

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

Fernanda Ribeiro Rosa

Deficiência de vitamina A altera o *status* de ferro e de estresse oxidativo em ratos

BRASÍLIA
Distrito Federal - Brasil
Agosto - 2009

Fernanda Ribeiro Rosa

Deficiência de vitamina A altera o *status* de ferro e de estresse oxidativo em ratos

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. Sandra Fernandes Arruda.

Co-orientação: Prof^a. Dr^a. Egle Machado de Almeida Siqueira

Brasília, 07 de agosto de 2009.

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

Comunicamos a aprovação da dissertação de mestrado da aluna **Fernanda Ribeiro Rosa**, intitulada “**Deficiência de vitamina A altera o status de ferro e de estresse oxidativo em ratos**”, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Prof^a. Dr^a Sandra Fernandes Arruda
Presidente – Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Membro – Universidade Federal de Viçosa

Prof^a. Dr^a Nathalia Marcolini Pelucio Pizato Valério
Membro - Externo

Prof^a. Dr^a Egle Machado de Almeida Siqueira
Suplente – Universidade de Brasília (UnB)

Brasília, 07 de agosto de 2009.

AGRADECIMENTOS

A Deus, e aos meus pais, Lady e Tarcísio, pela minha vida, pelo amor, pela minha formação pessoal, pelo sacrifício involuntário, e por sempre acreditarem em mim, e possibilitarem essa conquista;

Aos meus queridos irmãos, Bi e Léo, os quais fazem tudo ser mais fácil, pelos momentos de carinho, brincadeiras, paciência e amizade;

Aos meus familiares que acreditaram e torceram por mim, em especial aos meus padrinhos, Abel e Edna, distantes, mas sempre presentes nessa fase...

Agradeço a Prof^a. Dr^a Sandra Arruda, pela dedicação, amizade, por sua orientação sempre presente, exemplo de profissionalismo, e pelos vários momentos de conversas e discussões...

A Prof^a. Dr^a Egle Siqueira pelos ensinamentos, pelo tempo gasto, pelos incentivos, por compartilhar a experiência, e pela oportunidade do contato com a pesquisa...

Aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Biofísica: ao Chiquinho, pelos cafezinhos e pelo nitrogênio; ao Prof. Fernando Fortes, pela força e exemplo de amor a ciência; ao Diego pela disposição e pela ajuda com as vidrarias; a Silvana, Luciano e Ariel pela contribuição com as análises; a Fabiani, Ju e Adriana pelo carinho, contribuições e organização; ao Guto, Marcela e Douglas pelas tantas conversas de pesquisa e descontração...

Agradeço as Professoras, Dra. Maria do Carmo Peluzio e Dra. Nathalia Pizato, pela participação na banca e pela contribuição com o trabalho;

A todos os meus queridos amigos, que me escutaram, me divertiram e entenderam minha ausência nesse momento, mas nunca se esquecem de mim...

À CAPES e DPP pela concessão da bolsa de estudos e fomento a pesquisa;

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho! Meu muito obrigada!!!

Dedico esse título a minha família, e aos meus anjinhos, em especial ao Tio Antonio e a Tia Rita, que sem saber dos meus sonhos acreditaram que um dia trabalharia para tentar entender alguns mistérios da nutrição e doença, contribuindo para a vida através da ciência!!!

RESUMO

A vitamina A apresenta uma capacidade antioxidante direta *in vitro*, no entanto, sua ação antioxidante *in vivo*, assim como seu efeito sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, ainda não são bem estabelecidos. Um mecanismo de ação antioxidante direto, no qual a vitamina A seria capaz de reduzir moléculas radicares ou formar um aduto com espécies radicalares, estabilizando os elétrons desemparelhados por ressonância tem sido proposto. No entanto, estudos recentes sugerem um mecanismo indireto, descrevendo a existência de uma relação sinérgica entre o metabolismo de vitamina A e do ferro. A deficiência de vitamina A parece ser uma das causas da perda de homeostase do ferro resultando o acúmulo desses nos tecidos, o que leva a um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes e ao estabelecimento da condição de estresse oxidativo. O presente estudo avaliou o efeito da deficiência de vitamina A na concentração de ferro e no dano oxidativo em tecidos de ratos em diferentes estágios de depleção. Para tanto, 42 ratos Wistar machos foram distribuídos em dois grupos (21 ratos/grupo) e tratados com uma das seguintes dietas: Controle (CT): dieta AIN-93G e dieta deficiente em vitamina A (VA): dieta AIN-93G isenta de vitamina A. No início do estudo (T_0), após três dias de aclimação, 10 animais foram sacrificados para determinação dos parâmetros basais (Grupo T_0). Após 15 (T_{15}), 30 (T_{30}) e 45 (T_{45}) dias de tratamento 7 animais de cada grupo foram sacrificados, e o fígado, baço e intestino congelados em nitrogênio líquido, foram armazenados a -70°C . Foram avaliadas as concentrações de ferro, malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada nos três órgãos dos animais, os níveis de retinol hepático e hemoglobina. Após 15 dias de depleção, os animais apresentaram uma redução da concentração de retinol hepático (57%) em relação ao grupo controle ($p = 0,0007$), e aos 30 dias de depleção as reservas hepáticas de vitamina A estavam esgotadas. Não foi observada diferença significativa no teor hepático de ferro entre os dois grupos nos três períodos de tratamento. No baço, houve um aumento na concentração de ferro após 45 dias de tratamento nos dois grupos, controle e VA. Com 30 dias de tratamento, o grupo VA apresentou um aumento de ferro no baço em relação ao grupo controle ($p = 0,0046$). No intestino, foi observado o oposto, uma redução na concentração de ferro no grupo VA em relação controle, após 15 e 30 dias de tratamento, ($p = 0,0021$; $p = 0,0016$, respectivamente). A concentração de MDA hepático foi menor nos animais

deficientes em vitamina A (VA) com 30 e 45 dias de tratamento quando comparados ao grupo controle ($p = 0,042$; $p = 0,011$, respectivamente). No baço, os dois grupos apresentaram maior concentração de MDA no tempo 45 em relação aos demais períodos de tratamento, não havendo diferença significativa entre os dois grupos. No intestino, houve um acúmulo gradativo de MDA no grupo controle e uma redução gradativa no grupo VA. Após 45 dias de tratamento, o grupo VA apresentou menor estresse oxidativo que o grupo controle ($p = 0,025$). O teor de proteínas carboniladas no baço foi menor no grupo VA em relação ao grupo controle, apenas no período T15 ($p = 0,0002$). No intestino o grupo VA apresentou maior nível de proteínas carboniladas quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,0011$), com 15 dias de tratamento. Esses resultados sugerem que a deficiência de vitamina A altera a homeostase de ferro no baço e intestino, e que essas alterações são dependentes do tempo de depleção e tecido específicas. Os danos oxidativos a lipídeos parecem ser dependentes dos níveis de ferro, não sendo observado este efeito nos danos a proteínas.

Palavras-Chave: deficiência de Vitamina A, ferro, malondialdeído, proteína carbonilada, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Vitamin A has a direct antioxidant capacity *in vitro*, however, its antioxidant capacity *in vivo* as well as its effect on oxidative stress biomarkers were not well established. A straight antioxidant mechanism is proposed, in which vitamin A reduces free radicals or form an adduct with reactive oxygen species, stabilizing unpaired electrons by resonance. However, recent studies suggest an indirect mechanism, propose an interaction between vitamin A and iron metabolism. Vitamin A deficiency alters iron homeostasis resulting in iron tissues accumulation; an imbalance between oxidant and antioxidant agents, and a consequent oxidative stress condition. The present study investigated the effect of vitamin A deficiency in iron concentration and oxidative damages in rat tissues, during different depletion periods. Forty two male Wistar rats were distributed in two groups (21 rats/group) and treated with two distinct diets: Control (CT): AIN-93G diet and Vitamin A deficient diet (VA): AIN-93G diet without any source of vitamin A. At the beginning of the study (T₀), after three days of acclimatization, 10 rats were killed for the determination of basal biochemical parameters (Group T₀). After 15 (T₁₅), 30 (T₃₀) e 45 (T₄₅) days of treatment rats were killed and the liver, spleen and intestine excised and stored at -70°C for biochemical indices analysis. The iron, malondialdehyde (MDA) and carbonyl protein concentration was determined in the three tissues of the rats. The hepatic retinol concentration and hemoglobin was also analyzed. After 15 days of vitamin A depletion, hepatic retinol concentration was significantly reduced (57 %) in relation to Control group ($p = 0.0007$), and at 30 days of deficiency hepatic vitamin A store was completely depleted. In the three treatment periods, no difference was observed in iron liver concentration between the two groups. In spleen, after 45 days of treatment iron concentration was higher in the control and vitamin A deficient rats, compared to the other treatment periods. At 30 days of treatment, VA group showed an increase in spleen iron concentration in relation to the Control group ($p = 0.0046$). In the intestine, an opposite result was obtained, a reduction in intestinal iron concentration of VA group in relation to the Control group, after 15 and 30 days of treatment ($p = 0.0021$; $p = 0.0016$, respectively). The liver MDA concentration observed in vitamin A deficient rats (VA) at 30 and 45 days of treatment was lower than in the Control group ($p = 0.042$; $p = 0.011$, respectively). In the spleen, both groups showed high MDA concentration at 45 days in relation to the other periods of treatment, and no

difference was obtained between the two groups. A gradual MDA accumulation was observed in the intestine of the Control group, while in the VA group a gradual reduction was obtained. After 45 days of treatment, the VA group showed lower lipid peroxidation than the control group ($p = 0.025$). In the VA group, spleen protein carbonyl content was lower than Control group, only in the T15 period ($p = 0.0002$). High protein carbonyl content was observed in the intestine of VA group compared to Control group ($p = 0.0011$), with 15 days of treatment. These results suggest that vitamin A deficiency modifies iron homeostasis in the spleen and intestine of rats, and these changes seem dependents of depletion time. The lipid oxidative damages seem to be dependents of the iron levels, while proteins damages not.

Keywords: vitamin A deficiency, iron, malondialdehyde, carbonyl protein, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Ganho de peso, ingestão total de dieta e concentração de retinol hepático	69
Figura 01: Estrutura química da vitamina A e retinóides	17
Figura 02: Estrutura Química dos principais carotenóides dietéticos pró-vitamínicos	19
Figura 03: Ação nos tecidos extra-hepáticos e armazenamento no fígado da vitamina A adquirida na dieta. A vitamina A atua principalmente como um hormônio nuclear, na forma de ácido retinóico	24
Figura 04: Estrutura química do grupo heme	28
Figura 05: Esquema de regulação da absorção intestinal de ferro pelo peptídeo hepcidina.	31
Figura 6: Representação da estabilização do O ₂	40
Figura 7: Reação de redução do O ₂ a H ₂ O com formação de EROs	40
Figura 8: Demonstração da regulação fisiológica entre oxidantes e antioxidantes	48
Figura 9: Reação do TBA (1) e MDA (2) resultando no complexo TBA-MDA	50
Figura 10: Representação esquemática das fases de peroxidação lipídica	50
Figura 11: Formação do grupamento carbonil	52
Figura 12: Defesas antioxidantes enzimáticas	54
Figura 13: Concentração hepática de retinol dos ratos controle e deficientes em vitamina A, durante os 45 dias de tratamento	70
Figura 14: Concentração de ferro (µg/g) no fígado, baço e intestino de ratos controle e deficientes em vitamina A (VA) em diferentes períodos de tratamento	71
Figura 15: Concentração de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína total) no fígado, baço e intestino de ratos controle e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento	72
Figura 16: Concentração de proteína carbonilada no fígado, baço e intestino de ratos controle e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento	73
Figura 17: Concentração de ferro, MDA e proteína carbonilada no fígado (A), de ratos controle (CT) e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento	74
Figura 18: Concentração de ferro, MDA e proteína carbonilada no baço de ratos controle (CT) e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento	75
Figura 19: Concentração de ferro, MDA e proteína carbonilada no intestino (C), de ratos controle (CT) e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento	76
Figura 20: Representação do mecanismo de homeostase de ferro em animais controles durante 45 dias de tratamento	80
Figura 21: Representação do mecanismo de absorção de ferro na deficiência de vitamina A durante 45 dias de tratamento	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A_{nm} ;	Absorbância à
ADH	Enzima álcool desidrogenase
AL	Ácido lipóico
All-trans-RA	Todo-trans-ácido retinóico
AP-1	Proteína ativadora
ARAT	Acyl CoA: Retinol Acyl Transferase
AU	Ácido úrico
BHT	Butil-hidroxi tolueno
β CMOOX	β caroteno 15 15' monooxygenase
CAT	Catalase
CAR	Carotenóide
CAR [•] , CAR ^{•-} , CAR ^{•+}	Carotenóide radicalar
CBRP II	Proteína celular ligante de retinol
CoQ	Coenzima Q
CT	Grupo Controle
CuZnSOD zinco	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DCNT	Doença Crônicas não Transmissíveis
DFO	Desferroxamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNFH	2,4 di-nitro-fenil-hidrazona
Dcytb	Citocromo b redutase
DMT1	Proteína transportadora de metal divalente
DTPA	Ácido dietileno triamino pentacético

e ⁻	Elétron
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EROs	Espécies reativas oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FPN	Ferroportina
Free 8-iso-PGF2	Marcador plasmático de oxidação
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona-oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBED diacético	Ácido N,N'-o-hidroxi benzil etileno diamino
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HT28clone 19A	Células humanas de tumores de cólon
ICP	Espectroscopia de Emissão Atômica
IREG-1	Transportador transmembrânico
L [•]	Ácido graxo radicalar
LH	Ácido graxo
LOO [•] ; LOOH [•]	Lipoperóxidos
LPL	Lipases Lipoproteicas
LRAT	Lecitina retinol-acil transferase
MDA	Malondialdeído
MnSOD	Superóxido dismutase dependente manganês
NADPH reduzida	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO [•]	Óxido nítrico radicalar

