vitamina A nos leucócitos e linfócitos	83
Figura 25: Concentração de ferritina sérica nos ratos tratados com dieta CT (\blacklozenge) e DVA (\blacksquare) durante os 45 dias de tratamento	84
Figura 26: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), no baço, de ratos CT (\blacklozenge) e DVA (\blacksquare) durante os 45 dias de tratamento	85
Figura 27: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), no intestino de ratos CT (\blacklozenge) e DVA (\blacksquare) durante os 45 dias de ratamento	86
Figura 28: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), no fígado nos ratos tratados com dieta CT (\blacksquare) e DV A (\blacksquare), durante 45 dias de tratamento	87
Figura 29: Evolução da concentração de retinol hepático no decorrer do tempo em animais DVA e CT	89

RESUMO

A deficiência de vitamina A (**DVA**) tem sido amplamente reportada por alterar a homeostase do ferro (**Fe**) resultando no acúmulo deste nos tecidos. Entretanto, não há ainda, consenso na literatura quanto ao efeito da DVA sobre os níveis de hemoglobina (**Hb**), do hematócrito, e dos índices hematimétricos. O presente estudo avaliou o efeito da DVA nos níveis corporais de Fe, em ratos, durante o período de instalação da depleção hepática de VA. 52 ratos Wistar, machos recém desmamados, foram aclimatados por 3 dias. Após este período, 10 destes animais foram sacrificados para verificação dos parâmetros basais (**T0**). Os demais ratos foram distribuídos em dois grupos; o grupo controle (**CT**) que recebeu uma dieta padrão para roedores e o grupo deficiente em vitamina A que recebeu a dieta padrão deficiente em vitamina A. Após 15 (**T15**), 30 (**T30**) e 45 (**T45**) dias de tratamento, sete animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue foi coletado por punção cardíaca em dois frascos, com e sem Ácido etileno diamino tetracético (**EDTA**), para análise do hemograma total e ferritina sérica, respectivamente. O fígado, baço e intestino foram extraídos e congelados com nitrogênio líquido, e armazenado a -70° C, para determinação das concentrações de Fe teciduais e de retinol hepático. Após 15 dias de depleção, os animais apresentaram redução na concentração de retinol hepático e, após 30 dias de depleção, não foi mais possível detectar reserva hepática de retinol. Durante os 45 dias de tratamento, foi observado crescente aumento nos níveis de ferro esplênico nos animais depletados, enquanto os ratos do grupo controle apresentaram oscilação nesses níveis, com redução significativa em relação ao grupo DVA, em T30. No intestino, foi observado aumento da concentração de Fe no grupo CT, no entanto os níveis de ferro intestinal nos ratos DVA foram significativamente menores que os encontrados no grupo CT, em T15 e T30 ($p = 0,002$ e $0,001$ respectivamente). Não foi observada diferença significativa no teor hepático de Fe entre os dois grupos durante todo período de tratamento. Houve aumento significativo nas concentrações de Hb e hematócrito (**Htc**) nos dois grupos no T15 em relação aos níveis basais, mantendo-se constantes em T30 e T45, sem apresentarem diferenças significativas entre os dois grupos. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de ferritina sérica entre os dois grupos, durante todo o período do tratamento. O grupo DVA apresentou o

volume corpuscular médio (**VCM**) e a hemoglobina corpuscular média (**HCM**) menor em relação ao grupo CT em T45. Os resultados deste estudo evidenciam um papel positivo da vitamina A na hematopoiese e revelam que os efeitos da DVA nos níveis corporais de ferro em ratos são tecidos específicos e dependentes do tempo de depleção que os animais foram submetidos.

Palavras-chave: Interação ferro e vitamina A, ferro, anemia, hepcidina, deficiência de vitamina A.

ABSTRACT

The vitamin A deficiency (**VAD**) has been widely reported to alter the homeostasis of iron resulting in its accumulation on tissues. However, there is not yet in the literature an consensus regarding the effect of VAD on the levels of hemoglobin (**Hb**), hematocrit, and RBC indices. This study evaluated the effect of VAD on body iron levels in rats during the installation of the hepatic VA depletion. 52 male Wistar rats, weaned, were acclimated for 3 days. After this period, 10 of these animals were sacrificed for determination of baseline variables (**T0**). The remaining mice were divided into two groups: the control group (**CT**) received a standard diet for rodents and the group deficient in vitamin A (**VAD**) received the standard diet without vitamin A. At 15 (**T15**), 30 (**T30**) and 45 (**T45**) days of treatment, seven animals from each group were killed by cervical dislocation. Blood collected by cardiac puncture into two bottles, with and without EDTA for analysis of total blood count and serum ferritin, respectively. The liver, spleen and intestines were removed and frozen with liquid nitrogen and stored at -70° C, to determine the concentrations of iron tissues and hepatic retinol. After 15 days of depletion, the animals showed a reduction in hepatic retinol concentration and after 30 days, it was no longer possible to detect liver retinol reserve. During the 45 days of treatment, there was a growing increase in spleen iron levels in VAD animals, while control rats showed an oscillation at these levels, with significant reduction compared to the VAD group, in T30. In the intestine, we observed an increased of iron concentration in CT groups, however, in intestinal iron levels found in VAD rats were significantly lower than those found in the CT group at T15 and T30 ($p = 0.002$ and 0.001 , respectively). No difference was found in iron liver content between the two groups throughout the treatment period. There was a significant increase in (Hb) and (Hct) concentrations, in both groups at T15 compared to baseline levels and it remained constant at T30 and T45, showing no significant differences between the two groups. There were no significant changes in serum ferritin levels between the two groups throughout the treatment period. The VAD group presented the mean corpuscular volume (**MCV**) and mean corpuscular hemoglobin (**MCH**) lower than in the CT group at T45. The results of this study suggest a positive role of vitamin A on hematopoiesis and reveal that the

effect of VAD on body iron levels in mice is tissue specific and time-dependent of the animals were subjected to the depletion.

Keywords: Iron and vitamin A interaction, iron, anemia, hepcidin, vitamin A deficiency.

1. INTRODUÇÃO

O ferro desempenha diversas funções no organismo humano sendo essencial para a manutenção de vários processos fisiológicos tais como, transporte de elétrons e consequente geração de energia nas mitocôndrias; catálise de reações de óxido-redução; transporte de oxigênio aos diversos tecidos por acoplamento à molécula de hemoglobina. Participa também da estrutura de diversas proteínas e enzimas, o que torna o Fe essencial ao organismo (Beard, et al., 1996). Em humanos, a deficiência compromete o desenvolvimento cognitivo, aumenta a morbimortalidade materna e infantil, reduz a capacidade de trabalho e a resistência imunológica (Beard, et al., 1996; Bovell-Benjamin, et al., 2003). Entretanto, devido a essa versatilidade química, o Fe pode transferir elétrons para o oxigênio molecular, capazes de promover a oxidação de diversas moléculas e danos oxidativos celulares (Siqueira, et al., 2006). Desse modo o excesso de Fe no organismo pode levar ao aumento de estresse oxidativo tendo sido associado a diversos processos patológicos, tais como câncer, doenças hepáticas e cardíacas, diabetes, disfunções hormonais, do sistema imunológico e a várias outras doenças crônicas (Trinder, et al., 2002; Salonen, et al., 1992). Devido a este papel adverso do Fe no organismo, durante a evolução, os organismos vivos desenvolveram mecanismos moleculares capazes de manter as concentrações de Fe nos tecidos, suficientes para atender as demandas fisiológicas e prevenir os danos oxidativos celulares.

A vitamina A (**VA**) é conhecida há pelo menos 3500 anos como um fator que pode prevenir determinadas doenças, e seus efeitos biológicos têm sido relacionados com o crescimento, diferenciação celular, visão (Wolf, 1996) e sistema imune (Christopher, et al., 2006). A DVA é considerada um problema de saúde pública em 60 a 78 países em desenvolvimento, onde se estima que aproximadamente 252 milhões de crianças sejam afetadas por esta deficiência (Semba, et al., 2002). Desde as primeiras décadas do século passado tem sido reportada uma estreita relação entre a DVA e mortalidade em crianças, verificando-se que a suplementação com VA reduzia substancialmente a mortalidade (Nicolas G, 2002).

Estudo realizado em áreas endêmicas de DVA revelou que a suplementação em crianças a partir de 06 meses de idade reduziu consideravelmente a morbidade e a mortalidade (Idindili, et al., 2007; Fawzi, et al., 1993), demonstrando a importância da VA no restabelecimento da saúde. Mulheres grávidas também constituem um grupo de risco para a DVA em países em desenvolvimento (Christian et al, 2000).

Vários estudos têm evidenciado a existência de uma relação sinérgica entre o metabolismo da VA e o do Fe, (Arruda, et al., 2009; Roodenburg, et al., 2000; Mejia, et al., 1979; Amine, et al., 1970).

Apesar de a DVA ser reconhecida como umas das causas da anemia, ainda não está bem caracterizado o papel da VA nesse processo. No entanto, acredita-se que a DVA influencia no surgimento da anemia por atuar na modulação da hematopoiese e por meio da modulação do metabolismo de Fe (Semba, et al., 2002).

Estudo realizado por Zimmermann e colaboradores (2006) em crianças pré-escolares verificou que a suplementação com VA aumentou a concentração de Hb e o VCM reduzindo a anemia, sugerindo que a VA esteja envolvida no aumento da circulação de eritropoietina (**EPO**), cujo gene apresenta uma região responsiva a ácido retinóico (Evans, 2005).

O ácido retinóico participa da regulação de fatores transcrição de modo que o estado nutricional relativo a VA, no organismo poderia modular a síntese de diversas proteínas relacionadas com a homeostase do Fe e assim influenciar no *status* deste mineral no organismo. (Mwnari e colaboradores (2000) em um trabalho realizado na Tanzânia em crianças com idade de 9 a 12 anos, observaram também uma influência da suplementação de VA nos níveis de Hb, estes dados forneceram fortes evidências do efeito na suplementação de VA no combate a anemia, sugerindo que programas de suplementação sejam implantados para o combate a subnutrição. No entanto, estes resultados são conflitantes com outro estudo onde os autores concluíram que a suplementação de VA parece não aumentar a concentração de Hb em mulheres grávidas que vivem no sudeste da África, em áreas onde é marcante a prevalência da anemia (Semba, et al., 2001).

Deficiências concomitantes de VA e Fe são reconhecidas em determinadas regiões do Brasil, onde os indivíduos vivem em situação de insegurança alimentar,

agravada pela alta prevalência de anemia ferropriva. Nessas populações a fortificação apenas do Fe poderia ser um fator agravante na saúde, uma vez que a deficiência de VA parece promover o acúmulo de Fe nos tecidos, podendo favorecer a geração de espécies reativas de oxigênio (**ERO**) e consequentes, danos oxidativos as biomoléculas com aumento na prevalência de patologias associadas ao estresse oxidativo (Siqueira, et al., 2006).

Estudos realizados em ratos, também não apresentam consenso quanto ao efeito da deficiência de VA na concentração de Hb. Alguns autores observaram aumento da concentração de Hb na DVA (Arruda, et al., 2009; Walczyk, et al., 2003), e outros não, (Mejia, et al., 1979). Dessa forma, a identificação de alterações no estado corporal relativo ao Fe, durante a instalação da DVA, deverá contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na interação entre os metabolismo destes dois micronutrientes, gerando conhecimento fundamental no sentido de beneficiar todos os grupos populacionais, promovendo saúde, nutrição e alimentação adequada a grupos populacionais específicos e populações em situação de vulnerabilidade social (BRASIL. lei nº 11.346, 2006).

O presente projeto tem como objetivo investigar o *status* de ferro durante o processo de depleção hepática de vitamina A.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interação entre vitamina A e ferro

A VA constitui uma série de compostos alimentares, sendo importantes para o ciclo visual, proliferação e diferenciação celular, desenvolvimento embrionário assim como a integridade do sistema imunológico.

A interação entre a DVA e a anemia tem sido reportada desde as primeiras décadas do século passado por meio de estudos realizados em humanos e animais, e continua sendo ainda neste século motivo de investigação e preocupação, pois a deficiência destes dois micronutrientes afeta mais de 30% da população mundial (Zimmermann, et al., 2006; Health, 2001; WHO/UNICEF/UNU/IDA, 1998).

Hodges e colaboradores (1978) descreveram que a partir de 1922 foram desenvolvidos estudos com ratos Wistar, nos quais observaram que a deficiência de VA levou à diminuição do crescimento, perda da capacidade olfativa e dificuldade para se alimentar, bem como à concomitante diminuição de células relacionadas com a hematopoiese.

Em 1926, pesquisadores tentando elucidar a questão de mudanças hematológicas induzidas pela DVA, desenvolveram trabalho no qual ratos submetidos a uma dieta pobre em VA apresentaram perda de peso, diarreia, e desidratação. As quantidades de eritrócitos e o nível de Hb também foram observados e foi possível verificar que esses indicadores diminuíram significativamente. Importante ressaltar que quando os investigadores suplementaram estes animais com VA o ganho de peso e os níveis de Hb e eritrócitos foram restaurados. Os autores sugeriram que a VA era fundamental para a formação de eritrócitos. No entanto, ainda não conseguiam explicar como este fato ocorria (Kowssler, 1926., citado por Hodges, et al., 1978).

Entre meados da década de cinquenta e final da década de sessenta foram realizados várias pesquisas, conduzidas em países em desenvolvimento envolvendo a nutrição, os principais achados nas populações investigadas nestas regiões foi baixa ingestão de VA e alta prevalência de anemia corroborando com as pesquisas anteriores, que relatavam uma associação entre estes dois micronutrientes (Surveys, Manual for Nutrition, 1963).

Amine (1970) investigou a absorção e retenção de Fe em ratos com deficiência de VA em comparação com um grupo CT durante 5 semanas, quando foi observado um aumento da absorção de Fe em animais do grupo DVA.

Hodges e colaboradores (1978) conduziram estudo no qual homens saudáveis que se alimentavam com fontes dietéticas contendo todos os nutrientes exceto VA, desenvolveram certo grau de anemia.

Estudo realizado com ratos que foram submetidos à DVA durante 110 dias mostraram que a incorporação de Fe nos eritrócitos era reduzida entre 40 e 50% comparado com os animais CT, sugerindo que durante a deficiência de VA o Fe restara aprisionado no fígado e no baço e não era efetivamente liberado para a eritropoiese pela medula óssea (Mejia, et al., 1979), corroborando os estudos realizados por outros pesquisadores (Gardner et al., 1979).

Várias linhas de evidência têm apresentado que a VA modula o metabolismo do Fe. Em um estudo experimental com modelos animais (ratos) foi reportado que a deficiência de VA aumenta a concentração de Fe no baço (Roodenburg, et al., 1994) após 10 semanas de depleção de VA, e embora estes autores tenham observado uma estreita relação entre a DVA e a anemia os mecanismos envolvidos nesta relação continuavam sem ser elucidados.

Mejia e colaboradores (1988) conduziram um estudo em 1988 com diferentes tipos de estratégias de intervenção onde 4 grupos de crianças com anemia foram, submetidos a diferentes tipos de suplementação (Fe, VA, VA e Fe, placebo), por 2 meses cada grupo. O grupo VA (suplementado apenas com VA) obteve aumento significativo de concentração sérica de retinol, Hb, Htc, eritrócitos, e Fe sérico, não tendo nenhuma alteração na capacidade total de ligação de ferro e também na ferritina sérica.

Estudo populacional realizado na Tailândia por Bloem e colaboradores (1990) submeteu crianças em idade pré-escolar com sinais clínicos de DVA, a uma única dose de VA. Os pesquisadores observaram, após a suplementação aumento dos níveis de retinol, proteína ligante de retinol (**RBP**), Hb e Htc.

Alguns mecanismos biológicos podem explicar como a DVA pode levar à anemia e afetar a homeostase do Fe.

Estes mecanismos podem ser divididos em 03 categorias:

- Modulação da eritropoiese;
- Modulação do sistema imune, levando a anemia induzida por infecção;
- Modulação do metabolismo do Fe.

O todo-trans ácido retinóico parece estimular a formação de progenitores hematopoiéticos. O estímulo da eritropoiese é feito pelo aumento do número de células progenitoras. Essas células possuem receptores para EPO, assim proliferam, diferenciam-se e produzem Hb (Hoffbrand, et al., 2004).

Tem sido reportado por pesquisadores que a DVA promove o acúmulo de Fe nos tecidos levando ao aumento de sua disponibilidade para a catálise de reações de oxidação, como a geração de EROs (Papanikolaou, et al., 2005).

A suplementação de VA em ratos estimulou a liberação do Fe dos estoques do baço e da medula (Roodenburg, et al., 1996) promovendo melhora na homeostase do Fe. A DVA também tem sido relacionada com baixa capacidade de ligação de ferro e baixo percentual de saturação de transferrina (**Tf**) (Bloem, et al., 1990).

Pesquisas nutricionais apontam com clareza que as altas prevalências de DVA e de anemia, geralmente ocorrem juntas na população, (Semba, et al., 2002) corroborando os achados que relatam sobre a VA alterando a hematopoiese e deste modo levando à anemia.

2.2 Ferro

2.2.1 Deficiência

Deficiência de ferro (**DFe**) é a mais prevalente deficiência detectada de micronutriente (Donovan, et al., 2006) e um dos fatores de risco que levam a inaptidão e morte no mundo inteiro, afetando aproximadamente 2 bilhões de indivíduos (Arredondo, et al., 2005), instalando-se nos seres humanos, quando os requerimentos fisiológicos não são atingidos através da dieta (Zimmermann, et al., 2007).

Alguns autores apontam como o 2º maior problema de carência nutricional, perdendo apenas para a fome (Shills, et al., 2003) devendo ser ressaltado que a maioria dos indivíduos acometidos por essa carência vivem em países em desenvolvimento (Lynch, 2005).

A Organização Mundial de Saúde estima que 39% das crianças menores de 5 anos, 48% de crianças entre 5 e 14 anos, 42 % de todas as mulheres e 52% das mulheres grávidas em países em desenvolvimento são anêmicas, sendo metade por DFe (DeMaeyer, et al., 1985).

A maior incidência de anemia ocorre nos países em desenvolvimento. No Brasil esta incidência está relacionada a áreas menos desenvolvidas sendo também observada forte associação a condições socioeconômicas desfavoráveis (Siqueira, et al., 2006), nas quais fatores de risco associados às precárias condições de vida, inadequados sistemas de esgotamento sanitário e de tratamento de água além da alta prevalência de parasitoses, frequentemente atuam de modo concomitante e sinérgico, agravando o estado nutricional relativo ao Fe (Santos, 2002) considerada em termos de magnitude o maior problema carencial do país, sem grandes diferenciações geográficas afetando todas as macroregiões (Batista Filho, 1999).

No entanto a DFe não está relacionada apenas a condição socioeconômicas, sendo também observada em todas as classes sociais.

Segundo a Organização Panamericana de Saúde, o Brasil encontra-se em terceiro lugar na prevalência de anemia por deficiência de ferro na América Latina, verificando-se que 35% das crianças com idade de 1 a 4 anos encontram-se anêmicas com esta prevalência aumentando esse índice quando se observa a faixa etária das crianças menores que 2 anos idade chegando até 83 % de prevalência (Carvalho, et al., 2006).

Nos EUA, onde o problema nutricional é a obesidade, a prevalência de anemia por DFe também está presente (Shills, et al., 2003) confirmando que a DFe não está ligada apenas a fatores sócio-econômicos. De fato, uma alimentação balanceada é essencial para que esse problema da anemia por DFe não se instale na população. Assim, uma alimentação que não seja monótona, ou seja, bem diversificada atingindo

todos os grupos alimentares é fundamental para diminuir a prevalência deste tipo de anemia (Zimmermann, et al., 2007).

2.2.2 Toxicidade

O Fe está presente em diversas biomoléculas sendo vital para todos os organismos vivos e essencial para diversos processos metabólicos (Conrad, et al., 2000). Moléculas como a Hb e aconitase possuem Fe em suas estruturas moleculares o que viabiliza seu perfeito funcionamento. Portanto era de se esperar que o excesso deste mineral não fosse prejudicial para a saúde e, até mesmo fosse benéfico haja vista o grande número de produtos alimentícios fortificados com Fe que a indústria lança no mercado.

No entanto, devido à alta reatividade do Fe demonstrada na capacidade de receber e transferir seus elétrons torna esse elemento possivelmente tóxico para o organismo, pois catalisa a formação de ERO que tem sido associado a diversos processos patológicos (Siqueira, et al., 2006; Donovan A, 2006; Hermes, 2004).

A toxicidade do Fe é baseada na capacidade deste elemento participar de reações, tais como a reação de Fenton, geradoras de radicais livres (**RL**), que oxidam e danificam as macromoléculas e promovem morte celular e injúria aos tecidos. O Fe quando presente em excesso, pode danificar as células e tecidos, assim sua homeostase no organismo deve ser finamente regulada (Papanikolaou, et al., 2005).

A reação de Fenton (**Figura 1**) implica na oxidação do ferro ferroso (**Fe II**) a ferro férrico (**Fe III**) mediada pelo peróxido de hidrogênio (**H₂O₂**). Nesta reação o Fe II reduz o peróxido de hidrogênio em um íon hidróxido (OH⁻) e um radical hidroxil (**·OH**) que é um radical extremamente reativo em sistemas biológicos (Halliwell, et al., 2007).



Figura 1: reação de Fenton

RL são átomos ou moléculas altamente reativos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados nos seus orbitais mais externos. Por possuírem esse elétron desemparelhado os RL altamente instáveis podem reagir com outras biomoléculas como, por exemplo, açúcares, proteínas, carboidratos, lipídios de membranas e ácidos nucleicos promovendo sua oxidação, retirando um elétron destas biomoléculas, contudo danificando as mesmas (Papanikolaou, et al., 2005; Hermes, 2004). A biomolécula modificada pelo RL têm sua função alterada, resultando na disfunção celular.

Alguns autores sugerem que a alta concentração de Fe, avaliada pela concentração de ferritina sérica é um fator de risco para doenças coronarianas (Salonen, et al., 1992). Gardi e colaboradores (2002) em estudo sobre fibrose hepática sugerem que o excesso de Fe tecidual possa estar diretamente envolvido na síntese de colágeno.

Embora como visto acima, o excesso de Fe possa ser prejudicial ao organismo, sua versatilidade de agir como um agente oxido/redutor é essencial para o metabolismo (Papanikolaou, et al., 2005). Nessas condições entender os caminhos envolvidos na absorção, estoque e liberação do Fe para utilização é fundamental a fim de que se possa compreender os limites de sua toxicidade e carência e dessa forma sugerir propostas adequadas para suplementação e combate à deficiência.

2.2.3 Metabolismo do ferro: Principais mecanismos envolvidos

Como relatado acima, tanto a DFe como o excesso no organismo podem ser prejudiciais. Nesse sentido, os organismos vivos desenvolveram um eficiente mecanismo molecular de regulação dos níveis celulares de Fe capaz de manter a homeostase celular e entre diferentes tecidos do organismo (Donovan A, 2006).

2.2.3.1 Aquisição do ferro

O Fe utilizado pelo organismo pode ser obtido de duas fontes principais:

- Fe proveniente da dieta;
- Fe reciclado por meio da degradação dos eritrócitos senescentes, pelos macrófagos, no baço (Grotto, 2008).

O Fe proveniente da dieta pode se apresentar de duas formas, quais sejam. O Fe hêmico ligado a molécula de Hb e o Fe não hêmico (inorgânico).

O Fe da dieta na forma heme, proveniente da degradação da molécula de Hb nos capilares e também mioglobina do músculo, presentes na carne vermelha (Grotto, 2008) e demais fontes de produtos de origem animal, como nos ovos e laticínios, apresenta estado de oxidação Fe II e corresponde a 1/3 do total de Fe dietéticos, sendo mais biodisponível do que a forma inorgânica.

O Fe hêmico para ser absorvido é primeiramente liberado da heme proteína, por meio da digestão (Conrad, et al., 1993), e em seguida, o grupo heme é absorvido pelo epitélio do intestino delgado, por meio de uma molécula transportadora. No citossol o Fe é liberado da protoporfirina pela ação da enzima heme oxigenase quebrando assim o anel porfirina (Shills, et al., 2003). Diferentemente do ferro inorgânico, a absorção do Fe hêmico não sofre a influência de substâncias tais como o ácido ascórbico e os fitatos dietéticos que podem respectivamente aumentar ou reduzir a absorção do Fe inorgânico (Conrad, et al., 2000).

Sabe-se que a eficiência da absorção de Fe pelo organismo varia de acordo com as situações fisiológicas do indivíduo. Em situações de maior demanda por Fe, como na deficiência de Fe ou mesmo devido à gravidez, à adolescência ou à hemólise (Grotto, 2008), o organismo responde a esta demanda aumentada alterando a expressão de diferentes proteínas envolvidas no processo de absorção, as quais serão descritas posteriormente.

O Fe inorgânico pode se apresentar tanto na forma ferrosa (Fe II) quanto na forma férrica (Fe III), sendo esta a forma predominante nos vegetais e cereais (Grotto, 2008; Donovan A, 2006; Conrad, et al., 2000). O Fe III é solúvel em pH menor que 3 assim é necessário que seja solubilizado e quelado no estômago para que possa ser

absorvido em ambiente mais alcalino como, por exemplo, o duodeno. A mucina intestinal e certos componentes da dieta (aminoácidos) cumprem este papel (Conrad, et al., 2000).

No entanto outros componentes da dieta (fitatos, oxalatos, taninos) promovem a precipitação do Fe III formando macromoléculas que não são disponibilizadas para a absorção. O Fe III pode ser ainda reduzido por componentes da dieta ou por secreções intestinais, nas quais em ambiente com pH neutro é possível ser solubilizado.

Interessante perceber que ao contrário do Fe não hêmico (inorgânico), o Fe hêmico é solúvel em pH alcalino como o encontrado no duodeno e precipita em ambientes ácidos (**figura 2**). O Fe não hêmico presente na dieta não é facilmente absorvido. Em condições fisiológicas, em pH neutro e na presença de oxigênio, o Fe ferroso é oxidado a forma férrica formando precipitados.

No conteúdo do lúmen do intestino o Fe está presente na forma férrica e, portanto possui baixa biodisponibilidade caso não tenha sido quelado, (Conrad, et al., 2000). A quelação estabiliza o Fe reduzindo a precipitação deste no pH alcalino do intestino delgado (Miret, et al., 2003).

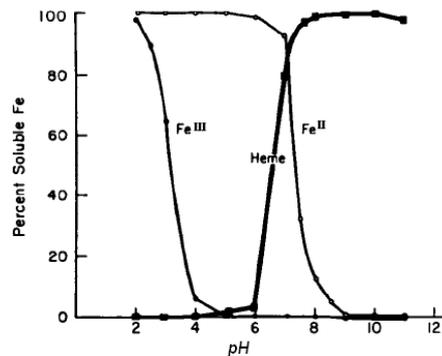


Figura 2: Curva de solubilidade do Fe III, II e Hêmico adaptado de (Conrad, et al., 2000). Na ausência de queladores, o Fe III é precipitado em pH ácido e o Fe II não precipita até a solução tornar-se alcalina. Ao contrário, Fe hêmico é solúvel em soluções alcalinas e precipita em soluções ácidas.

