

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

“Efeito de deficiência de vitamina A na biodisponibilidade de ferro”.

Azadeh Mehdad

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

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

BRASÍLIA
Distrito Federal - Brasil
Março-2007

“Efeito de deficiência de vitamina A na biodisponibilidade de ferro”.

Azadeh Mehdad

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

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

BANCA EXAMINADORA

APROVADO EM:- --- /-----/----

Profa.Dra.Egle Machado de Almeida Siqueira
(Orientadora- Departamento de Nutrição - UNB)

Profa.Dra.Marina Kiyomi Ito
(Membro-Departamento de Nutrição - UNB)

Profa.Dra.Adriana Pederneiras Rebelo da Silva
(Membro-Departamento de Nutrição - UCB)

Profa.Dra.Sandra Fernandes Arruda
(Membro-Departamento de Nutrição - UNB)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela dedicação, apoio e incentivo;

Ao meu esposo, pelo apoio e companheirismo;

À Profa. Egle M.A. Siqueira pela oportunidade, orientação, apoio, confiança e exemplo de profissionalismo;

À Profa. Sandra F. Arruda pelo apoio, sugestões e exemplo de profissionalismo;

Às amigas Alinne e Adriana pela amizade e discussões;

Aos amigos do laboratório de Biofísica pela amizade e convívio;

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudo;

À Deus , por tudo.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURA	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1.INTRODUÇÃO	12
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1.Vitamina A	14
2.1.1. Metabolismo e Função	14
2.1.2. Deficiência de Vitamina A	17
2.2.Ferro	20
2.2.1. Metabolismo e Função	20
2.3. Interação entre a vitamina A e o Ferro	26
3.OBJETIVOS	28
3.1.Objetivo Geral	28
3.2.Objetivos Específicos	28
4.MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Animais	29
4.2. Tratamento	29
4.3. Parâmetros Analisados	31
4.3.1.Hemograma	31
4.3.2.Teor de ferro nas dietas, fezes e tecidos	31
4.3.3.Determinação de índices de ferro	32
4.3.4.Determinação de retinol hepático	33

4.3.5.Determinação de consumo dietético	34
4.3.6.Determinação de eficiência da dieta	34
4.4.Analise Estatística	34
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
Artigo	36
6.CONCLUSÃO	53
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Lista de Abreviaturas

VA	Vitamina A
RE	Éster de Retinil
LART	Lecithin Retinol Acyltransferase
RBP	Retinol Binding Protein
Fe	Ferro
Hb	Hemoglobina
Tf	Transferrina
TfR	Receptores de Transferrina
HRE	Eficiência da regeneração da hemoglobina
Dcytb	Duodenal cytochrome B
DMT-1	Divalent Metal Transport 1
IREG-1	Duodenal iron - regulated transporter -1
EROs	Espécies reativas de oxigênio
$O_2^{\bullet -}$	Superoxido
O ₂	Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
\bullet OH	Radical hidroxil
EDTA	Etileno diamino tetra-acético sódico
HNO ₃	ácido nítrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
KOH	Hidróxido de potássio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

Lista de Tabelas

- Table 1:** Modified AIN93G diet for rodents used in the study of vitamin A and Iron Deficiency; **41**
- Table 2:** Mean \pm SD of the weight gain, food intake, feed efficiency and hepatic retinol in the three groups of this study, after 57 days; **44**
- Table 3:** Diet iron content, iron intake, iron excreted in feces, iron balance and relative iron absorption in rats of different groups for 57 days; **45**
- Table 4:** Body weights, hemoglobin and hemoglobin iron content in the control group, vitamin A deficient group ($\bar{V}A$) and iron/Vitamin A deficient group (\bar{Fe}/VA), after 57 days of treatment; **46**
- Table 5:** Body weight, hemoglobin and hemoglobin iron content gain, HRE and iron utilization in the rats from the control, ($\bar{V}A$) and (\bar{Fe}/VA) groups after 57 days; **47**
- Table 6:** Liver and spleen iron concentration in rats after the 57 days; **47**

O efeito da deficiência de vitamina A na biodisponibilidade de ferro.

Resumo

A deficiência de vitamina A altera o status de ferro resultando o acúmulo de ferro nos tecidos. Nos países em desenvolvimento a deficiência de vitamina A e a deficiência de ferro aparecem como importantes problemas de saúde pública. Estudos sugerem a existência de uma relação sinérgica entre o metabolismo da vitamina A e do ferro. O presente estudo investigou o efeito da deficiência de vitamina A na biodisponibilidade de ferro. Para tanto, ratos Wistar foram separados em três grupos e tratados por 57 dias com a dieta AIN-93G, contendo: 35 mg de Ferro e 4,000 UI de vitamina A por Kg de dieta, grupo controle (+VA +Fe); ou a dieta AIN-93G contendo 35 mg de ferro, sem qualquer fonte de vitamina A, grupo (-VA +Fe); ou AIN-93G, contendo apenas 12,2 mg/Kg de dieta de ferro e sem fonte de vitamina A, grupo (-VA - Fe). A biodisponibilidade de ferro foi avaliada pela Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE), estimado pelo conteúdo de ferro na hemoglobina e o ferro ingerido. A dieta (-VA - Fe) mostrou uma biodisponibilidade media maior do que o grupo Controle (P = 0.0056). O grupo que recebeu a dieta (-VA +Fe) apresentou a maior concentração de hemoglobina e a maior utilização de ferro que os outros dois grupos, porém não foi observada diferença significativa na HRE entre o grupo deficiente de vitamina A e o controle. Estes resultados mostraram que a deficiência de vitamina A afeta a utilização de ferro; resultando no acúmulo de ferro nos tecidos e aumento na concentração de hemoglobina; sugerindo que a vitamina A pode regular a biossíntese de proteínas envolvida no homestase de ferro.

Palavra Chave: deficiência de Vitamina A, hemoglobina, biodisponibilidade, ferro, ratos.

The effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability in rats.

Abstract

Vitamin A deficiency alters iron status leading to an iron accumulation in tissues. In the developing countries, vitamin A deficiency and anemia appear as important problem of public health. Previous studies suggest the existence of a synergic relation between vitamin A metabolism and iron. The present study investigates the effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability. For that, Wistar rats were separated in three groups and they were treated, for 57 days, with the AIN-G93 diet, containing 35 mg of iron and 4000 IU of vitamin A per Kg of the diet, Control group (+Fe + VA); or the AIN-G93 with 35 mg of iron per Kg of diet, without any source of vitamin A, group (-VA + Fe); or the AIN-G93 with only 12.2 mg iron/Kg of diet, without any source of vitamin A (-Fe -VA). Iron bioavailability was evaluated by Hemoglobin Regeneration Efficiency (HRE), which was estimated by hemoglobin iron content and iron intake. The (-Fe -VA) diet showed higher iron bioavailability than the control diet (P = 0.0056), while the group who fed (-VA) diet showed higher hemoglobin concentration and higher iron utilization than the other groups, but no significant difference on HRE was observed between (-VA) and control group. These results showed that vitamin A deficiency affects iron utilization; resulting in iron accumulation in tissues and increases hemoglobin concentration, suggesting that vitamin A deficiency can regulate the expression of proteins involved in the iron metabolism.

KEY WORDS: Vitamin A deficiency, iron, bioavailability, hemoglobin, rat

Estrutura da Dissertação

Esta dissertação será apresentada da seguinte forma: uma parte inicial composta por introdução, revisão bibliográfica, objetivos gerais e específicos e metodologia. Os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigo que foi submetido para a revista “Annals of Nutrition & Metabolism”.

Ao final será apresentada a conclusão deste estudo.

1. Introdução.

Entre as deficiências nutricionais de maior impacto sobre a saúde pública figuram a anemia, e a deficiência de vitamina A. Nos países em desenvolvimento, a cegueira noturna compreende o sintoma clínico mais comum da deficiência de vitamina A. Estima-se que nestes países, 43 milhões de crianças menores de cinco anos de idade apresentam deficiência de vitamina A e 140 a 250 milhões de pessoas apresentam risco desta deficiência (1,2).