NO_2^\bullet	Peróxido nitrito
Ns	nano segundo
O_2	Oxigênio molecular
$^\bullet\text{OH}$	Radical hidroxil
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
O_2^\bullet	Radical Superóxido
PIH	Piridoxal isocotinoil hidrazona
RA	Ácido retinóico
RALDH	Enzima retinal desidrogenase
RAR; RXR	Receptor de ácido retinóico
RARE	Elemento responsivo ao ácido retinóico
RDR	Teste relativo de dose resposta
RE	Éster de retinil
RBP	Proteína ligante de retinol
RL	Radical Livre
R^\bullet	Radical livre
RO^\bullet	Radical alcóxil
ROO^\bullet ; R-COO^\bullet	Radical peróxido
$(\text{ROO-CAR})^\bullet$	Radical peróxido de carotenóide
ROOH	Peróxido orgânico
SeGPX	Glutathiona peroxidase dependente de selênio
SOD	Superóxido dismutase
$^3\text{S}_1$	Formas tripleto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA	Ácido trifluoroacético
Tf	Transferrina
TfR	Receptor transferrina
TOH	Tocoferol
T ₀	Grupo inicial (basal)
T ₁₅	Tempo 15 dias de tratamento
T ₃₀	Tempo 30 dias de tratamento
T ₄₅	Tempo 45 dias de tratamento
VA	grupo deficiente em vitamina A
W	volts

SUMÁRIO	
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Vitamina A	17
2.1.1 Retinóides	17
2.1.2 Metabolismo da Vitamina A	22
2.2 Ferro	27
2.3 Interação entre Vitamina A e Ferro	35
2.4 Radicais livres, Espécies Reativas e Estresse oxidativo	38
2.4.1 Radicais livres e Espécies Reativas	39
2.4.2 Espécies Reativas de Oxigênio	39
2.4.2.1 Oxigênio Singleto (1O_2)	41
2.4.2.2 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	41
2.4.2.3 Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	42
2.4.2.4 Hidroxil ($\cdot OH$)	43
2.4.2.5 Radicais Peroxil e Alcoxil	44
2.4.3 Espécies Reativas de Nitrogênio	45
2.4.4 Estresse Oxidativo	46
2.4.4.1 Agentes Oxidantes (Pró-oxidantes)	47
2.4.4.1.2 Marcadores de Danos Oxidativos a Biomoléculas	49
2.4.4.1.2.1 Peroxidação Lipídica	49
2.4.4.1.2.2 Peroxidação Protéica	51
2.4.4.2 Agentes Antioxidantes	52
2.4.4.2.1 Defesas enzimáticas	53
2.4.4.2.2 Defesas não - enzimáticas	54
2.4.4.2.2.1 Ação Antioxidante dos retinóides e carotenóides	58
3 OBJETIVOS	62
3.1 Objetivo geral	62
3.2 Objetivos específicos	62
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 Animais	63
4.2 Variáveis Analisadas	63
Ganho de peso	63
Consumo de dieta	63
Determinação da concentração de retinol hepático:	64
Peroxidação lipídica	65
Proteína Carbonilada	66
Concentração de Ferro nos tecidos	67
4.3 Análise Estatística	68
5 RESULTADOS	69
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. Introdução

A ingestão adequada de micronutrientes é importante para a manutenção das diversas funções metabólicas do organismo. A vitamina A é um micronutriente essencial necessário ao crescimento e desenvolvimento. Embora abundante em vários alimentos, é potencialmente responsável por uma das carências nutricionais mais prevalentes no mundo, a hipovitaminose A, sendo conhecidas diversas patologias desencadeadas pela deficiência desse micronutriente (Majchrzak; Fabian; Elmadfa, 2006; Burria & Cliffordb, 2004; Almeida-Muradian, Penteado, 2003). A deficiência de vitamina A ocorre de forma endêmica principalmente em países em desenvolvimento, o que a torna um nutriente de grande interesse em saúde pública (Fujita et al., 2009). A cegueira noturna compreende o sintoma clínico mais comum. Estima-se que nestes países 43 milhões de crianças menores de 5 anos de idade apresentam deficiência de vitamina A, e 140-250 milhões de pessoas apresentam risco de deficiência de vitamina A (Kabat et al, 2009).

Nos alimentos de origem animal a vitamina A está presente na forma pré-formada, retinol, enquanto os carotenóides pró-vitamínicos, que compreendem compostos precursores de retinol, estão presentes nas frutas e hortaliças, sendo o β -caroteno o principal precursor de vitamina A nestes alimentos (Maoka, 2009).

A vitamina A desempenha inúmeras funções vitais no organismo humano, desde a fase neonatal até a fase adulta. Podem-se destacar a proliferação e diferenciação celular, o desenvolvimento embrionário, o mecanismo da visão e imunidade (Esteban-Pretel et al., 2009), e a potente atividade antioxidante, (Oliveira et al, 2009). A recomendação de ingestão diária (RDA) desse micronutriente varia entre 500 $\mu\text{g}/\text{dia}$ a 1000 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de acordo com o sexo e faixa etária (Johnson-Davis et al., 2009; Oliveros et al., 2007). A sua carência está associada com o aumento da morbidade e mortalidade infantil em crianças, relacionadas principalmente a doenças infecciosas (Vega et al., 2009; Oliveros et al., 2007).

O potencial antioxidante da vitamina A tem sido associado a sua capacidade de interagir com as espécies reativas de oxigênio (EROs) através da transferência de elétrons, remoção de íons hidrogênio, ou pela adição de espécies radicalares (Fraser, Enfissi, Bramley, 2009; Young & Lowe, 2001). No organismo humano, diversas EROs são produzidas incluindo o oxigênio singlete($^1\text{O}_2$), radical

hidroxil($\cdot\text{OH}$), superóxido($\text{O}_2\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs reagem facilmente com as biomoléculas causando principalmente peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação de proteínas (Halliwell & Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007). Estes danos estão associados a diversos processos patológicos, como acidentes vascular-cerebrais, infarto do miocárdio, patologias do sistema nervoso (doença de Alzheimer e Parkinson), vários tipos de câncer e ao processo de envelhecimento natural. O mecanismo e a eficiência de eliminação destas espécies dependem do potencial antioxidante do organismo, integrado pelas defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, essa última constituída por compostos provenientes da dieta, tais como vitamina A, carotenóides, vitamina C, polifenóis (Englberge et al., 2009).

Embora a literatura mostre que a ação antioxidante da vitamina A ocorre através de reações de óxido-redução, estudos sugerem a existência de uma relação sinérgica entre o metabolismo da vitamina A e do ferro, esse último um potente agente oxidante (Arruda et al. 2009; Ma et al., 2008; Tanumihardjo, 2002; Strube, Beard, Ross, 2002). A hipovitaminose A parece ser uma das causas da perda da homeostase de ferro levando a redução da incorporação de ferro nos eritrócitos e ao acúmulo deste nos tecidos. Indivíduos adultos anêmicos suplementados com vitamina A ou β -caroteno têm absorção duas vezes maior de ferro não hêmico. A vitamina A parece estar diretamente relacionada com o tratamento da anemia ferropriva. Estudos em animais evidenciam que a deficiência de vitamina A leva ao acúmulo de ferro nos tecidos, sugerindo que essa deficiência diminui a mobilização de ferro e/ou aumenta a absorção intestinal de ferro (Arruda et al. 2009; Maoka, 2009; Bolem, Wendell, 1990; Meija, Chew, 1988).

O ferro em excesso pode catalisar reações de oxidação e levar a produção de radicais livres e conseqüentemente aumentar o estresse oxidativo nos tecidos (Valko et al., 2007; Papanikolaou & Pantopoulos, 2005). Assim, os programas de suplementação de micronutrientes nas regiões onde a anemia ferropriva e hipovitaminose A coexistem devem considerar essa interação. O presente trabalho teve por objetivo avaliar *in vivo* o efeito da deficiência de vitamina A na concentração de ferro e no dano oxidativo em tecidos de ratos com diferentes estágios de depleção.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Vitamina A

2.1.1 Retinóides

O termo vitamina A descreve um grupo de compostos lipossolúveis metabolicamente relacionados como retinol e seus ésteres, é mais empregado para designar a família dos retinóides (retinil, retinol, retinal e ácido retinóico em suas diversas isoformas) (Glenn, 2009; Arnhold et al., 2002). Contém um anel β -ionona e uma cadeia de hidrocarboneto (Figura 1(a)), com saturações alternadas, ligadas a um grupo funcional. A variação de um retinóide para outro está em suas diferentes formas de oxidação do grupo funcional (Thompsona & Gal, 2002).

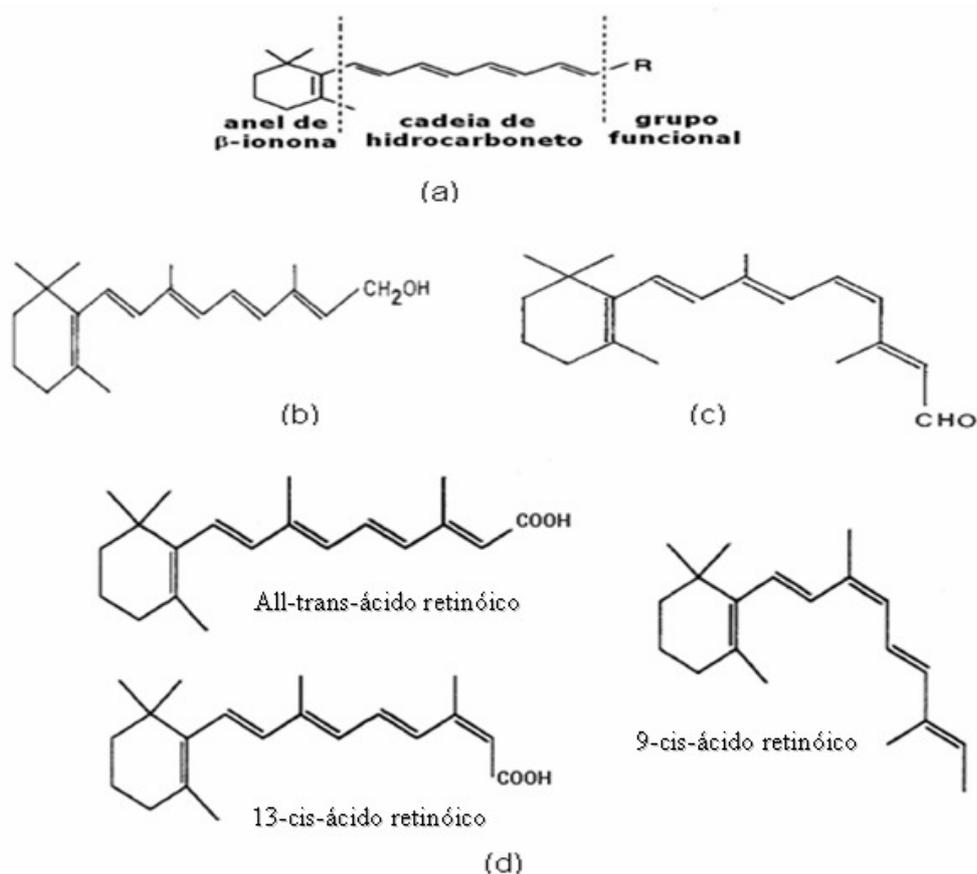


Figura 01. Estrutura química da vitamina A (a); estrutura do all-trans-retinol (b); estrutura do 11-cis-retinal existente na retina e ligado a rodopsina. (c); principais isoformas do ácido retinóico (d). Fonte: Senno, 2004.

A vitamina A é um micronutriente essencial para os processos biológicos como visão, reprodução, crescimento e diferenciação celular, e desenvolvimento embrionário na maioria dos mamíferos (Majchrzak, Fabian, Elmadfa, 2006). Não é sintetizada pelo organismo humano sendo absorvida pelo intestino através da dieta, podendo ser fornecida por meio dos alimentos e suplementos (Mucida, Park, Cheroutre, 2009; Anderson, 2002). Embora a vitamina A tenha sido uma das primeiras vitaminas a ser identificadas, a compreensão plena de seus efeitos fisiológicos e mecanismos de ação permanecem obscuros (Maoka, 2009; Oliveros et al., 2007; Burria & Cliffordb, 2004).

Os retinóides estão presentes nos alimentos de origem animal, tais como fígado, ovos e produtos lácteos, na forma de ésteres de retinil, molécula de retinol esterificada a uma molécula de ácido graxo; e nos alimentos de origem vegetal, principalmente em vegetais amarelos e verde-escuros, na forma de carotenóides pró-vitamina A que são parcialmente convertidos em retinol durante ou após a absorção. Na maioria dos produtos, a fortificação é feita com a utilização de carotenóides pelo fato de apresentarem toxicidade menor do que a vitamina A (Dias et al., 2009; Luo et al., 2009; Rutkowska & Stolyhwo, 2009).