A presença de outros minerais a exemplo do cálcio, do zinco, do cobre do cobalto, do níquel, cádmio e do manganês (metais divalentes) na dieta pode prejudicar a absorção do Fe não-hêmico, pois, provavelmente, utilizam vias comuns de absorção, levando a um mecanismo de competição entre esses minerais (Arredondo, et al., 2005).

A solubilidade do Fe inorgânico da dieta pode ser modificada melhorando a sua absorção com a adição de ácido ascórbico, proteína animal, peptídeos como cisteína, de modo a aumentar a solubilidade e melhorar a absorção deste mineral pelo organismo (Conrad, et al., 2000).

Uma pessoa adulta tem cerca de 4 a 5 g de Fe no organismo distribuídos conforme esquema apresentado na (**Figura 3**), sendo que 2,5g deste montante se encontram complexado dentro da molécula de Hb (Hoffbrand, et al., 2006; Grotto, 2010). Normalmente todo Fe da Hb está contido dentro dos eritrócitos ou em seus precursores na medula óssea.

Dadas condições usuais, 1mg de Fe é absorvido a cada dia pelo epitélio do duodeno e mesmo na DFe a absorção é somente cerca de 2 a 4 mg e, na sobrecarga, a absorção é reduzida para 0,5 mg (Miret, et al., 2003) denotando um controle muito fino na regulação da absorção, estoque e liberação do Fe que será utilizado pelo organismo.

Nos adultos a quantidade de Fe excretada pelo corpo é relativamente pequena. Este mineral não é normalmente excretado pela urina ou pelo intestino. No entanto, a perda ocorre com a esfoliação de células do trato gastrointestinal, sistema urinário, células da pele. Assim um homem adulto tem perdas de aproximadamente 1mg de Fe (Miret, et al., 2003). Do total de Fe perdido aproximadamente a mesma quantidade deve ser absorvida, como já mencionado, para compensar esta perda e deste modo manter o balanço adequado de Fe no organismo. Esta compensação é obtida por meio de eficiente sistema de reutilização deste metal das fontes internas, principalmente do Fe proveniente da Hb das hemácias senescentes após hemólise intra e extravascular (Cançado, 2002).

O Fe fornecido através da degradação dos eritrócitos senescentes é uma fonte de fundamental importância. Nesse sentido a fagocitose da molécula de Hb que recicla aproximadamente 30 mg/dia de Fe é essencial para manter a eritropoiese. Esta reciclagem é realizada pelos macrófagos do baço e do fígado (células de Kupfer) (Grotto, 2008).

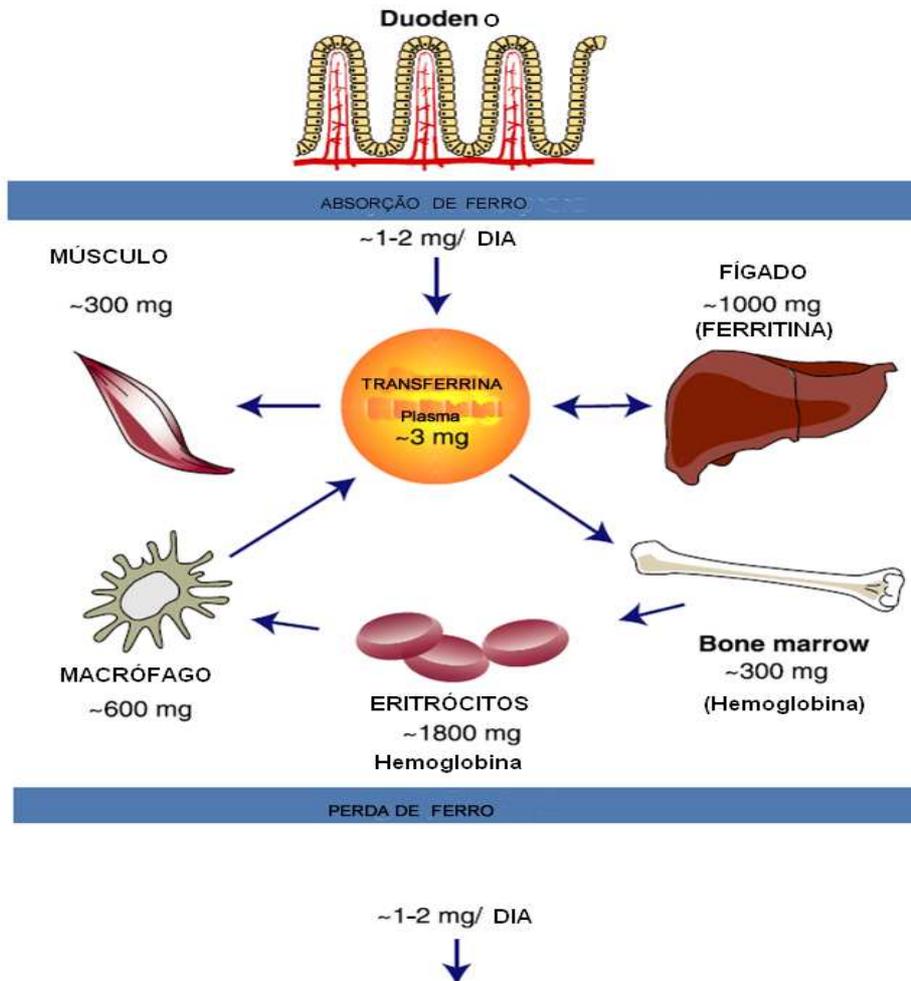


Figura 3: Distribuição de ferro em um adulto. Adaptado de (Papanikolaou, et al., 2005)

2.2.3.2 Absorção de ferro hêmico e não hêmico

Três tecidos estão envolvidos diretamente no metabolismo do Fe. O enterócito que contribui para entrada Fe no organismo, o hepatócito que estoca e libera Fe e os macrófagos que reciclam o Fe dos glóbulos vermelhos senescentes.

A formação dos eritrócitos necessitam de aproximadamente de 30mg de Fe os quais são fornecidos pela destruição dos eritrócitos senescentes pelas células do sistema reticuloendotelial, baço, e células de Kupffer (Grotto, 2010).

A maior absorção de Fe ocorre no duodeno. No entanto ao longo do intestino outros pontos também absorvem Fe, porém com menor eficiência, por exemplo, o íleo absorve bem menos Fe que o duodeno. Já foi demonstrado que na DFe a mucosa do duodeno apresenta maior adaptação à mudança no estado corporal de Fe comparado com outros pontos do intestino delgado (Miret, et al., 2003; Wheby, et al., 1970; Manis, et al., 1962).

Algumas proteínas estão envolvidas na transferência de Fe para dentro do enterócito, transportando ferro através da membrana apical, e outras exportam Fe de dentro do enterócito através da membrana basolateral para a circulação sanguínea (**figura 4**) nesse sentido, um sincronismo entre absorção, utilização e estoque deste mineral é essencial para a manutenção do equilíbrio desse metal no organismo.

2.2.3.3 Transferência de ferro da membrana apical para dentro do enterócito

2.2.3.3.1 DMT1

O transportador de metal divalente (**DMT1**), também conhecido como resistência natural associado ao macrófago (**Nramp2**) e transportador de cátion divalente 1 (**DCT1**) é o local de passagem do Fe II do lúmen do intestino para dentro do enterócito (Zimmermann, et al., 2007; Gunshin, et al., 1997).

O DMT1 é o meio pelo qual o Fe no estado de oxidação Fe II utiliza para entrar no enterócito. No entanto, a maior parte do Fe fornecido pela dieta que está presente no duodeno está na forma Fe III, sendo, portanto, necessário haver redução do íon férrico para a forma ferrosa dessa maneira favorecendo a passagem desse íon para dentro do enterócito (David, 2005).

Essa redução é realizada por uma ferroredutase presente na borda em escova denominada Citocromo b redutase (**Dcytb**) (Mckie, et al., 2001).

O mecanismo de transporte de Fe II para dentro do enterócito é acoplado por um próton e requer um gradiente de pH adequado para que ocorra.

A superfície da mucosa do duodeno e jejuno proximal permanecem moderadamente ácidas apesar da progressiva alcalinização do conteúdo luminal (Mackenzie, et al., 2005).

Esse microambiente ácido é obtido por meio do contratransporte, uma forma de transporte ativo secundário no qual os solutos se movem em direções opostas através de uma membrana celular, no caso específico, o enterócito.

O sódio se move para dentro da célula e o íon H^+ se move para fora (lúmen intestinal). Vale ressaltar que o sódio se move a favor de um gradiente de concentração e o íon H^+ se move contra seu gradiente de concentração. Esse tipo de transporte ($Na^+_H^+$) fornece o próton que mantém o potencial eletroquímico suficientemente adequado para a absorção de ferro.

Desse modo, o funcionamento do DMT1 é dependente de um baixo pH favorecendo o cotransporte, que também é uma forma de transporte ativo secundário. Porém diferentemente do transportador $Na^+_H^+$ todos os solutos no caso Fe^{II} e H^+ são transportados na mesma direção, qual seja, para dentro do enterócito (Mackenzie, et al., 2005).

O DMT1 é altamente expressado na borda em escova no duodeno em condições associadas com aumento da absorção de Fe como na DFe, anemia por doença crônica e hipóxia (Wosten, 2000) também é expresso em outros tipos celulares como os macrófagos, baço e células de Kupffer.

Estudo desenvolvido em ratos Belgrade de laboratório que tinham mutação no gene do DMT1 observou o desenvolvimento da anemia microcítica, (Miret, et al., 2003), fornecendo evidências de que este transportador está envolvido na regulação da captação de Fe no duodeno (Fleming, et al., 1998).

Estudo realizado recentemente em nosso laboratório possibilitou verificar o aumento da expressão de DMT1 em ratos que foram submetidos a dieta com baixo nível de Fe quando comparado com animais do grupo CT, sugerindo que o nível de RNA mensageiro (mRNA) da DMT1 estava aumentado na DFe (Arruda, et al., 2009). Aumento similar nos níveis de mRNA da *Dcytb* no duodeno foi também verificado, em outros trabalhos, sendo sugerido que o DMT1 e a ferredutase *Dcytb* estão fortemente correlacionadas e são regulados em sincronia (Miret, et al., 2003). Estes dados

corroboram a função do Dcytb de agir como agente redutor, reduzindo Fe III para a forma ferrosa, o qual será reconhecido e ligado ao DMT1 favorecendo a transferência de ferro para dentro do enterócito (**Figura 4**).

Em um estudo realizado por Frazer e colaboradores (2003), foi verificado que, após a ingestão de altas doses de Fe por via oral, a expressão de DMT1 e Dcytb era reduzida, sugerindo bloqueio na mucosa do duodeno resultando propriamente em uma redução nos níveis dessas proteínas necessárias para a transferência do Ferro II do lúmen para dentro do enterócito.

A expressão destas proteínas parece ser estritamente regulada. O mRNA do DMT1 contém um elemento responsivo ao Fe (**IRE**) na posição 3', que responde a concentração de Fe intracelular, modulando a expressão desta proteína, diferentemente do Dcytb que não contém esse IRE, regulando a expressão do mRNA dessa ferredutase (Miret, et al., 2003).

Alguns estudos sugerem que a localização do DMT1 muda em decorrência da deficiência e sobrecarga de Fe, e, em condições de deficiência, o DMT1 seria encontrado na membrana apical do enterócito e no citoplasma em condições de sobrecarga de Fe (Miret, et al., 2003).

2.2.3.3.2 Dcytb

Dcytb é uma proteína reguladora de Fe que funciona como uma ferredutase, sendo altamente expressada nos enterócitos duodenais. O Dcytb tem um papel na absorção de Fe na mucosa duodenal por reduzir Fe III para a forma Fe II e esse será transferido pelo DMT1 para dentro do enterócito (**Figura 4**). Esta função é particularmente importante na deficiência de Fe (McKie, 2008).

2.2.3.3.3 HCP 1

Outra proteína presente na membrana apical do duodeno e que está relacionada com a absorção de Fe é a transportadora de heme (**HCP 1**) (**Figura 4**). Como o próprio nome sugere, transporta Fe hêmico para dentro do enterócito.

No lúmen intestinal, o Fe hêmico é liberado do alimento, por meio da digestão das proteínas, no processo digestivo. O heme livre liga-se, então, à membrana da borda em escova dos enterócitos duodenais, por meio da proteína transportadora HCP 1, de 50-kDa, que contém nove domínios transmembrana, os quais atravessam intactos a membrana plasmática e importam o heme extracelular. No citoplasma do enterócito, o grupo heme encontra-se ligado à membrana de vesículas (Grotto, 2008).

Dentro do enterócito o heme é clivado por uma heme oxigenase que libera o Fe (Donovan, et al., 2006; Raffin, et al., 1974). No entanto, dentro do citosol a heme oxigenase quebra o anel porfirina de modo que o Fe contido neste complexo seja liberado fornecendo Fe III, biliverdina e monóxido de carbono (Donovan, et al., 2006).

O Fe liberado do heme pela heme oxigenase fará parte de um conjunto que se encontra no enterócito reunindo-se com o mesmo conjunto do Fe não hêmico. Ou seja, neste momento, não há mais distinção de Fe hêmico e não hêmico, pois todo conteúdo de Fe liberado dentro do enterócito, seja pelo DMT1, seja pela HCP 1 se juntará e unirá e permanecerá disponível para ser exportado pela ferroportina (**FPN**) ou será armazenado dentro da ferritina (Donovan A, 2006).

2.2.3.4 Transferência de ferro na membrana basolateral

2.2.3.4.1 Ferroportina / hefaestina

Ferroportina é uma proteína envolvida na transferência de Fe para a circulação através da membrana basolateral (**Figura 4**). A expressão desta proteína é controlada pelo nível de Fe do corpo e/ou hipóxia, produzindo desta forma diminuição da expressão de FPN na membrana basolateral do enterócito quando na deficiência de ferro.

A FPN contém um IRE em sua posição não traduzível 5' do mRNA. Evidências preliminares também sugerem que a FPN tem papel na recirculação de Fe nos macrófagos e parece ser localizada no meio intracelular e não na membrana da célula. A transferrina sérica tem grande afinidade pela forma Fe III. Assim, o Fe II externalizado deve ser oxidado. Essa oxidação é realizada pela ação de uma ferroxidase denominada hefaestina presente na membrana basolateral (Grotto, 2008)

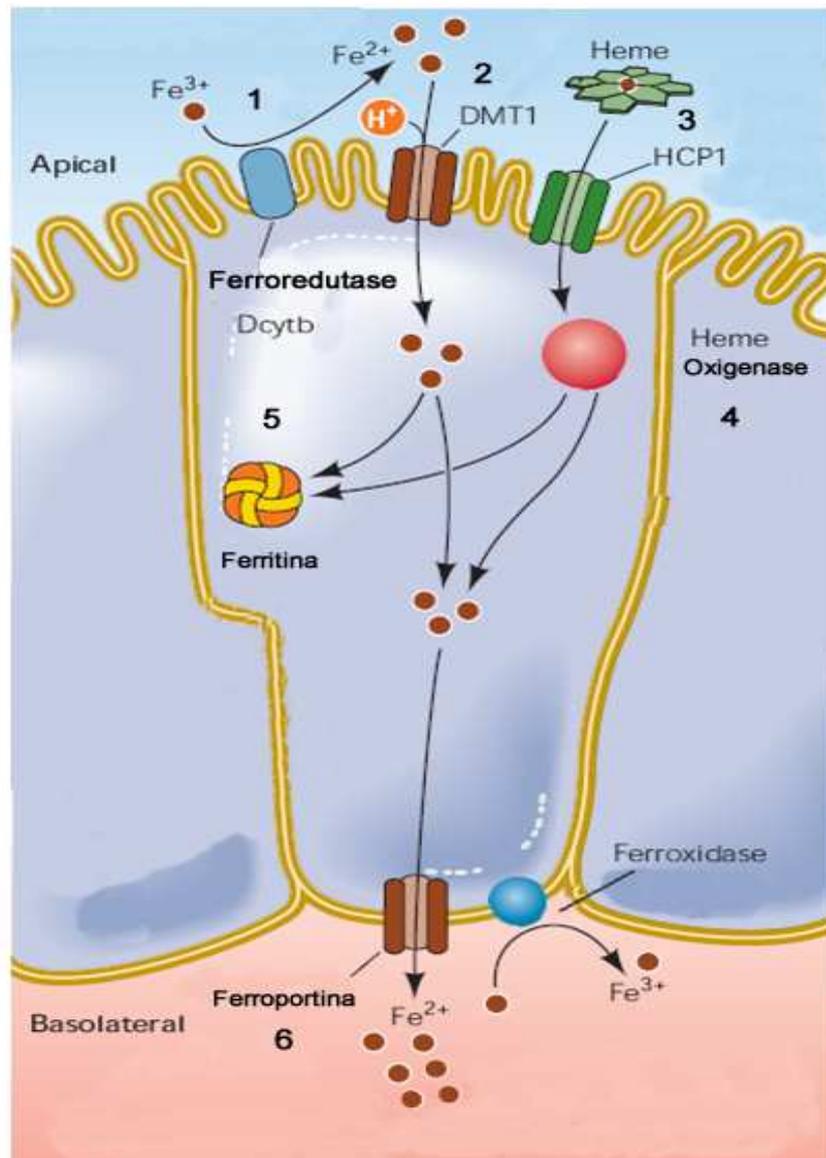


FIGURA 4: 1– Ferro não hêmico ($Fe\ III$) deve ser reduzido para ser posteriormente transportado na membrana apical, na borda em escova; 2 – DMT-1 mediado por próton dependente transporta $Fe\ II$ para dentro do enterócito; 3 – Transportador de ferro hêmico; 4 – Hemoxigenase libera ferro da protoporfirina, 5 – Ferro é utilizado ou estocado dentro da ferritina e mais tarde é perdido quando a mucosa intestinal é descamada; 6 – Ferroportina exporta ferro quando então é oxidado para a forma $Fe\ III$ para ser incorporado dentro transferrina férrica. Adaptado de (Donovan A, 2006).

2.2.4 Transferrina

Após o Fe entrar na circulação, ele deve ser transportado a diversos locais para sua utilização. Quem cumpre esta função no organismo é uma glicoproteína transportadora de Fe no plasma sanguíneo denominada transferrina (**Tf**).

O transporte de Fe de um órgão para outro é efetuado por uma proteína chamada de apotransferrina. Quando a apotransferrina se liga ao Fe III (oxidado pela ação de uma ferroxidase) o complexo ferro-apotransferrina recebe o nome de Tf. A Tf é uma glicoproteína sintetizada no fígado que contém dois sítios de ligação para Fe III. Portanto, é necessário que o Fe, que é exportado pela FPN para o plasma que está na forma ferrosa, seja oxidado para ser transportado pela Tf para as demais partes do organismo nas quais será utilizado (Donovan, et al., 2006).

Esta proteína, além de transportar Fe que atravessou a membrana basolateral do enterócito para a circulação, transporta também Fe secretado dos macrófagos após a degradação dos eritrócitos senescentes (Grotto, 2008).

A Tf possui três funções principais:

- Solubilizar Fe III que é insolúvel em pH neutro;
- Fornecer Fe para células através da interação com receptores de membrana denominados receptores de transferrina (Lieu, et al., 2001).
- Evitar a perda de ferro nos rins por filtração glomerular.

No plasma a Tf existe sob três formas: (Hentze, et al., 2010)

- Desprovida de Fe (apotransferrina);
- Ligada a um átomo ou íon de Fe (Tf monoférrica);
- Ligada a dois átomos de Fe (Tf diférrica).

Os receptores de transferrina (**TfR**) são glicoproteínas diméricas transmembrana ligadas à membrana por meio de pontes dissulfeto. São provavelmente expressados

em todas as células. Os TfR que estão presentes nas membranas das células não têm contato direto com o Fe e sim formam um complexo TfR/Tf/Fe (Anderson, 2007).

Estando em pH fisiológico a afinidade do TfR é aumentada preferencialmente para Tf diférrica. Este complexo TfR/Tf/Fe é, então, internalizado por endocitose, formando pequenas vesículas endossomais.

Inicialmente, a Tf se liga aos TfR's, Já dentro do endossoma o Fe é liberado da Tf após acidificação endossomal sendo posteriormente, após ser reduzido para a forma Fe II, transferido para o citoplasma da célula pelo DMT1 (Ponka, 2000; Anderson, 2007) (**Figura 5**).

A apotransferrina livre de Fe, que permanece presa ao receptor à pH 5,5, retorna para a superfície da célula onde em pH 7,4, a apotransferrina é liberada da célula (Anderson, 2007).

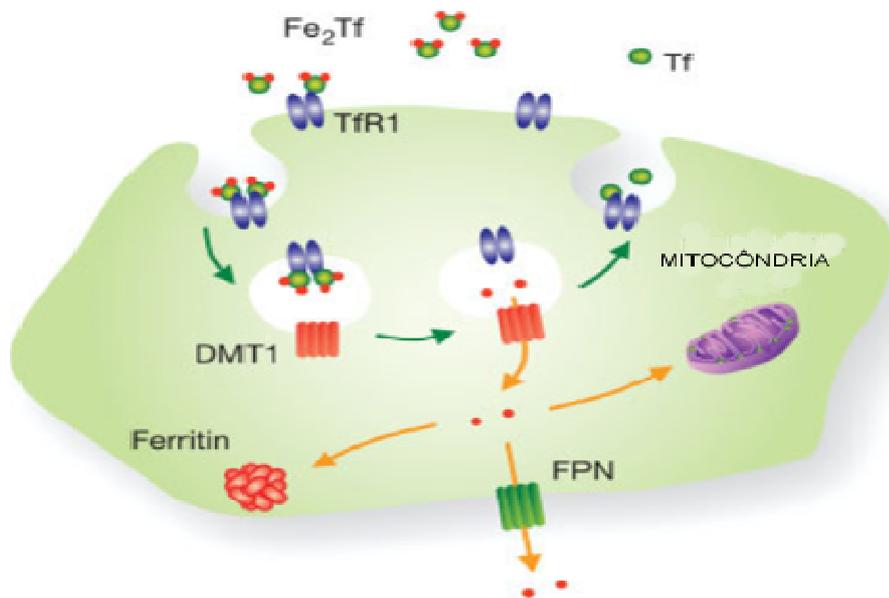


Figura 5: Captação de Fe para dentro da célula - adaptado de (Anderson, 2007) Tf, transferrina; FeTf, transferrina diférrica; TfR1, receptor de transferrina 1; DMT1, transportador de metal divalente 1; FPN, ferroportina.

O TfR é encontrado na forma solúvel no soro humano, sendo o aumento de sua expressão na superfície das células sensível ao estado de Fe do indivíduo (Strube, et

al., 2002). Esse receptor também pode ser controlado na sua transcrição. No entanto, os mecanismos ainda não estão bem caracterizados. Acredita-se que a transcrição do TfR possa ser afetada pela concentração de ácido retinóico (**AR**) (Strube, et al., 2002). As concentrações do TfR são passíveis de ser mensuradas, podendo ser indicadas como instrumento para verificação de DFe, mesmo na ausência de anemia.

2.2.5 Armazenamento (Ferritina)

O Fe que excede as necessidades é armazenado intracelularmente, sob a forma de ferritina, molécula de armazenamento de Fe, e hemossiderina principalmente no sistema macrofágico (reticuloendotelial) do fígado, baço, medula óssea e outros órgãos (Shills, et al., 2003).

A molécula completa de ferritina tem uma casca de proteína (apoferritina) que tem 13 nm de diâmetro externo com uma cavidade interna de 7nm de diâmetro (Arosio, et al., 2002), (**Figura 6 a e b**). A cavidade interna retém um ou mais cristais de oxiidróxido férrico. A concha de ferritina pode comportar até 4500 átomos de Fe por molécula (Ponka, 2000), embora a maioria das moléculas de ferritina contenha 2000 átomos de ferro.

A ferritina dos mamíferos contém duas diferentes subunidades: a High (**H**) e a light (**L**). A ferritina rica em subunidade H é encontrada no coração e cérebro e tem uma alta atividade de ferroxidase enquanto a ferritina rica em subunidade L é encontrada no baço e fígado e podem armazenar mais ferro que a subunidade L (Arosio, et al., 2002).

O Fe II, sendo mais solúvel é incorporado na concha com mais facilidade que a forma Fe III, sendo oxidado e depositado após sua associação com a superfície interna da subunidade.

Uma menor proporção de ferritina dos vertebrados está presente como ferritina sérica, clinicamente importante, por ser um marcador da quantidade de Fe do corpo, embora sua função permaneça ainda obscura (Arosio, et al., 2002).

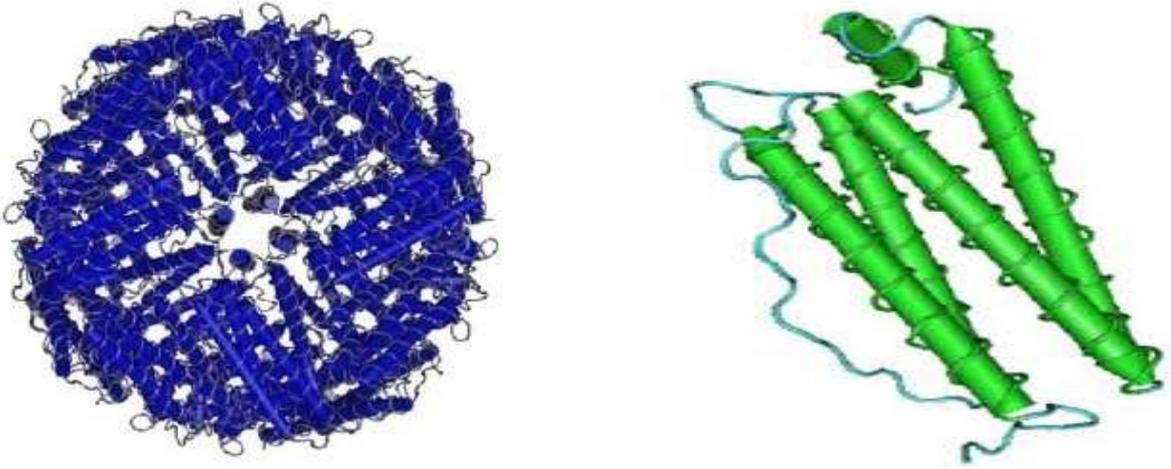


Figura 6 a: Aspecto estrutural da ferritina e sua subunidade (Arosio, et al., 2008)



Figura 6 b: Modelo do aspecto estrutural da ferritina com sua subunidade. U.S National Library of Medicine.

A principal reação *in vitro* de qualquer tipo de ferritina é reagir com Fe II e induzir à sua oxidação e depósito dentro de sua concha (Harrison, et al., 1996). Essa reação é considerada semelhante à que ocorre dentro das células, e é biologicamente importante por duas razões:

Primeiramente a ferritina tem alta capacidade de concentrar Fe em uma forma compacta e segura, podendo ser prontamente utilizado quando necessário. Assim, a ferritina atua como molécula de estoque de Fe evitando a perda deste metal. O seqüestro de Fe II da reação de Fenton é outra característica da ferritina, uma vez que a oxidação do íon Fe II para a forma Fe III, torna-o inócuo para formação de EROs como a H_2O_2 . Desta forma, a ferritina pode ser considerada também um antioxidante (Harrison, et al., 1996).