Estudos publicados nas duas últimas décadas têm evidenciado uma interação entre a deficiência de vitamina A e o status de ferro no organismo humano (3). Alguns estudos são contraditórios quanto à presença de anemia em ratos deficientes em vitamina A, entretanto, há consenso quanto ao acúmulo de ferro em tecidos de ratos deficientes em vitamina A (4). Devido ao potencial oxidante do ferro, o acúmulo deste nos tecidos pode induzir o estresse oxidativo celular, uma vez que o ferro participa na catálise de reações produtoras das espécies reativas de oxigênio (EROS), como H_2O_2 , e conseqüentemente, de radicais livres como o hidroxil (HO^{\bullet}), como na reação de Fenton (5). O estresse oxidativo tem sido associado a processos patológicos como a diabetes, doenças cardiovasculares, neuro-degenerativos e vários outros processos patológicos associados a danos oxidativos catalisados pelo ferro (6). Desta forma, a deficiência de vitamina A poderia predispor o organismo a um aumento de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo (7).

A associação entre os estado nutricional de ferro e a vitamina A tem sido amplamente divulgado, entretanto, não se conhece ainda os mecanismos de interação entre a vitamina A e o ferro no organismo.

O presente estudo visou investigar o efeito da deficiência da vitamina A na biodisponibilidade do ferro dietético, em ratos.

2. Revisão Bibliográfica.

2.1. Vitamina A

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel, sem valor energético, que não é sintetizada pelo organismo humano, podendo ser fornecida a partir dos alimentos, na forma de carotenóides pró-vitamina A, provenientes dos alimentos de origem vegetal ou na forma de retinol ou vitamina A pré-formada, nos alimentos de origem animal (8). Na maioria dos produtos, a fortificação é feita com a utilização de carotenóides pelo fato de apresentarem toxicidade menor do que a vitamina A. O armazenamento da vitamina A se dá predominante no fígado.

2.1.1. Metabolismo e Função.

O primeiro relato científico sobre a presença de um composto abundante e essencial ao organismo na gema do ovo foi publicada em 1909 por Stepp (9). Mais tarde outros autores verificaram que alguns compostos presentes nos vegetais verdes também tinham esta propriedade, os denominados carotenóides. Embora a vitamina A tenha sido uma das primeiras vitaminas a ser identificada, a compreensão de seus efeitos fisiológicos e mecanismos de ação permanecem obscuros. Nos países em desenvolvimento a deficiência de vitamina A aparece como importante problema de saúde pública, principalmente nas crianças. A cegueira noturna compreende o sintoma clínico mais comum. Estima-se que 43 milhões de crianças menores de 5 anos de

idade apresentam deficiência de vitamina A nos países em desenvolvimento, e 140 a 250 milhões de pessoas possuem risco de deficiência de vitamina A (1,2).

A vitamina A, encontrada nos alimentos de origem animal, ocorre na forma de éster de retinil, molécula de retinol esterificada a uma molécula de ácido graxo. Os ésteres de retinil, o retinol e o retinal são formas interconvertíveis que podem ser convertidas a ácido retinóico. As necessidades de vitamina A podem ser supridas pelas três primeiras formas. Embora estas formas possam ser convertidas em ácido retinóico, este último não pode ser reduzido à forma retinal. A vitamina A é armazenada no fígado na sua forma esterificada, ou seja, retinil. O ácido retinóico não pode ser armazenado no fígado, uma vez que este não possui grupo hidroxil necessário para a sua esterificação com os ácidos graxos (10).

Nos alimentos de origem vegetal é encontrada na forma pró-vitamínica, carotenóides precursores de vitamina A. Existem cerca de 600 formas de carotenóides já identificadas, porém, apenas cerca de 50 destas são metabolizadas pelos organismos vivos como precursores de vitamina A. O todo-trans- β -caroteno constitui a forma pró-vitamínica predominante nos vegetais, outras formas pró-vitamínicas, também encontradas nos vegetais são a criptoxantina e o α -caroteno (11), sendo o β -caroteno a forma mais importante, como fonte de vitamina A (10).

Generalizando, a vitamina A e suas varias formas desempenham três diferentes funções (12,13):

1. Diferenciação celular;
2. Desenvolvimento embrionário;
3. Ciclo visual;

As duas primeiras funções são desempenhadas apenas pelo ácido retinóico, enquanto o retinal está associado à visão. Com exceção da retina, o retinal está presente em concentrações extremamente baixas por ser convertido facilmente em ácido retinóico, que é capaz de regular a transcrição de alguns genes no núcleo celular (14,15).

A absorção dos carotenóides e da vitamina A começa com a liberação destes da matriz do alimento e a incorporação em micelas compostas de sais biliares, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolipídios. A quantidade de carotenóides incorporados às vesículas depende tanto de sua polaridade quanto da composição dos ácidos graxos da micela. Após incorporação nas micelas, os carotenóides são absorvidos por difusão passiva no duodeno, sendo, portanto, sua biodisponibilidade influenciada principalmente pela eficiência do organismo na liberação destes da matriz do alimento e por sua associação com os diferentes lipídios da dieta. Essencialmente todos os ésteres de retinil ingeridos são convertidos a retinol no lúmen intestinal onde serão absorvidos pelos enterócitos (10). O retinol aparece no enterócito associado à proteína celular ligante de retinol, sendo então esterificado a éster de retinil (RE) pela enzima lecitina

retinolaciltransferase (LART), e incorporado aos quilomícrons. Os carotenóides pró-vitamina A absorvidos diretamente, como β -caroteno, α -caroteno e a criptoxantina, são clivados na mucosa intestinal a retinal, reduzidos a retinol e depois transformados a éster de retinil. Sendo que tanto os carotenóides intactos, como aqueles convertidos a éster de retinil são incorporados aos quilomícrons, os quais são exocitados no sistema linfático para então caírem na corrente sanguínea, onde sofrem remoção dos triacilgliceróis. Os ésteres de retinil presentes nos quilomícrons remanescentes são absorvidos pelo fígado e armazenados nas células “estelate”. Quando há demanda de vitamina A pelos tecidos, os ésteres de retinil são convertidos a retinol nas células parênquimas do fígado, sendo transportados aos tecidos alvos, através do plasma, ligados à proteína ligante de retinol (RBP). Nos mamíferos, cerca de 50 a 80% de toda vitamina A é armazenada no fígado (10,14,16). Após absorção pelos tecidos alvos, o retinol pode ser oxidado a retinal e, subseqüentemente, ácido retinóico. Alguns tecidos são capazes de produzir ácido retinóico diretamente do β -caroteno não precisando passar necessariamente a retinol ou retinal (14).

2.1.2. Deficiência de vitamina A

A deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública em mais de 118 países, afetando mais de 140 milhões de crianças em idade pré-escolar, em todo mundo (1).

A deficiência de vitamina A pode ser causada por dois fatores principais: Uma prolongada ingestão inadequada de vitamina A (incapaz de

satisfazer as necessidades orgânicas), tanto em crianças quanto em indivíduos adultos, prejudicando as funções fisiológicas, ainda que os sinais de carência não sejam evidentes (17). Episódios infecciosos freqüentes podem ser resultantes da deficiência de vitamina A (18). Segundo Scrimshaw et al., 1968 (19), citado por Darlow & Graham, 2000, nenhuma outra deficiência nutricional apresenta maior sinergismo com doenças infecciosas que a carência de vitamina A, pois tal condição nutricional confere uma susceptibilidade maior às infecções.

A prevenção da deficiência de vitamina A pode ser obtida por meio da suplementação medicamentosa, da fortificação de alimentos ou, ainda, por meio de diversificação da dieta.

O fato da vitamina A ser armazenada no fígado, permite que a suplementação por cápsulas seja eficaz na prevenção e combate da hipovitaminose A. No entanto, apesar do custo com a suplementação ser reduzido em relação à fortificação de alimentos, essa é uma medida de curto prazo. A fortificação de alimentos tem sido utilizada com sucesso em áreas onde a vitamina A é escassa, como no caso da fortificação do açúcar, na Guatemala (20) e do glutamato de sódio, na Indonésia (21). Porém, a fortificação dos alimentos é considerada uma medida em médio prazo e representa um alto custo/benefício.