Grande parte da população humana depende de carotenóides dietéticos como a principal fonte da vitamina A (Goswami, Ivanoff. Barua, 2003). Desde os primeiros relatos estruturais do β -caroteno por Kuhn e Karrer em 1928–1930, aproximadamente 750 formas de carotenóides já foram descritas (Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 2004), e cerca de 20 novas estruturas de carotenóides estão sendo relatadas anualmente através da melhoria nos instrumentos de análise (Maoka, 2009). Embora sejam abundantes as formas de carotenóides nos vegetais, apenas cerca de 50 destas são metabolizadas pelos organismos vivos como precursores de vitamina A, sendo o β -caroteno a forma com maior atividade pró-vitamínica (Figura 02) (Englberge et al., 2009; Jun et al., 2009). A atividade pró-vitamínica de um carotenóide depende da presença do anel de β -ionona em sua estrutura.

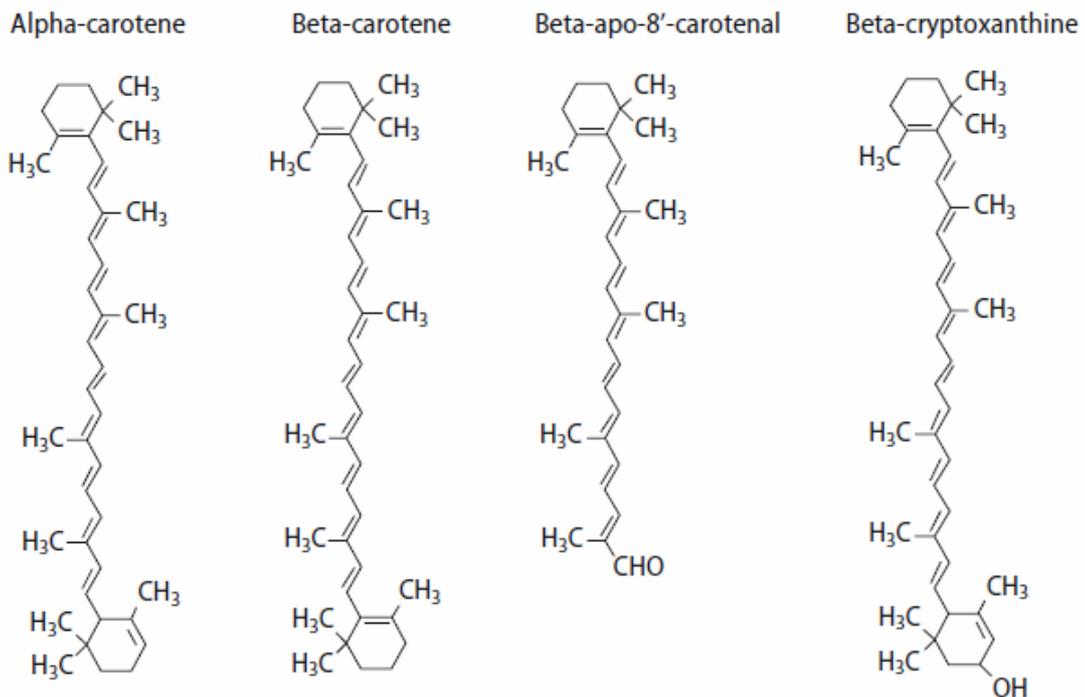


Figura 02. Estrutura Química dos principais carotenóides dietéticos pró-vitâmnicos .
Fonte: Dragsted, 2008.

Embora essencial ao metabolismo, a ingestão elevada de vitamina A está relacionada com vários efeitos adversos, principalmente no metabolismo hepático, e parece ser teratogênica (Yehya et al., 2009; Anderson, 2002; Arnhold et al., 2002). Alguns estudos demonstraram que altas doses de vitamina A, utilizadas principalmente pelo uso terapêutico em tratamento de leucemia e dermatológicos, induz a hepatotoxicidade, cefaléia, irritabilidade, confusão mental, depressão e alterações no metabolismo lipídico (De Oliveira et al., 2009; Myhre et al., 2003; Fenaux, Chomienne, Degos, 2001). Por este motivo, a dose diária de ingestão deve ser limitada para evitar os agravos da hipervitaminose. O limite máximo de ingestão segura (UL) para essa vitamina, estabelecido pelo Comitê Científico de Alimentação Humana (2002) e pela Comissão da Ingestão Dietética de Referência (2002), é de 3000 µg/dia (in Majchrzak (2006), a ingestão recomendada varia de 300 a 1300 µg/dia de acordo com o sexo, faixa etária e estado fisiológico segundo Dietary Reference Intakes (DRIs).

A deficiência de vitamina A é um dos grandes problemas de saúde pública em 118 países, atingindo cerca de 20 milhões de mulheres grávidas; aproximadamente 100 a 140 milhões de crianças pré-escolares; entre 250.000 a 500.000 crianças por

ano sendo 50% destas menores de um ano (Davey et al., 2009; Kabat et al., 2009). Segundo o Sistema de Informações de Deficiência de Micronutrientes (Micronutrient Deficiency Information System- MDIS) da Organização Mundial de Saúde cerca de três milhões de crianças com idade de 0 a 5 anos adquirem xerofthalmia, doença caracterizada por debilidades visuais em decorrência da deficiência de vitamina A. No caso de gestantes, as estatísticas apontam que cerca de 5% sofrem de cegueira noturna durante a gravidez (WHO/FAO, 2002). A deficiência de vitamina A apresenta muitas outras conseqüências além da cegueira noturna ou a perda de visão, é relatado retardo no desenvolvimento mental, encurtamento e espessamento dos ossos, atrofia dos testículos, imunodeficiência, levando a um aumento da morbidade e mortalidade (Wei et al., 2009).

No Brasil, considera-se que as informações existentes são insuficientes para definir a situação da carência de vitamina A no país, não dispondo de estudos suficientes e adequados que permita definir o problema da hipovitaminose A como um todo (Batista-Filho, Rissin, 2003). Atualmente, 23% das mortes por diarreia em crianças brasileiras são reconhecidamente associadas a deficiência de vitamina A, sendo o Brasil classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como área de carência sub-clínica grave. Calcula-se que o número de crianças com carência marginal de vitamina A seja de cinco a dez vezes maior do que o número de crianças com carência clínica (Kobori, Amaya, 2008; Ramalho, Flores, Saunders, 2002). Estudos realizados principalmente na região nordeste têm indicado a deficiência de vitamina A como um grave problema de saúde pública, registrando 14,7 a 54,7% de inadequação dos níveis séricos de retinol (Prado et al., 1995). Inquéritos bioquímicos confirmam que há deficiência de vitamina A também nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Ramalho, Flores, Saunders, 2002). Os grupos populacionais mais atingidos são as gestantes, nutrizas e crianças, sendo a faixa etária 3 a 5 anos a mais vulnerável (Batista-Filho, Rissin, 2003; Ramalho, Flores, Saunders, 2002).

A forma subclínica assintomática aumenta a morbidade e mortalidade por infecções, diarreia, doenças do trato respiratório (Kabat et al, 2009), e anemia (West Jr, 2003). Em mulheres grávidas está associada com alta mortalidade durante a gravidez (West Jr, 2003). A deficiência da vitamina A na dieta ou defeito do metabolismo dessa vitamina são citados como as prováveis causas de distrofias e disfunções visuais (Kabat et al., 2009). Em alguns casos não é claro se a ocorrência

de hipovitaminose A esteja ligada ao consumo insuficiente ou a outros fatores envolvidos na biodisponibilidade e bioconversão dos carotenóides dietéticos (Goswami, Ivanoff, Barua, 2003). A causa primária das deficiências vitamínicas é a falta ou aporte deficiente dessas substâncias na dieta (Ramalho, Flores, Saunders, 2002; WHO, 1996).

As principais enfermidades causadas pela hipovitaminose A estão associadas à visão, na deficiência de vitamina A ocorre a condição chamada cegueira noturna (nictalopia), e quando se torna mais severa começa a alterar a integridade ocular afetando principalmente a conjuntiva e a córnea. Ocorre uma série de alterações oculares que vão desde o ressecamento (xeroftalmia) até a degeneração total (queratomalacia), geralmente irreversível, da conjuntiva e/ou da córnea chegando a conseqüente cegueira (Tanumihardjo, 2002), causada pela cicatrização da córnea em uma região que compromete a passagem da luz para a retina. Essa cicatrização ocorre em decorrência da inibição da diferenciação das células epiteliais basais causada pela depleção de vitamina A, o que faz com que estas células sofram queratinização (Vauclair et al., 2007). Publicações da Organização Mundial de Saúde de 2002 indicam que pelo menos 250.000 crianças perdem a visão anualmente em conseqüência da falta de vitamina A em suas dietas.

A hipovitaminose A também tem sido associada a efeitos negativos na hematopoiese, parece contribuir para o desenvolvimento da anemia (Davey et al., 2009), acúmulo de ferro nos tecidos em animais submetidos a deficiência dessa vitamina (Arruda et al. 2009), sugerindo que a deficiência de vitamina A diminui a mobilização e/ou aumento da absorção de ferro (Roodenburg et al., 2000). Este é um aspecto importante a ser considerado em países em desenvolvimento já que as anemias nutricionais constituem um dos principais problemas de saúde pública.

A hipovitaminose A pode ser diagnosticada por meio de testes bioquímicos plasmáticos e pelo teste Relativo de Dose Resposta (RDR). A dosagem plasmática de vitamina A, embora já tenha sido muito usada, possui algumas limitações, pois o fígado, principal órgão que atua como estoque de vitamina A, mantém os níveis deste micronutriente constantes no plasma de forma que seus níveis no sangue só declinam quando as reservas hepáticas já estão esgotadas (Ross, Pasatiempo, Green, 2004; Davila et al., 1985).

No teste de dose resposta (RDR) são diluídas doses de vitamina A em óleos e oferecidas ao paciente. Amostras do plasma são coletadas e dosadas no tempo 0

(zero) e 5 horas após a administração das doses. O RDR é um bom meio de se avaliar o estado nutricional de vitamina A, embora a necessidade de duas coletas de amostras sanguíneas possa ser um problema quando se trata de crianças, ou de lactantes, por causa da necessidade da permanência deles no local de coleta (WHO, 2002).

2.1.2 Metabolismo da Vitamina A

A biodisponibilidade da vitamina A é afetada, entre outros fatores, pelo estado nutricional do indivíduo e pela integridade da mucosa intestinal. Alguns fatores nutricionais importantes para a biodisponibilidade da vitamina A são: proteínas, gorduras, vitamina E e zinco (Almeida-Muradian, Penteado, 2003; Ramalho, Flores, Saunders, 2002), além da alta prevalência de infecções, a falta de saneamento ambiental e de água tratada, as condições sócio-econômicas desfavoráveis e os tabus alimentares aumentam a demanda ou interferem na ingestão e metabolização da vitamina A pelo organismo (Ramalho, Flores, Saunders, 2002).

A absorção da vitamina A e dos carotenóides pró-vitamínicos começa com sua liberação da matrix dos alimentos pela ação de enzimas presentes no estômago e intestino, e incorporação em micelas compostas por ácidos biliares, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolipídeos. A eficiência da liberação é influenciada pela disposição física dos carotenóides no alimento, o tamanho das partículas trituradas pela mastigação e ação das enzimas e ácidos estomacais, e da eficiência das enzimas digestivas (Parker, 1996).

O retinol, após incorporação às micelas, é absorvido pela mucosa intestinal no duodeno, por um mecanismo envolvendo difusão passiva, semelhante ao do colesterol e triglicérides, produtos da lipólise. A eficiência de absorção, ou biodisponibilidade, é maior para vitamina A pré-formada (80-90%) comparada aos carotenóides (50-60%), e depende tanto de sua polaridade quanto da composição dos ácidos graxos da micela e da eficiência do organismo na liberação destes da matriz do alimento. Essencialmente todos os ésteres de retinil ingeridos (vitamina A) são convertidos no lúmen intestinal a retinol e então absorvido pelos enterócitos (Parker, 1996).

O β -caroteno é a principal fonte alimentar de vitamina A, por ser uma molécula pró-vitamínica, cada molécula de β -caroteno é clivada para formar retinal,

essa ação é catalisada pela enzima β - β -caroteno 15,15' monooxigenase (β CMOOX) localizada no epitélio intestinal, e produz duas moléculas de retinal que podem ser reduzidas de maneira reversível a retinol ou irreversivelmente oxidadas a ácido retinóico pela retinal desidrogenase. (Fields, Soprano, Soprano, 2007).

Ao ser absorvido pelo enterócito o retinol pode permanecer livre ou pode ser associado à proteína celular ligante de retinol (CBRPII), e em seguida, independente da fonte alimentar de vitamina A, o retinol é esterificado novamente a éster de retinil (RE) pela lecitina-retinol-aciltransferase (LRAT) e incorporado nos quilomícrons. A LRAT esterifica o retinol livre e o retinol ligado a CRBP II, enquanto a enzima Acil Coenzima A: Retinol Acil Transferase (Acyl CoA: Retinol Acyl Transferase- ARAT), esterifica apenas o retinol livre no citoplasma. Tanto os ésteres de retinil quanto os carotenóides intactos são incorporados aos quilomícrons, os quais são exocitados no sistema linfático para então caírem na corrente sanguínea e serem transportados até o fígado, onde os ésteres de retinil serão absorvidos e armazenados nas células "estreladas" (Parker, 1996;), e em menor quantidade aos tecidos da medula óssea, baço, tecido adiposo, e os rins (Fields, Soprano, Soprano, 2007).