Uma pequena fração da ferritina circulante no plasma e sua concentração são relacionadas com os depósitos de Fe dos tecidos, particularmente o reticuloendotelial.

Os valores de referência são mais altos em homens do que em mulheres. Na anemia por DFe, a ferritina sérica é muito baixa; seu aumento indica sobrecarga de Fe, liberação excessiva de ferritina de tecidos lesados ou uma resposta de fase aguda, como, por exemplo, na inflamação. Na anemia de doença crônica, a ferritina sérica é normal ou alta (Hoffbrand, et al., 2004).

2.2.6 Regulação celular e sistêmica

Os níveis de ferro no organismo são regulados por dois mecanismos principais, a saber:

- **Intracelular** – que depende da quantidade de Fe que a célula dispõe;
- **Sistêmica** – na qual a hepcidina tem um papel fundamental.

2.2.6.1 Regulação intracelular

A proteína reguladora de ferro (**IRP**) tem importância crucial no controle de expressão de proteínas que estão envolvidos na captação e estoque do Fe.

As IRP's controlam a expressão pós-transcricional das proteínas, ao se ligarem a elementos responsivos ao ferro localizados em regiões não codificadoras do mRNA. Assim, os níveis intracelulares de ferro modulam a síntese de várias proteínas envolvidas no metabolismo do Fe (Hentze, et al., 2010).

Os IRE podem estar localizados nas regiões não codificadoras 3' ou 5'. Quando a IRP se liga ao IRE que está localizado na extremidade 3' não traduzível, a molécula de mRNA torna-se estável, evitando a sua degradação, promovendo a síntese protéica. Entretanto, a ligação do IRP com a IRE localizado na extremidade 5' não traduzível, bloqueia a tradução do mRNA em proteína, diminuindo a síntese protéica (Grotto, 2008).

A formação da IRP acontece na baixa concentração de ferro. Assim quando há excesso de Fe no organismo, a proteína não mais se chama IRP e sim aconitase, enzima que converte o citrato a isocitrato, no ciclo de Krebs (**CK**). Portanto, em

condições de excesso de Fe intracelular, as IRP's mudam sua conformação e não se acoplam ao IRE (Hentze, et al., 2010).

A aconitase, enzima fundamental do CK, como já mencionado acima catalisa a interconversão de citrato a isocitrato. Esse é o primeiro passo no CK, após a condensação de acetil-Coa e oxaloacetato para formar citrato. Assim, a deficiência de aconitase, compromete a produção de energia tornando o CK ineficiente, cuja funcionalidade é extremamente dependente da presença de Fe no organismo (Shills, et al., 2003).

Esta enzima possui um grupamento ferro-enxofre no seu sítio ativo, cuja geometria depende das quantidades de Fe. A aconitase mantém uma estrutura cubóide (**Figura 7**) com 4 átomos de Fe e 4 átomos de enxofre ligados em vértices alternados mantendo dessa forma sua estrutura enzimaticamente ativa.

Na DFe, a estrutura da aconitase perde átomos de Fe em seu centro (**Fe-S**), alterando a conformação tridimensional, (**3Fe – 4S**), transformando-se então na IRP, que pode se ligar ao IRE bloqueando a tradução dos mRNA's da ferritina e da FPN, ou estabilizando as moléculas de mRNA do TfR e do DMT1 (Hentze, et al., 2004).

Com os estoques de Fe normais os grupamentos Fe-S tornam-se 4Fe-4S, transformando a IRP na aconitase, que proporciona aumento dos níveis de NADPH, fornecendo um adicional de agentes redutores que podem ser utilizados para manter um balanço adequado de óxido-redução. Esse mecanismo favorece uma coordenação na regulação dos níveis TfR e síntese de ferritina que respondem inversamente de acordo com a quantidade de Fe. Sobrecarga de Fe produz aumento da síntese de ferritina acompanhado por diminuição da expressão de TfR, enquanto fenômeno oposto é observado quando na deficiência de Fe (Anderson, 2007).

Estudos em fígado de ratos forneceram as primeiras evidências de que a repressão da tradução de ferritina pode ser devida à ligação da IRP, que inicialmente era denominada proteína ligadora do IRE, ao IRE localizado na região não traduzível 5' (Leibold, et al., 1988).

Uma análise da sequência não traduzível do mRNA dos receptores de transferrina demonstrou a existência de 5 IRE's e esses exibem homologia com o IRE presente na região não traduzível do mRNA da ferritina (Casey, 1988).

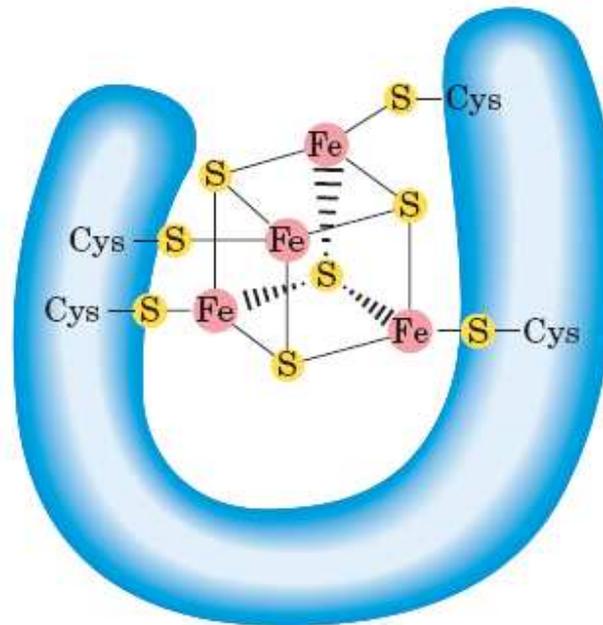


Figura 7: Aconitase com todos os seus vértices preenchidos com ferro (Fe) e enxofre (S) ligados por resíduos de cisteína (Cys) Lenninger adaptado de (MM, 2000)

Os IRE's localizados próximos à região não codificadora 3', quando não ligados a IRP permitem que haja a clivagem do mRNA e a síntese protéica é interrompida. A não ligação do IRP aos IRE's localizados próximos à região 5' permite que o complexo de inicialização da tradução seja ativado, induzindo a síntese protéica (Grotto, 2008; Hentze, et al., 2010).

Proteínas como DMT1 e a FPN podem ser reguladas pelo complexo IRP-IRE, no qual os níveis de mRNA da DMT1 aumentam na deficiência de ferro, sugerindo que os IRE's na região não traduzível 3' podem estabilizar a expressão da DMT1 por mecanismo Fe dependente. Foi observado também um IRE na região não traduzível 5' do mRNA da FPN desta forma a regulação de sua expressão é mediada pelo complexo IRE/IRP regulando a expressão em nível protéico (Grotto, 2008; Donovan, et al., 2006; Roy, et al., 2000).

2.2.6.2 Regulação sistêmica (Hepcidina)

O Fe é eliminado do organismo pelas secreções corporais como a descamação de células intestinais, suor, menstruação. O organismo não possui um mecanismo eficiente para regular a excreção do excesso de Fe que é absorvido ou mesmo acumulado após a reciclagem através dos macrófagos (Grotto, 2008). Nessas condições, é fundamental que exista um controle do equilíbrio de Fe nos locais de absorção, estoque e utilização, quando necessário.

Um candidato que tem emergido como regulador primário da homeostase do Fe atuando na sua regulação sistêmica é o hormônio sintetizado pelo fígado, denominado hepcidina, peptídeo, com ação hormonal, sintetizado no fígado que possui a capacidade de restringir a disponibilidade de Fe, inibindo a absorção e a exportação intestinal desse mineral (Donovan A, 2006).

Este papel hormonal da hepcidina pode ser visualizado em experimentos nos quais os animais deficientes do hormônio hepcidina, desenvolveram sobrecarga de Fe nos tecidos (Grotto, 2008). No entanto, apresentavam depleção de Fe nos macrófagos. Em outros estudos, animais que super expressavam a hepcidina desenvolveram anemia microcítica e hipocrômica (Nicolas G, 2002). Também tem sido demonstrado que a diminuição da concentração de Fe sérica que está presente em resposta de fase aguda está associada com aumento da expressão de hepcidina e que a redução de Fe sérico não ocorre em animais deficientes deste peptídeo (Nicolas, et al., 2002).

O estado do Fe no organismo, deficiência e sobrecarga, regula a expressão de hepcidina. O estado inflamatório também tem um papel fundamental na expressão de hepcidina sendo que a interleucina 6 é apontada como estimulante da expressão deste hormônio (Nemeth E, 2004) induzindo a hipoferremia (Rivera, et al., 2005).

A FPN, localizada na membrana basolateral dos enterócitos e macrófagos, age como receptor da hepcidina. O complexo FPN/hepcidina é internalizado e a FPN é degradada, tendo como resultado final acúmulo de Fe dentro dos enterócitos e macrófagos, interrompendo a liberação de Fe (Nemeth E, 2004). A redução da

passagem do Fe para o plasma resulta na baixa saturação da Tf; e menos Fe é liberado para o desenvolvimento dos eritroblastos (**Figura 8**). Adaptado de (De Domenico I, 2007).

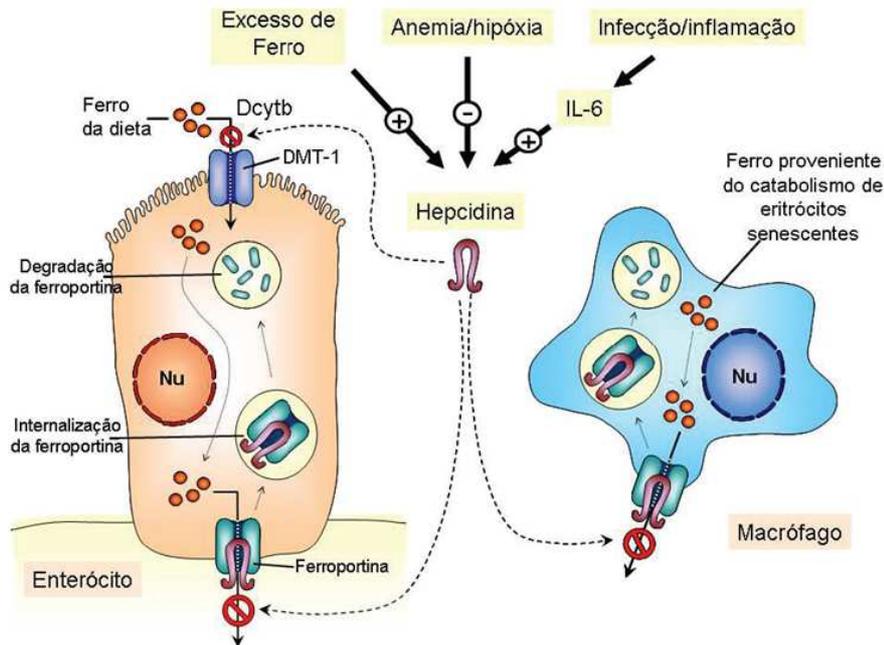


Figura 8: Ação da hepcidina no metabolismo do Fe. Ao formar o complexo com a FPN leva à sua degradação. No enterócito, o Fe não é transportado para o exterior da célula, e a absorção é inibida (figura à esquerda). No macrófago, o mineral fica acumulado no seu interior, diminuindo sua disponibilidade para a eritropoiese (figura à direita), adaptado de (Grotto, 2008).

Algumas proteínas de membranas têm sido implicadas na modulação da expressão de hepcidina *in vivo* (**Hfe, TfR2**) mutações em qualquer uma destas proteínas têm resultado em hemocromatose, desordem comum que se caracteriza por sobrecarga de Fe (Donovan A, 2006).

Hfe é uma proteína do tipo MHC (complexo de histocompatibilidade classe 1) e que está modificada na maioria dos pacientes com hemocromatose (Donovan A, 2006; Feder, et al., 1996).

Em camundongos e humanos deficiência em Hfe tem reduzido a expressão hepática de hepcidina apesar da sobrecarga de Fe. Hfe é expressa nos hepatócitos e também nas células de Kupffer (Donovan A, 2006; Zhang, et al., 2004).

Esta proteína está envolvida na regulação da absorção intestinal do Fe e, por intermédio de sua interação com o TfR, é capaz de detectar o grau de saturação do Tf e, assim, informa para o enterócito sobre a necessidade de aumentar a absorção ou não de Fe na luz do intestino (Donovan A, 2006; Frazer DM, 2003).

Hfe parece formar um complexo com TfR sugerindo a hipótese de que fatores solúveis como Tf diférrica (pelo qual compete com Hfe pelo TfR) podem modular a atividade da Hfe e regular um caminho para sinalizar a promoção da expressão de hepcidina (Anderson, 2003).

O receptor de transferrina TfR 2, que é homólogo ao TfR, está alterado em um pequeno grupo de pacientes com desordens genéticas de hemocromatose. Como o Hfe, deficiência no TfR2 atenua a expressão de hepcidina em camundongos e humanos (Cançado, 2009).

Nenhuma anormalidade na eritropoiese foi observada em camundongos e humanos com deficiência no TfR 2, sugerindo que o requerimento do TfR2 para regular a expressão de hepcidina seja intrínseco ao hepatócito não sendo influenciado por anemia e/ou hipóxia (Donovan A, 2006).

A Tf diférrica parece estar envolvida na regulação da expressão da hepcidina. Essa molécula compete com Hfe pela ligação com o TfR 1 presente na superfície celular dos hepatócitos. Esse modelo de regulação proposto pode ser visualizado pela (**Figura 9**), na qual altos níveis de concentração de Tf diférrica se ligaria com maior afinidade ao TfR 1 (Anderson, 2003).

Nesta situação, os níveis de Hfe livre aumentariam induzindo a expressão de hepcidina no núcleo dos hepatócitos. Quando os níveis de Tf diférrica caem, os TfR 1's ficam mais disponíveis, reduzindo os níveis de Hfe livres, o que levaria a sinalização para redução da expressão de hepcidina, promovendo desta maneira maior absorção de Fe pelo enterócito na luz intestinal e aumentando a exportação deste pela FPN na membrana basolateral (Frazer DM, 2003).

Situações em que ocorrem alterações no gene do TfR 2, que como dito acima, se liga a Hfe na superfície celular, levam ao fenótipo de hemecromatose, em que a expressão da hepcidina está diminuída ou não responsiva ao excesso de Fe absorvido da dieta (Ganz T, 2006).

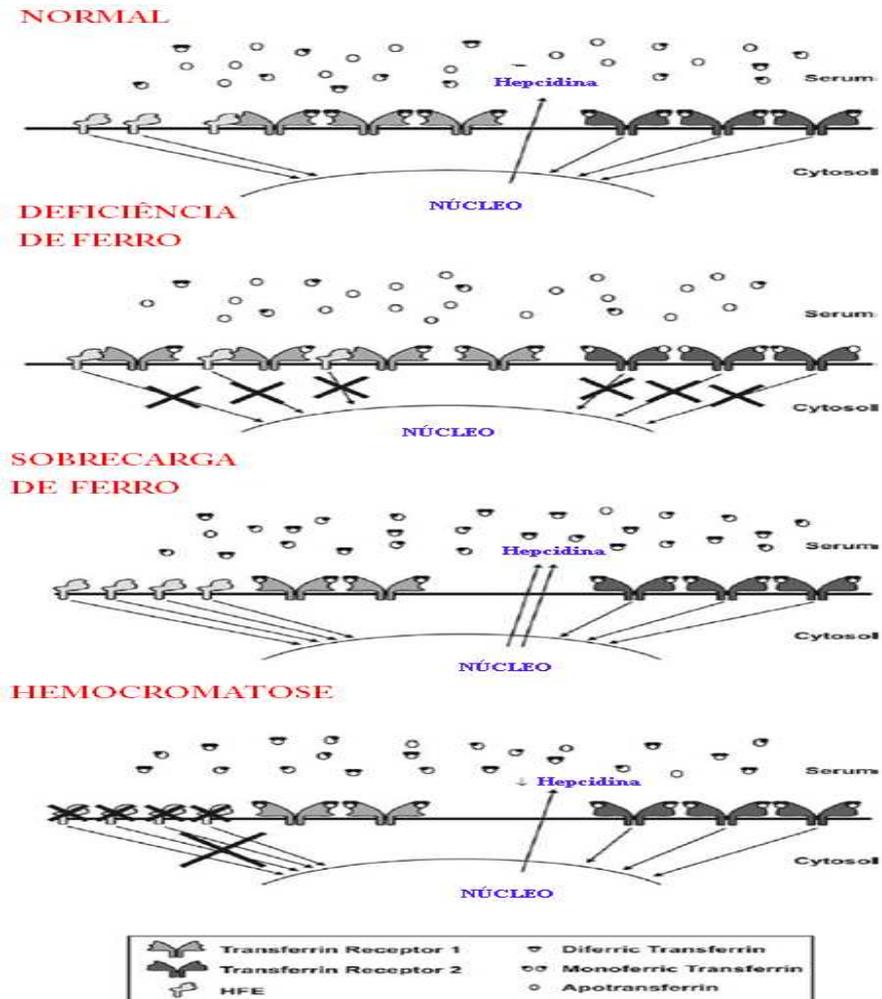


Figura 9: Modelo de regulação da expressão de hepcidina.

2.2.7 Eritropoiese

A eritropoiese é um fenômeno dinâmico, no qual diversas fases se realizam graças à síntese de DNA, mecanismos de mitose, síntese de Hb com a incorporação do Fe, perda do núcleo e organelas, tendo como produto final o glóbulo vermelho, anucleado, com reservas energéticas para uma vida média útil e funcional de 120 dias.

Na medula óssea, a eritropoiese normalmente se faz pela diferenciação da célula tronco hematopoiéticas, que é definida como uma célula com grande capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula, em célula da linhagem eritrocitária – proeritroblasto – que pela ação de fatores maturativos se diferencia nas seguintes células: eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilo, eritroblasto ortocromático e reticulócito, que é liberado para a circulação sanguínea periférica. De 24 a 48 horas após perder o seu retículo, passa a ter o nome de eritrócito, hemácia ou glóbulo vermelho (Grotto, 2003).

Diariamente são produzidos em torno de 10^{12} novos eritrócitos por meio do processo complexo e finamente regulado da eritropoiese, a qual passa da célula tronco pelas células progenitoras, unidade formadora de colônia de granulócito eritróide, monócito e megacariócito (**CFU_{GEMM}**), unidade eritróide de formação explosiva (**BFUe**) e eritróide CFU (**CFUe**) até o primeiro precursor reconhecível de eritrócito na medula óssea, o pronormoblasto que por meio de várias divisões celulares, origina uma série de normoblastos progressivamente menores em cujo citoplasma a quantidade de Hb é crescente (Hoffbrand, et al., 2004).

O núcleo finalmente é expelido do normoblasto dentro da medula óssea, resultando um estágio de reticulócito que ainda contém RNA ribossômico e é capaz de sintetizar hemoglobina. Essa célula é um pouco maior que o eritrócito maduro, fica de um a dois dias na medula óssea e também circula no sangue periférico durante período idêntico de dias, antes de amadurecer, sobretudo no baço, quando o RNA é totalmente perdido. Surge deste modo, o eritrócito maduro, disco bicôncavo sem núcleo com coloração rósea. O contato estreito com os tecidos e, portanto, o sucesso das trocas gasosas é favorecido pela morfologia dos eritrócitos, que apresentam $8\mu\text{m}$ de diâmetro, sendo capazes de passar rapidamente através da microcirculação, cujo diâmetro é $3,5\mu\text{m}$, mantendo o equilíbrio osmótico, apesar da alta concentração de Hb na célula (Hoffbrand, et al., 2004). A destruição dos eritrócitos usualmente ocorre depois de uma sobrevivência média de 120 dias, quando as células são removidas extravascularmente

pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial (**SRE**), em especial na medula óssea, mas também no fígado e no baço (Papanikolaou, et al., 2005).

Os eritrócitos não têm núcleo e seu metabolismo deteriora gradativamente à medida que as enzimas são degradadas e não repostas, tornando as células inviáveis. O catabolismo do heme dos eritrócitos libera Fe para recirculação via Tf plasmática para os eritroblastos da medula óssea e protoporfirina, a qual é transformada em bilirrubina. O heme é clivado pela ação da heme oxigenase com a formação de biliverdina que posteriormente é convertida em bilirrubina (Lolascon A, 2009).

Na circulação a bilirrubina se liga à albumina sendo posteriormente captada pelo fígado e conjugada, tornando-a, deste modo, hidrossolúvel (Floch, et al., 2007). Após, essa circula no fígado, onde é conjugada com glucuronídeos excretados no intestino via bile e convertida em estercobilinogênio e estercobilina (excretado nas fezes) (Hoffbrand, et al., 2004).

2.2.7.1 Síntese de hemoglobina

A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigênio para os tecidos e de dióxido de carbono para os pulmões. Para executar essa troca gasosa, eles contêm a proteína especializada denominada Hemoglobina (Lolascon A, 2009).

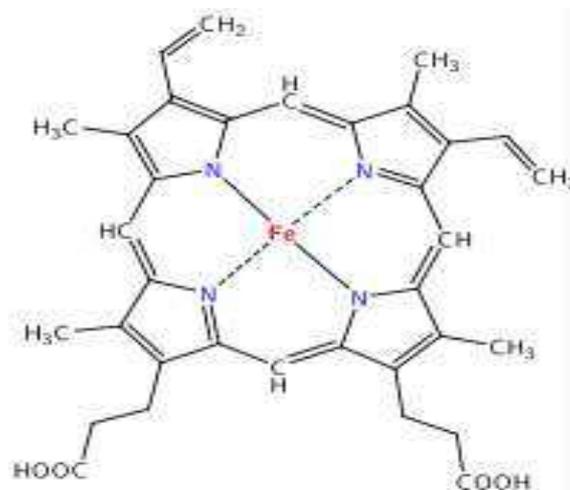
A molécula de Hb (**Figura 10 b**) é um tetrâmero de quatro cadeias de globina com seu próprio núcleo heme agrupado num “bolso”. A globina da Hb é uma cadeia de aminoácidos, arranjados em forma de hélice e dobrada sobre si mesma. Desta forma, no seu interior se encontra o heme formado pela protoporfirina e pelo átomo de Fe no estado reduzido (Fe II), protegido do meio externo (Grotto, 2010).

As globinas se acondicionam reversivelmente, a molécula de 2,3 difosfoglicerato, que modula a afinidade da Hb pelo oxigênio, ou seja, o oxigênio e 2,3 difosfoglicerato competem pelo mesmo sítio ativo da molécula de Hb (Mulquiney, 1999, Hoffbrand, et al., 2004).

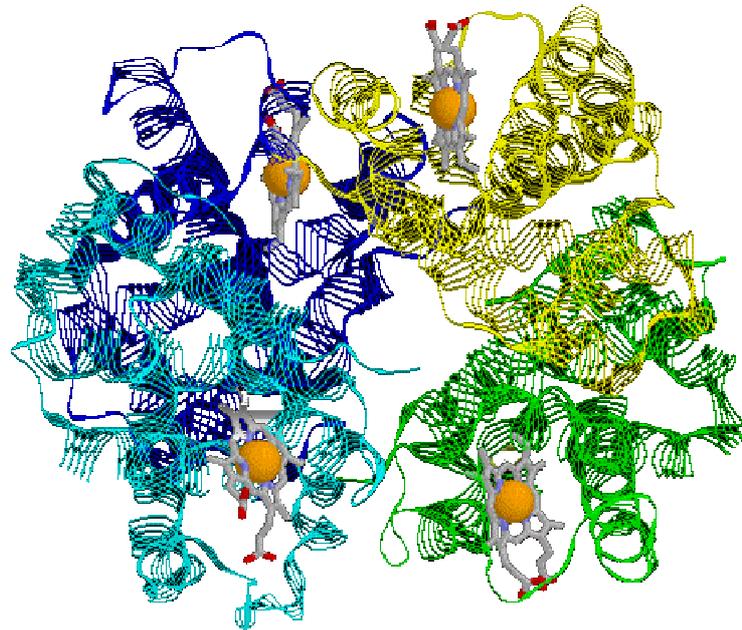
A síntese de heme na Hb se dá principalmente nas mitocôndrias, por meio de uma série de reações bioquímicas que começam na condensação de glicina e de

succinil - coenzima A por ação da ácido-aminolevulínico-sintetase. Finalmente, a porfirina se combina com ferro no estado ferroso para formar o heme, que se ajusta com a cadeia de globina feita nos polirribossomos (Grotto, 2010).

O heme é sintetizado em todas as células do organismo do mesmo modo que é formado pelo eritroblasto. A estrutura química do heme é a de uma porfirina com um átomo de Fe ligado aos nitrogênios de quatro anéis pirrólicos, os quais são unidos entre si (**Figura 10 a**). A síntese do heme é realizada principalmente na mitocôndria do eritroblasto, e algumas fases ocorrem no citoplasma (Verrastro, 1998).



(a)



(b)

Figura 10 a, b: (a) Representação da estrutura química do heme, (b) Representação da molécula de hemoglobina. Adaptado <http://themedicalbiochemistrypage.org/heme-porphyrin.html>.

2.2.7.1.1 Funções da hemoglobina

Os eritrócitos no sangue arterial sistêmico transportam oxigênio dos pulmões aos tecidos e voltam no sangue venoso, com dióxido de carbono para os pulmões. Quando o sangue pobre em oxigênio passa pelos pulmões, este recebe o oxigênio que se difundiu pelos pulmões. Nos eritrócitos o oxigênio, oxigena, mas não oxida a hemoglobina. Assim, o Fe permanece no estado reduzido, devido a uma alteração da conformação da hemoglobina, que se transforma em oxi-hemoglobina. No entanto, nos capilares dos tecidos, a Hemoglobina fornece o oxigênio e, assim, a Hb nos tecidos irá se encontrar no estado desoxigenado (Schechter, 2008).

À medida que a molécula de Hb carrega e descarrega oxigênio, as cadeias individuais de globina movimentam-se uma sobre a outra, o que facilita a entrada do 2,3 difosfoglicerato, diminuindo a afinidade da Hb pelo oxigênio e promovendo o ingresso deste nos tecidos (Mulquiney, 1999, Hoffbrand, et al., 2004).

2.2.7.2 Índices hematimétricos

A Hb é medida em gramas por decilitro (g/dL) e representa a quantidade da proteína por unidade de volume do sangue. O hematócrito representa a proporção dos eritrócitos no total do sangue medido em porcentagem (%). Com o resultado obtido do número de eritrócitos, Hb e hematócrito, é possível calcular outras médias ou índices, chamados hematimétricos, tais como o volume corpuscular médio (**VCM**), a hemoglobina corpuscular média (**HCM**) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (**CHCM**) (Rosenfeld, 2007).