A obtenção da vitamina A sintética, possibilitou a fortificação de alimentos e a disponibilidade de suplementos em países em desenvolvimentos,

resultando numa redução significativa desta deficiência nestes países. No entanto, a deficiência de vitamina A continua um problema de saúde pública.

Entre as patologias associadas à deficiência de vitamina A está a anemia ferropriva (22).

2.2. Ferro

O ferro é um elemento químico, metálico, necessário para vários processos vitais nos seres vivos. Este elemento existe em abundância na crosta terrestre, mas sua absorção pelo organismo humano é dificultada pelo mecanismo protetor contra a intoxicação celular por excesso de ferro. A maior parte do ferro corporal está ligada à hemoglobina no sangue, ou a mioglobina nos músculos; outra parte está ligada às enzimas no interior de cada célula do organismo. O ferro não é excretado na urina, sendo, em grande parte, reaproveitado e, por isso, a necessidade individual de ferro deve ser suficiente para repor apenas as perdas diárias do organismo (1mg/d) (23).

2.2.1.METABOLISMO E FUNÇÃO

O ferro é necessário para todas as células, prevalentemente em dois estados de oxidação no organismo, ferroso [Fe^{+2}] e férrico [Fe^{+3}], que respectivamente, podem doar ou receber elétrons facilmente. O ferro é transportado, entre os sítios de absorção, armazenamento e utilização, por uma glicoproteína plasmática denominada de transferrina (Tf), que se liga firmemente e de forma reversível ao ferro. A transferrina é reconhecida por receptores de membrana celulares específicos (TfR), cruciais para a aquisição de ferro pelas células. Após a liberação intracelular do complexo Tf-TfR, o ferro penetra em compartimentos funcionais ou é armazenado nas células associado à molécula de ferritina (4000 átomos de ferro por molécula) (23).

Normalmente, cerca de 60-70% do ferro do corpo humano está

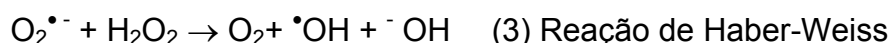
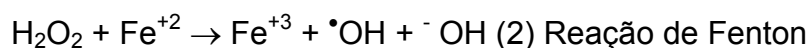
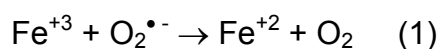
presente na hemoglobina dos eritrócitos circulantes, 10% na mioglobina, citocromo e outras enzimas e, cerca de 20-30% é armazenado na ferritina. A ferritina é uma proteína cuja única função conhecida é o seqüestro e armazenamento do ferro (23).

A deficiência ou o excesso de ferro pode causar distúrbios funcionais. A deficiência de ferro é sem dúvida a causa mais comum da anemia na maior parte do mundo (22). A sintomatologia da deficiência de ferro inclui não somente anemia como também sintomas fora dos eritrócitos, tais como estomatites, glossites, etc. O tratamento da deficiência de ferro torna-se um desafio real nos países em desenvolvimento com alta incidência de deficiência em ferro, onde o maior problema é a produção e distribuição de alimentos fortificados para a população. O excesso de um importante nutriente no organismo pode-se tornar ainda pior que a sua deficiência, e isto é exemplificado pela sobrecarga de ferro no organismo (24).

O metabolismo de ferro em humanos é caracterizado por uma permuta limitada de ferro endógeno e da dieta e por uma eficiente reutilização dos recursos internos. Devido à limitação da capacidade do organismo em excretar ferro, a sobrecarga de ferro pode ser desenvolvida como resultado de uma hiper-absorção prolongada de ferro da dieta, por administração parenteral de ferro (via transfusão de sangue), ou por combinação dos dois fatores. Pacientes com sobrecarga de ferro acumulam excessivas quantidades deste em vários órgãos, inclusive no fígado, pâncreas, e coração e, podendo associar com cirrose hepática, diabetes e disfunção cardíaca. O excesso de ferro no

organismo é extremamente perigoso, no entanto, sua escassez é incompatível com a vida, por ser essencial em diversas funções metabólicas nos seres vivos. Por outro lado, devido a sua alta reatividade, o ferro está envolvido com a formação de radicais livres via reação de Fenton (23). Estes radicais estão relacionadas com os processos patológicos e de envelhecimento (24).

O ferro acumulado nos tecidos, células e organelas, principalmente aquele associado ao pool lábil, atua como catalisador na reação de Fenton (reação 2) potencializando a toxicidade do oxigênio através da geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (reação 2), considerado o mais reativo das EROs (7).



No início do século passado, os mecanismos de regulação molecular da homeostase do ferro no organismo vêm sendo desvendados. Desde 1937 quando foi proposto que o ferro dietético regulava o ferro corporal (25) até meados dos anos noventa, houve pouco progresso na identificação dos mecanismos envolvidos na regulação do ferro corporal (26).

Atualmente, sabe-se que diversas proteínas estão envolvidas no metabolismo e manutenção do status de ferro no organismo. A síntese destas proteínas está submetida a um fino mecanismo de regulação que resulta na manutenção da homeostase intracelular de ferro. A forma predominante do ferro dietético é a Fe^{+3} . Os dois sistemas de captação, denominados hêmico e não-hêmico, requerem a redução de Fe^{+3} a Fe^{+2} . No primeiro sistema, um receptor hêmico, presente na membrana apical do enterócito, internaliza o grupo heme que é transportado para o retículo endoplasmático (RE) onde, por ação das hemoxigenases microsossomais, é degradada a biliverdina e CO, liberando Fe^{+2} , que segue, então, a mesma via que o ferro inorgânico (5), descrita a seguir.

Um ponto chave na regulação da homeostase de ferro é a absorção deste no lúmen intestinal. Na membrana basolateral dos enterócitos imaturos, presentes nas criptas intestinais, existem receptores de transferrina e a proteína HFE, que atuam como sensores do status de ferro no organismo. Na membrana apical dos enterócitos maduros, situados nos microvilos intestinais, encontram-se predominantemente a DMT1, Dcytb e a IREG-1 (que está na membrana basolateral), que são as proteínas, associadas à absorção de ferro intestinal. O Fe^{+3} inorgânico é reduzido por uma enzima, ferro redutase duodenal, conhecida como Dcytb, e captado pelo enterócito, através do transportador de cátions divalentes (DMT-1). Uma vez dentro da célula, o Fe^{+2} é incorporado à molécula de ferritina e armazenado na forma de Fe^{+3} , ou é transportado até a membrana basolateral, por uma proteína semelhante a transferrina. Na membrana basolateral, a difusão do ferro é facilitada pelo

transportador transmembrânico (IREG-1 ou ferroportina). Uma outra proteína de membrana, hephaestina, promove a oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} que nesta forma, liga-se à proteína transportadora de ferro, apotransferrina, que o transporta às células alvo, com receptores para transferrina através da corrente sanguínea. A associação do ferro com proteínas, dentro do sistema biológico protege as células contra possíveis danos oxidativos, catalisados por ferro e, ainda, facilita a captação deste pelos demais tecidos (5,27).

Na deficiência de ferro é observado um aumento significativo nos níveis de mRNA de DMT1 e do Dcytb duodenal, sugerindo que os genes DMT1 e Dcytb são regulados em sincronia (28,29), diferentemente do gene IREG-1, envolvido na transferência basolateral do ferro. Em camundongos com deficiência crônica de ferro foi observado um aumento de 10 vezes nos níveis de mRNA de DMT1 e Dcytb, e apenas de 2-3 vezes para o IREG-1 (30,31,32).

De maneira geral, a regulação das proteínas sensores e de transporte de ferro é responsável pela habilidade do intestino adaptar a absorção de ferro de acordo com o status de ferro do organismo. Este processo de regulação é bastante eficiente dentro de uma ampla faixa de concentração de ferro na dieta, porém há limites para as dietas com concentrações excessivas ou muito deficientes de ferro.

Deficiência de ferro é um problema biológico e se manifesta quando a quantidade ingerida não é suficiente. A deficiência de ferro é responsável por 400 a 500 milhões de casos de anemia entre população global. Porém, o

excesso de ferro também é prejudicial ao organismo, particularmente nos indivíduos que possuem disfunção ou ferropatias como na hemochromatosis, que é um dos distúrbios genéticos mais freqüentes. Por isso não há surpresa que o ferro seja uma das maiores preocupação no saúde e bem estar de ser humano. No organismo, a carência de ferro se instala de forma gradual e progressiva passando por três estágios: depleção de ferro na dieta, deficiência de ferro e anemia ferropriva (33).