Nos tecidos, os quilomícrons sofrem ação das Lipases Lipoproteicas (Lipoprotein Lipase- LPL), permitindo com isso a liberação de ácidos graxos, carotenóides e dos retinóides livres. Após sofrerem ação da lipase lipoprotéica os quilomícrons resultantes são denominados quilomícrons remanescentes, e ao chegarem ao fígado liberam os ésteres de retinil restantes os quais são incorporados às células parenquimais hepáticas (Figura 03) (Senno, 2004).

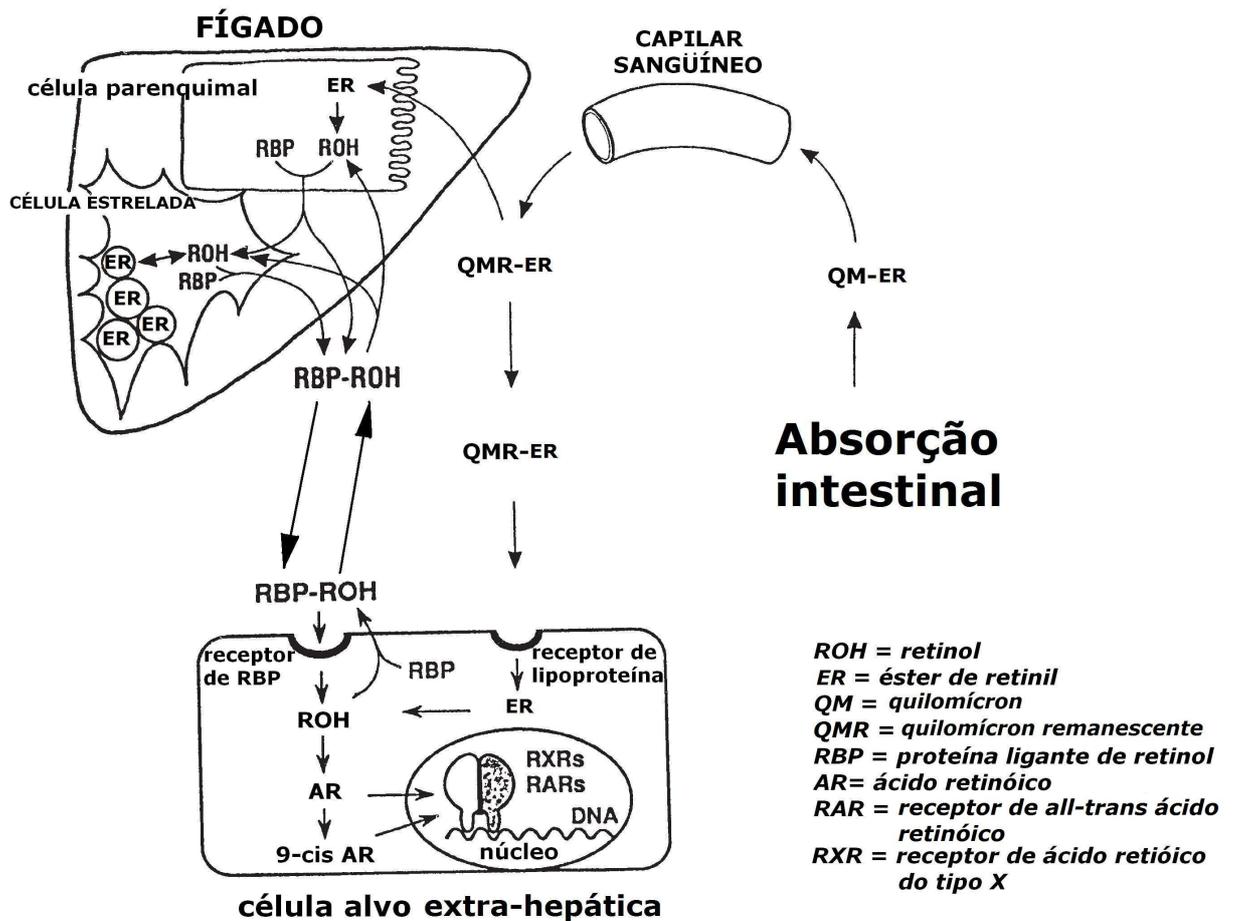


Figura 03: Ação nos tecidos extra-hepáticos e armazenamento no fígado da vitamina A adquirida na dieta. A vitamina A atua principalmente como um hormônio nuclear, na forma de ácido retinóico. No fígado a vitamina A é estocada no interior das células estreladas na forma de éster de retinil, até que seja transportada ao restante do organismo ligada a proteína ligante de retinol (RBP) como retinol. Fonte: Senoo, 2004 com adaptações.

Quando há demanda de vitamina A pelos tecidos os ésteres de retinil das células parenquimais do fígado se ligam principalmente a CRBP-III e pela ação da enzima LRAT, são oxidados a retinol e transportados para os tecidos alvos através da circulação sanguínea ligados a proteína ligante de retinol (RBP) (Touma et al., 2009; Fields, Soprano, Soprano, 2007). Após captação pelos tecidos alvos, o retinol pode ser metabolizado por seqüências de reações de oxidação e produzir duas classes de retinóides biologicamente ativos: o retinaldeído, por ação da enzima álcool desidrogenase (ADH1,4,5), e o ácido trans retinóico, pela ação da enzima retinal desidrogenase (RALDH) (Ghenimi et al., 2009; Manicassamy, Pulendrana, 2009; Parker, 1996). 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. Alguns tecidos são capazes de produzir ácido retinóico diretamente do β -caroteno não precisando passar necessariamente a retinol ou retinal (Fields, Soprano, Soprano, 2007).

Os ácidos retinóicos (RA) possuem em sua estrutura o grupo COOH ligado ao carbono 15 e inclui várias isoformas, representados principalmente pelos all-trans-ácido-retinóico (all-trans-RA), o 13-cis-ácido retinóico e o ácido-9-cis-retinóico (9-cis-RA) (Figura 1), desempenham funções muito importantes, atuam como potentes hormônios na expressão de centenas de genes, como por exemplo, nos genes responsáveis pela síntese de enzimas como a álcool desidrogenase e a transglutaminase, as proteínas transportadoras de retinol, além de potentes reguladores de diversos processos metabólicos, atuam nos genes diretamente envolvidos na diferenciação celular e na inibição da proliferação celular (Mitro et al., 2007; Vauclair et al., 2007; Ross, 2003).

Uma vez no núcleo, os ácidos retinóicos são responsáveis pela ativação de duas famílias de receptores nucleares, denominados receptores de ácido retinóico (RAR) e receptor X de retinóides (RXR). Esses receptores possuem três formas, α , β e γ , codificados por três diferentes genes. Na presença de seus ligantes naturais, o all-trans-RA é capaz de se ligar com alta afinidade ao RAR α , β e γ , enquanto o 9-cis-RA, embora se ligue em ambos os receptores, apresenta maior afinidade pelo ao RXR α , β e γ . Quando ativadas pelo ácido retinóico, estas proteínas formam o complexo ligante-receptor, formando dímeros do tipo RAR/RXR ou RXR/RXR, e atuam como fatores de transcrição, ligam-se a seqüências específicas do DNA, denominadas elementos responsivos ao ácido retinóico (RARE ou RXRE), localizados na região 5' regulatória de genes que sofrem regulação pelos retinóides (Ross, 2003).

O all-trans-RA e o 9-cis-RA, por apresentarem alta afinidade por seus receptores de membrana, tem a produção e catabolismo extremamente controlados, porém ainda pouco elucidados (Ross, 2003). Uma hipótese é que as enzimas LRAT e a citocromo da família P450 (família de enzimas envolvidas no catabolismo de corpos estranhos) especificamente a CYP26 (que degrada o all-trans-retinol a metabólitos polares) representam um ponto chave na regulação da homeostase dos retinóides (Ross, 2003). O nível plasmático da proteína RBP é significativamente

reduzido com o aumento da concentração hepática de RA, sugerindo que o aumento de RA hepático sinaliza que os tecidos periféricos estão com níveis normais de retinóides (Randolph, Ross, 1991). Um outro estudo sugere que o intestino possa ser o ponto de regulação dos retinóides através da expressão da enzima β CMOOX (β - β caroteno 15,15 monoxigenase), sugerindo que a regulação dessa enzima é realizada via RAR. O tratamento de animais com antagonistas de RAR provocou o aumento da atividade da β CMOOX intestinal (Bachmann et al., 2002). Estudos prévios demonstraram que essa enzima é citosólica e que sua atividade parece ser dependente do íon ferroso (Fidge, Smith, Goodman, 2001), porém outros estudos sugeriram que um ou mais co-fatores celulares também são essenciais para a plena atividade enzimática em mamíferos (Paik et al., 2001).

2.2 Ferro

Do ponto de vista biológico o ferro, é o mais importante dos metais, sem o qual, a vida não seria possível, exceto para alguns microrganismos da família *Lactobacillus* (Crichton et al., 2002). É capaz de formar um número muito amplo de estruturas, na sua grande maioria complexados a compostos orgânicos, destacando-se aqueles envolvidos nos processos biológicos (Monsen, 1999). O ferro é componente essencial de diversas metaloproteínas e desempenha papel essencial em diversos processos bioquímicos, tais como: transporte de oxigênio, metabolismo oxidativo e crescimento celular (Lynch, 1997).

A maior parte do ferro corporal está ligada à hemoglobina no sangue, e em menor quantidade, à mioglobina nos músculos, às enzimas citocromos e proteínas com centro ferro-enxofre (FeS) envolvidas nas transferência de elétrons na cadeia respiratória. (Ponka, 2000).

As diversas propriedades químicas do ferro, tais como a capacidade de formar complexos com compostos orgânicos, o seu potencial óxido-redutor sendo capaz de alternar entre as formas ferrosa (Fe^{+2}) e férrica (Fe^{+3}), são responsáveis pela função indispensável em diversos organismos vivos (Papanikolaou, Pantopoulos, 2005). O oxigênio é capaz de oxidar Fe^{+2} à Fe^{+3} espontaneamente, desta forma o estado de oxidação mais estável do ferro, em qualquer que seja o meio que contenha oxigênio é o férrico (Barros, 1992).

Em torno de 1 a 2 mg do ferro dietético são absorvidos diariamente pelos enterócitos duodenais para repor o ferro perdido. Entretanto, estima-se que cerca de 20-30 mg de ferro por dia é suprida endogenamente para a eritropoiese e demais funções. Na medula óssea o ferro é utilizado para a inserção no anel de porfirina para formação de hemoglobina. O turnover do ferro é mediado principalmente pela destruição dos eritrócitos senescentes pelo sistema reticuloendotelial (Beard, 2009). Os eritrócitos, que contém cerca de 80% do ferro corporal, apresentam uma média de 120 dias de funcionalidade em seres humanos. Ao final de sua vida funcional esses são reconhecidos como senescentes devido a mudanças na estrutura de suas membranas e são catabolizados nas células de Kupffer e macrófagos do baço. Após a fagocitose, a hemoglobina é desnaturada para liberação do heme, esse no espaço intracelular é degradado pela heme oxigenase que libera o ferro. Cerca de 85% do ferro proveniente da degradação de hemoglobina é novamente liberado para a

circulação em forma de ferro ligado a transferrina ou ferritina. Os hepatócitos possuem uma reserva fisiológica, estratégica, de ferro de aproximadamente 1g, mobilizada quando há um desequilíbrio na homeostase de ferro (Beard, 2009).

Na dieta, o ferro está presente sob duas formas fundamentais, heme e não-heme ou inorgânico, em dois estados de oxidação, ferroso e férrico, que respectivamente, podem doar ou receber elétrons facilmente. O ferro hêmico está presente principalmente nas carnes, enquanto o ferro não-heme encontra-se presente nos alimentos de origem vegetal e alimentos fortificados. Embora o ferro hêmico seja mais biodisponível, a forma inorgânica (Fe^{+3}) está presente em maior concentração na dieta (Vander et al., 2005; Martínez-Navarrete et al., 2002).

O ferro heme refere-se a todas as formas de ferro de origem animal (Figura 04). Nessa forma o ferro aparece no centro do anel orgânico chamado de porfirina (composto orgânico formado por quatro anéis pirrólicos ligados por ligações metínicas (-CH-), que possui no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico), essa estrutura é encontrada na mioglobina, hemoglobina, citocromos, peroxidases e citocromo oxigenase (Beard, 2009). O grupamento heme é o local de transporte de elétrons nos citocromo e citocromo oxigenase; das peroxidases que protegem as células das lesões oxidativas ao reduzirem peróxidos a água; é também o local de captação de oxigênio pela mioglobina e hemoglobina (Zhenyu, 2009).