O VCM é a relação que existe entre o volume globular obtido do Hct e o número de eritrócitos. O VCM é importante para definir se a anemia é predominante dos eritrócitos de pequeno volume, isto é, microcítica ou de grande volume macrocítica. (Rosenfeld, 2007).

O HCM se refere à quantidade de hemoglobina dentro de cada eritrócito e fornece a informação do tipo de anemia: hipocrômica, com pouca hemoglobina, ou hiperocrômica, com muita Hb dentro de cada eritrócito. A HCM é dada pela relação entre o valor da Hb obtida em gramas por 100dL e a contagem dos eritrócitos. O resultado é em picogramas (pg). A CHCM é calculada pela relação entre a Hb obtida em g/100 dL e o volume globular que retrata a quantidade de Hb dentro de um determinado volume de sangue. O resultado obtido é dado em porcentagem (Verrastro, 1998).

2.2.7.3 Anemia (anemia da doença crônica)

A anemia da doença crônica (**ADC**) é a causa mais frequente de anemia em pacientes hospitalizados com idade superior a 65 anos, sendo a segunda maior causa de anemia perdendo apenas para anemia por DFe (Weiss, 1999).

A principal porta de entrada do Fe para dentro do corpo é através da dieta, por meio da qual o Fe hêmico e o não hêmico podem ser absorvidos no duodeno para dentro do enterócito. No entanto, o principal sistema celular responsável para

fornecimento adequado de Fe para a eritropoiese é o sistema monócito/macrófago (Grotto, 2008).

A necessidade de Fe para cumprir todas as funções do organismo inclusive a eritropoiese é estimada entre 20 a 30mg. Todavia, somente 10% dessa quantidade são provenientes da absorção no duodeno por transportadores específicos (Grotto, 2010).

A maior quantidade deste mineral tem origem na reciclagem do metal dos eritrócitos que foram submetidos à fagocitose. Esta função dos macrófagos mantém a homeostase do Fe no organismo. Os macrófagos também atuam na regulação da homeostase do Fe durante processo inflamatório, levando à ADC. A participação central dos monócitos e macrófagos na patogênese da ADC tem sido reportada desde os anos 80 (Fillet, et al., 1989). Uma das explicações para essa resposta medular inadequada está diretamente relacionada à ativação dos macrófagos e à liberação de citocinas inflamatórias, que atuam inibindo a proliferação dos precursores eritrocitários e, portanto, inibindo a eritropoiese (Cançado, 2002).

Tanto na anemia ferropriva quanto na ADC os níveis plasmáticos de Fe estão baixos. Entretanto, na anemia ferropriva o nível de Fe dentro dos macrófagos também estão diminuídos e na ADC os níveis plasmáticos deste elemento estão parcialmente aumentados sem, contudo, haver liberação para o plasma (Lee, 1998).

O Fe dentro dos macrófagos catalisa a formação de radicais hidroxil, que tem papel fundamental na defesa imune contra patógenos invasores.

A ADC, por vezes denominada de anemia da inflamação ou funcional, possui três mecanismos propostos para explicar sua patofisiologia (Cançado, 2002).

- A inflamação pode levar à retenção do Fe dentro das células do sistema reticulo endotelial, levando à diminuição da liberação deste metal para eritropoiese;
- Citocinas e proteínas de fase aguda que afetam negativamente a proliferação e diferenciação das células progenitoras eritróides;
- Redução da atividade biológica da EPO contribui para o desenvolvimento da ADC, sendo o nível da EPO inadequado dependendo do grau da anemia;

A ADC é anemia hipoproliferativa na qual a hipoferremia está presente apesar de adequada quantidade de Fe no estoque retículoendotelial, sendo, geralmente, normocítica e normocrômica (Cançado, 2002).

A mobilização de Fe dos estoques do sistema retículoendotelial é diminuída durante a ADC e isto implica resposta do organismo contra a infecção (Kluger & Rothenburg, 1979). Mobilizações diminuídas de Fe do fígado e do baço também são visualizadas quando da ocorrência de DVA, não estando completamente entendido se essa alteração na mobilização está relacionada com a alteração daquela que ocorre durante a infecção (Thurnham, 1993; Bloem, 1995).

A deficiência de vitamina A parece que está envolvida na patogênese da anemia por diversos mecanismos biológicos, uma vez que esta vitamina está relacionada ao crescimento e diferenciação das células dos eritrócitos progenitores e ainda, ativa a resposta imunológica contra a infecção, reduzindo, deste modo, a anemia da infecção, liberando os estoques de ferro para os tecidos. Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência da anemia é alta nas populações afetadas pela DVA em países em desenvolvimento (Semba, et al., 2002).

O AR parece estar envolvido na modulação da produção da EPO, hormônio sintetizado pelos rins, envolvido na eritropoiese, uma vez que este contém elementos responsivos ao AR. Estudo realizado por (Okano, et al., 1994), em ratos depletados de VA, verificou que, após administração intragástrica de todo-trans-ácido retinóico, aqueles apresentaram aumento da concentração sérica de EPO após 4 horas da administração, sugerindo que o AR possa modular a produção de EPO.

2.3. Vitamina A

Um foco da atenção em saúde Pública é investigar determinados micronutrientes nos seres humanos, de modo a averiguar o quanto a deficiência desses pode ter efeitos prejudiciais à saúde do homem. Entre os muitos micronutrientes a VA aparece com importância fundamental, devendo ter atenção especial devido à alta prevalência de sua deficiência em países em desenvolvimento, bem como os efeitos deletérios no organismo dos indivíduos acometidos por esta deficiência (Beitune, et al., 2003).

Relatos sobre a capacidade do fígado, fonte rica em VA, agir como uma fonte alimentar capaz de amenizar problemas de cegueira noturna (**CN**) já haviam sido descritos por médicos egípcios e gregos na antiguidade (Wolf, 1996).

Em 1881, foi relatado pela 1ª vez que a DVA poderia prejudicar o crescimento de animais, quando os pesquisadores relacionaram que a morte de ratos que foram submetidos a uma dieta à base de caseína pura, gordura, sucrose e minerais, era devido a deficiência desta vitamina. Todavia, os animais que receberam somente leite apresentaram crescimento considerado normal (Wolf, 1996). Esse fato levou outros pesquisadores a postularem que era necessário estar presente na dieta o que chamaram de “fatores mínimos de qualidade”, para manter um crescimento normal e a sobrevivência dos animais (Hopkins, 1906; citado por Wolf, 1996).

Estudos científicos, publicados desde 1913, relatavam que componentes da manteiga, dos ovos ou do óleo de fígado de bacalhau favoreciam o crescimento e diferenciação celular dos tecidos de ratos alimentados com rações com banha de porco ou óleo de oliva como únicas fontes de gordura (Shills, et al., 2003).

O ácido retinóico (**AR**), produto final da oxidação do retinol, tem se apresentado como o metabólito mais potente da VA expressando todas as funções biológicas dessa vitamina com exceção da atividade da forma retinal no processo da visão (Shills, et al., 2003). O AR também age na expressão gênica de vários genes por meio da interação com receptores nucleares que se ligam a porções específicas presentes nos genes de algumas proteínas alterando a expressão destas.

A DVA e, por consequência, a hipovitaminose A, grave doença carencial, pode levar à xeroftalmia que representa um grupo de sinais e sintomas de todas as lesões oftalmológicas decorrentes da DVA (Souza, et al., 1988) e embora possa ser prevenida, a hipovitaminose A ainda é um problema de saúde pública em vários países em desenvolvimento (Souza, et al., 2002), sendo um indicador utilizado na determinação de morbidade e mortalidade da população infantil destes países (Souza, et al., 2002).

Castro (1980), em seu clássico livro “Geografia da fome”, relata a questão da fome oculta, caracterizada pela carência de micronutrientes, dentre eles a VA, como problema que assolava o País já no início do século passado, no qual o pesquisador aponta como sendo consequência de falta de alimentação adequada.

Dentre as manifestações oculares a CN também denominada nictalopia, aparece como o primeiro marcador da DVA, caracterizando-se como a dificuldade de enxergar durante a noite. A relação entre a CN e a VA foi descrita pela primeira vez em 1925, quando os pesquisadores observaram que ratos submetidos à DVA se adaptavam mais lentamente ao ambiente com luz escura do que os animais do grupo controle (Wolf, 1996).

O prolongamento da DVA leva a um estágio denominado de mancha de Bitot, que se caracteriza por uma grande quantidade de células epeliais descamadas, podendo prosseguir com ressecamento da córnea e formação de úlceras que aumentam de tamanho e profundidade até as córneas serem perfuradas, (Wolf, 1996), sendo essa condição denominada querotomalácia, sendo passível de evoluir paramanifestações microbianas agravadoras do quadro até a cegueira irreversível.

A DVA tem se caracterizado como problema de saúde pública em 60 a 78 países em desenvolvimento o que afeta milhões de indivíduos em todo mundo e estima-se que até 253 milhões de crianças em idade pré-escolar sofrem dessa deficiência (Semba, et al., 2002).

A relação entre a DVA e a mortalidade de crianças tem sido relatada desde 1930, quando a suplementação com VA diminuiu significativamente a mortalidade entre os pacientes com sarampo (Fawzi, 1993).

Em um estudo realizado em áreas endêmicas de DVA comprovou que a suplementação em crianças a partir de 06 meses de idade reduziu consideravelmente a morbidade e a mortalidade (Idindili, et al., 2007), (Fawzi, et al., 1993). Estudos de intervenção, nos quais crianças menores de 6 anos de idade que viviam em áreas onde a DVA nas formas clínicas e subclínicas estavam presentes, confirmaram que a suplementação reduziu a morbi-mortalidade do grupo de crianças suplementadas em comparação com o grupo controle (Prado, 1995; Barreto, 1994).

Mulheres grávidas e em idade gestacional e crianças em idade pré-escolar também são consideradas um grupo de risco para a DVA (Zimmermann, et al., 2006; Christian P, 2000; Souza, et al., 2002).

A DVA geralmente apresenta-se relacionada com carências nutricionais como, por exemplo, desnutrição energética proteica. Entretanto, outros fatores, que não só a

baixa ingestão de alimentos fontes desta vitamina, também pode levar a essa deficiência tais como, a carência de lipídeos na alimentação afetando a absorção, o desmame precoce (Prado, 1995), assim como as parasitoses, que dificultam a absorção dos retinóides (Souza, et al., 1988).

A ascaridíase em populações, nas quais a ingestão de VA e seus precursores são reduzidos, contribui de forma importante para a deficiência clínica de VA (Souza, et al., 2002). Desta forma, os países em desenvolvimento onde determinados grupos populacionais vivem em baixa condição sócio econômica e nos quais não existe adequado programa social para combater a alta prevalência de infestação parasitária são locais propícios para se identificar indivíduos com DVA na forma clínica e subclínica, uma vez que a DVA parece estar relacionada com baixo nível de renda e escolaridade. Assim, pessoas com nível de renda e educacional adequados podem obter dieta mais diversificada tendo como consequência diminuição da prevalência da DVA ou mesmo o não surgimento desta (Prado, 1995).

A DVA leva a perturbações na homeostase do Fe, e a suplementação com retinóides pode reverter esta perturbação, por meio de um mecanismo que envolve a IRP. Alguns autores têm reportado que o ácido retinóico diminui a atividade do mRNA da IRP, alterando, desta forma, a quantidade de proteínas envolvidas nessa homeostase do Fe (Schroeder, et al., 2007). Neste sentido, parece que a IRP se apresenta como um elo de ligação entre a VA e a regulação da homeostase do Fe. O potencial antioxidante da VA poderia ser devido a esse efeito modulador da vitamina sobre a homeostase de ferro no organismo (Arruda, et al., 2009).

Trabalhos realizados em nosso laboratório sugerem que a VA mantém a homeostase do Fe por meio da modulação, direta ou indireta da expressão gênica da hepcidina. O aumento da expressão da hepcidina hepática e o acúmulo de Fe nos tecidos observado em animais DVA, sugerem que as mudanças no estado oxidativo desses espécimes possam estar relacionadas ao acúmulo de ferro desencadeado pela hepcidina. Estes resultados corroboram com o papel da VA na modulação da homeostase do Fe (Arruda, et al., 2009).

Dito isto, fica claro que entender os mecanismos de como esta vitamina age no organismo (absorção, transporte, metabolismo) bem como sua interação com outros

micronutrientes como o Fe, é fundamental para implementar estratégias de suplementação, bem como reconhecer os problemas de sua deficiência e excesso.

2.3.1 Caracterização molecular

Uma série de desordens descritas em modelos animais com DVA demonstrava prejudicar o crescimento, reprodução e o tecido epitelial, diminuindo também a resistência a infecção, sendo aliviadas com o consumo de fontes de VA de origem animal (VA pré-formada) e plantas (carotenóides) (Underood, 2004). Esses resultados já apontavam que a VA presente na dieta tinha um papel fundamental na saúde do indivíduo bem como sua deficiência ou mesmo ausência poderia ter um efeito maléfico para o indivíduo e toda a população.

As principais fontes de VA na dieta são as frutas e os vegetais, pró-vitamina A (**pro-VA**) e os ésteres de retinil (**ER**) encontrados em alimentos de origem animal. Em humanos, os carotenóides absorvidos da dieta são clivados a retinal e posteriormente são reduzidos a retinol ou então são absorvidos de forma intacta. Diferente dos carotenóides, os ER dietéticos são hidrolisados no lúmen intestinal e o retinol livre é transportado para dentro do enterócito (Harrison, et al., 2001).

A VA pode ser obtida da dieta através de fontes de origem animal (VA pré-formada) estando presente na forma de éster de retinil (**ER**) que é uma molécula de retinol esterificada a uma molécula de ácido graxo pelo seu grupamento hidroxila OH. Fontes de VA pré-formada podem ser encontradas em fígado, ovos, manteiga.

Embora os vegetais não contenham propriamente VA, alguns são ricos em carotenóides com atividade pró-VA (β , α e γ -carotenos, criptoxantina) sendo que o β -caroteno apresenta maior atividade de VA. Estes carotenóides são convertidos no organismo em VA. A conversão dos carotenóides em VA ocorre no fígado, por meio da ação de enzimas originando o retinal, que é, posteriormente, reduzido a retinol (Underood, 2004), podendo ser exportado para outros tecidos, via ligação com proteína transportadora de retinol ou serem armazenados na forma de retinil, nas células estreladas do fígado. Assim, a identificação das enzimas envolvidas na clivagem do

beta-caroteno (pró-vitamina A) foi fundamental para o entendimento da formação da VA através de fontes de carotenóides (Underood, 2004).

Embora o termo VA tenha sido utilizado para referenciar compostos químicos específicos, como o retinol e seus ésteres, é mais empregado como termo genérico (Souza, et al., 2002), ou seja, refere-se a compostos que exibem as propriedades biológicas do retinol, que contenham um anel β -ionona e possuam uma cadeia de hidrocarbonetos com duplas ligações alternadas, com um grupo funcional no final da cadeia que demonstra propriedades biológicas do retinol (**figura 11**) (Musib, 2000).



Figura 11: Estrutura química da VA. Adaptado de (Musib, 2000).

2.3.1.1 Retinol

A molécula de retinol contém um anel β -ionona e uma cadeia lateral com duplas ligações conjugadas e uma hidroxila OH no carbono 15 (**C-15**) (**Figura 12**) (Senoo, 2004). O Retinol é transportado no plasma por proteínas específicas, onde após serem encaminhados para o fígado são reesterificados a ER e armazenados nas células estreladas hepáticas para serem utilizados quando necessário (Senoo, 2004).

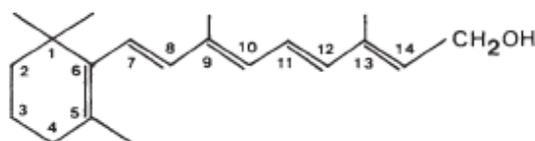


Figura 12: Estrutura do todo-trans-retinol. Adaptado de (Senoo, 2004).

2.3.1.2 Éster de retinil

A VA pré-formada pode ser encontrada em alimentos de origem animal na forma de ER (**Figura 13**) que representa a molécula de retinol esterificada com ácidos graxos. Os ER's presentes na dieta são hidrolisados por hidrolases de ester de retinil (**HER**) iniciando, deste modo, o processo de absorção desta molécula dentro do lúmen intestinal (Piantedosi, et al.).

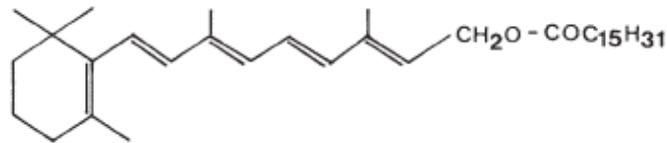


Figura 13: Estrutura do palmitato de retinil, principal forma de retinil encontrado dentro das células estreladas. Adaptado de (Senoo, 2004).

2.3.1.3 Retinal

Na retina o 11-cis-retinal (**Figura 14**) se liga a proteína opsina formando pigmentos visuais nos bastonetes (rodopsinas), esses são sensíveis à luz e conseguem detectar baixos níveis de luminosidade, por meio da excitação da molécula de rodopsina, resultando na isomerização do 11-cis-retinal, que é transformado em todo-trans-retinal, dando início a uma cascata de eventos responsável pela transdução do sinal intracelular. Essa isomerização promove uma diferença de potencial que é transmitida para o cérebro (MM, 2000).

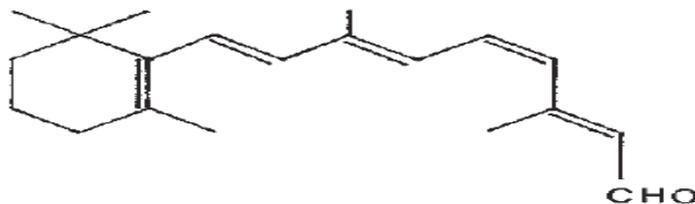


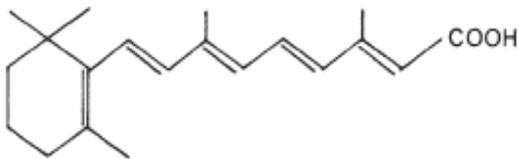
Figura 14: Estrutura do 11-cis-retinal existente na retina e ligado à rodopsina. Adaptado de (Senoo, 2004).

2.3.1.4 Ácido retinóico

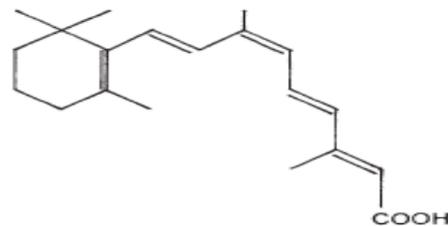
O AR, produto final da oxidação do retinol possui várias isoformas como o todo-trans-ácido retinóico, 9-cis-ácido retinóico e o 13-cis-ácido retinóico (**Figuras 15 a, b, c**), apresentando-se como o metabólico mais potente da VA, expressando todas as funções biológicas desta vitamina com exceção da atividade do retinal na visão (Shills, et al., 2003) sendo naturalmente sintetizado em duas etapas a partir da VA (retinol).

- 1º o retinol é oxidado reversivelmente a retinal;
- Posteriormente o retinal é oxidado a AR de maneira irreversível.

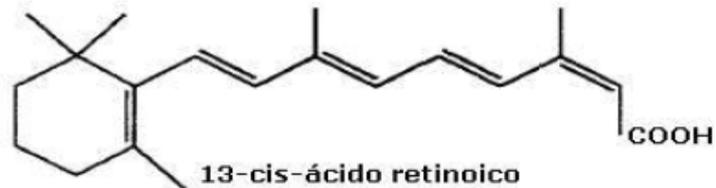
O AR, todo trans ácido retinóico, (**Figura 15 a**) se liga ao receptor nuclear de AR (**RAR**) e o 9-cis-ácido retinóico (**Figura 15b**) se liga com maior especificidade ao receptor nuclear X de AR (**RXR**) (**Figura 16**). Estes dois receptores pertencem a duas famílias de receptores nucleares para AR, que têm efeito na regulação da expressão de um grande número de genes (Ross, 2003). Estas duas famílias de receptores de AR (**RAR e RXR**) expressam subfamílias assim discriminadas (**α , β , γ**). Estes receptores se juntam formando heterodímeros RAR/RXR ou homodímeros RXR/RXR, ligando-se em regiões específicas do DNA denominadas elementos responsivos de ácido retinóico (**RARE**). O RXR pode se ligar também a outros receptores com fatores de transcrição nuclear, podendo esses tipos de interações promíscuas influenciar na sinalização e ativação de diversos tipos de genes (Blomhoff, et al., 1991).



Todo-trans-ácido retinóico (a)



9-cis-ácido retinóico (b)



(c)

Figura 15 a, b, c: todo-trans-ácido retinóico se liga a receptores nucleares para ácido retinóico (RAR α , RAR- β e RAR γ) e 9-cis- ácido retinóico se liga a receptores X (RXR α , RXR β , RXR γ). 13-cis-ácido retinóico pode se ligar ao RAR's. Adaptado (Senoo, 2004).



Figura 16: Interação do ácido retinóico com seus receptores levando a regulação da transcrição. Adaptado de (Ross, 2003).

2.3.1.5 Carotenóides

Aproximadamente 600 carotenóides têm sido isolados e caracterizados e desses, cerca de 10% podem ser convertidos em VA por várias espécies de animais, inclusive a espécie humana (Yeum, et al., 2002).

Após serem consumidos, provenientes dos alimentos, os carotenóides são liberados da matrix e incorporados em micelas compostas de ácidos biliares, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolípidos. Os carotenóides parecem ser absorvidos

pela mucosa do intestino delgado por difusão passiva (Parker RS, 1996; Hollander D, Ruble PE Jr, 1978).

Os carotenóides com atividade pró-vitamina como o β e α -caroteno e criptoxantina são primeiramente clivados a retinal e posteriormente são reduzidos a retinol (**Figura 17**) e posteriormente reduzidos a ER (Parker RS, 1996).

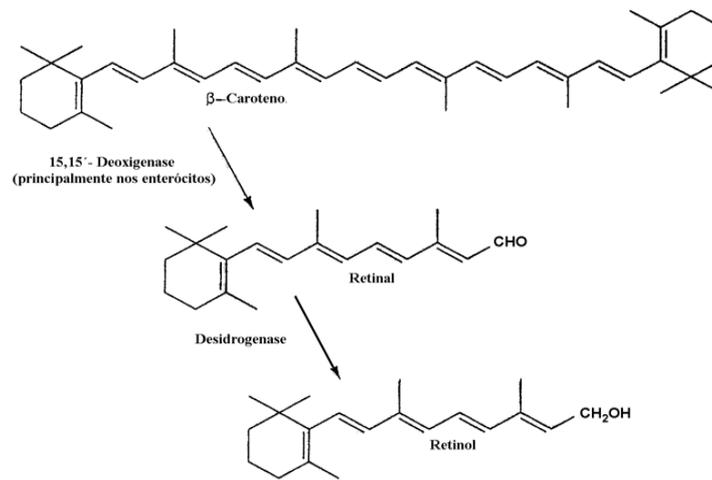


Figura 17: conversão do β - caroteno em retinol.

2.3.2 Metabolismo (digestão e absorção)

A VA é inicialmente processada no intestino. Grande quantidade dessa vitamina entra no intestino sob a forma de ER no núcleo do quilomícron (**QM**), de onde o fígado age depurando a VA. No fígado, a VA ou é armazenada, na forma de retinil, ou é secreta na forma de retinol, ligada a proteínas específicas denominadas, proteína ligante de retinol.

A formação dos quilomícrons é fundamental para a absorção dos ER's, retinol e os carotenóides no lúmen do intestino delgado. Assim, uma deficiência na liberação de sais biliares diminui a absorção da VA (Senoo, 2004). Uma dieta com pouca gordura também influencia negativamente na absorção dessa vitamina (Shills, et al., 2003).

Tanto a VA pré-formada como a pró-VA entram na linfa como retinol esterificado. No entanto, o β -caroteno necessita ser clivado para produzir retinal e posteriormente através da ação de redutases específicas ser reduzido a retinol.

A VA é uma molécula solúvel em solução lipídica orgânica e não pode ser sintetizada endogênamente por humanos. Nessas condições, é nutriente essencial, de modo que é necessário ingeri-la através da alimentação.

Os ER devem ser hidrolisados no lúmen do intestino liberando assim retinol livre que é absorvido pelo o enterócito (**Figura 18**) (Blomhoff, et al., 1991). Por sua vez, os carotenóides necessitam ser clivados para gerar retinal e, posteriormente, ser reduzidos a retinol onde são esterificados a ER (**Figura 18**). Todavia, essa clivagem acontece em nível de enterócito e, nesse passo, os carotenóides são absorvidos intactos no lúmen do intestino onde sofrem a ação das enzimas digestivas (Harrison, et al., 2001; Weng, et al., 1999).

A liberação dos carotenóides da matriz alimentar aumenta sua biodisponibilidade. Desse modo, a mastigação e a ação de enzimas envolvidas no processo da digestão facilitam a absorção dos carotenóides. Do mesmo modo, a ação dos sais biliares, promovendo a emulsificação da VA presente na gordura, favorece a formação de micelas de modo que aumenta a superfície de contato para a ação das enzimas digestivas.

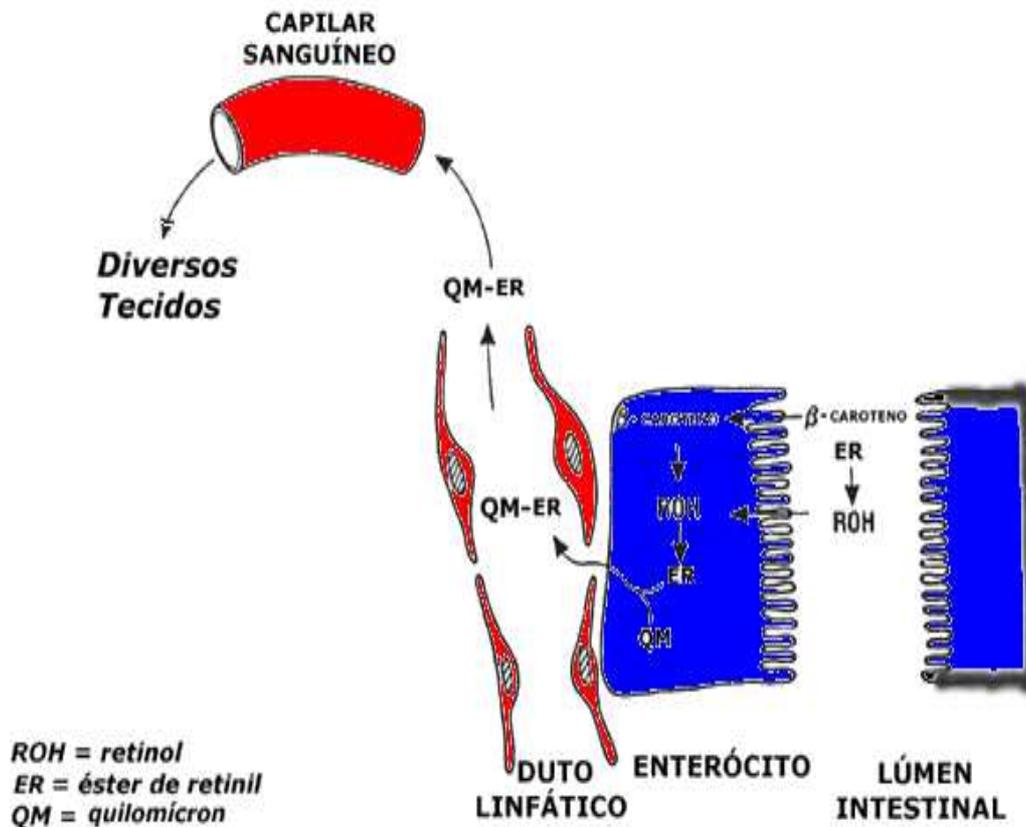


Figura 18: Absorção do β -caroteno e do retinol pelos enterócitos. O β -caroteno absorvido pode ser clivado a retinol. O retinol é esterificado a éster de retinil, sendo incorporado aos quilomícrons e transportado por meio da corrente sanguínea para os diversos tecidos do organismo. Adaptado de (Senoo, 2004).