2.3. Interação entre Vitamina A e o Ferro:

Desde 1920, uma associação entre a deficiência de vitamina A e anemia ou outros índices de baixo status de ferro foram reportados em humanos e em animais (34,35,36). Recentemente, alguns estudos sugerem a existência de um sinergismo entre o metabolismo de vitamina A e a homeostase de ferro no organismo (37,38,39). A hipovitaminose A promove o acúmulo do ferro nos tecidos e, conseqüentemente, aumenta a sua disponibilidade para a catálise de reações de oxidação, como a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). O fenótipo apresentado na deficiência de vitamina A é similar ao de indivíduos portadores de hemocromatose, ou seja, acúmulo de ferro em tecidos. Estes indivíduos apresentam freqüentemente complicações como cirrose hepática, cardiomiopatia, diabetes e outras, associados os danos oxidativos catalisados por ferro (6).

A associação entre o status de vitamina A e metabolismo de ferro foi relatado pela primeira vez em 1978 por Hodge et al (40). A vitamina A é necessária para eritropoiese. Nos indivíduos que sofrem de deficiência de vitamina A, o ferro não é incorporado pelas células vermelhas do sangue como em indivíduos normais (3). Uma correlação positiva entre os valores de retinol sérico e hemoglobina foi observada em crianças de alguns países como a Índia (41), Guatemala (42), Indonésia (21), África do Sul (43) e em mulheres grávidas na Indonésia (44). A suplementação com ferro e vitamina A aumentou significativamente a concentração de hemoglobina em crianças (45) e em mulheres grávidas e anêmicas quando comparada à suplementação apenas

com ferro. (46,47).

Vários mecanismos têm sido relatados para explicar esta interação (3). Bolem e colaboradores (48) sugeriram que a deficiência de vitamina A pode diminuir a síntese de transferrina e assim reduzir o transporte de ferro. Beynen (43) e Sijtsma (44) sugeriram que a deficiência de vitamina A prejudica a captação de ferro pela medula óssea. Roodenburg (38) verificou que esta deficiência é resultado de uma eritropoiese ineficiente e Meija (49) mostrou que a deficiência de vitamina A afeta a mobilização de ferro armazenado.

Alternativamente, foi sugerido que a alta prevalência de infecções, que freqüentemente são detectados durante a deficiência de vitamina A, sejam indiretamente responsáveis pela baixa concentração de hemoglobina, já que o organismo seqüestra o ferro durante o processo de infecções (50).

Arruda e colaboradores, em um recente estudo observaram que ratos com deficiência de vitamina A apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo, e que o estresse foi reduzido assim que os ratos receberam uma fonte de vitamina A. Os autores observaram ainda que o aumento de danos oxidativos nos ratos com deficiência de vitamina A foi acompanhado de um acúmulo de ferro nos tecidos (4). Estes resultados consubstanciam outros achados que mostrou que a vitamina A de alguma maneira afeta o metabolismo de ferro e ainda, que a vitamina A é um antioxidante, cujo mecanismo de ação pode ser mediado pela regulação do status de ferro no organismo.

3. Objetivos:

3.1. Objetivo Geral

➤ Verificar o efeito da deficiência de vitamina A na biodisponibilidade de ferro nos ratos;

3.2. Objetivos específicos

➤ Determinar a concentração de ferro no fígado e baço de ratos deficientes em vitamina A e deficientes ou não em ferro;

➤ Determinar a concentração de hemoglobina em ratos deficientes de vitamina A;

➤ Determinar a concentração de retinol hepático;

➤ Verificar o efeito de vitamina A na absorção de ferro;

➤ Verificar o possível efeito da deficiência de vitamina A no ganho de peso; no consumo da dieta e na eficiência da dieta;

➤ Verificar o efeito da vitamina A na biodisponibilidade e na utilização do ferro;

4. Materiais e métodos:

4.1. Animais:

18 ratos machos (Wistar), recém desmamados (21 dias) foram adquiridos do Biotério Central da UNB, Brasília, Brasil. Os ratos foram distribuídos em gaiolas individuais, com bandeja revestida de filó para a coleta das sobras de dieta e fezes. As gaiolas foram mantidas no biotério do laboratório de Biofísica com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz / escuro de 12 horas, sendo a dieta oferecida no período das 16h às 8h. Durante o experimento os ratos tiveram livre acesso à água mineral. O ganho ponderal foi verificado semanalmente e a quantidade de dieta ingerida foi registrada diariamente.

4.2. Tratamento:

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos e, então, submetidos às seguintes dietas, por um período de 57 dias:

✱ O grupo Controle (+Fe/+VA) que recebeu uma dieta preparada de acordo com AIN-93G (51), a qual contém 14,400 μg de β - caroteno sintética e 35 mg de ferro por kg de dieta;

✱ O grupo (-VA) que recebeu a AIN-93G modificada, depletada de vitamina A, ou seja, sem qualquer fonte de vitamina A, porém com a quantidade de ferro adequada (35 mg de ferro por Kg de dieta);

✱O grupo (**Fe/VA**) que recebeu a AIN-93G modificada, depletada de vitamina A e deficiente em ferro, ou seja, contendo apenas 12.2 mg de ferro por Kg de dieta;

Após o período de tratamento com as dietas (57 dias), os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. As Amostras de sangue dos animais foram coletadas em frascos contendo EDTA 7% (32µl/1.5 mL de sangue) para determinação do hemograma completo. Os fígados e baços foram extraídos, lavados com solução salina 0.9 %, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C, para posterior determinação do conteúdo de ferro e retinol hepático.

4.3. Parâmetros analisados:

4.3.1. Hemograma:

O hemograma foi realizado em um contador de células (COULTER T-890 – Coulter corporation, Miami, Florida), no laboratório de Biofísica.

4.3.2. Teor de ferro nas dietas, fezes e nos órgãos dos ratos:

Foi pesado 0,5g de amostra liofilizada de cada amostra em uma balança analítica (Scientech AS 210), a qual foi transferida para o copo de digestão. Em seguida, foram adicionados 5mL de HNO₃ PA e 2,5mL de H₂SO₄ PA, os quais atuaram como oxidante e desidratante, respectivamente. A unidade de digestão foi montada e digerida em forno de microondas (DGT 100 Plus - Provecta Analítica), de acordo com a metodologia empregada por Sé (52), utilizando o seguinte programa:

- 5 min – 330W (eliminar matéria orgânica);
- 6 min – 700W (eliminar matéria inorgânica);
- 1 min – 800W (eliminar matéria inorgânica);
- 20 min – 0W (resfriamento);

Após a digestão, o volume resultante foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com HNO₃ 0,1mol/L. A concentração de minerais nas amostras foi determinada por espectroscopia de emissão atômica (ICP-AES-Shapes-

Spectroflame Modulates – Spectro Analytical Instruments - Kleve-Germany), utilizando-se uma curva padrão com o limite de detecção para o ferro de 0,3µg/g de amostra. A curva padrão de ferro foi preparada com os padrões minerais, utilizando a solução Titrisol do Merk. Os resultados foram obtidos em ppm e convertidos para mg de minerais por 100g de amostra úmida e apresentados na forma de média ± desvio padrão (DP).

4.3.3.Determinação de índices de ferro:

O biodisponibilidade de ferro foi determinado a partir da expressão proposta por Hernandez (53), abaixo descrita:

➤ A biodisponibilidade é determinada através da eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE):

$$\% \text{ HRE} = [\text{mg Fe Hb (final)} - \text{mg Fe Hb (inicial)} \times 100] / \text{mg Fe consumido}$$

➤ Índice do Fe na Hemoglobina:

$$\text{mg Fe Hb} = [\text{Peso (g)} \times \text{Hb (g/L)} \times 6.7 \times 0.335] / 10000.$$

- O volume total de sangue nos ratos é 6,7% do peso;
- O índice de Fe na hemoglobina, em média, é 0,335;

➤ Utilização de Ferro (mg) = % HRE × % do Fe da dieta / 100.