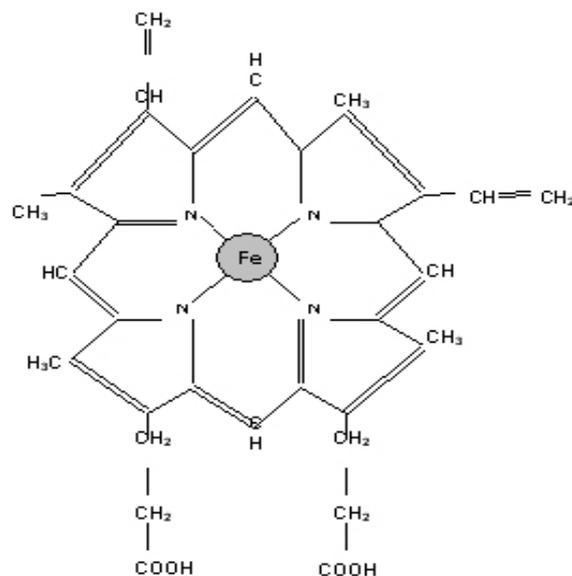


Figura 04: Estrutura química do grupo heme.

O ferro não-heme compreende todas as outras formas de ferro. Nessa forma o ferro aparece ligado a diversos compostos presentes nos alimentos sendo liberado no trato gastrointestinal após digestão. Uma vez liberado da matriz dos alimentos, o ferro não-heme apresenta-se na forma férrica no estômago e permanece na forma solúvel enquanto o pH do meio se mantiver ácido. Diversos compostos alimentares podem se ligar ao ferro não-heme, aumentando ou diminuindo sua biodisponibilidade. O ácido cítrico, alguns aminoácidos e o ácido ascórbico são promotores da absorção desse micronutriente. Enquanto os fitatos, polifenóis, taninos, ácido tânico se ligam aos íons ferroso ou férrico reduzindo a biodisponibilidade (Beard, 2009).

Embora seja um elemento essencial, a absorção de ferro nos mamíferos é extremamente controlada por mecanismos moleculares, eficazes na manutenção do equilíbrio entre demandas e oferta, que estabelecem a homeostase de ferro no organismo (Jamieson & Kuhnlein, 2008; Testa, 2002).

A metabolização do ferro heme tem início com sua liberação das moléculas de hemoglobina e mioglobina dos alimentos pela ação de enzimas proteolíticas presentes no estômago e intestino delgado. A proteína carreadora do grupo heme-1 (HCT1) tem sido apontada como responsável pela absorção do ferro heme dietético em função de sua alta expressão nos enterócitos do duodeno. Após absorção, o grupo heme aparece associado a uma vesícula ligada a membrana citoplasmática. No interior da vesícula o heme é degradado pela enzima heme oxigenase 1 (HO-1) liberando no citosol o ferro na forma ferrosa (Fe^{+2}) que então parece seguir a mesma via que o ferro não hêmico (Beard, 2009).

A maior parte do ferro não-heme da dieta apresenta-se no trato gastrointestinal na forma férrica (Fe^{+3}), e precisa ser primeiramente reduzido a forma ferrosa (Fe^{+2}), possivelmente por ação da enzima, citocromo b redutase (Dcytb) presente na membrana da borda em escova do intestino ou por agentes redutores presentes na própria dieta. Os íons ferrosos são então internalizados pelos enterócitos, através da proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), onde são novamente oxidados a forma férrica e incorporado a ferritina no enterócito ou exportado através da membrana basolateral (Beard, 2009).

Uma vez dentro da célula, o Fe^{+2} é oxidado a Fe^{+3} incorporado à molécula de ferritina e armazenado ou transportado até a membrana basolateral, por uma proteína semelhante a transferrina. Na membrana basolateral, a difusão do ferro é

facilitada pelo transportador transmembrânico, a ferroportina (IREG-1). 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, a apotransferrina, que o transporta através da corrente sanguínea às células alvo, essas células possuem receptores de transferrina. A associação do ferro com proteínas constitui uma forma de proteção celular contra possíveis danos oxidativos, catalisados por ferro livre e, facilita a captação deste pelos demais tecidos (Beard, 2009; Fairweather-Tait, 1997).

Embora a absorção intestinal de ferro heme e não-heme seja distinta, sua exportação pela membrana basolateral é comum a ambas as formas, e parece ser regulada pelas reservas de ferro do organismo através de uma sinalização mediada pelo peptídeo denominado hepcidina (Wang et al., 2006). O controle da absorção no lúmen intestinal é um ponto chave na regulação da homeostase de ferro corporal (Beard, 2009; Fairweather-Tait, 1997). Em situações de baixas concentrações de ferro corporal, observa-se um aumento significativo nos níveis de mRNA de DMT1 e da Dcytb duodenal, sugerindo que os genes DMT1 e Dcytb são regulados em sincronia, diferentemente do gene IREG-1, envolvido na transferência basolateral do ferro (Zoller et al., 2001; Dupic et al., 2002).

O ferro é transportado, entre os sítios de absorção, armazenamento e utilização, pela glicoproteína plasmática denominada transferrina (Tf), que se liga fortemente de forma reversível ao ferro. A transferrina é reconhecida por receptores de membrana específicos denominados receptores de transferrina (TfR), necessários 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) (Beard, 2009; Rivera et al., 2005; Hernandez M, Sousa, 2003).

A taxa de produção de transferrina é controlada pelo status de ferro corporal. Em indivíduos com depleção dos estoques de ferro e concentrações plasmáticas de ferro diminuídas a produção e concentração plasmática de transferrina aumentam na tentativa de manter normais as taxas desse nutriente no organismo. Porém, quando os estoques estão muito baixos, ou seja, na deficiência de ferro, saturação de transferrina baixa (<15%), o fornecimento de ferro para a medula óssea é insuficiente para manter normais as taxas de eritropoiese. A taxa de captação e a localização de captação do ferro a partir do pool plasmático são proporcionais ao

número de receptores de transferrina expressos na membrana plasmática da célula (Beard, 2009).

Embora o mecanismo de transporte de ferro intracelular ainda não tenha sido totalmente elucidado, esse mecanismo que envolve a hepcidina é o mais provável (Figura05) (Beard, 2009). Animais que não expressam hepcidina apresentam sobrecarga de ferro (Nemeth et al., 2004), enquanto a alta expressão de hepcidina em ratos e humanos leva a uma redução na absorção intestinal de ferro e conseqüente anemia ferropriva (Nicolas et al., 2002; Weinstein, et al., 2002). Assim, quando os estoques corporais de ferro estão repletos observa-se um aumento na expressão de hepcidina que se liga a ferroportina e promove sua internalização e degradação, inibindo a exportação do ferro dos enterócitos. Com o acúmulo de ferro no meio intracelular do enterócito, o DMT1 é inibido, promovendo a redução da absorção de ferro do lúmen intestinal. A hepcidina também inibe a liberação de ferro dos macrófagos (baço) e hepatócitos, agindo sobre a FPN presente nessas células, e nos trofoblastos placentários (Beard, 2009).

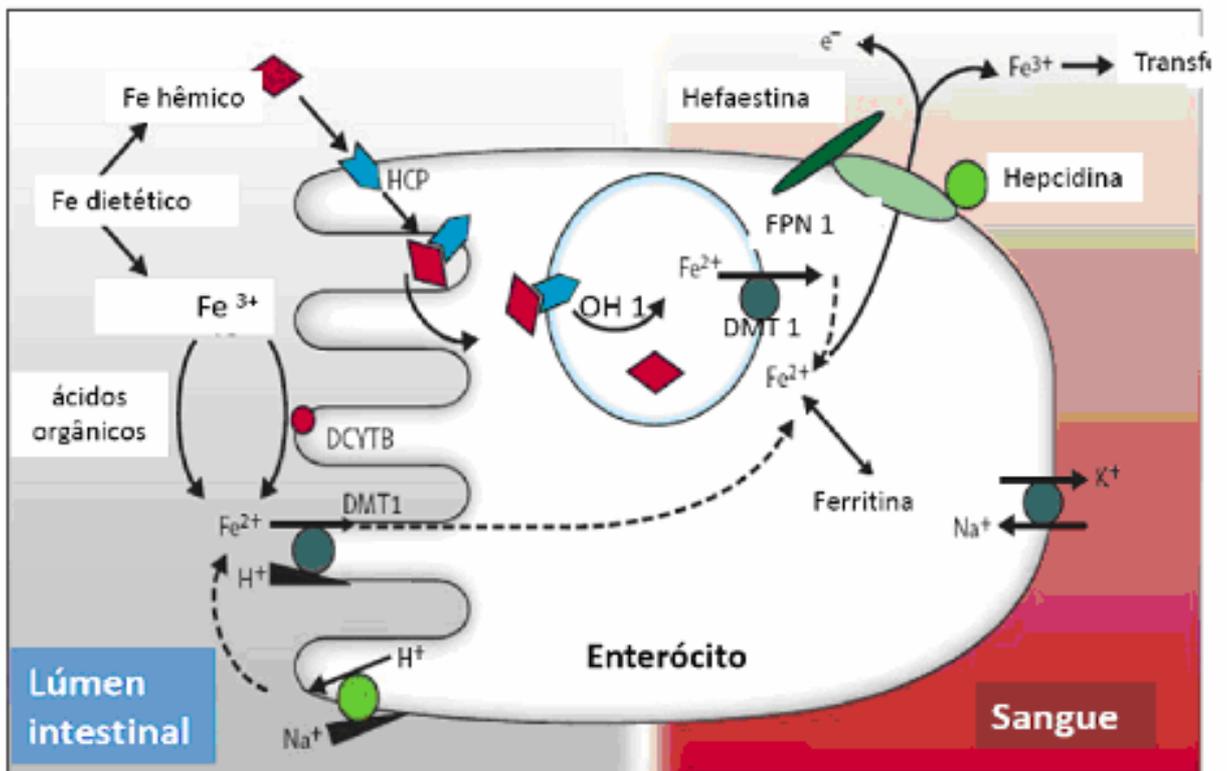


Figura 05 . Esquema de regulação da absorção intestinal de ferro pelo peptídeo hepcidina. Fonte: adaptado de Zimmermann and Hurrell, 2007.

O estado de ferro corporal está relacionado com o sexo, sendo que a média de ferro corporal total é de cerca de 3,8 g no homem, e 2,3 g na mulher. Em ambos os gêneros, as concentrações séricas de ferritina se mantêm estáveis até a adolescência. A partir da adolescência, essas concentrações aumentam nos homens, estabilizando por volta dos 30-35 anos de vida (McClung & Karl, 2009). Nas mulheres, as concentrações de ferritina são estáveis entre a menarca e a menopausa, aumentando após a menopausa (Swanson, 2003; Milman et al., 2004). Maiores concentrações de hemoglobina, ferritina sérica e consumo de ferro dietético são encontradas nos homens em relação às mulheres, provavelmente devido ao maior consumo de energia, carne vermelha e bebidas alcoólicas (Milman et al., 2004; Fleming et al, 2002). Polla, Polla, Polla (2003) sugerem inclusive que o menor status de ferro nas mulheres favorece a sua longevidade em relação aos homens.

A mesma propriedade que torna o ferro um elemento essencial ao metabolismo de alguns organismos, também é responsável por sua toxicidade. O ferro participa como catalizador de reações de óxido-redução, e conseqüente geração de radicais livre, sendo que o excesso desse nutriente pode levar ao estabelecimento de uma condição de estresse oxidativo (Maoka, 2009).

Devido à limitada capacidade do organismo em excretar ferro, a sobrecarga 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, ou ainda por alguma alteração na mobilização de ferro dos estoques corporais. Pacientes com sobrecarga de ferro acumulam excessivas quantidades deste em vários órgãos, inclusive no fígado, pâncreas, e coração, podendo resultar em cirrose hepática, diabetes e disfunção cardíaca.

A etiologia das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como o câncer, o diabetes, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e o envelhecimento precoce tem sido associada a danos oxidativos produzidos por radicais livres (Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 2004). O ferro pode agir como agente carcinogênico ou co-carcinogênico através da indução do estresse oxidativo, facilitação do crescimento tumoral e modificação do sistema imune (Jun et al., 2009). Estudos *in vivo*, *in vitro*, achados clínicos e estudos populacionais suportam a evidência de que o ferro, por meio da catálise de reações de geração de EROs e radicais livres (RL), tem participação na iniciação (dano ao DNA, como a oxidação de bases nitrogenadas e/ou a quebra de fitas simples ou dupla, e falha em repará-

lo), promoção de alteração fenotípica, onde a anomalia em uma célula leva a desorganização do tecido ou progressão (desenvolvimento do câncer) da carcinogênese (Englberge et al., 2009; Jun et al., 2009; Papanikolaou & Pantopoulos, 2005).

O ferro em excesso participa na reação de Fenton reagindo com EROs menos reativas para produzir EROs mais reativas. O ferro catalisa a reação do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) resultando na formação de radicais hidroxil ($\cdot OH$), que apresentam maior reatividade quando comparadas as anteriores. Os produtos de oxidação decorrentes destas macromoléculas podem iniciar lesão tecidual, direta ou indiretamente (Jun et al., 2009., Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em um estudo onde foram analisadas as fezes de 80 homens suplementados com sulfato ferroso (19 mg de ferro/dia) foi observado um aumento nas concentrações de ferro nas fezes de 60 para 300 $\mu mol/L$, e de 40% em radicais livres, aumentando o risco de desenvolvimento do câncer de intestino (Lund et al, 1999). Wu et al (2004) realizaram um estudo de coorte prospectivo com homens e mulheres com idades entre 35 e 74 anos, não portadoras de câncer no início do estudo. Após 18 anos de acompanhamento dos indivíduos foi observado um aumento do risco de morte por câncer entre os indivíduos com altos níveis séricos de ferro, saturação de transferrina ou cobre, sendo a associação com a saturação de transferrina mais forte entre as mulheres e com o cobre entre os homens. Knobel et al. (2006) demonstraram *in vitro*, usando células humanas de tumores de cólon (HT28 clone 19A), que o dano ao DNA, o crescimento celular e a geração EROS são aumentados na presença de Fe^{3+} .