Os ER's provenientes das fontes de pré-VA (alimentos de origem animal) são a principal forma de VA presente naqueles alimentos, sendo também a mais importante maneira de armazenamento dessa vitamina nos tecidos. Estes esterese devem ser hidrolisados pela ação de hidrolases de ésteres de retinil (**HER's**), presentes na borda em escova do intestino, liberando assim o retinol de modo que os ER existentes na dieta são convertidos em retinol no lúmen do intestino (Blomhoff, et al., 1990; Senoo, 2004).

No enterócito o retinal proveniente da clivagem dos carotenóides é reduzido a retinol e posteriormente é esterificado, assim como o ER proveniente da VA pré-formada é hidrolisado, liberando o retinol que, agora no enterócito, é novamente esterificado e acondicionado no QM sendo lançados para a circulação sanguínea (Senoo, 2004).

É importante ressaltar que a esterificação do retinol presente no enterócito é conseguida através de duas enzimas específicas: Lecitina: retinol aciltransferase (**LRAT**), que esterifica retinol em concentrações fisiológicas ligadas à proteína celular ligante de retinol II (**CRBP II**) (Shills, et al., 2003), e Acil-coa-retinol aciltransferase (**ARAT**), que esterifica retinol livre, ou seja, quando este não se encontra ligado a CRBP II.

Um dos papéis fisiológicos das proteínas celulares ligadoras de retinol é promover o transporte do retinol até as enzimas que estão envolvidas no processo de oxidação da VA e no caso específico da CRBP II, reesterificar o retinol a ER (Piantedosi, et al.). A CRBP II pode ligar-se a ambos, retinol e retinaldeído, dentro do enterócito sendo que o retinol ligado a CRBP II é um ótimo substrato para LRAT.

Após o retinol ser esterificado no enterócito ele é incorporado, agora como ER nos QM. Os QM (**Figura 19**) possuem uma apolipoproteína que ativa a lipase lipoproteica nos capilares do tecido adiposo, cardíaco, músculo esquelético e glândula mamária em lactação permitindo a liberação dos ácidos graxos livres, retinóides livres e carotenóides para estes tecidos (MM, 2000).

Após sofrerem a ação da lipase lipoprotéica, os QM remanescentes, sem a maior parte dos triacilgliceróis, mas ainda contendo colesterol, apolipoproteínas e ER's, viajam pelo sangue até o fígado, permanecendo presentes nos QM mesmo após a lipólise efetuada pela lipase lipoprotéica e juntos com os QM remanescentes, são depurados pelo o fígado (Rosales et al., 1999).

A VA que se encontra presente no interior do QM na forma de ER é levada para células estreladas do fígado (**Figura 20 a e b**), principal local de armazenamento (Matsuura, et al., 1997).

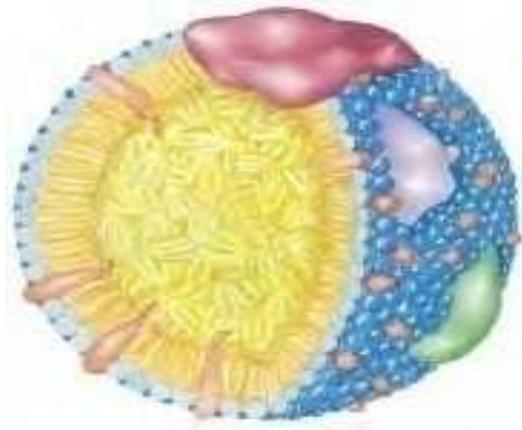


Figura 19: Quilomicron (MM, 2000)

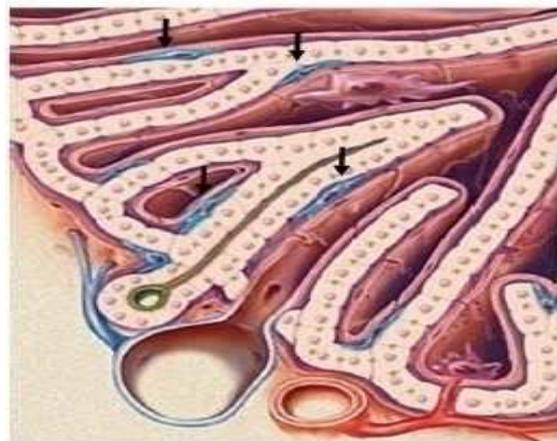


Figura 20 (a)



Figura 20 (b)

Figura 20 a e b: Morfologia da célula estrelada (local de armazenamento ER) em um fígado normal (Friedman, et al., 2002).

- a:** Diagrama de sinusóide hepática demonstrando a orientação de células estreladas (indicado com uma seta) dentro da arquitetura sinusoidal.
- b:** Alta resolução das células estreladas (azul) situada dentro do espaço subendotelial.

Os QM remanescentes, que contêm quase todo retinol absorvido são depurados no fígado. Nas células parênquimas do fígado os ER são rapidamente hidrolisados a retinol e se ligam a RBP (**Figura 21**). Este complexo retinol/RBP é transportado para dentro das células estreladas que estocam os retinóides na forma de palmitato de retinil.

O complexo retinol/RBP também pode ser secretado no sangue, seguindo para as células alvo. Nas células alvo, o retinol pode ser oxidado a AR e/ou 9-cis-AR, entrar no núcleo das células e interagir com receptores específicos RAR, RXR, influenciando a expressão gênica. Um grande número de genes contém um ou mais RARE e, portanto, são potencialmente responsivos ao AR.

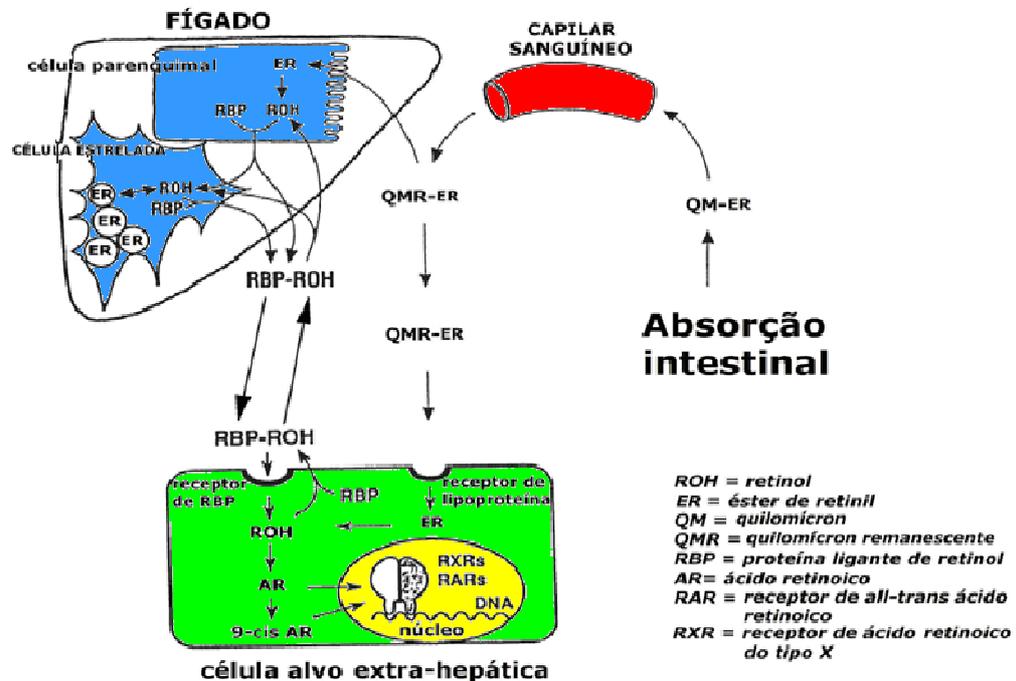


Figura 21: Ação nos tecidos extra-hepáticos e armazenamento no fígado da VA adquirida na dieta. A VA atua principalmente como um hormônio nuclear, na forma de AR. No fígado, a VA é estocada no interior das células estreladas na forma de ER, até que seja transportada ao restante do organismo ligada a RBP como retinol. Adaptado de (Senoo, 2004).

As células estreladas hepáticas como também as parenquimatosas contêm proteínas ligadoras de retinol assim como diversas outras células transportadoras de retinol e AR e enzimas fundamentais na esterificação e hidrólise de ER (**Figura 22**) (Senoo, 2004).

Como comentado acima a LRAT intestinal age esterificando o retinol que será incorporado dentro do QM. No fígado, a LRAT hepática é regulada sensivelmente pela demanda nutricional, sendo que a DVA promove a redução da atividade no fígado e a suplementação com retinol na dieta induz a atividade da LRAT naquele órgão. A diminuição da atividade da LRAT hepática é fundamental para reduzir a esterificação e armazenamento do retinol, deixando-o disponível para a exportação para outros tecidos ou para a oxidação.

Retinóides (VA e seus metabólicos) são conhecidos por regular diversas atividades celulares tais como a proliferação e diferenciação celular, morfogênese, e tumorgênese. Em condições fisiológicas, as células estreladas estocam cerca de 80% do total de retinóides do corpo, na forma de palmitato de retinil dentro de gotículas lipídicas no citoplasma e regulam o transporte e o armazenamento dos retinóides. Essas células expressam receptores específicos para retinol (Senoo, 2004).

Alguns pesquisadores acreditam que além de regular uma série de genes, os retinóides também teriam a capacidade de fazer o mesmo quanto ao nível de transcrição de seus próprios genes. Isso foi sugerido baseado nos achados de RARE e RXRE dentro do promotor de genes que codificam várias proteínas relacionadas com o retinóide, como por exemplo, foi encontrado um RARE no promotor do gene do RAR e um RXRE e no promotor do gene da proteína celular ligadora de retinóide II (**CRABP II**), (Ross, 2003).

A concentração de retinóides no sangue é regulada dentro de uma faixa fisiológico pelas células estreladas. Através de endocitose mediada por receptores específicos, as células levam retinol do sangue onde este circula como um complexo de

retinol e a proteína ligadora de retinol, como já mencionado acima. Estudos com microscopia eletrônica sugerem que RBP transfere o retinol das células parênquimas para as células estreladas e as células estreladas ligam e internalizam RBP por endocitose (**Figura 22**). Uma vez dentro da célula, o retinol livre tem vários destinos, sendo um deles o reagrupamento do complexo com o RBP e retorno para o sangue. Neste sentido, a célula estrelada hepática tem importante função na regulação da homeostase dos retinóides.

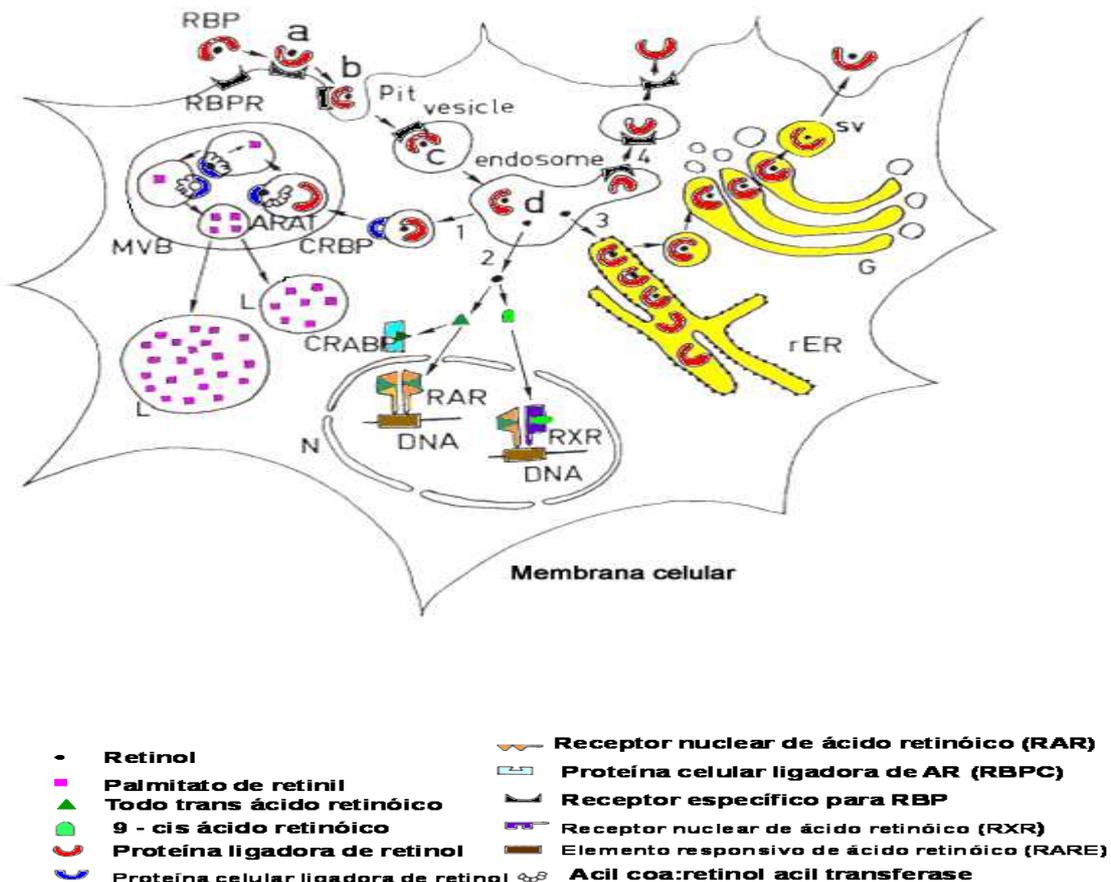


Figura 22: Absorção e estoque do retinol e proteína ligadora de retinol (RBP) pelas células estreladas. Um complexo (retinol/RBP) circula no sangue. Este complexo se liga especificamente ao receptor

expresso na superfície das células estreladas (a) onde alcança o endossoma (d) por covas e vesículas (c). Já no endossoma o retinol pode ter três caminhos: (1) Retinol ligado a proteína ligadora de retinol celular (CRBP) e esterificado com ácido palmitato no corpúsculo multi-vesicular. (MVB) sendo estocado dentro de gotículas lipídicas; (2) retinol pode ser oxidado a ácido retinóico, pelo qual se liga com a proteína ligadora de ácido retinóico celular ou é transportado e migra para núcleo da célula onde se liga com receptor de ácido retinóico celular (*RAR* for all-*trans*-retinoic acid, *RXR* for 9-*cis*-retinoic acid), promovendo modulação da expressão de alguns genes; (3) retinol pode ser transportado do endossoma para alcançar a superfície do retículo endoplasmático (RER), ligado com RBP sendo secretado para fora através do complexo de golgi (G) e secretado por vesículas (sv), (4) RBP e os receptores são reciclados e reutilizados. Adaptado de (Senoo, 2004).

2.3.3 Retinóides e eritropoietina

EPO é uma glicoproteína com aproximadamente 30400 Daltons, produzida principalmente nas células renais. Atua na eritropoiese primariamente nas unidades formadoras de colônias e estimula a maturação por normoblastos (Jelkmann, 2004).

A eritropoiese é regulada pelo hormônio EPO. O estímulo para a produção de eritropoietina é a tensão de oxigênio nos tecidos dos rins. A produção de EPO, portanto, aumenta na anemia, quando a Hb, por algum motivo metabólico ou estrutural, é incapaz de liberar oxigênio normalmente, quando o oxigênio atmosférico está baixo ou quando há disfunção cardíaca, pulmonar ou lesão na circulação renal que afete a liberação de oxigênio nos rins (Jelkmann, 2004).

A EPO parece ser regulada pelo AR, uma vez que possui na região 3' um elemento responsivo ao AR (Evans, 2005). Em experimentos *in vitro* e em modelos de animais a suplementação com VA estimulou a produção de EPO. Contudo, os pesquisadores não elucidaram como a suplementação aumenta a concentração de EPO em humanos (Evans, 2005). Tem sido proposto que AR possa estimular a eritropoiese via regulação da produção de EPO devido à sua participação direta no desenvolvimento dos eritrócitos (Zimmermann, et al., 2006; Evans, 2005).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da deficiência de vitamina A no *status* de ferro em ratos durante o período de depleção hepática.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de depleção de vitamina A no fígado, durante o período de tratamento dos ratos com dieta DVA.
- Verificar o efeito da deficiência de vitamina A no ganho de peso;
- Avaliar o efeito da deficiência de vitamina A no consumo de dieta;
- Avaliar o efeito da deficiência em vitamina A nos dados hematimétricos (níveis de Hb, Htc, VCM, HCM, CHCM, número de leucócitos, eritrócitos e linfócitos);
- Avaliar o efeito da deficiência em vitamina A na concentração de ferritina sérica;
- Avaliar o efeito da deficiência em vitamina A na concentração de ferro nos tecidos (intestino, baço, fígado) de ratos submetidos à dieta DVA.

4. Metodologia

4.1 Animais

52 ratos Wistar machos, com 21 dias de idade, foram alojados no biotério, em gaiolas individuais, com ciclos de luz/escuridão 12/12h, e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

A dieta foi oferecida durante o ciclo de escuridão, com livre acesso a água. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB, UNBDOC no 18996/2008.

No início do estudo (**T0**), após três dias de aclimatização, 10 animais foram sacrificados por deslocamento cervical para determinação dos parâmetros basais (**Grupo T0**). Os demais animais foram aleatoriamente separados em dois grupos de tratamento (21 ratos/grupo) e alimentados com uma das seguintes dietas:

- Grupo Controle (**CT**): dieta AIN-93G com 35 mg de Fe/kg dieta e 4000UI de vitamina A. Estes teores correspondem à recomendação de ferro e vitamina A para roedores (Reeves, et al., 1993).
- Grupo Deficiente em Vitamina A (DVA): dieta AIN-93G com 35 mg de Fe/kg dieta, sem fonte de vitamina A.

Após 15 (**T15**), 30 (**T30**) e 45 (**T45**) dias de tratamento com uma das dietas descritas anteriormente, 7 animais de cada grupo foram sacrificados, por deslocamento cervical. O sangue foi coletado por punção cardíaca em dois frascos, com e sem EDTA (etilenodiamino tetra ácido, a 7%) para análise do hemograma total e ferritina sérica, respectivamente. O fígado, baço e intestino delgado foram retirados e lavados com solução salina para retirada do excesso de sangue, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70° C até a realização das análises.

4.2 Variáveis analisadas

4.2.1 Ganho de peso

Os animais foram pesados semanalmente em balança de precisão (Marte Balanças, AS 500C, São Paulo, SP, Brasil) com capacidade mínima de 0,5g e máxima de $500g \pm 0,001g$.

4.2.2 Consumo da dieta

O consumo da dieta foi determinado diariamente através da diferença entre a quantidade de dieta ofertada e a sobra pesada em balança analítica (Scientech, SA 210, Boulder, CO, EUA) com capacidade mínima de 0,001 g e máxima de 210 g ± 0,0001 g.

4.2.3 Hemograma

A dosagem dos eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração da hemoglobina corpuscular média, linfócitos e leucócitos, foi realizada em contador de células (Coulter Corporation, T-890, Miami, FL, EUA), utilizando o sangue total, colhido em micro tubo já com EDTA e imediatamente levado para leitura no contador de células. As leituras foram realizadas em triplicata para cada amostra de sangue.

4.2.4 Determinação da concentração de ferritina sérica

Para determinação de ferritina sérica foi utilizado Kit RAT FERRITIN (**procedimento em anexo**), sendo utilizado o soro obtido da amostra de sangue coletado em tubo sem EDTA.

4.2.5 Determinação da concentração de retinol hepático

A concentração de retinol hepático foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**HPLC**), segundo método descrito por Tanumihardjo & Penniston (2002). Todo processo foi realizado a meia luz. Uma amostra de aproximadamente 0,1 g de fígado foi macerada em homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax T8, IKA®- Werke, Staufen Alemanha) à temperatura de 4°C e, posteriormente, ressuspendido em etanol

(J. T. Baker, México) (5 x volume do tecido) e agitado durante 15 segundos em vortex (B. BraunBiotech International, Certomat MV, Melsungen, Alemanha). Ao homogeneizado foi acrescentado KOH 50% (J. T. Baker, México) (0,8 x volume do tecido + etanol), em seguida agitado durante 15 segundos e depois incubado em banho maria a 50 °C, durante 30 minutos. As amostras foram homogeneizadas a cada 15 minutos por aproximadamente 15 segundos durante o período de incubação. Após a saponificação, o retinol foi extraído com hexano pureza HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha) (2 x volume [tecido + etanol + hexano] /3 vezes).

A extração foi realizada após a adição do hexano, com homogeneização em vortex, durante 30 segundos, e centrifugação a 1000xg (centrífuga Janetzki, T24, Engelsdorf-Leipzig, Alemanha) durante 3 minutos para a separação das fases. A fase menos densa, que continha o hexano, foi retirada e transferida para um tubo limpo, onde o hexano foi evaporado com nitrogênio gasoso e o extrato estocado a -70°C em microtubos, protegidos da luz, para evitar oxidação, até análise

A separação e identificação da molécula de retinol foram feitas utilizando o Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, Shimadzu, Sinc do Brasil Instrumentação Científica Ltda), coluna CLC-ODS (M), com fluxo de 1 mL/min, fase móvel metanol/ água (95:5) e detecção em 325 nm. Para obtenção do perfil cromatográfico, o extrato foi diluído em 2 mL de etanol, pureza HPLC (J. T. Baker, México), filtrada em membrana de nylon 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore). Foram aplicados 20 µL deste filtrado via injetor automático. As análises foram feitas em duplicata.

Para quantificação foi construída uma curva padrão utilizando o todo-trans-retinol sintético (Fluka Biochemika, retinol ≥ 99% - HPLC) diluído em etanol. A concentração da solução padrão foi calculada a partir da absorbância obtida a 325 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Brasil), utilizando o valor de $A^{1\%}_{325\text{nm}} = 5248$. 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, $y = 3,8547 \cdot 10^{-9}x + 0,001188$; $R^2 = 0,9998$.

4.2.6 Concentração de ferro nos tecidos

Foram utilizados, aproximadamente, 0,1 g de fígado e baço, e 0,4 g de intestino para determinação da concentração de ferro. Na cápsula de digestão, foram adicionados às amostras 5 mL de HNO₃ PA e 2,5 mL de H₂SO₄ PA. As amostras foram então digeridas em forno microondas (DGT 100 Plus - Provecta Analítica), de acordo com a metodologia descrita por (Baranowska, et al., 1995) utilizando o seguinte programa:

- 5 min – 330 w;
- 6 min – 700 w;
- 1 min – 800 w;
- 20 min – 0 w (resfriamento).

A concentração de ferro nas amostras foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES-Shapes-Spectroflame Modulates – Spectro Analytical Instruments - Kleve-Germany), e como fonte de excitação o gás argônio. Foi utilizada uma curva padrão construída com padrão de ferro (Titrisol; Merk) nas seguintes concentrações 0,04; 0,4; 2,5; 5,0; 10 ppm e comprimento de onda 238nm. Os resultados foram expressos em µg de ferro por g de tecido úmido. A exatidão do método para quantificação de ferro foi determinada utilizando amostra referência (Rice Flour (1568a), United States Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland), analisada em triplicata. A exatidão obtida foi de 86%.

Todas as vidrarias utilizadas na realização das análises foram lavadas com H₂O deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation), deixadas em HCl 10% por 3 h e após este tempo enxaguadas com H₂O deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation) por 3 vezes, (Baranowska, et al., 1995).

4.3. Análise estatística

A análise da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, utilizando o software SPSS (versão 17.0, SPSS Incorporation, Chicago, IL, EUA). Para análise das diferenças intragrupo (mesma dieta ao longo do período de tratamento) foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de múltiplas comparações com correção de Bonferroni, e para comparação entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA fator único (Microsoft Corporation, Microsoft Office Excel 2003, Redmond, WA, EUA). Todas as variáveis apresentaram distribuição normal, no *software* SPSS. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. Resultados

Após o 15º dia de tratamento o grupo DVA apresentou redução significativa na concentração de retinol hepático em relação ao grupo Controle. Após o 30º dia de tratamento, não foi mais possível quantificar a concentração de retinol no fígado dos animais DVA pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 23).

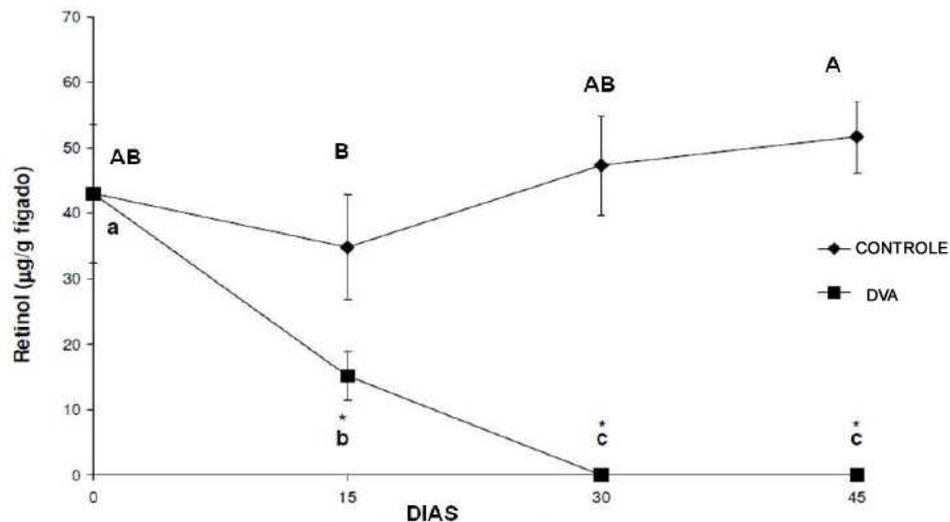


Figura 23: Concentração hepática de retinol ($\mu\text{g/g}$) dos ratos controle (CT) e deficientes em vitamina A (DVA), durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam diferenças intragrupos, entre os três períodos de tratamento: maiúsculas CT e minúsculas DVA ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p < 0,001$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo. LD (limite de detecção) = $0,0011 \mu\text{g/g}$.