➤ Absorção de ferro:

$$\% \text{ absorção de Fe} = [(\text{mg Fe ingerido}) - (\text{mg Fe nos fezes}) \times 100] / \text{mg Fe ingerido};$$

➤ Balanço de Fe (mg) = mg Fe ingerido – mg Fe nos fezes

4.3.4.Determinação de retinol hepático:

Uma amostra de 0.1 g de fígado úmido foi macerada no homogeneizador à temperatura de 4°C, ressuspenso em etanol (1,5 × volume) e agitado no vortex durante 15 segundos. À esta suspensão foi acrescentada (0,8 × volume) de KOH 50%, em seguida foi agitado durante 15 segundos e depois transferida para um banho de água a 50 °C, durante 30 minutos. Durante a saponificação, as amostras foram homogeneizadas a cada 15 minutos por aproximadamente 15 segundos. Após a saponificação, o retinol foi extraído com (2 × volume) de hexano por três vezes. A extração foi feita da seguinte forma: Após o acréscimo do hexano, a amostra foi homogeneizada em vortex durante 30 segundos sendo posteriormente centrifugada durante 3 minutos para a separação das fases. A fase superior foi retirada e transferida para um tubo limpo. O extrato obtido foi secado com o nitrogênio gasoso e estocado a menos 80°C até leitura no HPLC. O resíduo obtido foi ressuspenso em 2 mL de etanol e 20 µL foi injetado no sistema de HPLC, utilizando-se a coluna Shim-Park C₁₈ CLC-ODS Column ,25 cm (Shimadzu) . A mistura de metanol/ água (95:5) foi utilizada como fase móvel sob fluxo de 1.5 mL / min. O retinol foi detectado em 325 nm (54). Duas amostras de cada fígado foram analisadas.

4.3.5.Determinação de consumo dietético:

Foi calculada a partir da soma da quantidade de dieta fornecida aos ratos, no período de tratamento, descontando-se as sobras diárias.

4.3.6.Determinação de eficiência de dieta:

A eficiência de dieta foi determinada a partir de razão entre o ganho de peso dos ratos e a quantidade de dieta consumida, no período de tratamento.

4.4. Análise Estatística:

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. O teste de variação tipo One-Way com a correção do Bonferroni foi utilizado para verificar a diferença entre os grupos. As diferenças são consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão estão apresentados na forma de um artigo que está sob revisão no *Annals of Nutrition & Metabolism*. Apresentado a seguir.

ARTIGO

Title: The effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability.

Running title: Interaction between vitamin A and iron

Azadeh Mehdad¹; Egle Machado de Almeida Siqueira², Sandra Fernandes Arruda¹.

¹Nutrition Department and ²Cellular Biology Department, University of Brasilia - Brazil

To whom correspondence should be addressed:

Asa Norte, Campus Universitário Darcy Ribeiro, ICC-Sul, subsolo, módulo 03.

Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília. 70.910.900

– Brasília-DF – Brazil

Tel: +55-61-33072042

E-mail: eglemasi@unb.br

Key Words: Vitamin A deficiency; iron, bioavailability, hemoglobin, rats.

ABSTRACT:

Background: Vitamin A deficiency alters iron status leading to an iron overload in tissues by a unknown mechanism. **Aim:** The effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability was investigated in rats, comparing results based on Hemoglobin Regeneration Efficiency (HRE), which was estimated by the hemoglobin iron content and iron intake. **Methods:** Iron bioavailability was evaluated in the AIN-93G diet (control group); in AIN-93G diet without any vitamin A source (\bar{VA} group) and in AIN-93G diet without any vitamin A source and containing only 12.2 mg of iron per Kg of diet (\bar{Fe}/\bar{VA}). **Results:** The (\bar{Fe}/\bar{VA}), diet showed higher iron bioavailability than the Control diet ($P = 0.0056$), while the rats fed (\bar{VA}) diet showed higher hemoglobin concentration and higher iron utilization than the other groups, but no iron bioavailability difference was observed among the groups. **Conclusion:** These results showed that vitamin A deficiency affects iron utilization; resulting in the iron tissues accumulation and in the hemoglobin concentration increases, suggesting that vitamin A may regulate the expression of proteins involved in the iron homeostasis.

INTRODUCTION:

Early studies carried out in rats have showed an increase in hemoglobin concentration induced by vitamin A deficiency (1). However, further experimental studies have found opposite results; a decrease in hemoglobin or erythrocyte iron concentration was observed in vitamin A deficient humans and rats (2,3). Positive effects of vitamin A supplementation on iron status have been confirmed by others (4,5). Besides the reduction of iron incorporation into erythrocytes (6,7), a number of studies have found diverse effects in vitamin A deficient rats, such as red blood cell morphology alteration (8,9), production of mild anemia (10,11), reduction of plasma total iron binding capacity, and also an iron accumulation in tissues (11,12,13). The iron overload may increase cell and tissue oxidative stress, producing free radicals by the Fenton reaction (14,15,16). Numerous studies have found a close association between iron status and pathological disorders associated with oxidative stress, such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases and neurodegenerative disorders (17,18,19,20). A recent study in our laboratory showed an increase of tissue oxidative stress in vitamin A deficient rats (21).

Despite some controversial results about the effect of vitamin A on iron metabolism, several findings reported have suggested a close interaction between these two micronutrients; however, the mechanism through which vitamin A deficiency affects iron metabolism still remains unclear. In the present study, we hypothesized vitamin A deficiency may improve iron bioavailability by affecting iron absorption and/or utilization, resulting in iron overload in the body.

METHOD AND MATERIALS:

Animals

Eighteen male Wistar rats, weaned (21 days old), were purchased from Biotecnologia Planalto (Biotplan, Planaltina, D.F., Brazil). Upon arrival, the rats were divided in three groups of six animals with similar body weight distribution among the groups (~51 g). The rats were housed in individual cages in a room kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with a 12-hour light/dark cycle. They were fed between 16:00h and 08:00h, and given free access to mineral water. The Animal Care and Use Committee of the University of Brasilia, Brasilia, Brazil, approved the experimental protocol.

Treatment

The basic AIN-93G diet (22) was modified as shown in **Table 1**. The rats were treated with one of the following diets for 57 days: the control group received AIN-93G; (VA) group received AIN-93G without any source of vitamin A, and the Fe/VA group received AIN-93G without vitamin A and only 12.2 mg of iron per kg of diet. This iron content was the lower concentration possible to achieve due to diet iron ingredients contamination. These diets were consumed in wet form during this period. The animals were weighed weekly and food intake recorded daily. Feces were collected daily and separated from food by a nylon sieve; urine was not collected since it contains negligible iron. The feces were freeze dried, weighed, ground and analyzed for iron content according to the same methodology used for the diets. After the treatment period (57 days), rats were killed by cervical dislocation. Blood was collected from the vena cava

into heparinized syringes or hematocrit tubes for immediate Hb analysis (final Hb) in the Coulter T-890 cell counter. The liver and spleen were excised, washed in ice-cold saline solution, and blotted on paper towels to remove blood excess. The wet weight was recorded and it was rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for future analyses.

Table 1

Modified AIN93G diet for rodents used in the study
of vitamin A and Iron Deficiency.

Ingredients	g/kg diet
Sucrose	629.5
Casein	200.0
Fiber	50.0
Soybean oil	70.0
Mineral Mix ¹	35.0
Vitamin Mix ²	10.0
L-Cystine	3.00
Choline bitartrate	2.50
Tert-Butylhydroquinone	0.014

¹Mineral mix was adjusted for different levels of iron (12.2 mg of iron per kg diet for iron deficient group and 35 mg/kg diet for the others two groups).

² Vitamin mix did not contain any source of vitamin A for deficient groups (VA and Fe/VA), and had 14,400 µg of synthetic β-carotene per kg diet for control group.