O aumento da prevalência do excesso de ferro corporal entre homens, mulheres pós-menopausa e em idosos saudáveis tem sido também reportado e atribuído a mudanças nos hábitos dietéticos, como o alto consumo de carne, álcool e vitamina C, a fortificação de alimentos com ferro e a suplementação (Milman et al, 2004; Lahti-Koski et al, 2003; Milman et al, 2003; Yuan et al, 2003; Fleming et al, 2002; Milman et al, 2002).

As recomendações de ingestão de ferro foram revisadas, havendo uma redução para quase todos os grupos populacionais (National Academy of Science, 2001). Porém, muitos países ainda adotam a fortificação de alimentos de forma generalizada a toda população, podendo estar expondo a parcela da população que

apresenta estado nutricional de ferro normal a um maior risco de acúmulo de ferro e desenvolvimento de DCNT.

2.3 Interação entre Vitamina A e Ferro

A anemia ferropriva e a deficiência de vitamina A constituem as duas maiores deficiências nutricionais no mundo, as maiores prevalências estão em áreas geográficas coincidentes, sendo as crianças e mulheres em idade reprodutiva os grupos mais vulneráveis. E estas duas deficiências podem ocorrer simultaneamente (WHO, 2002; Monsen, 1999).

Alguns estudos sugerem a existência de um sinergismo entre o metabolismo de vitamina A e a homeostase de ferro no organismo (Schroeder, Reddy, Schalinske, 2007; Roodenburg et al., 2000; Roodenburg et al., 1996). A hipovitaminose A parece promover o acúmulo do ferro nos tecidos e, conseqüentemente, aumenta a sua disponibilidade para a catálise de reações de oxidação, como a geração de radicais livres. 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 a danos oxidativos catalisados por ferro (Viatte et al., 2006).

Embora a associação entre o status de vitamina A e ferro tenha sido relatada na literatura pela primeira vez em 1978 por Hodges et al, o exato mecanismo de interação entre esses dois nutrientes ainda não é conhecido.

A vitamina A é necessária para eritropoiese, portanto quando há deficiência de vitamina A, o ferro não é incorporado às células vermelhas do sangue como em indivíduos normais. Há relato que evidencia a deficiência de vitamina A associada com a redução na incorporação de ferro aos enterócitos e redução na concentração de hemoglobina (Lynch, 1997). Também é descrita a associação entre a redução da vitamina A com redução do ferro sérico, baixa capacidade de ligação de ferro (TIBC) e saturação da transferrina, aumento na ferritina sérica, com uma maior deposição de ferro no fígado e baço (Chaston et al., 2008). No entanto ainda não há consenso sobre o efeito dessa deficiência na absorção de ferro (Walczyk et al., 2003).

Alguns mecanismos têm sido relatados para explicar esta interação. Alguns autores sugeriram que a deficiência de vitamina A pode diminuir a síntese de transferrina e assim reduzir o transporte de ferro (Bolem, Wendell, 1990), ou que a deficiência de vitamina A prejudica a captação de ferro pela medula óssea (Sijtma,

Van den Berg, 1993; Bolem, Wendell, 1990), ou ainda que esta deficiência é resultado de uma eritropoiese ineficiente (Roodenburg et al., 1996), ou que a deficiência de vitamina A afeta a mobilização de ferro armazenado nos tecidos (Meija, Chew, 1988).

A literatura tem descrito um efeito positivo da suplementação de vitamina A no status de ferro em humanos com anemia (Walczyk et al., 2003; Tanumihardjo, 2002) e em animais com deficiência de vitamina A (Kelleher, Lonnerdal, 2005). A suplementação combinada desses dois micronutrientes tem mostrado ser efetiva na redução da deficiência de ferro e anemia ferropriva quando comparada com a administração de ferro ou vitamina A separadamente (Constante et al. 2006; Souza, Vilas Boas, 2002).

O efeito do ferro sobre o metabolismo da vitamina A e estado nutricional também tem sido bastante estudado. Em ratos foi observado que a deficiência de ferro está associada com baixa concentração de retinol plasmático e aumento hepático de vitamina A, e o aumento na deposição de vitamina A no fígado parece estar associada com baixos níveis de hemoglobina sanguínea. Estes resultados sugerem que o metabolismo de vitamina A é alterado e a mobilização desta vitamina pode ser prejudicada na deficiência de ferro (Strube, Beard, Ross, 2002; Rosales et al., 1999).

Strube et al. (2002) investigaram os efeitos da deficiência de ferro e vitamina A isoladamente e combinados, e relacionaram com dados bioquímicos, moleculares e hematológicos desses micronutrientes. A restrição de ferro reduziu o ganho de peso, a ingestão alimentar, e os níveis de hemoglobina, hematócrito, ferro sérico e saturação de transferrina. Os autores observaram ainda que a quantidade de ferro dietético afeta a concentração plasmática e hepática de retinol. A deficiência de ferro esteve associada com uma baixa concentração de retinol plasmático e aumento na concentração de vitamina A hepática, indicando insuficiência na mobilização de estoques de vitamina A hepática durante a deficiência de ferro. A deficiência marginal de vitamina A não agravou os parâmetros de ferro durante a deficiência de ferro.

Arruda et al. (2009) observaram que ratos com deficiência de vitamina A apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo, e que o estresse foi reduzido quando os ratos receberam alguma 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. Estes resultados consubstanciam outros achados que sugerem que a vitamina A por algum mecanismo modula 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, e não por interação direta com EROs (Arruda et al. 2009; Luo et al., 2009).

2.4 Radicais livres, Espécies Reativas e Estresse oxidativo

O acúmulo de oxigênio na atmosfera da Terra primitiva teve como consequência a seleção e adaptação de organismos vivos para um metabolismo aeróbico. Os organismos começaram então a interagir com o meio ambiente visando manter um equilíbrio interno que favorecesse a sobrevivência, o crescimento e a reprodução, contudo esta mudança levou ao aumento de mutações genéticas e à aceleração dos processos evolutivos. A principal vantagem foi a ocorrência de transformações metabólicas dependentes de oxigênio que levaram à melhor utilização dos substratos energéticos, permitindo o desenvolvimento de complexos organismos multicelulares (Halliwell & Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007; Fridovich, 1998).

A evolução dos organismos para um metabolismo aeróbico apresenta vantagens em relação aqueles com metabolismo anaeróbico, incluindo o melhor aproveitamento de energia derivada dos alimentos. Nos organismos aeróbicos a oxidação de uma única molécula de glicose produz 36 moléculas de ATP, enquanto apenas duas moléculas são produzidas em condições anaeróbicas. A produção de ATP no metabolismo aeróbico envolve a redução completa do O_2 molecular em H_2O , na cadeia respiratória mitocondrial, com a utilização de 4 elétrons. Entretanto, tais benefícios revelaram o potencial tóxico do O_2 , a redução incompleta da molécula de O_2 pode levar a formação de espécies químicas intermediárias, altamente reativas e que ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, as EROs, como H_2O_2 e 1O_2 , e, à geração de RL, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxil ($\cdot OH$). As EROs podem ser formadas em qualquer compartimento celular, porém a mitocôndria é o principal sítio de formação (Halliwell & Gutteridge, 2007). Desta forma, aqueles organismos que conseguiram desenvolver defesas contra estas espécies radicalares sobreviveram e fazem parte da enorme variedade de seres aeróbicos que hoje compõem a biosfera (Valko et al., 2007).

2.4.1 Radicais livres e Espécies Reativas

Radical livre é uma terminologia dada a todo átomo ou molécula que possui elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo. A instabilidade eletrônica que resulta da presença deste elétron desemparelhado torna essas espécies mais reativas (Halliwell & Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007; Yu, 1994).

Uma espécie radicalar pode ser formada a partir da perda ou ganho de um elétron por uma espécie não radicalar, ou pela dissociação de moléculas através da fissão homolítica, processo no qual o compartilhamento de elétrons é interrompido, gerando duas espécies com elétrons desemparelhados. As espécies reativas embora não apresentem elétrons desemparelhados podem participar de reações catalisadas por metais de transição, gerando radicais livres (Valko et al., 2006; Bauer, 2000).

No organismo humano são produzidos em condições normais as espécies reativas de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio. Dentre esses se destacam as EROs devido à alta reatividade e aos danos que podem causar, principalmente os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$). (Valko et al., 2007).

2.4.2 Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio é um paradoxo pelo fato de ser um gás essencial a produção de energia, mas ao mesmo tempo gerar EROs através do metabolismo celular. Em alta concentração pode ser extremamente prejudicial aos constituintes celulares. Várias moléculas exógenas, como os poluentes ambientais orgânicos e inorgânicos, ou processos endógenos, inflamação, doenças respiratórias, são conhecidas por aumentar a geração das EROs resultando no esgotamento de antioxidantes (Amado et al, 2009).

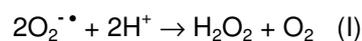
O oxigênio molecular apresenta 2 elétrons desemparelhados com *spins* paralelos em dois orbitais atômicos distintos, localizados na última camada eletrônica. Isto explica sua capacidade de agir como um agente oxidante. Entretanto, para se estabilizar o O_2 no estado basal precisa receber 2 elétrons com *spins* de mesma direção entre si e antiparalelos aos *spins* já presentes em seus orbitais. Esta restrição ao recebimento de elétrons pelo O_2 no estado basal faz com que o mesmo

2.4.2.1 Oxigênio Singleto ($^1\text{O}_2$)

É formado de acordo com a quantidade de energia absorvida, um dos elétrons do O_2 pode ter a direção de seu spin invertida, pareando com o elétron de spin antiparalelo presente no outro orbital atômico, ou o elétron pode manter-se no mesmo orbital atômico, porém ocorre a inversão do *spin*, tornando a molécula mais reativa e conseqüentemente tendo uma meia-vida curta. É altamente reativo no sistema biológico, capaz de inativar proteínas, provocar peroxidação lipídica e danos ao DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.4.2.2 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um agente oxidante relativamente fraco, é menos reativo quando comparado as outras EROs. Em organismos com um balanço adequado entre produção de radicais livres e defesas antioxidantes a maior parte do radical superóxido produzido é consumido em uma reação de dismutação espontânea ou catalisada enzimaticamente pela superóxido dismutase (SOD), cujo produto final é o H_2O_2 (Halliwell, 1994). Porém, uma série de enzimas, tais como xantina-oxidase e diversas oxidases, são capazes de produzir *in vivo* H_2O_2 (reação I). Os níveis de xantina oxidase aumentam em condições de trauma e hipóxia (Valko et al., 2006; Bauer, 2000).



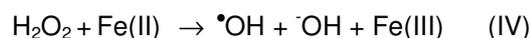
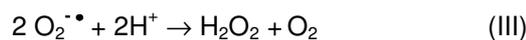
O que faz com que o H_2O_2 seja potencialmente danoso é a sua facilidade de difusão através de membranas biológicas e sua alta estabilidade. Dessa forma, o H_2O_2 produzido na mitocôndria alcança facilmente outros compartimentos intracelulares, podendo causar danos oxidativos inclusive no núcleo celular. Apesar disso, existem uma série de compostos (metais de transição, enzimas e pequenas moléculas) capazes de decompor o H_2O_2 , impedindo seus efeitos (Hermes-Lima, 2004).

2.4.2.3 Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

O radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) é produzido principalmente em sistemas biológicos devido a reduções incompletas do O_2 , acontece com cerca de 0,1- 0,2% do O_2 consumido pelos vertebrados. A maior parte do O_2 consumido pela respiração celular é reduzido pela enzima citocromo c oxidase, a qual, pela presença de dois grupamentos heme e dois grupos prostéticos de cobre, favorece a redução do O_2 a H_2O sem a liberação de intermediários (Valko et al., 2006; Fridovich, 1998). Quando ocorre o escape de elétrons, a redução do O_2 não é tetravalente, ocorrendo a formação do radical $O_2^{\cdot -}$, principalmente na mitocôndria (Bauer, 2000; Babior 1990).

O radical $O_2^{\cdot -}$ pode agir tanto como um agente redutor como agente oxidante. A reatividade varia de acordo com o composto que reage, é relativamente baixa, e conseqüentemente apresenta maior meia vida quando comparado ao radical $\cdot OH$. Paradoxalmente, é a espécie intermediária que causa maiores danos, uma vez que, devido à sua reatividade seletiva, pode difundir-se por maiores distâncias, alcançando diferentes alvos oxidativos (Valko et al., 2006; Fridovich, 1998).

Este radical pode iniciar uma seqüência de reações que levam a formação de outras espécies reativas de oxigênio não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxil ($\cdot OH$) (reações I, II e III). Em organismos vivos, a enzima superóxido dismutase (SOD), catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em O_2 e H_2O_2 . Na presença de metais de transição ou quinonas, o $O_2^{\cdot -}$ transfere elétrons para os peróxidos, e inversamente podem também atuar como oxidante, convertendo hidroquinonas em semiquinonas com concomitante produção de H_2O_2 (reações II, III e IV) (Hermes-Lima, 2004).