Os grupos CT e DVA apresentaram um aumento significativo no ganho de peso e no consumo da dieta durante os 45 dias de tratamento, não havendo diferença significativa entre os dois grupos tanto no ganho de peso como no consumo (**Tabela 1**).

Tabela 1: Ganho de peso, ingestão total de dieta dos ratos dos grupos controle e deficientes em vitamina A, nos tempos T0, T15, T30 e T45 dias de tratamento.

GRUPOS	GANHO DE PESO (g)	CONSUMO DE DIETA (g/período)
T0	-	-
CT 15	142,9 ± 11,2 ^c	323,5 ± 24,39 ^c
DVA 15	149,1 ± 12,0 ^c	348,81 ± 23,5 ^c
CT 30	233,5 ± 20,3 ^B	584,6 ± 45,1 ^B
DVA 30	239,1 ± 28,6 ^b	635,4 ± 58, 2 ^b
CT 45	289,4 ± 22,0 ^A	869,6 ± 72,8 ^A
DVA 45	289,9 ± 36,0 ^a	886,3 ± 73,6 ^a

Tabela1: Letras diferentes indicam diferenças intragrupos, entre os três períodos de tratamento: maiúsculas CT e minúsculas DVA ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p < 0, 001$). CT: controle; DVA: deficiente em vitamina A. T0: tempo inicial. Os dados correspondem à média e desvio padrão, n= 7 animais por grupo.

Os ratos dos dois grupos apresentaram aumento da concentração de hemoglobina e hematócrito nos primeiros 15 dias de tratamento em relação ao período basal, mantendo os mesmos valores ao longo dos 45 dias de tratamento. Não havendo diferença entre os dois grupos (**Figura 24 a , b**).

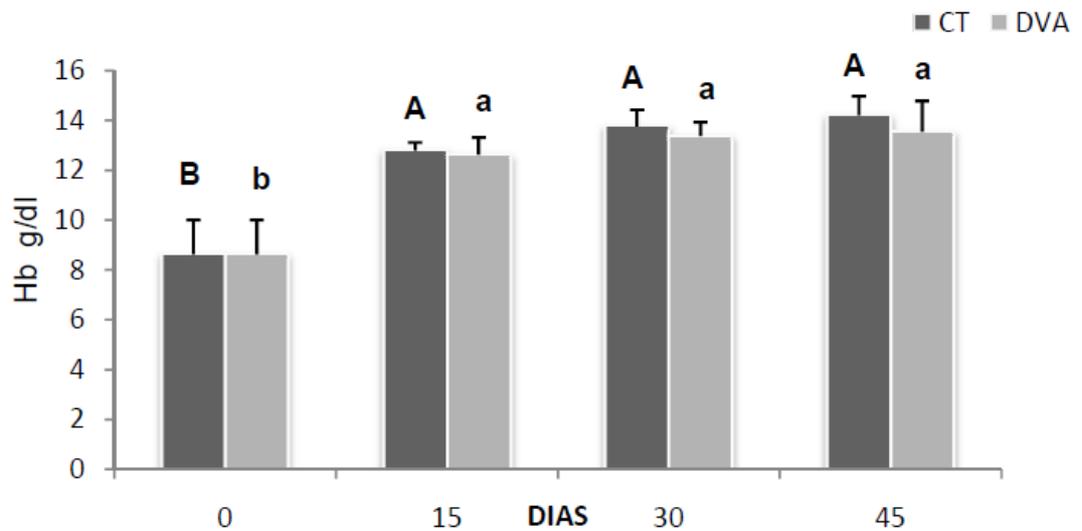


Figura 24 a: Efeito da deficiência em vitamina A na hemoglobina (Hb) de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (▒) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

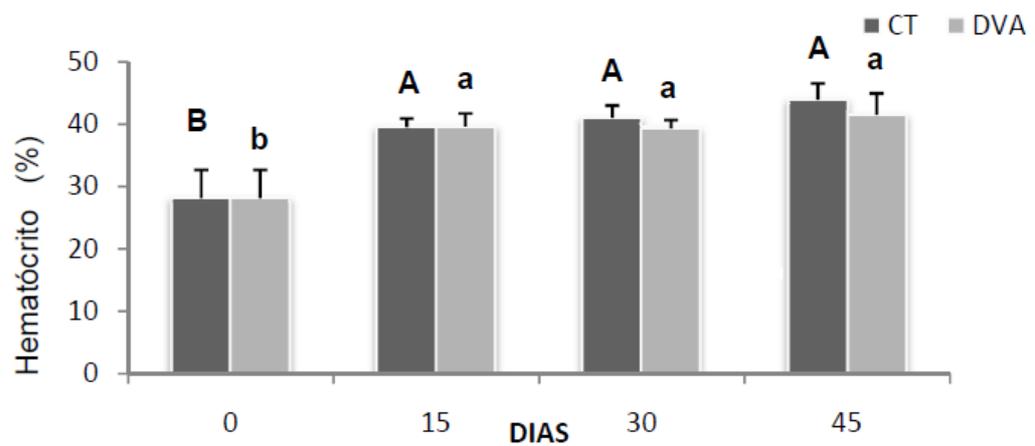


Figura 24b: Efeito da deficiência em vitamina A no hematócrito de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (▒) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

VCM e o HCM (**Figura 24 c , d**) apresentaram alterações entre os dois grupos, havendo uma redução significativa após 45 dias de tratamento no grupo DVA em relação ao grupo controle, no entanto a CHCM (**Figura 24 e**) não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

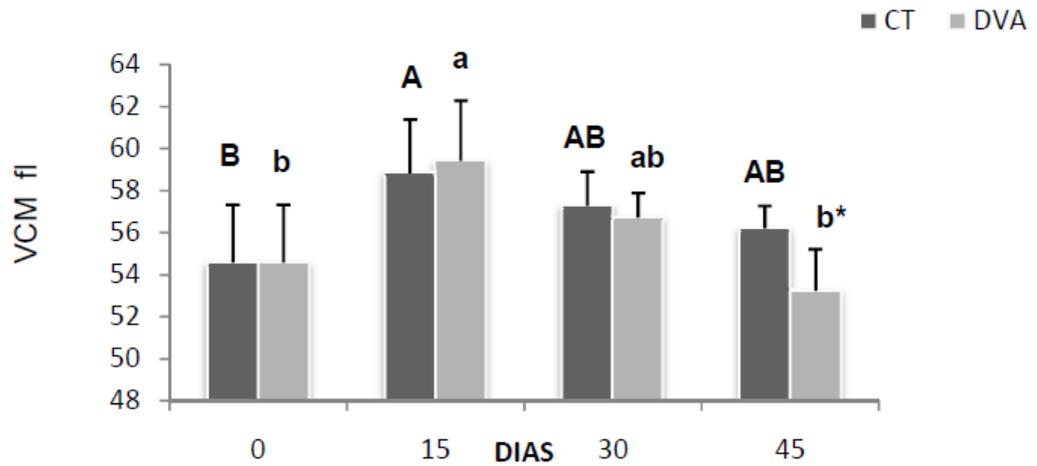


Figura 24 c: Efeito da deficiência em vitamina A no volume corpuscular médio (VCM) de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (▒) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

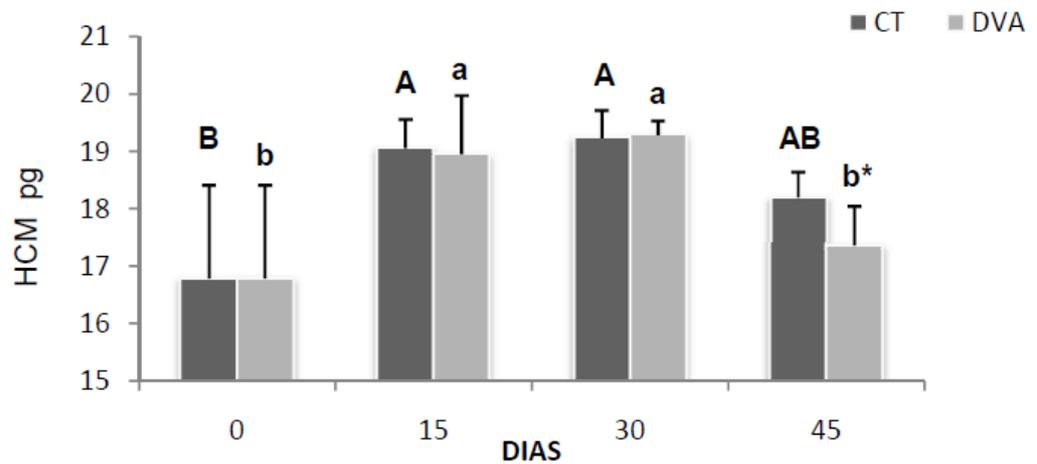


Figura 24 d: Efeito da deficiência em vitamina A na hemoglobina corpuscular média (HCM) de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (▒) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

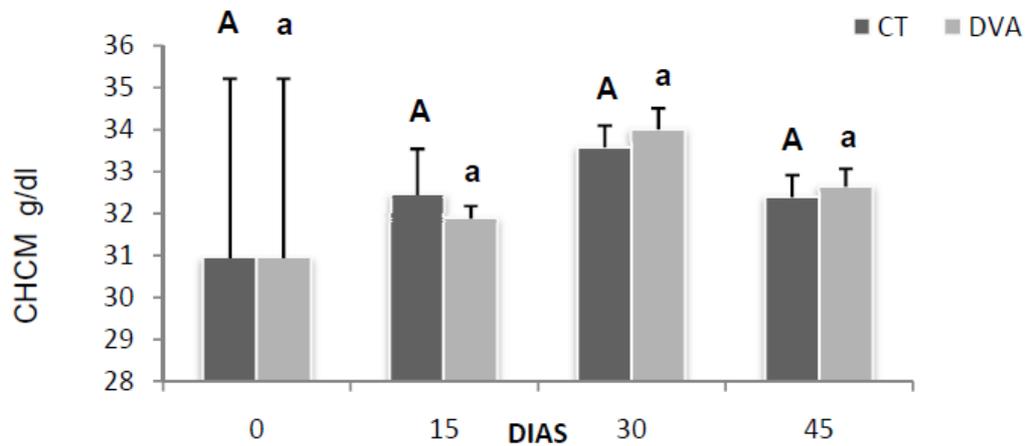


Figura 24 e: Efeito da deficiência em vitamina A na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (◐) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

Os ratos dos dois grupos apresentaram aumento da concentração dos eritrócitos nos primeiros 15 dias de tratamento em relação ao período basal, não havendo diferenças entre os dois grupos durante todo período de tratamento (**Figura 24 f**).

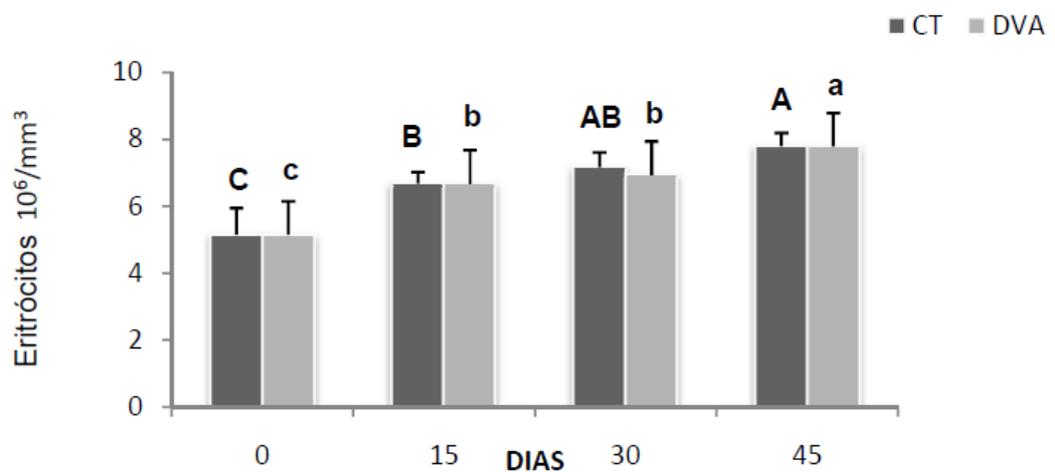


Figura 24 f: Efeito da deficiência em vitamina A nos eritrócitos de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (◐) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

Não foi observada diferença significativa nas concentrações de leucócitos e dos linfócitos dos ratos intra-grupos ou entre os grupos nos diferentes tempos de intervenção (**Figura 24 g , h**), no entanto se observa uma tendência de aumento dessas concentrações no grupo DVA em T30. ($p < 0,07$ nos leucócitos e $p < 0,09$ nos linfócitos).

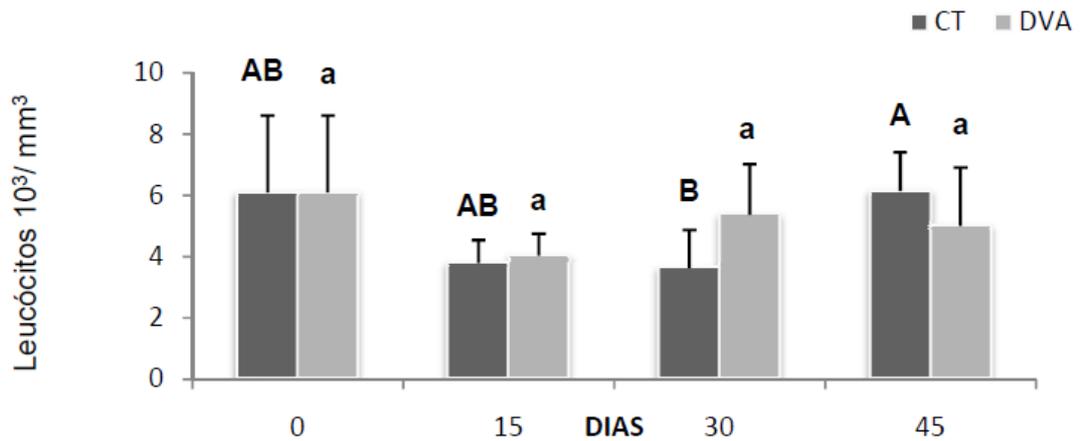


Figura 24 g: Efeito da deficiência em vitamina A na concentração dos leucócitos de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (■) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

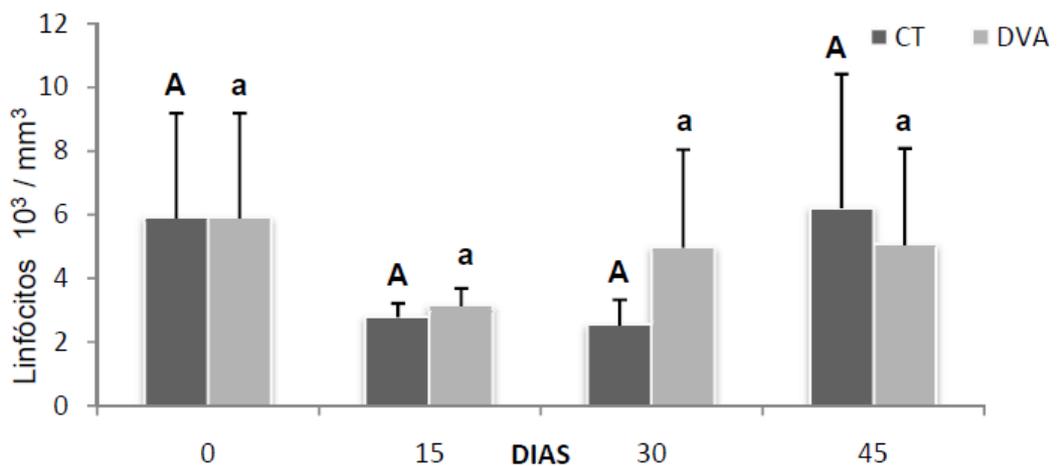


Figura 24 h: Efeito da deficiência em vitamina A na concentração dos linfócitos de ratos tratados com dieta controle (■) e deficiente em vitamina A (■) durante T0, T15, T30, E T45 dias de tratamento.

Não foi observada diferença significativa na concentração de ferritina sérica dos ratos intra-grupos ou entre os grupos nos diferentes tempos de intervenção (**Figura 25**).

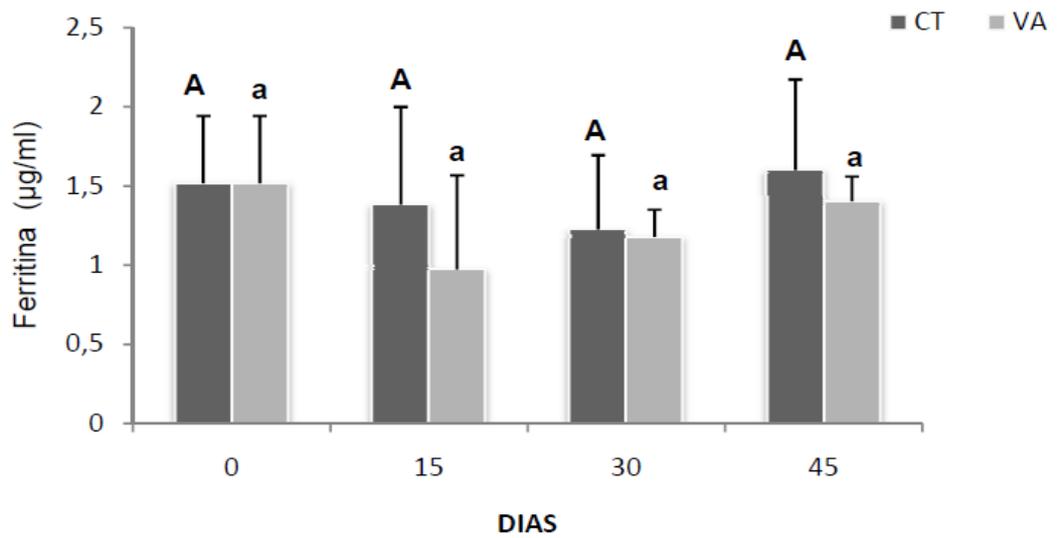


Figura 25: Concentração de ferritina sérica nos ratos tratados com dieta controle (■) ou deficiente em vitamina A (▒), durante 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças intragrupos, entre os três períodos de tratamento: maiúsculas CT e minúsculas DVA ($p < 0,05$). Os dados correspondem a média e desvio padrão do soro, $n = 7$ animais por grupo.

Foram realizadas análise da concentração de ferro em 03 tecidos (baço, intestino e fígado) como listado abaixo:

No baço dos animais do grupo CT pode ser observada oscilação significativa na concentração de ferro. Foi observado aumento significativo na concentração de ferro no baço após 15 dias de tratamento nos dois grupos. No grupo controle, após 30 dias de tratamento, os níveis ferro retornaram aos níveis basais (T0), não ocorrendo essa redução no grupo DVA, o que contribui para a diferença significativa nos níveis de ferro observada no grupo DVA em relação ao grupo controle no T30. Os níveis de ferro observados após 45 dias de tratamento elevaram-se em ambos os grupos (**Figura 26**).

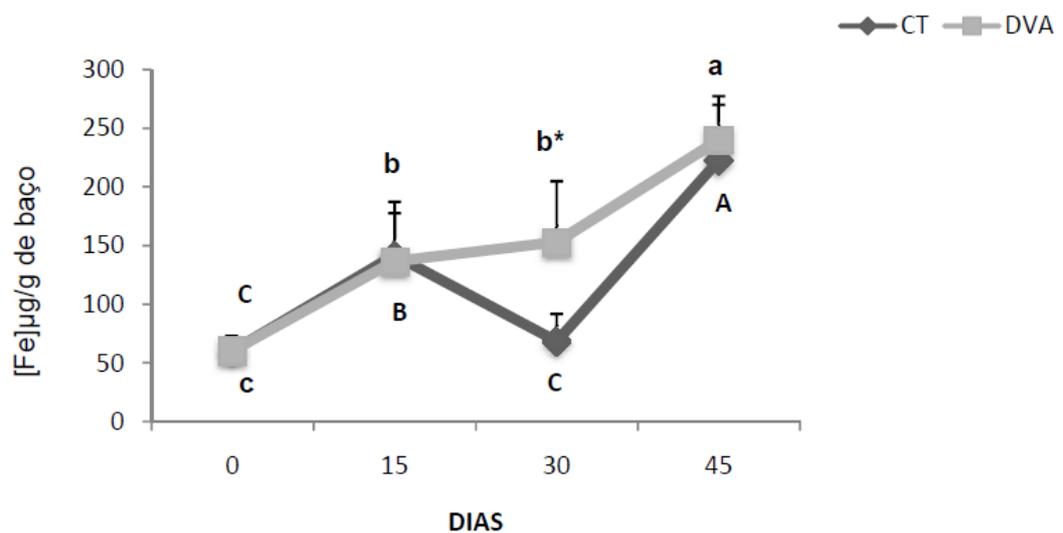


Figura 26: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), no baço, de ratos controle (\blacklozenge) e deficiente em vitamina A (\blacksquare) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam diferenças intragrupos, entre os três períodos de tratamento: maiúsculas CT e minúsculas DVA ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p < 0, 01$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

Semelhante ao resultado observado no baço, no intestino dos animais CT foi também observada oscilação no conteúdo de ferro durante todo o período de tratamento. No T15, os animais do grupo CT apresentaram aumento na [Fe] em relação a T0, entretanto aos 30 dias ocorreu redução significativa em relação a T15. No tempo T45 esse nível retornou ao valor encontrado em T15.

No grupo DVA os níveis de ferro nos enterócitos (**Figura 27**) mantiveram-se constantes durante os 30 dias de intervenção, sofrendo um aumento significativo em T45. Entre os grupos, foi observada redução significativa nos níveis de ferro intestinal dos animais DVA no T15 e T30. Entretanto, essa diferença não se manteve no final do tratamento em T45 (**Figura 27**).

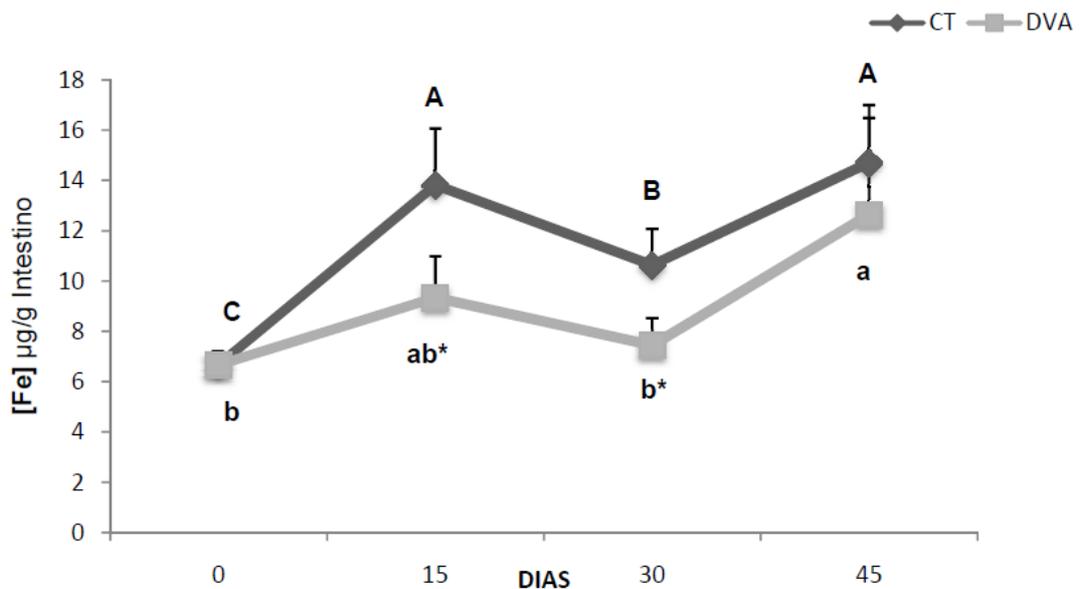


Figura 27: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), no intestino de ratos controle (\blacklozenge) e deficientes em vitamina A (\blacksquare) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam diferenças intragrupos, entre os três períodos de tratamento: maiúsculas CT e minúsculas DVA ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p < 0,01$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

Na **Figura 28**, observa-se aumento significativo na concentração de ferro hepático entre 15 e 30 dias nos dois grupos, CT e DVA. O grupo DVA apresentou redução na concentração de Fe entre os períodos de 30 e 45 dias de tratamento, sem, no entanto ser suficiente para produzir alterações significativas entre os 02 grupos analisados no mesmo período do tratamento.

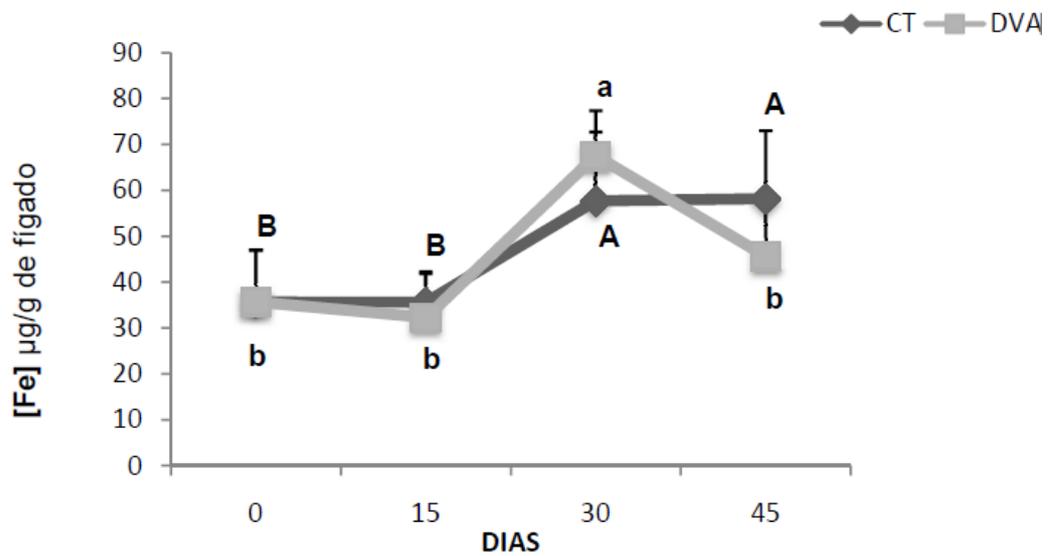


Figura 28: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), no fígado, de ratos controle (\blacklozenge) e deficiente em vitamina A (\blacksquare) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam diferenças intragrupos, entre os três períodos de tratamento: maiúsculas CT e minúsculas DVA ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p < 0,05$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

6. Discussão

Vários estudos têm reportado uma interação entre o *status* de VA e a absorção, estoque e distribuição de Fe no organismo (Arruda, et al., 2009; Zimmermann, et al., 2007; Walczyk, et al., 2003; Ameny, et al., 2002; Mejia, et al., 1979). Apesar de existir consenso sobre a interação entre VA e o Fe no organismo, os mecanismos exatos de como esses eventos acontecem ainda não estão totalmente elucidados (Arruda, et al., 2009; Zimmermann, et al., 2006).

Desde a segunda metade do século passado já é conhecido que a concentração de retinol sérico diminui rapidamente somente após a depleção do retinol hepático (Mejia, et al., 1979).