Iron determination in diet and feces

A sample of 0.5 and 0.3 g of diet and feces samples respectively, previously lyophilized, were weighed, 5 mL nitric acid were added and microwave digestion was carried out in a Provecto Analítica microwave system (DGT 100 Plus) using the following program: 330 W / 5 min; 700 W / 6 min; 800 W / 1 min and 00 W / 20 min. After the digestion, samples were resuspended in nitric acid 0.1 mol/L to a final volume of 50 mL. Iron concentration was determined using a plasma emission spectrometer (ICP - AES / Spectro, Kleve, Germany), standardized with iron calibration standards concentration range from 0.01 - 5 ppm. (Titrizol from Merck, Germany).

Iron Indices

The variables used to evaluate iron bioavailability and utilization was calculated as described by Hernández (23):

1) Percentage of bioavailability, calculated as hemoglobin regeneration efficiency (HRE): $\% \text{ HRE} = [\text{mg Fe Hb (final)} - \text{mg Fe Hb (initial)}] \times 100 / \text{mg Fe consumed}$.

2) Iron Utilization (mg) = $\% \text{ HRE} \times \text{percentage of iron in the diet} / 100$

3) Iron content of Hb:

$$\text{mg Fe Hb} = [\text{body weight (g)} \times \text{Hb (g/L)} \times 6.7 \times 0.335] / 10000$$

This variable was calculated assuming a total blood volume of 6.7 % of the rat body weight, and an average iron content of Hb of 0.335.

4) Iron Absorption:

Iron balance = mg Fe intake – mg Fe in feces

% Fe absorption = [(mg Fe intake) – (mg Fe in feces) × 100] / mg Fe intake.

Retinol assay:

Liver retinol concentration was measured by Tanumihardjo method (24), which was adapted for hepatic retinol by us. Briefly, a sample of 0.1 g of liver was homogenized at 4°C, suspended into ethanol (1.5 × initial volume) by vortexing for 15 seconds. To this suspension, it was added KOH 50% (0.8 × initial volume), vortexed for 15 seconds and placed in a water bath at 50°C for 30 minutes. The sample was vortexed every 15 minutes for about 15 seconds. After the saponification, the sample was extracted three times with 2 × volume of hexane by vortexing for 30 seconds and centrifuging for 3 minutes to aid in the separation of phases. The top organic layer was pooled into a clean test tube and evaporated under nitrogen. The residue was redissolved in 2 ml of ethanol and 20 µl was injected into the HPLC system (Shimadzu, 25 cm Shim-pack C₁₈ CLC-ODS column). A mixture of methanol/water (95:5) was used as the mobile phase, at a flow rate of 1.5 ml/min, and retinol was detected at 325 nm. Two samples from each liver were analyzed.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SD, n=6. A One-Way ANOVA with Bonferroni correction was used for comparisons among groups. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS:

The rats that fed a vitamin A deficient diet ($\bar{V}A$) and those that fed an iron/vitamin A deficient diet ($\bar{Fe}/\bar{V}A$) showed a lower growth rate ($P=0.009$ and 0.001 , respectively), and lower hepatic retinol concentration ($P<0.0001$ for both) than control rats (Table 2). The $\bar{Fe}/\bar{V}A$ group showed the lowest food intake ($P=0.005$) and showed also the lowest feed efficiency (g weight gain / g feed) ($P=0.02$) in relation to the other two groups.

Although the rats from the group $\bar{Fe}/\bar{V}A$ excreted less iron in feces and showed the lowest iron balance among the three groups ($P<0.05$), their iron balance was still positive. The percentage of iron absorption was not significantly different among the groups (Table 3).

Table 2

Mean \pm SD of the weight gain, food intake, feed efficiency and hepatic retinol in the three groups of this study, after 57 days¹.

Diet	Weight gain	Total food intake	Feed efficiency ²	Hepatic Retinol
Control	306.48 \pm 9.46 ^a	1211.21 \pm 35.50 ^a	0.253 \pm 0.003 ^a	57.6 \pm 15.50 ^a
$\bar{V}A$	274.05 \pm 14.09 ^b	1127.29 \pm 58.24 ^a	0.243 \pm 0.008 ^b	0.31 \pm 0.21 ^b
$\bar{Fe}/\bar{V}A$	262.05 \pm 18.77 ^c	1089.40 \pm 53.66 ^b	0.240 \pm 0.006 ^c	0.23 \pm 0.18 ^b

¹ values are mean \pm SD, n = 6. $P<0.05$

² Feed efficiency = g weight gain / g feed.

Table 3

Diet iron content, iron intake, iron excreted in feces, iron balance and relative iron absorption in rats of different groups for 57 days¹.

Diet	Fe in diet mg/100g	Fe intake	Fe excreted mg	Fe balance ²	Fe absorption ³ %
Control	3.86 ^a	46.75 ± 1.37 ^a	8.38 ± 1.69 ^a	38.37 ± 1.96 ^a	82.1 ± 3.5 ^a
VA	3.99 ^a	44.87 ± 2.32 ^a	8.15 ± 1.06 ^a	36.72 ± 2.16 ^a	81.9 ± 2.1 ^a
Fe/VA	1.94 ^b	21.13 ± 1.04 ^b	4.03 ± 1.27 ^b	17.10 ± 0.61 ^b	81.1 ± 5.2 ^a

¹ Values are mean ± SD, n = 6, P < 0.05.

² Iron balance = mg Fe intake – mg Fe in feces.

³ % Fe absorption = (mg Fe intake – mg Fe in feces × 100) / mg Fe intake.

The final hemoglobin concentration in the VA group was higher, while in the Fe/VA group it was lower than in the Control group (P=0.006 and P<0.0001, respectively). The Fe/VA group showed lower hemoglobin iron content than the control and the VA groups (P<0.0001 for both); no difference was found between control and Fe/VA groups (**Table 4**).

The average final body weight in the control group was higher than the VA and Fe/VA groups (P=0.005; P<0.0001, respectively). The Fe/VA group also showed lower hemoglobin iron content than the other groups (P<0.0001) (**Table 4**).

Table 4

Body weights, hemoglobin and hemoglobin iron content in the control group, vitamin A deficient group (VA) and iron/Vitamin A deficient group (Fe/VA), after 57 days of treatment¹.

Diet	Weight g		Hemoglobin g/L		Fe in Hb ² mg	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Control	52 ± 3 ^a	359 ± 8 ^a	81 ^a	133 ± 10 ^b	0.95 ± 0.05 ^a	10.70 ± 0.99 ^a
VA	51 ± 3 ^a	325 ± 15 ^b	81 ^a	152 ± 6 ^a	0.93 ± 0.05 ^a	11.08 ± 0.46 ^a
Fe/VA	51 ± 3 ^a	313 ± 17 ^b	81 ^a	92 ± 8 ^c	0.93 ± 0.06 ^a	6.47 ± 0.75 ^b

¹ Values are mean ± SD. n = 6, P < 0. 05.

² Iron content of Hb was calculated, assuming a total blood volume of 6.7% of the rat body weight, and an average iron content of Hb of 0.335⁽²²⁾.
Fe in Hb: [body weight (g) × Hb (g/L) × 6.7×0.335]/10.000

The Fe/VA diet showed higher average of iron bioavailability, expressed here as HRE in relation to the Control group (P = 0.002), while the vitamin A deficient diet VA showed no difference in relation to the control group. The Fe/VA diet showed lower iron utilization (P<0.0001), while the (VA) showed a higher iron utilization (P=0.03) in relation to the Control diet (**Table 5**).

Table5

Body weight, hemoglobin and hemoglobin iron content gain, HRE and iron utilization in the rats from the control, (VA) and (Fe/VA) groups after 57 days¹.

Diet	Gain			HRE ²	Iron utilization ³
	Weight g	Hb g/L	Fe in Hb mg	%	mg
Control	306.48 ± 9.46 ^a	51.7 ± 10.42 ^b	9.75 ± 0.97 ^a	20.83 ± 1.78 ^b	0.8 ± 0.07 ^b
VA	274.05 ± 14.09 ^b	71.0 ± 5.54 ^a	10.15 ± 0.45 ^a	22.65 ± 0.66 ^b	0.9 ± 0.03 ^a
Fe/VA	262.05 ± 18.77 ^c	11.0 ± 7.81 ^c	5.54 ± 0.76 ^b	26.19 ± 2.92 ^a	0.5 ± 0.06 ^c

¹ Values are mean ± SD, n = 6, P < 0.05.