Os organismos vivos estão frequentemente expostos a agentes nocivos, por isso algumas células fagocitárias como os macrófagos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos produzem o radical $O_2^{\cdot -}$ para inativar vírus e bactérias (Babior 1990).

Este radical também é gerado em reações de autoxidação, onde catecolaminas, tetrahidrofolatos, e flavinas reduzidas reagem diretamente com o O₂ formando o radical O₂^{-•} (Halliwell & Gutteridge, 2007; Halliwell, 1994).

2.4.2.4 Hidroxil (•OH)

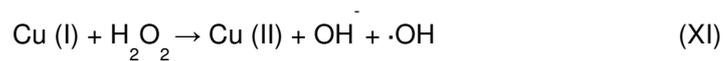
A característica mais relevante do radical hidroxil (•OH) é a sua alta reatividade com um tempo de meia-vida estimado em 1ns (Halliwell & Gutteridge, 2007). Em organismos vivos, devido a sua alta reatividade, pode reagir com todas as biomoléculas próximas do local que é gerado, provocando danos em DNA, lipídeos e proteínas, podendo assim inviabilizar uma célula originando um quadro de apoptose celular (Halliwell & Gutteridge, 2007; Bauer, 2000). O dano ao DNA pode resultar em interrupção ou indução da transcrição, indução de sinais para a transdução, erros de replicação e instabilidade genômica. Esse dano é o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e no envelhecimento (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O radical hidroxil pode ser formado a partir das espécies reativas peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e do radical superóxido (O₂^{-•}) com um metal de transição na sua forma reduzida, tais como ferro e cobre conforme as reações de Fenton e Haber-Weiss (reações V, VI e VII) (Yu, 1994). Na reação de Fenton a formação do •OH ocorre através da redução do H₂O₂, processo que resulta na quebra da ligação O-O, onde o doador de elétrons é um metal de transição na sua forma reduzida. As reações demonstram a formação do radical hidroxil catalisada por íons cuprosos (Cu(I)) e íons ferrosos (Fe(II)), respectivamente (Halliwell & Gutteridge, 2007).



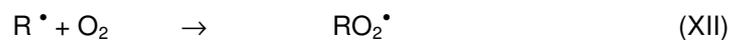
Os complexos com íons metálicos podem ainda reagir com agentes redutores presentes no meio intracelular, como por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C) e

radicais $O_2^{\cdot -}$. Dessa forma o radical hidroxil pode ser formado a partir do ciclo redox dos íons Fe (III) e Cu (II) (ver reações VIII a XI) (Halliwell & Gutteridge, 2007; Babior, 1990). O ácido ascórbico reduz espécies reativas e participa do mecanismo protetor contra peroxidação, o gene responsável pela síntese de ácido ascórbico não é transcrito em humanos e em alguns outros mamíferos, embora esteja presente no genoma. Essa a via endógena de síntese é fonte de EROs, portanto a perda da capacidade de sintetizar ácido ascórbico é considerada benéfica, visto que a dieta é capaz de suprir a deficiência endógena (Cerqueira et al, 2007).



2.4.2.5 Radicais Peroxil e Alcoxil

O radical hidroxil (OH^{\cdot}) ao reagir com compostos orgânicos produz um carbono radicalar (R^{\cdot}) que em condições aeróbicas reage com o oxigênio dando origem aos radicais alcoxil (RO^{\cdot}) e peroxil (RO_2^{\cdot}) (reação XII). A química do radical peroxil varia de acordo com a natureza do radical R, o meio e a concentração de O_2 e outros reagentes. (Goetz, 2008; Babior 1990).



A ação das EROs sobre as membranas biológicas promove reações em cadeia, que resultam na peroxidação de fosfolípidios de membrana contendo cadeias de ácidos graxos insaturados, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos. Apesar dos peróxidos orgânicos ($ROOH$) serem relativamente estáveis a temperatura ambiente, a exposição destes a metais de transição, ao aquecimento ou aos raios UV, provoca sua decomposição levando também a geração de radicais de alcoxil (RO^{\cdot}) e peroxil (ROO^{\cdot}) (reações XIII e XIV). A oxidação de lípidios em condições de estresse oxidativo e a ação das prostaglandinas H sintetases 1 e 2,

que participam da síntese de prostaglandinas, constituem processos significativos na geração destes radicais (Valko et al., 2006; Fridovich, 1998; Emerit, 1994).



Os radicais peroxil estão envolvidos na clivagem do DNA e na modificação do esqueleto carbônico da proteína. (Halliwell & Gutteridge, 2007; Emerit, 1994).

2.4.3 Espécies Reativas de Nitrogênio

O principal radical livre de nitrogênio é o óxido nítrico (NO^\bullet), é um radical alcóxil, é sintetizado nos organismos vivos na presença de oxigênio a partir da L-arginina durante a conversão da arginina a citrulina, por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Quando exposto ao ar, o radical óxido nítrico reage com o O_2 formando o gás dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet), espécie reativa de nitrogênio de maior reatividade que o NO^\bullet (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O interesse no estudo do NO^\bullet começou a partir da descoberta da capacidade deste ativar a enzima guanilato ciclase aumentando os níveis de GMP cíclico com conseqüente queda nos níveis intracelulares de cálcio, resultando no relaxamento muscular, dilatação dos vasos e conseqüente queda da pressão sanguínea (Halliwell & Gutteridge, 2007; Valko et al., 2006).

O NO[•] tem uma meia-vida de segundos em ambiente aquoso e maior estabilidade em meios com baixa concentração de O₂. Por ser solúvel em meio aquoso e lipídico, o NO[•] difunde-se pelo citoplasma e atravessa a membrana plasmática. Atua como importante sinalizador biológico em diversos processos como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento dos músculos lisos e na regulação do sistema imune. No meio extracelular, o NO[•] reage com H₂O e O₂ para formar nitrato e nitrito. Durante os processos inflamatórios as células do sistema imune produzem O₂^{-•} e NO[•], que reagem entre si formando uma espécie reativa com maior potencial oxidativo, o ânion peroxinitrito (ONOO⁻) que pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica (Valko et al., 2007).

2.4.4 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é definido como a condição na qual ocorre um desequilíbrio entre a produção fisiológica de EROs e ação das defesas antioxidantes favorecendo os efeitos oxidativos danosos (Halliwell & Gutteridge, 2007). As células, apesar de produzirem continuamente RL e EROs durante o metabolismo aeróbico, produzem simultaneamente antioxidantes para combatê-los, evitando assim o estresse oxidativo. A produção intracelular de EROs não implica necessariamente toxicidade celular, isso somente irá ocorrer quando sua produção ultrapassar a capacidade das defesas antioxidantes ou afetar a sinalização redox, interferindo na funcionalidade das células (Jones, 2006), e conseqüentemente, resultando em patologias decorrentes da ação dos radicais livres sobre as biomoléculas (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os danos causados pelos radicais livres às biomoléculas, através da destruição de membranas biológicas, mutações gênica, alteração de receptores bioquímicos e outros processos podem resultar em condições patológicas (Valko et al., 2007; Cooke et al., 2003).

O estresse oxidativo parece estar relacionado a etiologia de diversas doenças crônicas não-transmissíveis, tais como, doenças cardiovascular, câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas; também tem sido comumente associado ao envelhecimento, doenças inflamatórias e auto-imunes, infecção por HIV, quadros de isquemia e reperfusão devido a transplantes de órgãos (Asare et al., 2009;

WHO/FAO, 2003;). As doenças crônicas não-transmissíveis compreendem aquelas desenvolvidas ao longo da vida como resultado de uma interação entre características genéticas e influências ambientais, estas últimas representadas principalmente por hábitos alimentares inadequados, o tabagismo, poluição, sedentarismo e o consumo de bebidas alcoólicas (Block et al., 2002).

Tanto o excesso como a deficiência de micronutrientes podem potencializar danos oxidativos ao DNA, lipídeos e proteínas. A perda da homeostase desses nutrientes pode acontecer devido a erros inatos do metabolismo e/ou consumo excessivo de micronutrientes (Block et al., 2002). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, as doenças carenciais coexistem com as DCNT que, em sua maioria, estão associadas ao excesso de nutrientes (Brasil, 2007). A prevalência das DCNT tem aumentado no mundo e, este cenário tende a se intensificar com o envelhecimento da população (Brasil, 2006). Mundialmente, a mortalidade por doenças crônicas em 2001 foi de 46% e estima-se que atinja 57% em 2020 (WHO/FAO, 2002). No Brasil, houve um aumento de 34% para 48% de 1979 a 2003 (Brasil, 2006).

2.4.4.1 Agentes Oxidantes (Pró-oxidantes)

Agentes oxidantes ou pró-oxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo devido à maior geração intracelular de EROs e conseqüente deficiência dos mecanismos antioxidantes (Figura 8). Dentre algumas moléculas exógenas que fazem parte dos agentes oxidantes podemos citar a radiação ionizante, medicamentos, cigarro, ozônio, poluentes ambientais e alguns micronutrientes dietéticos. No grupo das moléculas endógenas estão algumas enzimas da cadeia respiratória, inflamações, peroxissomos e fagócitos. Alguns metais de transição, principalmente ferro e cobre, provenientes de fontes dietéticas são utilizados como doadores de elétrons nas reações que desencadeiam a formação de alguns radicais livres, potencializando o efeito dessas no organismo (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007; Young, Lowe, 2001; Guven et al., 2000)

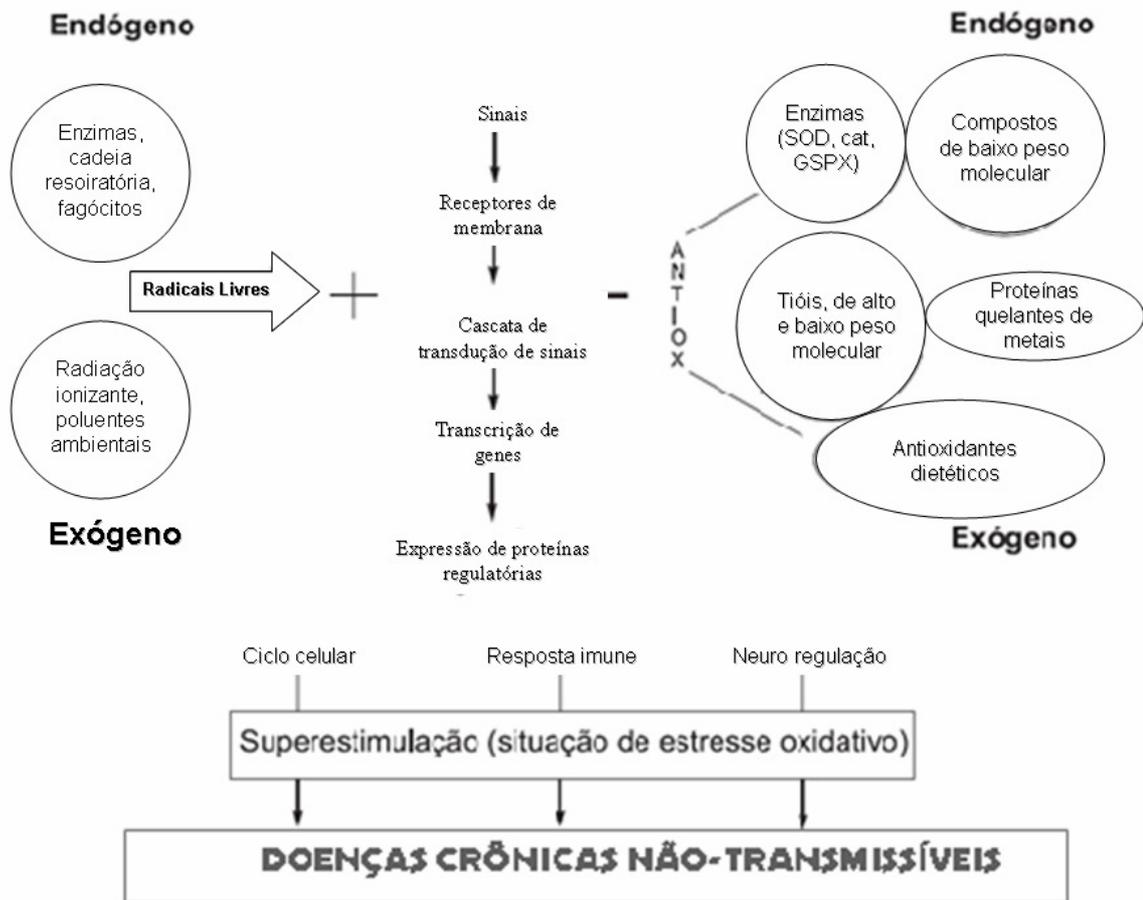


Figura 8. Esquema da regulação fisiológica entre oxidantes e antioxidantes. Os antioxidantes (ANTIOX) endógenos incluem enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), peroxirredoxinas (PRX) e tiorredoxinas (Trx); compostos de baixo peso molecular: ácido úrico (AU); ácido lipóico (AL); coenzima Q (CoQ) e glutathione (GSH); tiol proteínas, como albumina, peroxirredoxinas e tiorredoxinas, e proteínas armazenadoras/transportadoras de íons de metais de transição. As defesas antioxidantes exógenas referem-se aos antioxidantes obtidos por meio da alimentação, sendo os mais estudados o ácido ascórbico (Asc), α -tocoferol (α -TH), carotenóides (CAR) e polifenóis. Fonte: Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007 com adaptações.