O fígado, especificamente nas células estreladas, constitui o principal órgão que atua como estoque de VA mantendo os níveis deste micronutriente constantes no plasma de forma que seus níveis no sangue só declinam quando as reservas hepáticas já estão esgotadas, ou seja, quando o organismo já está depletado de VA. Sendo assim a diminuição dos estoques de VA do fígado não acontece de maneira abrupta e sim decaem gradativamente fornecendo retinol para o plasma a fim de atender a demanda dos demais tecidos. Neste sentido, pode-se observar que a DVA no organismo está presente somente quando há depleção hepática dessa vitamina (Davila, et al., 1985).

Como observado na Figura 23, após o 15^o dia de tratamento, os animais que foram submetidos à dieta DVA tiveram os níveis de retinol diminuídos gradativamente até o 30^o dia da deficiência de ingestão de VA, quando não mais foi possível quantificar o retinol hepático, determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), segundo método descrito por (Tanumihardjo, et al., 2002). Outros autores reportaram redução similar nos níveis de retinol hepático de ratos depletados de VA (**Figura 29**) (Ghenimi, et al., 2009; Arruda, et al., 2009; Arruda, et al., 2009). Os resultados obtidos evidenciam o processo de depleção da vitamina A no fígado dos ratos caracterizando a deficiência deste nutriente após 30 dias de tratamento.

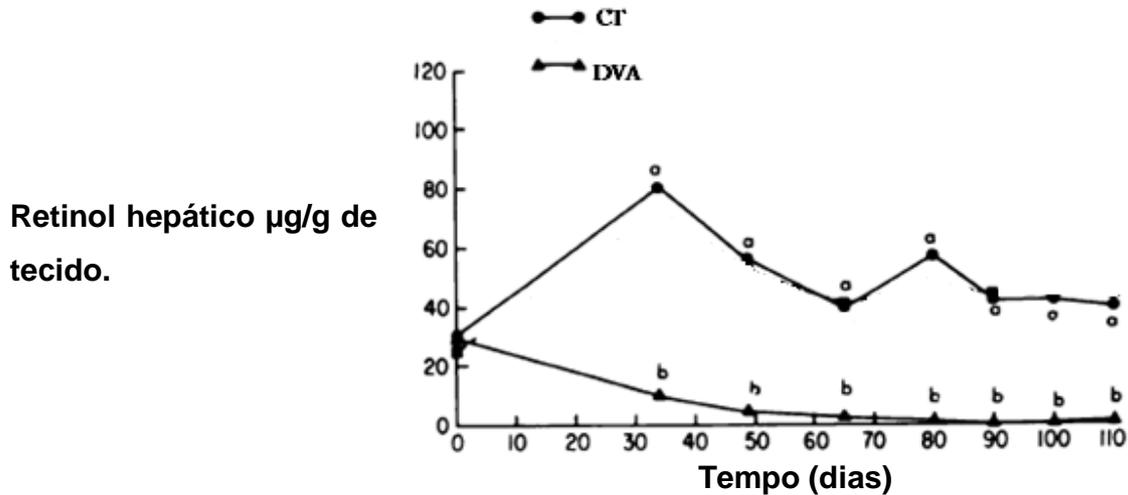


Figura 29: Evolução da concentração de retinol hepático no decorrer do tempo em animais DVA e CT. Adaptado de (Mejia, et al., 1979).

No presente estudo, a redução marginal nos níveis de retinol hepático (**Figura 23**) observada no grupo CT, nos primeiros 15 dias de tratamento e a recuperação dos níveis basais no final do tratamento (T45) sugere-se ser uma adaptação dos animais a uma mudança da consistência da dieta (leite - nascimento até o desmame) para dieta sólida, AIN-93G, onde no período de adaptação após o desmame os animais costumam menos a dieta oferecida que durante os demais períodos de tratamento o que pode ser confirmado analisando a **Tabela 1**, sendo assim o decréscimo observado de T0 a T15 e a recuperação da concentração de retinol a partir de T15, observados no grupo CT poderia estar demonstrando uma adaptação do fígado atendem à demanda corporal diminuindo suas reservas e, após, adaptando-se à nova dieta oferecida, retornando aos níveis encontrados em T0.

A depleção de vitamina A não alterou o ganho de peso (**Tabela 1**) entre os grupos, no entanto houve aumento de peso gradativo dentro dos grupos a partir de (T15). Resultado similar já havia sido reportado desde a década de setenta (Mejia, et al., 1979), quando ratos tratados com dieta DVA não apresentaram redução de peso quando comparados com os animais controle após 40 dias de tratamento. Também não foi observado influência da DVA no consumo da dieta entre os grupos (**Tabela 1**).

Em um estudo realizado em nosso laboratório Arruda e colaboradores, 2009, observaram resultado divergente ao encontrado neste, no qual os animais tratados durante 57 dias, com dieta deficiente de vitamina A, apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) no ganho de peso em relação ao grupo CT. Sugere-se que esta divergência encontrada no ganho de peso dos animais deficientes em relação ao grupo controle nos dois estudos seja devida ao tempo de tratamento.

A DVA levando à anemia tem sido reportada desde 1920 (Strube, et al., 2002). No entanto, a literatura não apresenta consenso sobre o efeito da DVA na concentração de Hb, ou seja, alguns autores mostraram que essa deficiência leva à anemia (Roodenburg, et al., 1996; Mejia, et al., 1979; Hodges, et al., 1979), sugerindo que os estoques de Fe ficam indisponíveis para a hematopoiese implicando em um papel fundamental da VA na liberação de Fe do fígado (Strube, et al., 2002), mas outros estudos não possibilitaram observar diminuição na concentração de Hb quando na DVA (Roodenburg, et al., 2000).

No presente estudo a DVA não alterou a concentração de Hemoglobina nos grupos CT e DVA, (**Figura 24 a**). Entretanto, os animais DVA, assim como os ratos do grupo Controle, apresentaram aumento significativo da concentração de Hb na primeira quinzena de tratamento, mantendo-se constante até o final do estudo, não havendo diferenças entre os dois grupos.

Os animais no início do tratamento demonstraram níveis menores de Hb em relação ao tempo até T15 mantendo-se constantes até T45. Esse aumento da hemoglobina de T0 a T15 não deve ser considerado influência da DVA, haja vista que ambos os grupos apresentaram o mesmo perfil de crescimento.

Essas alterações no período de T0 a T15 denotando correção nos índices hematimétricos puderam ser visualizados também no hematócrito, que sofreram aumento na primeira quinzena do estudo (**Figura 24 b**), assim como ocorreu no número de eritrócitos e nos valores para VCM e HCM (**Figuras 24 c; d**) nos dois grupos, corroborando os resultados encontrados na concentração da hemoglobina.

Estes resultados sugerem que a DVA, durante 45 dias, não deve comprometer ou prejudicar a hematopoiese e, conseqüentemente, não deve resultar em um quadro de anemia. No entanto, outro trabalho em que o tempo de depleção ou administração

de uma dieta DVA foi superior a esse período de 45 dias evidenciaram alteração na concentração de Hb, nos ratos DVA (Mejia, et al., 1979).

Adversamente à redução na concentração de hemoglobina, alguns estudos reportaram aumento de Hb nos ratos DVA. Os autores atribuem esse aumento a uma provável hemoconcentração que ocorreria quando os animais são expostos à DVA levando à diminuição do volume do plasma, (Zimmermann, et al., 2006; Stephensen, 2001; Mejia, et al., 1979).

Arruda, et al., 2009, consubstanciaram esta hipótese ao observarem redução no ganho de peso dos animais DVA. Entretanto, (Mejia, et al., 1979) relataram em seus trabalhos que, embora a hemoconcentração possa mascarar uma provável anemia, após aproximadamente 80 dias com redução de retinol hepático e sérico é possível observar diferenças significativas na hemoglobina, hematócrito e diminuição de ferro sérico, reforçando a hipótese da necessidade de maior tempo de tratamento com dieta DVA para se observar alterações nos índices hematimétricos. Assim, a aparente divergência quanto à manifestação da anemia em ratos deficiente em vitamina A é devida ao período de depleção.

Outra variável fundamental na determinação do estado corporal de ferro é a concentração de ferritina sérica, uma vez que esta reflete os níveis de ferro estocados em todos os tecidos. Ou seja, uma redução nos níveis de ferritina sérica indica depleção dos estoques de ferro no organismo, enquanto que aumento nos níveis de ferritina sérica pode indicar sobrecarga de ferro.

A concentração de ferritina sérica, (**Figura 25**), manteve-se constante durante todo o período de tratamento, corroborando os resultados encontrados na concentração de Hb, isto é, os estoques de ferro foram mantidos, apesar de ter havido uma demanda maior de ferro para a síntese de hemoglobina, que ocorreu nos primeiros 15 dias.

Como já relatado acima, no presente estudo, a DVA em ratos recém desmamados, durante 45 dias, não prejudicou a hematopoiese. Entretanto, foi observada redução do volume corpuscular médio (**VCM**) e da hemoglobina corpuscular média (**HCM**) (**Figura 24 c e d**) no grupo DVA com relação ao grupo CT, no tempo T45. Uma redução no VCM, que determina o volume dos eritrócitos, e na HCM que se refere à quantidade de Hb dentro de cada eritrócito, pode caracterizar anemia microcítica e

hipocrômica, respectivamente, desta forma, esses resultados sugerem uma possível deficiência na hematopoiese consequente da DVA.

Resultado similar no VCM e HCM foi encontrado por (Mejia, et al., 1979) com trabalhos desenvolvidos após 80 dias com dieta DVA. Essa redução nas duas variáveis VCM e HCM, observada no presente estudo, sugere alteração na hematopoiese, após 45 dias de depleção dos ratos, antes mesmo que alterações na concentração de Hb estejam presentes. Os perfis dos valores de VCM e HCM observados nas Figuras 24 c; d respectivamente revelam uma similaridade nos níveis destas duas variáveis durante o todo o período de tratamento, em ambos os grupos. Apenas no final do estudo, no T45, a redução nas duas variáveis foi maior no grupo DVA. Estes resultados sugerem que a redução no HCM foi compensada pela diminuição do VCM. O resultado do CHCM (**Figura 24 e**) corrobora esta hipótese, pois não houve alteração nesse índice. Provavelmente com a progressiva diminuição da HCM, não mais compensada pelo VCM poderíamos verificar diminuição também do CHCM denotando anemia hipocrômica.

Em um estudo realizado por Zimmermann et al, (2006) em crianças pré-escolares, verificou-se que a suplementação com VA durante 10 meses reduziu a anemia e, portanto, a melhora na eritropoiese pôde ser evidenciada com o aumento do VCM e modesto aumento na concentração da Hb.

Aumento na concentração de eritropoetina (**EPO**), hormônio que estimula a eritropoiese também foi observado, no estudo desenvolvido por Zimmermann e colaboradores (2006), em crianças que receberam suplementação com VA por 10 meses em comparação com o grupo placebo. Os autores sugeriram que a VA esteja envolvida no aumento da circulação de EPO, devido à existência de uma região responsiva ao ácido retinóico em seu gene. É importante ressaltar que neste estudo os autores não observaram diferenças significativas no peso entre os dois grupos durante todo o tempo do tratamento, resultado similar encontrado no presente estudo.

A DVA durante 45 dias também não causou qualquer alteração no número de leucócitos e linfócitos (**Figura 24 g; h**), sugerindo que, embora estejam ocorrendo possíveis alterações na hematopoiese, o processo inflamatório ainda não está instalado.

A resposta celular às demandas fisiológicas associadas à biodisponibilidade de ferro dietético resultou em aumento de Fe no baço e intestino e na manutenção dos níveis de ferro hepático nos primeiros 15 dias de tratamento, apesar do aumento da hemoglobina, hematócrito, VCM e HCM. Porém, na segunda quinzena de tratamento (T30) o aumento de ferro no fígado, simultâneo à redução de ferro no intestino e baço no grupo controle, sugere uma eficiência maior na exportação do ferro intestinal e do baço para os outros órgãos, via corrente sanguínea. Este resultado sugere aumento de ferro sérico, para captação por outros órgãos, dentre eles o fígado que é o principal órgão de estoque de ferro, evidenciando aumento da mobilização de ferro absorvido no intestino e do ferro reciclado no baço, capaz de suprir as demandas fisiológicas decorrentes do crescimento do animal, posto que não houve redução da concentração de hemoglobina ou ferritina, e, ainda, preservar ferro no fígado que é o principal órgão de estoque desse mineral.

No início do tratamento a concentração Fe no grupo DVA no baço (**Figura 26**) foi similar ao do grupo CT, ou seja, aumentou até T15. Entretanto, essa elevação não deve ser creditada à DVA, pois durante esse período ainda não se pode afirmar que a DVA estava estabelecida.

Como observado na figura 23, a concentração de retinol hepático não foi mais detectada a partir de T30 e, de fato, a partir de T30 foi possível observar uma diferença significativa na concentração de ferro entre os grupos CT e DVA no baço, sendo possível sugerir que a DVA estivesse alterando a reciclagem do Fe no baço a partir deste período.

No Baço a partir de T30 pode-se observar uma diferença significativa entre os grupos CT e DVA (**Figura 26**), com o grupo CT tendo uma diminuição na concentração de Fe atendendo a uma demanda fisiológica; e o grupo DVA provavelmente respondendo a deficiência de vitamina A instalada, ou seja, aumentando a concentração de Fe no baço e prosseguindo até T45, observando-se acúmulo crescente na concentração de Fe nesse órgão durante os 45 dias de intervenção, sem as oscilações que demarcaram o aumento da concentração no grupo CT. Analisando ainda a concentração de ferro no baço no grupo DVA (**Figura 26**) bem como as figuras 24 (c) e (d) que se referem ao VCM e HCM, respectivamente, sugere-se que o aumento

da concentração de ferro neste tecido relação ao grupo CT possa estar influenciando a diminuição do VCM e HCM no tempo T45, de modo que houve aumento da concentração de Fe neste tecido com alteração destes índices hematimétricos sugerindo que houve alteração na hematopoiese por diminuição da liberação de ferro do baço e possivelmente dos macrófagos deste órgão.

Pode-se questionar que no tempo T45, a concentração de ferro no baço não foi significativamente diferente entre os dois grupos (controle e DVA). Desse modo, não se justificaria a diferença observada no VCM e HCM no mesmo tempo T45 e, portanto, a hipótese de que a diferença nesses índices tenha sido devida à menor mobilização ou reciclagem do ferro esplênico, não teria fundamento e, se assim fosse, os dois índices hematimétricos estariam alterados também no grupo controle em T45.

No entanto, a concentração de ferro no grupo controle neste tecido responde de maneira fisiológica, armazenando e liberando ferro no decorrer do tempo. Em T30 se observa efetivamente diferença entre os 02 grupos estudados, havendo redução nos níveis de ferro no baço dos animais do grupo controle. Esse resultado sugere que a função de reciclagem de ferro esteja ocorrendo nos animais controle e, portanto, o ferro removido do baço, está sendo mobilizado via corrente sanguínea para os outros tecidos, onde será utilizado em suas diversas funções inclusive hematopoiético.

No grupo deficiente em vitamina A, não ocorre redução de ferro esplênico em T30. Ao contrário, a concentração de ferro no T30 é significativamente maior que no grupo Controle, evidenciando redução na exportação do ferro esplênico nos animais deficientes em VA, ou seja, o ferro parece aprisionado dentro do órgão ou nos macrófagos deste órgão, sem, no entanto ainda produzir alterações dos índices hematimétricos. Contudo, em T45 nesse grupo esses índices são alterados demonstrando ausência de ferro suficiente para manter o VCM e HCM adequados o que parece ter sido atingido no grupo controle com o fornecimento fisiológico e periódico de ferro.

Arruda e colaboradores (2009), após submeterem ratos à depleção de VA por 57 dias observaram aumento na concentração de Fe no baço no grupo DVA em relação ao grupo Controle. Assim, com o crescente aumento nos níveis de ferro no baço dos

animais DVA, obtido no presente estudo, pode-se sugerir uma tendência destes animais acumularem Fe no baço devido à DVA.

O aumento na concentração de Fe no baço maior que o observado no intestino dos ratos DVA no período T30 ocorre, provavelmente devido aos níveis de hepcidina aumentados. O aumento na concentração de hepcidina, hormônio sintetizado pelo fígado, regulador da homeostase de ferro, e concomitante aumento significativo no nível da concentração de Fe no baço foi visualizado em nosso laboratório por (Arruda, et al., 2009), quando ratos submetidos à DVA aumentaram a expressão de hepcidina o que favoreceu a um aumento da concentração de ferro no baço.

No enterócito não é observado aumento significativo na concentração de Fe no grupo DVA até T30 (**Figura 27**), no entanto no T45, há aumento significativo nos níveis de Fe intestinais em relação ao período anterior (T30) no grupo DVA. Esse aumento coincide com a depleção total de VA, no fígado. Ainda na Figura 27 se observa também diferenças significativas no intestino entre os dois grupos nos tempos T15 e T45 com o grupo DVA apresentando menor concentração de Fe nesse tecido.

A diferença existente entre os dois grupos é a ausência de VA no grupo DVA, sendo assim sugere-se que a fonte de VA fornecida pela dieta AIN-93G na forma de palmitato de retinil no grupo CT possa facilitar a absorção de Fe no lúmen do intestino. Sugere-se que no grupo DVA a ausência da molécula de VA no lúmen do intestino interagindo com o íon ferro esteja prejudicando a absorção desse íon, denotando possível ação dessa molécula (VA) no lúmen do intestino na absorção do Fe, no entanto são necessárias pesquisas futuras para que se comprovem essa hipótese.

No fígado, ao longo dos 45 dias de tratamento, observa-se um perfil nos níveis de ferro distinto do observado no intestino e no baço. Todavia, não apresentando diferenças significativas entre os grupos em nenhum período do tratamento (**Figura 28**). No grupo DVA a concentração de Fe no fígado aumenta em T30 e é significativamente diferente dos dois períodos anteriores, voltando ao valor encontrado no início do tratamento em T45.

No trabalho de Strube, et al (2002), no qual foi avaliado o efeito da deficiência de vitamina A e de ferro nos níveis de ferro e retinol plasmático assim como na concentração de ferro hepático, em ratos tratados por 5 semanas, os autores não

observaram elevação nos níveis de ferro hepático, durante o tempo do tratamento, resultado similar ao encontrado no presente estudo. Em outro trabalho observou-se aumento da concentração de Fe no fígado somente depois de 50 dias de consumo de uma dieta DVA, (Mejia, et al., 1979).

Os resultados encontrados por estes autores, junto com os do presente estudo, sugerem que o efeito da deficiência de vitamina A nas reservas hepática de ferro seja tempo dependente, ou seja, 45 dias de depleção de VA não foram suficientes para alterar os níveis de ferro no fígado. No trabalho de realizado em nosso laboratório (Arruda, et al., 2009), os animais que foram submetidos a uma dieta DVA não apresentaram aumento da concentração de Fe no fígado, diferentemente do baço que obteve aumento significativo dessas concentrações com relação ao grupo CT.

É interessante observar que no trabalho desenvolvido por Arruda e colaboradores 2009, o nível de mRNA de hepcidina, hormônio produzido pelo fígado, estava elevado. Entretanto, não houve alteração nos níveis de Fe hepático. Esse resultado corrobora os resultados encontrados por outros pesquisadores (Strube, et al., 2002), por intermédio dos quais se levanta a hipótese de que a regulação da ferroportina hepática (FPN) seja independente dos níveis de hepcidina e, portanto, insensível á DVA. O efeito pós traducional da hepcidina sobre a molécula de FPN, proteína encontrada nos enterócitos, macrófagos e hepatócitos, responsável pela exportação do Fe, para a corrente sanguínea, tem sido relatado (Nemeth, et al., 2004). Assim, um aumento nos níveis de hepcidina acarretaria internalização e degradação da FPN, resultando aumento da concentração de Fe tecidual. No entanto, naquele trabalho, não foi observado aumento nos níveis de ferro no fígado mesmo com elevação da hepcidina, o que está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, no qual também não foi observado aumento da concentração de Fe hepático no grupo DVA em T45 (**Figura 28**). Estes resultados corroboram a hipótese de que a FPN hepática não responde à regulação da hepcidina.

No estudo realizado por Arruda e colaboradores (2009) os ratos tratados durante 57 dias com dieta deficientes em VA e simultaneamente, deficiente em ferro apresentaram no fígado, aumento nos níveis de transcritos de DMT-1, não tendo sido observada diferença significativa nos níveis de FPN em relação ao controle e grupo

deficiente apenas em VA. O DMT1 é a proteína envolvida na importação do Fe do lúmen intestinal ou no caso do fígado, é encontrada na membrana dos endossomos, responsável pela liberação do ferro endossomo, para o citoplasma do hepatócitos. Nos ratos deficientes em VA e ferro, foi também observados reduzidos níveis de ferro hepático sendo assim os autores concluíram que a regulação dos níveis hepáticos de transcrito desses dois transportadores, o DMT-1 e a FPN, em ratos ocorra predominantemente em nível pós-traducional, mediada pelos níveis intracelulares de ferro via complexo IRP/IRE.

O papel do hormônio hepcidina na modulação dos níveis de transcritos de DMT-1 ainda não está bem esclarecido, alguns autores observaram redução apenas nos níveis de transcritos de DMT-1, que contém IRE (Yamaji et al., 2004), em células caco, acrescidas de hepcidina.

No estudo realizado por Arruda e colaboradores (2009), os níveis altos de hepcidina hepática encontrados nos ratos DVA, não resultaram numa redução nos níveis de DMT-1 hepático, consubstanciando a tese de que o DMT-1 hepático sofre maior influência da regulação intracelular, mediado pelo o complexo IRP/IRE que a regulação sistêmica, mediada pela hepcidina (Arruda, et al., 2009). Ou seja, os níveis reduzidos de ferro, acarretariam na perda de ferro do grupamento 4Fe-4S da IRP, tornando-a capaz de ligar-se aos IRE localizado na região 3' do mRNA do DMT-1, promovendo sua estabilização e, conseqüentemente, aumentando da síntese de DMT-1.

No presente estudo, o comportamento diferenciado entre os níveis de ferro hepático e aqueles observados no baço e intestino, ao longo dos períodos de tratamento, pode ser devido à especificidade da resposta tecidual, a um mesmo estímulo celular. Esta influência tecido específica já foi relatada por Corradini e colaboradores (2005), quando foi possível observar que mutações na FPN aumentavam o acúmulo de ferro nos macrófagos, mas não nos enterócitos de modo que em condições de funcionamento normais, a ferroportina dos macrófagos e dos enterócitos podem responder de modo distinto aos estímulos recebidos, possivelmente por interações com outras proteínas de membrana específicas de cada órgão (Oates, 2007).

Perda de ferro (sangue) e/ou ingestão ou absorção inadequada de ferro de fontes dietéticas podem causar deficiência de ferro, que se manifesta comumente como anemia microcítica, VCM baixo. O hormônio hepcidina, secretado pelo fígado, atua de modo diferenciado nos diferentes *status* de Fe, de modo que na sobrecarga de ferro diminui os níveis de Fe do plasma, uma vez que internaliza e promove a degradação da FPN, presente nos enterócito e macrófagos, resultando menor absorção intestinal e reciclagem desse mineral no organismo. A expressão aumentada deste hormônio também induz à anemia. Essa situação é comum na anemia da doença crônica (Hentze, et al., 2010).

O desenvolvimento de hipoferremia ocorre rapidamente como resultado da diminuição da liberação de ferro pelos macrófagos e representa mecanismo de defesa contra patógenos dependentes de ferro (Hentze, et al., 2010).

Tem sido sugerido que os macrófagos respondem mais rapidamente à indução da hepcidina que os enterócitos (Oates, 2007; Rivera, et al., 2005). Nesse sentido, observa-se que a indução da hipoferremia seja provavelmente resultado do sequestro de Fe pelos macrófagos ao invés de queda da absorção pelo intestino. Porém, os autores que fomentam essa hipótese salientam a necessidade de mais estudos para sua confirmação.

A hipoferremia associada com a inflamação é provavelmente mediada pela hepcidina reduzindo o efluxo de Fe e a absorção pelos macrófagos e enterócitos respectivamente. Em trabalho realizado por Kemna e colaboradores (2005), uma injeção de lipopolisacarídeo em humanos resultou em aumento da excreção de hepcidina urinária, seguido de queda de Fe no plasma.

O lipopolissacarídeo, derivado da parede bacteriana, é conhecido por iniciar resposta inflamatória por interação com receptores na membrana dos hepatócitos (Oates, 2007; Schwabe et al., 2006) e macrófagos (Hoshino et al., 1999).

É importante ressaltar que a hipoferremia devida a processo inflamatório pode também influenciar a liberação da hepcidina em resposta a citocinas pró-inflamatórias (Oates, 2007; Nemeth E, 2004; (Andriopoulos, et al., 2006). Em resposta à presença de LPS e/ou citocinas específicas, há aumento a expressão de hepcidina levando a hipoferremia (Oates, 2007; Andriopoulos, et al., 2006; Kemna, et al., 2005). A

transcrição de hepcidina é ativada também por citocinas inflamatórias, especialmente interleucina 6 (Grotto, 2008).

Como observado nas figuras 24 g; h não houve alterações significativas nos níveis dos leucócitos e linfócitos respectivamente entre os grupos até o final do tratamento no T45, assim não se pode afirmar que esteja iniciando um processo inflamatório o que poderia dar início a ADC, no entanto se observa uma tendência de aumento desses dois índices em T30 no grupo DVA com relação ao grupo CT não mais apresentada no T45, sugerindo uma resposta de fase aguda no T30, o que poderia ser confirmada por análise de proteínas de fase aguda. Entre as proteínas de fase aguda, destaca-se a proteína C-reativa (PCR), uma vez que seu nível sérico é aumentado durante a inflamação aguda (Cançado, 2002).

Nos macrófagos, a exportação do ferro para o plasma ocorre também através da ferroportina (FPN). Essa reciclagem tem papel fundamental na homeostase sistêmica do ferro (Hentze, et al., 2010).

Os macrófagos fagocitam microorganismos e partículas estranhas por endocitose e desse modo, constituem poderoso mecanismo de defesa do organismo, principalmente, em processos inflamatórios que podem ter se originados devido a DVA sendo que essa deficiência pode ainda alterar os níveis da hematopoiese, uma vez que o gene responsável pela expressão do hormônio eritropoetina (EPO) possui elemento responsivo a ácido retinóico.

Assim, o ácido retinóico pode não só alterar a absorção e reciclagem de ferro, como também a síntese da molécula de hemoglobina.

7. Conclusão

Diante do que foi exposto a DVA em ratos durante 45 dias de tratamento não alterou o consumo ou ganho de peso dos animais. No entanto, esta deficiência resultou na alteração dos níveis de ferro no baço e intestino, e ainda, embora não tenha alterado os níveis de hemoglobina e ferritina, reduziu os valores de VCM e HCM evidenciando uma alteração na hematopoiese dos animais DVA. Esses resultados evidenciam um papel positivo da vitamina A na hematopoiese e revelam que os efeitos da DVA nos níveis de ferro em ratos são tecidos específicos e dependentes do tempo de depleção que estes ratos foram submetidos.