² % HRE = [mg Fe Hb (final) – mg Fe Hb (initial) × 100] / mg Fe Consumed

³ Iron utilization (mg) = % HSE × % iron diet / 100.

Table 6

Liver and spleen iron concentration in rats after the 57 days¹.

Diet	Spleen	Liver
	µg/g tissue	
Control	234.9 ± 58.9 ^b	82.4 ± 9.7 ^b
VA	389.1 ± 69.7 ^a	93.0 ± 18.3 ^b
FeVA	243.2 ± 41.1 ^b	40.4 ± 6.5 ^a

¹ values are mean ± SD, P<0.05.

DISCUSSION:

In the literature, there is no consensus about the effect of VA deficiency on hemoglobin concentration. In the present study, after 57 days, the induction of VA deficiency led to increases in blood hemoglobin concentration in the rats (**Table 4**). Trying to understand this enhancement of blood hemoglobin concentration, we investigated the effect of VA deficiency on iron absorption. In contrast to previous studies (10,25), our findings showed that the deficiency of VA did not alter the relative iron absorption.

Bioavailability can be broadly defined as absorption and availability of a nutrient for utilization. Such a definition implies the consideration of more than absorption and includes excretion and retention. (26,27). Considering iron bioavailability as the hemoglobin regeneration efficiency (23), in the present study only the vitamin A and iron deficient diet showed higher iron bioavailability in relation to the control group. However, if a broad definition is used – such as the iron utilization – the vitamin A deficient diet shows higher iron bioavailability than the control diet.

The vitamin A deficient diet impaired weight gain on the rats (**Table 2**). However, the effect of the simultaneous iron and vitamin A deficiencies reduced even more the weight gain on the rats, in addition to other negative effects, such as reduction of food intake and feed efficiency, which were not observed in rats subjected only to vitamin A deficiency (**Table 2**).

A positive effect of vitamin A deficiency on liver iron concentration has been previously reported (28); however, our findings did not show any liver iron

accumulation in vitamin A deficient rats (**Table 6**), pursuant to recent studies (13,29). On the other hand, our results showed a strong iron accumulation on the spleen of vitamin A deficient rats. These findings suggest that vitamin A may affect differently a cellular iron transport protein, which depends on the tissue functions.

According to our results, vitamin A deficiency affects iron utilization, resulting in iron accumulation in the spleen, and in increases on blood hemoglobin concentration, and no influence iron absorption. These results suggest that vitamin A may regulate the biosynthesis of proteins involved in iron homeostasis.

ACKNOWLEDGMENT

We thank CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the provided financial support.

LITERATURE CITED:

1. Sure, B., Kik, M.C., Walker, DJ. The effect of avitaminosis on hematopoietic function. I. Vitamin a deficiency. *Journal Biology Chemistry*. 1929; 83:375-385.
2. Hodges, R.E., Sauberlich, H.E., Canham, J.E., Wallace, D.L., Rucker, R.B., Meija, L.A. & Mohanram, M. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 1978; 31:876-885.
3. Mohanram, M., Kulkarni, K.A., and Reddy, V. Hematological studies in vitamin A deficient children. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 1977; 47: 389-393.

4. Roodenburg A.J., West CE, Hovenier R, Beynen AC. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br. J. Nutr.* 1996; 75(4): 623-636.
5. Bolem, M.W., Wedel, M., Egger, R.J., Speek, A.J., Schrijver, J., Saowakontha, S., Schereurs, W.H.P. Iron metabolism and vitamin A deficiency in children in Northeast Thailand. *Am. J. Clin. Nutr.* 1989; 50: 332-338.
6. Van Houwelingen, F. Van den Berg, G.J., Lemmens, A.G., Sijtsma, K.W., Beynen AC. Iron and zinc status in rats with diet-induced marginal deficiency of vitamin A and/or copper. *Biol Trace Elem Res.* 1993; 38 (1): 83-95.
7. Mejia, L.A., Hodges, R.E., Rucker, R.B. Role of vitamin A in the absorption, retention and distribution of iron in the rat. *J. Nutr.* 1979a; 109: 129-137.
8. Mejia, L.A., Hodges, R.E. and Rucker, R.B. Clinical signs of anemia in vitamin A-deficient rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979b; 32 (7): 1439-1444.
9. Amine, E.K., Corey, J., Hegsted, D.M., Hayes, K.C. Comparative hematology during deficiencies of iron and vitamin A in rats. *J. Nutr.* 1970; 100:1033-1041.
10. Sijtsma K.W., Van Den Berg, G.J., Lemmens, A.G., West, C.E., Beynen, A.C. Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A. *Br. J. Nutr.* 1993; 70(3): 777-785.
11. Roodenburg, A.J., West, C.E., Yu, S., Beynen A.C. Comparison between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron. *Br J Nutr.* 1994; 71(5): 687-699.
12. Roodenburg, A.J., West, C, E., Hovenier, R., Beynen. A.C. Evaluation of a two-generation rat model for vitamin A deficiency and the interrelationship with iron metabolism. *Br. J. Nutr.* 1995; 74(5):689-700.

13. Roodenburg, A.J., West, C.E., Beguin, Y, Van Dijk, J.E., Van Eijk, H.G., Marx J.J., Beynen, A.C. Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency. *J. Nutr. Biochem.* 2000; 11(4): 223-230.
14. Todorich, B.M., Conner, J.R. Redox metals in Alzheimer diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1012:171-178.
15. Kaur, D., Andersen, J.K. Ironing out Parkinson's diseases: is therapeutic treatment with iron chelators a real possibility? *Aging Cell.* 2002; 1(1): 17-21.
16. Lopes, G.B., Schulman, H.M, Hermes-Lima, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1472:142-152.
17. Balaban, R.S., Nemoto, S., Finke, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 2005;120(4): 483–495. Review.
18. Ong, W.Y., Halliwell, B. Iron, Atherosclerosis, and Neurodegeneration. A key role for cholesterol in promoting iron-dependent oxidative damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1012: 51-64.
19. Yuan, X-M., Li, W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med.* 2003; 35:578-591.
20. Pierre, J.L., Fontecave, M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals.* 1999; 12(3): 195–199.
21. Arruda, S., Souza, E.M.T., Siqueira, E.M.A. Carotenoid from malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves protect cells against oxidative stress in rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2005; 75(2): 161-168.
22. Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey GCJr. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing

- committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 1993; 123(11): 1939-1951.
23. Hernandez M, Sousa V, Moreno A, Villapando S, Lopez-Alarcon M. Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different sources of iron. *J. Nutr.* 2003; 133(1): 154-159.
24. Tanumihardjo, S.A. Penniston, K.L. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J. Lipid Res.* 2002; 43(2):350-355.
25. Layrisse M, García-Casal MN. Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. *Nutr Rev.* 1997; 55:233-239.
26. O'Dell, B.L, Savage, J.E. Effect of Phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1960; 103:304-306.
27. Fairweather-Tait, S.J. From absorption and excretion of minerals, to the importance of bioavailability and adaptation. *Br. J. Nutr.* 1997; 78: S95-S100.
28. Meija, L.A., Hodges, R. E., Arroyave, G., Viteri, F., and Torun, B. Vitamin A deficiency and anemia in Central American children. *Am. J. Clin. Nutr.* 1977; 30:1175-1184.
29. Strube, Y. J., Beard, J. L., Ross, C. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *J. Nutr.* 2002; 132:3607-3615

7. CONCLUSÃO:

Estudos sugerem a existência de uma relação sinérgica entre o metabolismo da vitamina A e do ferro. O presente estudo não confirmou os resultados de relatos prévios que sugerem um efeito positivo da vitamina A sobre a absorção de ferro não hêmico e, que a deficiência de vitamina A provoca a anemia.

Os resultados observados no presente estudo mostraram que a deficiência de vitamina A aumenta a concentração de hemoglobina e promove acúmulo de ferro nos tecidos dos ratos, porém, não foi observado qualquer efeito da vitamina A na absorção relativa do ferro. Entretanto, a utilização do ferro dietético, estimada a partir da eficiência de regeneração da Hemoglobina (HRE) em relação à porcentagem de Ferro dietético, foi significativamente aumentada na deficiência de vitamina A. Portanto, considerando o amplo conceito de biodisponibilidade que inclui além da absorção, a utilização, a excreção e a retenção do nutriente, nossos resultados sugerem que a vitamina A influencia de forma positiva a utilização do ferro no organismo, ou seja, aumenta a disponibilidade do ferro nos tecidos. Vários estudos têm mostrado que a vitamina A, na forma de ácido retinóico, regula a expressão de vários genes, desta forma, acreditamos que a vitamina A possa regular a utilização do ferro nos tecidos, através da regulação da síntese das proteínas envolvidas na exportação e/ou importação celular de ferro.

8. Referências Bibliográficas:

1. Vitamin A Field Support Project (VITAL). Arlington, Virginia: International Science and Technology Institute; 1991.
2. Souza WA, Vilas Boas OMGC. A deficiência de vitamina A no Brasil: Um panorama. Rev Fana Saldo Publica. 12(3): 173-179.2002.
3. Walczyk T, Davidson L. No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans. Am J Clin Nutr. 77: 144-9. 2003.
4. Arruda SF, Siqueira EMA, Souza EMT. Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and purslane (*Portulaca oleracea*) leaves reduce oxidative stress in vitamin A-deficient rats. Ann Nutr Met. 2004 (in press).
5. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. J Inorg Biochem 91: 9-18. 2002.
6. Enns CA. Pumping Iron: the strange partnership of the hemochromatosis protein, a class I MHC homolog, with the transferrin receptor. Traffic2: 167-174, 2001.
7. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. Mut Res. 531: 81-92. 2003.
8. Underwood BA. Vitamin A deficiency disorders: international efforts to control a preventable "POX". J Nutr .134:231S-236S.2004.
9. Stepp, W. Versuche uber futterung mit lipid ernahrung. Biochem Ztscher. 22, 542-546, 1909.
10. Parker RS. Absorption metabolism and transport of carotenoides. FASB J. 10:542-551.1996.

11. Palace, V. P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P. K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart diseases. *Free Rad Biol Med.* 26, 5/6, 746-761, 1999.
12. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASB J*, 10, 2924-2933, 1991.
13. Morris-Kay, G. M.; Sokolova, N. Embryonic development and pattern formation. *FAESB J*, 10, 961-968, 1996.
14. Blomhoff, R.; Green, M. H.; Breg, T.; Nourm, K. R. Transport and storage of vitamin A. *Science*, 250, 399-403, 1990.
15. Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASB J*, 10, 940-954, 1996.
16. Vieira, A. V.; Schnider, W. J.; Vieira, P. M. Retinoids: transport, metabolism and mechanisms of action. *J Endocr*, 146, 201-207, 1995.
17. Coelho DF Ramalha Ra. O inquérito dietético na avaliação do estado nutricional de vitamina A em gestantes. *Clinica Medica*; 6(28): 44-60, 1995.
18. Darlow BA, Graham PJ. Vitamin A supplementation for preventing morbidity & mortality in very low birth weight infants. *Cochran Database System Revist* , (2):501-506, 2000.
19. Scrimshaw, Taylor CE, Gordon JE. Interaction of nutrition and infection. 57 Ed. Geneve .World health organizations. 1968.
20. Meija LA, Arroyave G. The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *Am J Clin Nutr*, 36:87-93, 1982.

21. Semba RD, Muhalil, West KP. Impact Of vitamin A supplementation on hematological indicators of iron metabolism and protein status in children. *Nutr Res*, 12; 469-78, 1992.
22. 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.
23. Ponka P. Iron Metabolism: physiology and Path physiology. *The J. Trace Elements in Experimental Medicine* 13:73-83, 2000.
24. Bozho M, James R Conner, Redox metals and Alzheimer diseases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*1012: 171-178, 2004.
25. Mc Cance,R.A. & Widdowson, E.M. Absorption and excretion of iron. *Lancet*. 2:680-684. 1937.
26. Roy, C.N., Enns, A.A. Iron homoestasis: new tales from the cript. *Blood*. 96: 4020-4027. 2000.
27. Miret S, Simpson RJ, Mckie A. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr*. 23: 283-301. 2003.
28. Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W, Weiss G. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology*. 120: 1412-1419. 2001.
29. Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, Borot N, Radosavljevic M, Loreal O, Brissot P, Gilfillan S, Bahram S, Coppin H, Roth MP. Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology*. 122: 745-751. 2002.

30. Canonne-Hergaux F, Levy JE, Fleming MD, Montross LK, Andrews NC, Gros P. Expression of the DMT1 (NRAMP2/DCT1) iron transporter in mice with genetic iron overload disorders. *Blood*. 97: 1138-1140. 2001.
31. Mckie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 5: 299-309. 2000.
32. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Murphy TL, Vulpe CD, McKie AT, Anderson GJ. A rapid decrease in the expression of BMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut*. 52: 340-346. 2003.
33. Paiva AA. Parâmetros para avaliação de estudo nutricional de ferro. *Rev Saúde Pública* 34: 421-426 2000.
34. Findly, G.M & MacKenzie, R.D. The bone marrow in deficiency diseases. *J. Pathol* .25: 402-403, 1922.
35. Koessler, K., Maurer, S. & Loughlin, R. The relation of anemia, primary and secondary to vitamin A deficiency. *J. Am. Med. Assoc.* 87:476-482, 1926.
36. Blackfan, K.D. & Wolbach, S.B. Vitamin A deficiency in infants, a clinical and pathological study. *J. Pediatr.* 3:679-706, 1933.
37. Roodenburg AJC, West CE, Yu S, Beynen AC. Comparison 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.

38. Roodenburg AJC, West CE, Hovenier R, Beynen AC. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br J Nutr.* 75: 623-636. 1996.
39. Garcia-Casal M & Layrisse M. Food iron absorption: role of vitamin A. *Arch Latinoam Nutr.* 48: 191-196. 1998.
40. Hodge Re, Sauberlich HE, Canham JE. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr,* 31:876-85, 1978.
41. Mohanram M, Kulkarni KA, Reddy V. Hematological studies in vitamin A deficiency children. *Int J Vitam Nutr Res ,* 47; 389-93, 1977.
42. Meija LA, Hodges RE, Arroyave G, Viteri F , Vitamin A deficiency & Anemia in Central American Children. *Am J Clin Nutr,* 30:1175-84, 1977.
43. Beynen AC, Sijtsma KW, Van den Berg GJ, Iron status in rats fed a purified diet without vitamin A. *Biol Trace Elem Res,* 35:81-4, 1992.
44. Sijtsma KW, Van den Berg GJ Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A. *Br J Nutr,* 70:777-85, 1993.
45. Meija LA, Chew F. Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. *Am J Clin Nutr,* 48; 595-600, 1988.
46. Panth M, shatrunga V, Yasdohara P. Effect of vitamin A supplementation on hemoglobin and vitamin A levels during pregnancy. *Br J Nutr,* 64; 351-8, 1990.
47. Suharno, D., West CE , Karyadi D .Supplementation with vitamin A and iron for nutritional anemia in pregnant women in west Java, Indonesia. *Lancet,* 342; 1325-8, 1993.

48. Bolem MW, Wendell M, Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. *Am J Clin Nutr*, 51:76-9, 1990.
49. Meija, L. & Arryave, G. The effects of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *Am. J. Clin. Nut.* 36:87-93, 1982.
50. Thurnham DI. Vitamin A, Iron and haemopoiesis. *Lancet*, 342:1312-3, 1993.
51. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr 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. *J Nutr*. 123: 1939-51. 1993.
52. Sé, N.D. Potenciais fontes dietéticos de cálcio, ferro e zinco do cerrado. Departamento de biologia Celular. Relatório final-CNPq-de atividades 2004.
53. Hernandez M, Sousa V, Moreno A. Iron Bioavailability and Utilization in Rats Are Lower from Lime-Treated Corn Flour than from Wheat Flour When They Are Fortified with different Sources of Iron. *Nutr Requirement*, 154-159, 2002.
54. Tanumihardjo, S.A. Penniston, K.L. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J. Lipid Res*, 43(2):350-355, 2002.