O presente trabalho atingiu os objetivos determinados e como perspectivas futura de investigação consideramos a necessidade da análise da expressão das proteínas DMT-1, FPN, hepcidina e hemojuvelina durante a depleção hepática de VA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameny MA, J Raila, Walzel E, Schweigert FJ. *Effect of Iron and/or Vitamin A Re-supplementation of Vitamin A and Iron Status of Rats After a Dietary Deficiency of Both Components*. Journal of Trace Elements. 16:175-178, 2002.
- Amine EK, Corey J, KC Hayes. *Comparative hematology during deficiencies of iron and vitamin A in the rat*. J. Nutr. 100(9):1033-1040, 1970.
- Anderson GJ. *Mechanisms of iron loading and toxicity*. Am J Hematol. 82: 1128-1131, 2007.
- Andriopoulos B, Pantopoulos K. *Hepcidin generated by hepatoma cells inhibits iron export from co-cultured THP 1 monocytes*. J. Hepatol. 44:1125-1131, 2006.
- Arens JF, Van Dorp DA. *Synthesis of some Compounds Possessing Vitamin A Activity*. Nature. 157:190-191, 1946.
- Arosio P, Levi S. *Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage*. Free Radical Biology & Medicine. 33:457-463, 2002.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. *A family of molecules for iron storage, antioxidation and more*. Biochimica et Biophysica Acta. 1790(7):589-599, 2008.
- Arredondo M, Martínez R, Núñez MT, Ruz M, Olivares M. *Inhibition of iron and copper uptake by iron, cooper and zinc*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 289: 981- 986, 2005.
- Arruda SF, Siqueira EMA, Valência FF. *Vitamina A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat*. 25:473-478, 2009.
- Baranowska I, Czrnicki K, Aleksandrowicz R. *The analysis of lead cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the Upper Silesian industrial district*. The Science of the Total Environment. 159(2):155-162, 1995.
- Barrreto M.L. *Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory-tract infection in young children in Brazil*. Lancet. 344:228-231, 1994.
- Batista Filho, M & TORRES, M.A.A. *Acesso a terra e situação nutricional em populações do semi-árido nordestino*. Rev. Pernambucana Desenv. 9(1):1982.

Batista Filho, M. Alimentação, nutrição & saúde. In: Epidemiologia & saúde (Z.M Rouquayrol & N. Almeida Filho, org.), 353-374, 5º Ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999.

Beard JL, Dawson H. *Iron metabolism: a comprehensive review*. Nutrition Reviews. 54(10): 295-317, 1996.

Beard JL, Connor JR. *Iron status and neural functioning*. Annu Rev Nutr. 23: 41-58, 2003.

Beitune Patrícia EI, Duarte G, Nunes Edson de M, Quintana SM, Vannucchi H. *Deficiência da vitamina a e associações clínicas: revisão*. ALAN. 54(4):355-363, 2003.

Bloem Martin W, Michael WI, Eric J van Agtmaal, Andries J Speek. *Vitamin A intervention: Short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism*. The American Journal of Clinical Nutrition. 51:76-79, 1990.

Blomhoff R, Green MH, Green JB, K. R T. & Norton. *Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, iron, and storage*. Physiol. Rev. 71(4):951-990, 1991.

Blomhoff R, Green M, Berg T, Norum KR. *Transport and sotage of Vitamin A*. Science. 250: 399-404, 1990.

Bovell-Benjamin AC, Ginard JX. *Novel approaches and application of contemporary Science and Nutrition practices in Iron Fortification Programs*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 43(4):379-400, 2003.

BRASIL. lei nº 11.346, de 15 setembro de 2006. Cria o sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional - SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. 1 Seção 1.9 Setembro 2006: 01.

Rev.bras.hematol.hemoter.,2002,24(2):127-136

Cançado RD. *Anemia de Doença Crônica*. Rev.Bras.hematol.hemoter. 24(2):127-136, 2002.

Cançado RD. *Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária*. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 31(3):192-202, 2009.

Carvalho Miriam Corrêa de, Emílio Carlos Elias Baracat, Valdemiro Carlos Sgarbieri. *Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro*. Segurança alimentar e nutricional. 13(2):54-63, 2006.

Casey JL. *Iron-responsive elements: regulatory RNA sequnces that control mRNA leves and translation*. Science. 240: 924-928, 1988.

- Castro J. *Geografia da fome (o dilema brasileiro: pão ou aço)*. 10a. Rio de Janeiro: Antares Achiamé, 1980.
- Christian P, West KP Jr, Khatry SK, Katz J, LeClerq SC, Kimbrough-Pradhan E, Dali SM & Shrestha SR. *Vitamin A or b-carotene supplementation reduce symptoms of illness in pregnant and lactating Nepali women*. J. Nutr. 130:2675-268, 2000.
- Conrad Marcel E, Jay N Umbreit. *Iron Absorption and transport-An Uptake*. American Journal of hematology. 64:287-298, 2000.
- Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG. *Rat duodenal iron-binding protein mobilferrin is a homologue of calreticulin*. Gastroenterology. 104:1700-4, 1993.
- Conrad ME, Weintraub LR, Sears DA, Crosby WH. *Absorption of hemoglobin iron*. Am. J. Physiol. 211:1123-30, 1996.
- Cristopher J. Cifelli, Ross AC . *All-trans-retinoic acid distribution and metabolism in vitamin A-marginal rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 291:195-202, 2006.
- David M. *Iron Imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation*. Am. J Physiol gastrointest Liver Physiol. 289: 631-635, 2005.
- Davila ME, Norris L, Cleary MP, Ross AC. *Vitamin A during lactation: relationship of maternal diet to milk vitamin A content and to the vitamin A status of lactating rats and their pups*. The Journal of nutrition. 115:1033-1041, 1985.
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan. J. *Hepcidin regulation: ironing out the details*. J Clin invest. 11:1755-1758, 2007.
- DeMaeyer E, M & Adiels-Tegman. *Prevalence of anaemia in the world*. World Health Statistics Quaterly, 38:303-316, 1985.
- Donovan A, Roy CN, Andrews NC. *The ins and outs of iron homeostasis*. Physiology. 21(2):115-123, 2006.
- Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. *Iron and metabolism in the new millennium*. Trends in Cell Biology. 17(2):93-100, 2006.
- Ellison J.B. *Intensive vitamin therapy in measles*. BMJ 2:708-711, 1932.
- Evans T. *Regulation of hematopoiesis by retinoid signalling*. Exp Hematol. 33: 105-161, 2005.
- Fawzi W.W, Chalmers Thomas C, Herrera M. Guillermo, Mosteller F. *Vitamin A supplementation and Child Mortality: A Meta-analysis*. JAMA. 269:898-903, 1993.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W. *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis.* Nat genet. 13:399-408, 1996.

Fillet G, Beguin Y, Baldelli L. *Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation.* Blood. 74: 844-851, 1989.

Fleming MD, Romano MA, MA Su, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. *Nramp2 is mutated in the anemic belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport.* Proc. Natl. Acad. Sci. 95:1148-53, 1998.

Floch MH, Kris K, Pitchumoni CS. *Netter's Gastroenterology.* 1. artmed, 2007.

Frazer DM, Anderson GJ. *The orchestration of body iron intake how and where do enterocytes receive their cues?* Blood Cells Mol Dis. 30:288-97, 2003.

Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Murphy TL. *A rapid decrease in the expression of DMT 1 and Dcytb but not Ireg 1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption.* Gut. 52:340-346, 2003.

Friedman SL, Arthur MJ. *Reversing Hepatic fibrosis.* Science Medicine. 8:194-205, 2002.

Fustinoni AM. *Vitamina A no leite materno: influência do estado nutricional de lactantes e da composição do leite.* Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Mestrado da Universidade de Brasília. 2008.

Ganz T, Nemeth E. *Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 290:G199-203, 2006.

Gardi C, Arezzini B, Fortino V, Comporti M. *Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells.* Biochem Pharmacol. 64(7):1139-1145, 2002.

Gardner R, Hodges R, Rucker R. *Fate of erythrocyte iron in vitamin A deficient rats.* Fed Proc. 38:762, 1979.

Ghenimi N, Beauvieux MC, Biran M. *Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders.* The journal of Nutrition. 139:696-702, 2009.

Grotto Helena Z.W. *Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo.* Rev. bras. hematol. hemoter. 25(3):169-172, 2003.

Grotto Helena Z.W. *Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase.* Ver. Bras. Hematol. Hemoter. 30(5):390-397, 2008.

- GROTTO Helena Z.W. *Fisiologia e metabolismo do ferro*. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV. *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature. 388:482-88, 1997.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4. New York, NY: Oxford University Press, 2007.
- Harrison E.H, Hussain M.M. *Mechanisms Involved in the intestinal Digestion and Absorption of Dietary Vitamin A*. The Journal of Nutrition. 131:1405-1408, 2001.
- Harrison P.M, Arosio P. *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim. Biophys. Acta. 1275:161-203, 1996.
- Health Organization World. *Vitamin A deficiency and iodine deficiency disorders: prevalence estimates for the global burden of disease. Micronutrient Deficiency Informationsystem (MDIS)*. Geneva, Switaerland: World Health Organization, 2001.
- Hentze M.W, Martina U. M, Nancy C. Andrews. *Balancing Acts: Molecular Control of Review*. Cell. 117:285-297, April, 2004.
- Hentze M. W, Martina U. M, Bruno Galy, Clara C. *Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism*. Cell. 142:24-38, July, 2010.
- Hermes Lima M. *Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals*. (New Jersey), n. 1: 319-366, 2004.
- Hodges RE, Rucker RB, Gardner RH. *Vitamin A deficiency and abnormal metabolism of iron*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 58-61, 1979.
- Hodges Rober E, Howerde E, John E. Canham. *Hematopoietic stutides in vitamin A deficiency*. The American Journal of Clinical Nutrition. 31:876-885, may, 1978.
- Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. *Essential Haematology*. 4. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- Hoffbrand AV, Pettit FE, Moss PAH. *Essential Haematology*. 5. Oxford (UK), 2006.
- Hollander D, Ruble PE Jr. *Betacarotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport*. Am. J. Physiol. Endocrinol Metab. 235: E686-E689, 1978.
- Hopkins FC. *The analyst and the medical man*. Analyst 31:385-404, 1906.

Idindili B, Masanja H, Urassa H, Bunini W, Aponte J.J. *Randomized controlled safety and efficacy trial of 2 vitamin A supplementation schedules in Tanzanian infants 1-3*. Am J Clin Nutr. 85(5):1312-1319, 2007.

Jelkmann W. *Molecular Biology of Erythropoietin*. Internal Medicine. 8:43, 2004.

Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, Hoeven H Van der, Swindels D. *Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS*. Blood. 106:1864-1866, 2005.

Kowssler KK. *The relation of anemia, primary and secondary, to vitamin A deficiency*. JAMA. 87(7):476-482, 1926.

Krause A, Neitz S, Mägert HJ, et al. *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett 480:147-50, 2000.

Lee JR. *Microcitose e as anemias associadas com a síntese e prejudicada da hemoglobina*. Hematologia Clínica (São Paulo: Mir): 884-919, 1998.

Leibold EA, Munro HN. *Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved in the 5' untranslated region of ferritin heavy-and light-subunit mRNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci. 241:2171-2175, 1988.

Lieu PT, Heiskala M, Peterson P, Yang Y. *The roles of iron in health and disease*. Molecular Aspects of Medicine. 22:1- 87, 2001.

Lolascon A. *Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis*. Haematologica. 94(3), 2009.

Lynch SR. *The impact of iron fortification on nutritional anaemia*. Best Pract res Clin Haematol. 18:333-346, 2005.

Mackenzie B, Michael D Garrick. *Gastrointest Liver Physiol*. Am J Physiol. 289:981-986, 2005.

Matsuura T, Gad MZ, Harrison ER. J nutr. 127: 218-24, 1997.

McKie Andrew T. *The role of Dcytb in iron metabolism: an update*. Biochemical Society. 36:1239–1241, 2008.

Mckie AT, Barrow D, Gladys O. Latunde-Dada. *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science. 291:1755-1759, 2001.

Mejia LA, Chew F. *Hematological effect of supplementation anemic children with vitamin A alone and in combination with iron*. Am J Clin Nutr. 48: 595-600, 1988.

- Mejia LA, Hodges RE, Rucker AB. *Role of vitamin A in the absorptino, retention and distribution of iron in the rat.* J Nutr. 109:129-137, 1979.
- Mejia LA, Hodges RE, Rucker RB. *Clinical signs anemia in vitamin A-deficient rats.* Am J Clin Nutr. 32:1439-1444, 1979.
- Miret S, Simpson RJ, Mckie A. *Physiology and molecular biology of dietary iron absorption.* Annual Review of Nutrition. 23:283-301, 2003.
- MM Nelson DL e Cox. *Lehninger - Principles of biochemistry.* 3^o edição. Worth New York NY, USA, 2000.
- Musib LC. *The absorption mechanism o retinoic acids in the intestinal epithelium.* thesis (Doctor of Philosophy) – Graduate school, University of Minnesota, p 205. 2000.
- Mwnari LA, Worsley A, Ryan P, Masika J. *Supplemental vitamin A improves anemia & growth in anemic school children in Tanzania.* J Nutr. 130:2691-2696, 2000.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK. *IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin.* J Clin Invest. 113:1271-6, 2004.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward. *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization.* Science. 306:2090-2092, 2004.
- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin.* Proc Natl Acad Sci USA. 99:4596-601, Apr, 2002.
- Nicolas G, et al. *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxya, and inflammation.* J. Clin. Invest. 110:1037-1044, 2002.
- Oates P.S. *The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption.* Histology and Histopathology. 22:791-804, 2007.
- Okano M, et al. *Retinoic acid up-regulates erythropoietin production in hepatoma cells and in vitamin A-depletion rats.* FEBS Lett. 349:229-233, 1994.
- Oliveira RJ, Benigna MJ, Miranda-Silva SM, M. M & Gonçalves Lola. *Magnitude, distribuição espacial e tendência da anemia em pré-escolares da Paraíba.* Revista de Saúde Pública. 36:26-32, 2002.
- Palace VP, Khaper, Qin Q, Singal PK. *Antioxidant potential of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease.* Free Radical Biology & Medicine. 26:746-761, 1999.

- Papanikolaou G, Pantopoulos K. *Iron Metabolism and toxicity*. Toxicology and Applied Pharmacology. 202:199-211, 2005.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem. 276:7806-7810, 2001.
- Parker RS. *Absorption, metabolism, and transport of carotenoids*. FASEB J. 10: 542-51, 1996.
- Piantedosi R, Ghyselinck N, Blaner WS, Vogel S. *Cellular Retinol-binding Protein Type III Needed for Retinoid Incorporation into Milk**. The Journal Biological Chemistry. 280(25):24286-24292, 2005.
- Ponka P. *Iron metabolism: Physiology and path physiology*. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine. 13:73-83, 2000.
- Prado M. *Hipovitaminose A em crianças de áreas rurais do semi-árido baiano*. Revista Saúde Pública. 29(4):295-300, 1995.
- Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC, Schmid R. *Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase*. J Clin Invest. 54: 1344-1352, 1974.
- 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*. The Journal of Nutrition. 123: 1939-1951, 1993.
- Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Sorensen OE, Ganz T. *Hepcidin excess induces the sequestration of iron exacerbates tumor-associated anemia*. Blood. 105:797-802, 2005.
- Roodenburg A.J.C, West C. E , Hovenier R, Beynen A.C. *Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency*. Br. J. Nutr. 75:623-636, 1996.
- Roodenburg AJC, West CE , Hovenier R, Beynen AC. *Comparasion between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron*. Br. J. Nutr. 71:687-699, 1994.
- Roodenburg AJC, West CE, Béguin Y, Dijk JE Van. *Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency*. J Nutr Biochem. 11:223-230, 2000.
- Rosales Francisco J, Jang Jing-Tsz, Erikson Keith M. Beard John L, Ross AC. *Iron Deficiency in Young Rats Alters the Distribution of Vitamin A between Plasma and Liver and between Hepatic Retinol and Retinyl Esters*. Journal of Nutrition. 129:1223-1228, 1999.

Rosenfeld R. Fundamentos do Hemograma: do laboratório à clínica. RJ: Guanabara Koogan, 2007.

Ross AC. *Retinoid Production and Catabolism: Role of Diet in Regulating Retinol Esterification and Retinoic Acid Oxidation*. The Journal of Nutrition. 2915-2965, 2003.

Roualt TA. *Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of ferritin messenger RNA*. Science 241:1207-1210, 1988.

Roy CN, Enns CA. *Iron homeostasis: new tales from the crypt*. mBlood. 96: 4020-4027, 2000.

Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. *High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern finnish men*. Circulation. 86: 806-811, 1992.

Santos Leonor Maria Pacheco. *Bibliografia sobre deficiência de micronutrientes no Brasil 1990-2000*. OPAS 2a - anemia. 2002.

Schroeder Stacy E, Manju B. Reddy, Kevin L. Schalinske. *Retinoic Acid Modulates Hepatic iron Homeostasis in Rats by Attenuating the RNA-Binding Activity of Iron Regulator Protein*. The Journal of Nutrition. 137:2686-2690, 2007.

Schechter AN. *Hemoglobin research and the origins of molecular medicine*. BLOOD, 112:10, 2008.

Semba RD, Bloem MW. *The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis*. European Journal of clinical Nutrition. 56: 271-281, 2002.

Semba RD, Kumwenda N, Taha TE. *Impact of vitamin A supplementation on anaemia and plasma erythropoietin concentrations in pregnant women: a controlled clinical trial*. Eur J Haematol. 66:389-395, 2001.

Senoo H. *Structure and function of hepatic stellate cells*. Medical Electron Microscopy. 37:3-15, 2004.

Shills ME, JA Olson, M Shirke, Ross AC. tratado de Nutrição moderna na Saúde e na doença. 9º. São Paulo: Manole, 2003.

Siqueira EMA, S. Arruda, Simone Gonçalves Almeida. *Papel adverso do ferro no organismo*. Comun Ciênc Saúde. 17(3):229-236, 2006.

Souza MS de L, Carvalho O dos Santos, Souza DWC. *Inter-relação entre parasitoses e hipovitaminose A. Infecção por schistosoma mansoni e o nível sérico de retinol de*

população de zona endêmica de Minas Gerais (BRASIL). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 30(4):281-287, jul-ago. 1988.

Souza WA, Vilas Boas OMGC. *A deficiência de vitamina a no Brasil: um panorama*. Pan American Journal of Public Health. 12:173-179, 2002.

Stephensen CB. *Vitamin A, infection, and immune function*. Rev Nutr. 21:167-192, 2001.

Strube Yi Ning J, John L Beard, 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. 3607-3615, 2002.

Suharno D, West CE, Muhilal D Karyadi, Hautvast GAJ. *Supplementation with vitamin A and iron for nutritional anaemia in pregnant women in West Java Indonesia*. Lancet. 342:1325-1328, 1993.

Sullivan K.M, Mei Z, Grummer-Strawn, Parvanta Ibrahim. *Haemoglobin adjustments to define anaemia*. Tropical Medicine and International Health. 13:1267-1271, 2008.

Surveys, Manual for Nutrition. Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense. 2. Washington, D.C, 1963.

Tanumihardjo SA, Penniston KL. *Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations*. J.Lipid Res. 43(2):350-355, 2002.

Tanumihardjo SA. *Assessing Vitamin A status: Past, Present and future*. J. Nutr. 134:290S-293S, 2004.

Trinder T, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. *Molecular pathogenesis of iron overload*. Gut. 51:290-295, 2002.

Underood BA. *Vitamin A deficiency disorders: international efforts to control a preventable*. the Journal of Nutrition. 134:231S-236S, 2004.

Verrastro T. *Hematologia Hemoterapia fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica. 1*. ATHENEU, 1998.

Walczyk T, Davidson L. *No enhancing effect of vitamin a on iron absorption in humans*. Am J Clin. 77:144-149, 2003.

Weintraub LR, Conrad ME, Crosby WH. *Absorption of hemoglobin iron by the rat*. Pro. Soc. Exp. Bio. Med. 120:840-43, 1965.

Weiss G. *Iron and anemia of chronic disease*. Kidney Int. 69:12-17, 1999.

Weng W, et al. *Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice.* *Biochemistry.* 38:4143-4149, 1999.

Wheby MS, Suttle GE, Ford KT. *3rd Intestinal absorption of hemoglobin iron.* *Gastroenterology.* May;58(5):647-654, 1970.

WHO/UNICEF/UNU/IDA. *Prevention, assessment and control. Report of a joint WHO/UNICEF/ONU consultation. Prevention, assessment and control. Report of a joint WHO/UNICEF/ONU consultation.* Geneva , Switzerland: World Health Organization, 1998.

Wolbach SB, Howe PR. *Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin.* *J. Exptl. Med.* 42:753, 1925.

Wolf G. *A history of vitamin A and retinoids.* *FASEB J.* 10:1102-1107, 1996.

Wosten M. *A signal transduction system that responds to extracellular iron.* *Cell.* 103:113-125, 2000.

Yeum, Kyung-jin, Robert MR. *Carotenoid Bioavailability and bioconversion.* *Annual Review of Nutrition.* 22:483-504, July, 2002.

Zhang AS, Xiong S, Tsukamoto H, Enns CA. *Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes.* *Blood.* 103:1509-1514, 2004.

Zimmermann MB, Hurrell RF. *Nutritional iron deficiency.* *Lancet.* 370:511-520, agosto, 2007.

Zimmermann MB, et al. *Vitamins A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron.* *Am J Clin Nutr* 84(3):580-586, 2006.

ANEXO

RAT FERRITIN

Immunoperoxidase Assay for Determination of FERRITIN in Rat Samples

Reagentes

- Diluente concentrado: 1 frasco com 50 mL de solução salina tampão fosfato (PBS) concentrada 5x, contendo soro albumina bovina, 0,25% *Tween* e 0,25% *Proclin 300* como conservante.
- Solução de lavagem concentrada: 1 frasco com 50 mL de solução salina tampão fosfato (PBS) concentrada 20x, contendo 1% *Tween*.
- Enzima-anticorpo conjugada 100x: 1 frasco com 200 uL de anticorpo anti-ferritina de rato conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) em um tampão estabilizador.
- Solução do substrato: 1 frasco com 12 mL de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio em tampão de ácido cítrico a pH 3.3.
- Solução de parada: 1 frasco com 12 mL de 0,3 M de ácido sulfúrico.
- Poços revestidos com anti-ferritina de rato: 12 tiras removíveis com 8 poços cada.
- Calibrador de ferritina de rato: 1 frasco com 1 mL.

Outros Materiais

- Pipetas de precisão (2 uL a 200 uL).
- Tubos de ensaio.
- "Aspirador" para microplaca.
- Água Milli-Q.
- Leitor de microplaca com capacidade de medir absorvância a 450 nm.
- Vidrarias para preparar reagentes e soluções tampão.
- Timer.
- Vortex.

Diluição das amostras de soro

Uma diluição 1:40 é apropriada para a maioria das amostras de soro. Para o preparo, transfira 10 uL para 390 uL de diluente. Homogenize.

Uma diluição menor ou maior pode ser necessária para as amostras que produzem resultados fora do intervalo da curva padrão.

Preparo dos reagentes

- Diluente concentrado 5x: Diluir na proporção 1:5 com água Milli-Q.

Após preparo, a solução permanece estável por 1 semana (armazenar a 4-8°C).

- Solução de lavagem concentrada 20x: Diluir na proporção 1:20 com água Milli-Q. A formação de cristais na solução concentrada é comum quando a temperatura de armazenamento é baixa. Aquecer o concentrado a 30-35°C antes da diluição pode dissolver os cristais.

Após preparo, a solução permanece estável por 1 semana (armazenar a 4-8°C).

- Enzima-anticorpo conjugada 100x: a quantidade necessária para trabalhar em cada microplaca é preparada adicionando 100 uL da solução conjugada a 10 mL do Diluente. Homogenize com cuidado.

Diluir imediatamente antes de usar.

- Solução do substrato: pronta para uso.
- Solução de parada: pronta para uso.
- Poços revestidos com anti-ferritina de rato: prontos para uso.

Armazenar na embalagem original, selada, com o pacote de dessecante.

- Calibrador de ferritina de rato: Deve ser aliqüotada e congelada. Estando concentrado a 2,7 ug/mL, deve ser diluído de acordo com o esquema abaixo. Homogenize com cuidado a cada passo.

400 ng/mL	200 ng/mL	100 ng/mL	50 ng/mL	25 ng/mL	12,5 ng/mL
Padrões (1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)

Todos dos padrões (2) a (6) contendo 0,3 mL do Diluente cada.

Padrão	ng/mL	Quantidade	Diluente 1x
1	400	100 uL calibrador ferritina	575 uL
2	200	0,3 mL padrão 1	0,3 mL
3	100	0,3 mL padrão 2	0,3 mL
4	50	0,3 mL padrão 3	0,3 mL
5	25	0,3 mL padrão 4	0,3 mL
6	12,5	0,3 mL padrão 5	0,3 mL

Procedimento

- Adicione 100 uL do diluente nos poços 1A e 1 B, que servirão como “branco”.
- Pipete 100 uL de cada um dos padrões nos poços 1B e 2B (padrão 1) aos poços 1G e 2G (padrão 6).
- Pipete 100 uL da amostra de soro nos poços 1H e 2H. As próximas amostras irão para os poços 3A e 4A, 3B e 4B, e assim por diante.
- Incube por 1 hora à temperatura ambiente, mantendo a placa nivelada.
- Aspire o conteúdo dos poços.
- Preencha completamente cada poço com solução de lavagem 1x e aspire. Repita este procedimento 3x, totalizando 4 lavagens. Para a lavagem manual, preencha completamente cada poço com solução de lavagem 1x, inverta a placa despejando o conteúdo num recipiente de descarte

(agitando suavemente). Utilize papel absorvente para remover a solução residual. Repita este procedimento 3x, totalizando 4 lavagens.

- Pipete 100 uL da enzima-anticorpo conjugada 1x em cada poço.

Incube por 10 minutos à temperatura ambiente.

- Aspire ao conteúdo dos poços.
- Preencha completamente cada poço com solução de lavagem 1x e aspire. Repita este procedimento 3x, totalizando 4 lavagens. Para a lavagem manual, preencha completamente cada poço com solução de lavagem 1x, inverta a placa despejando o conteúdo num recipiente de descarte (agitando suavemente). Utilize papel absorvente para remover a solução residual. Repita este procedimento 3x, totalizando 4 lavagens.
- Pipete 100 uL da solução do substrato TMB em cada poço.
- Incube por 10 minutos à temperatura ambiente.
- Adicione 100 uL da solução de parada em cada poço.
- Determine a absorbância a 450 nm (até 2 horas após a adição da solução de parada).

Cálculo dos Resultados:

Subtraia dos valores a média do “branco”. Trace a curva padrão, com a concentração padrão no eixo-x e absorbância no eixo-y. Corrija o fator de diluição da amostra para chegar à concentração de ferritina na amostra original.