2.4.4.1.2 Marcadores de Danos Oxidativos a Biomoléculas

2.4.4.1.2.1 Peroxidação Lipídica

Em termos gerais, a peroxidação lipídica é o processo, segundo o qual, ocorrem oxidações sucessivas em lipídeos insaturados, se inicia com a oxidação dos ácidos graxos insaturados devido ao excesso de radicais livres, principalmente radicais $\cdot\text{OH}$, com conseqüente formação de radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos de lipídeos ($\text{L}\cdot$ ou $\text{LOOH}\cdot$, respectivamente). Levam a alteração da fluidez das membranas, alterando, portanto seu funcionamento e podendo até rompê-las (Montine, Quinn, Montine, 2003). O termo é largamente conhecido pela indústria alimentícia, uma vez que é o principal responsável pela rancidez de óleos, carnes e derivados (Girotti, 1998).

Este processo parece ocorrer por sucessivas abstrações de átomos de hidrogênio do grupamento metil dos ácidos graxos poliinsaturados ou da cadeia lateral destes por radicais livres. O radical resultante desta reação pode então, ao interagir com O_2 , formar radicais peróxidos (Montine, Quinn, Montine, 2003; Guven et al., 2000; Henle, Linn, 1997). Os lipídeos hidroperóxidos alteram a estrutura, propriedades e função das membranas celulares (Girotti, 1998), além de constituírem fonte de aldeídos reativos, como o MDA, que são capazes de causar danos ao DNA e proteínas, resultando em processos mutagênicos (Toyokuni et al., 1994).

Os níveis de malondialdeído (MDA) são utilizados para avaliar a peroxidação lipídica em tecidos, sendo quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ou por espectrofotometria através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), que identifica compostos que apresentam reatividade com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O teste espectrofotométrico tem sido criticado na literatura, pois pode superestimar os níveis de peroxidação lipídica, pois diversos produtos da oxidação de lipídeos que não apenas o malondialdeído são capazes de formar complexos com o TBA.

proteínas transmembrânicas aumentando os danos celulares. Várias condições patológicas estão relacionadas à peroxidação lipídica. Isto ocorre porque os produtos formados são potencialmente tóxicos, como é o caso principalmente dos aldeídos e dos hidroperóxidos (Halliwell & Gutteridge, 2007). O MDA, assim como outros produtos da peroxidação lipídica, também possui efeito mutagênico e carcinogênico (Valko et al., 2006).

2.4.4.1.2.2 Peroxidação Protéica

A oxidação de proteínas está intimamente relacionada aos processos de envelhecimento e de desenvolvimento de desordens neurodegenerativas. Uma vez oxidadas, as proteínas tornam-se alvos de degradação por proteases endógenas. Este processo proteolítico diminui o acúmulo de proteínas sem função bioquímica adequada (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Na oxidação protéica pode ocorrer a introdução de um novo grupo funcional, como o hidroxil e o carbonil, que levam a uma alteração da função e do turnover protéico (Valko et al., 2007). O radical $\cdot\text{OH}$ promove a abstração de um átomo de hidrogênio da cadeia polipeptídica da proteína resultando na formação de um radical de carbono central, que reage com O_2 formando o radical peroxil, este reage com a forma protonada do $\text{O}_2^{\cdot -}$ (HO_2^{\cdot}) originando o alcóxil peróxido. Na ausência de metais de transição, as proteínas são resistentes à ação do H_2O_2 , mas os radicais hidroxil e alcóxil podem provocar a clivagem das ligações peptídicas (Griffiths et al., 2002)..

A maior evidência de que EROs são capazes de interagir com proteínas é a presença de proteínas carboniladas em condições de estresse oxidativo, geradas pela quebra e oxidação da cadeia polipeptídica ou pela oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos como arginina, lisina, prolina e treonina. Os níveis de proteínas carboniladas tem sido utilizado como um dos marcadores de estresse oxidativo, sendo considerado um biomarcador genérico, pois é produto da oxidação de diferentes aminoácidos (Figura 11) (Stadtman & Levine, 2000).

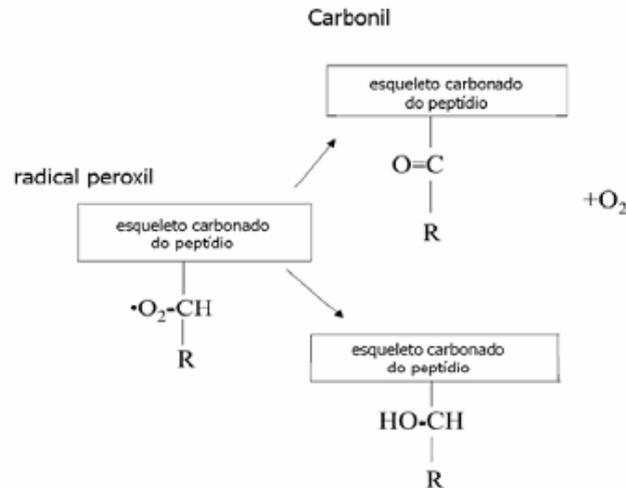


Figura 11. Formação do grupamento carbonil. Fonte: Griffiths et al., 2002.

2.4.4.2 Agentes Antioxidantes

O desenvolvimento dos organismos aeróbicos somente tornou-se possível graças às adaptações biológicas que levaram ao desenvolvimento de defesas antioxidantes contra a toxicidade do oxigênio e espécies derivadas deste (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007).

Por definição um antioxidante constitui qualquer substância que em baixa concentração comparada com uma substância oxidante, retarda ou inibe a velocidade de oxidação do substrato (Englberge et al., 2009). De maneira geral, o sistema de defesas antioxidantes é composto por defesas enzimáticas e não enzimáticas.

Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem: captadores de radicais e supressores de estados excitados; sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam EROs/ERNs e a ligação de íons metálicos a proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007). Entre os principais antioxidantes encontrados no plasma humano estão proteínas/peptídeos com grupamento tiol (SH) (800-1000 $\mu\text{mol/L}$), sendo a albumina a principal representante; ácido úrico (150-400 $\mu\text{mol/L}$); ácido ascórbico (30-150 $\mu\text{mol/L}$); tocoferol (20-50 $\mu\text{mol/L}$) e carotenóides (0,08-3 $\mu\text{mol/L}$) (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007). De maneira geral as defesas antioxidantes podem ser classificadas em: enzimáticas e não-enzimáticas.

2.4.4.2.1 Defesas enzimáticas

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase dependente de selênio (SeGPx ou GPX), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione-redutase (GR), que protegem as células dos efeitos tóxicos dos radicais livres (Valko et al., 2007).

O sistema de defesa enzimático começou a ser descrito na década de 60, com a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), essa enzima converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 através de uma reação de dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$, constitui a primeira defesa do organismo contra as EROs. Possui diversas isoformas, cada uma sendo caracterizada pelo tipo de metal que compõe seu grupo prostético (Fridovich, 1998). Nas células de mamíferos a enzima SOD mitocondrial é dependente de Mn (MnSOD), enquanto a citosólica é dependente de Cu e Zn (CuZnSOD). Devido à atividade da enzima SOD gerar como produto final H_2O_2 , a eficiência de sua ação é dependente da atividade de duas outras enzimas para remoção deste produto, a catalase e a glutathione peroxidase (GPX) (Valko et al., 2007).

A CAT é responsável pela degradação do H_2O_2 a H_2O e O_2 , enquanto a SeGPx, catalisa reações de degradação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, através da oxidação da glutathione. A redução da glutathione-oxidada (GSSG) a glutathione reduzida (GSH) é catalisada pela enzima glutathione redutase (GR) e libera duas moléculas de água, utilizando como co-fator a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). A SeGPx e a GR são encontradas no citoplasma e na mitocôndria. A enzima GPx possui atividade de glutathione-peroxidase independente de selênio, reduzindo peróxidos orgânicos (Englberge et al., 2009; Valko et al., 2007). Por ser o maior sítio de geração de radicais livres, a mitocôndria possui alta atividade de enzimas antioxidantes como GR, SOD e GPX, em ambos os lados das suas membranas, em relação aos demais compartimentos celulares, para minimizar o estresse oxidativo (Figura 12) (Valko et al., 2007).

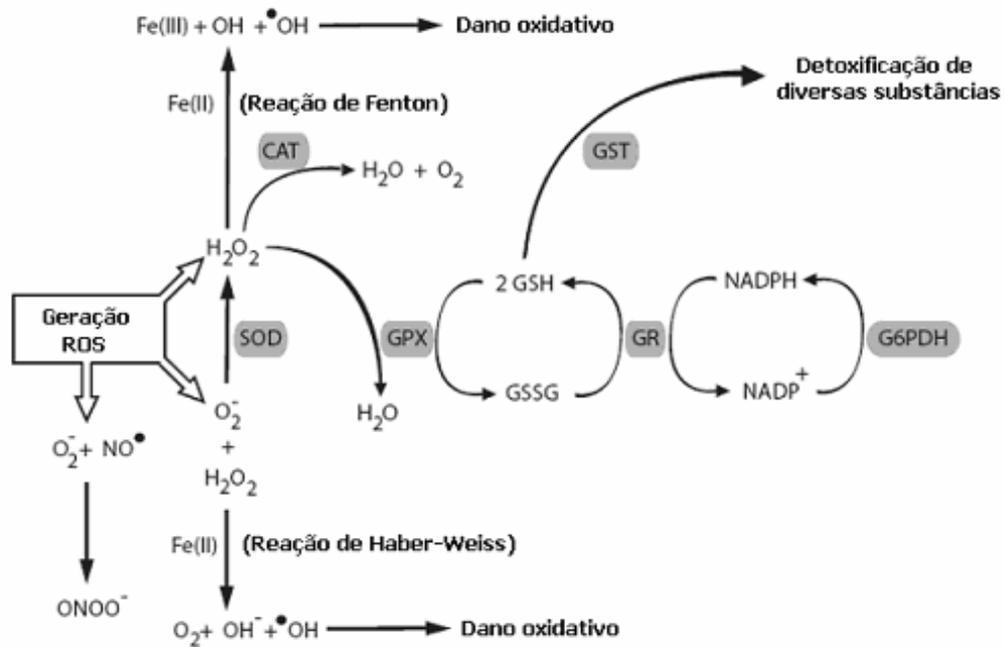


Figura 12. Esquema de ação das defesas antioxidantes enzimáticas. Fonte: Halliwell & Gutteridge, 2007.

2.4.4.2.2 Defesas não - enzimáticas

O sistema não-enzimático de defesas antioxidantes é composto por antioxidantes de baixo peso molecular. Estes podem ser substâncias produzidas pelo próprio organismo ou obtidas da dieta. Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, dessa forma os antioxidantes obtidos da dieta parecem auxiliar nas defesas contra oxidação, tendo importante papel na manutenção da saúde. Os benefícios para a saúde associados ao consumo de frutas e hortaliças devem-se, em parte, à presença de antioxidantes nestes alimentos. Os compostos antioxidantes podem reagir de duas maneiras distintas, diretamente com um radical livre, neutralizando-o, ou impedindo a sua formação (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007).

Dentre os agentes antioxidantes não enzimáticos seqüestradores de elétrons estão os metabólitos como lactato, piruvato e ácido úrico, outras substâncias endógenas como o hormônio do crescimento (GSH), estrógenos, ácido lipóico, melatonina e bilirrubina, e por fim, os chamados fitonutrientes, largamente encontrados nos denominados alimentos funcionais, como os polifenóis, os flavonóides, o ácido ascórbico, o α -tocoferol, os carotenóides, como o β -caroteno, as xantofilas e o licopeno. Há também os seqüestradores de origem não-biológica,

utilizados, em estudos *in vitro*. Os mais comuns são: benzoato, 2-desoxirribose, butil hidroxil tolueno (BHT), dimetilsulfóxido (DMSO), tiouréia e compostos furanosídicos. (Asare et al., 2009).

No grupo de antioxidantes que atuam impedindo ou dificultando o início das reações de formação de EROs os mais estudados são desferroxamina (DFO), ácido etileno diamino tetracético (EDTA), ácido dietileno triamino pentacético (DTPA), ácido N,N'-o-hidroxil benzil etileno diamino diacético (HBED), e piridoxal isocotinoil hidrazona (PIH). Normalmente, essas moléculas agem como quelantes de metais de transição, principalmente de ferro e cobre (Block et al., 2002).

As defesas não-enzimáticas compreendem ainda as proteínas que se ligam aos metais de transição, como a transferrina, a ferritina e a ceruloplasmina não deixando esses metais disponíveis para catalisarem reações, como a reação de Fenton (Block et al., 2002).

Os mecanismos de ação antioxidante do ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenóides e polifenóis *in vitro* são conhecidos. No entanto, estudos tem sido desenvolvidos na tentativa de estabelecer a eficiência de absorção no trato gastrointestinal, biodisponibilidade, mecanismo de ação e recomendações desses compostos para consumo humano. Há perspectivas de que antioxidantes dietéticos possam ser usados futuramente no tratamento de doenças cuja gênese envolva processos oxidativos (Jun et al., 2009).

A vitamina E é relatada como um dos antioxidantes mais eficazes, sendo o mais comum e potente antioxidante distribuído na natureza, principalmente em óleos vegetais, além de ser parte integrante de um sistema de proteção que envolve outros componentes, dentre eles o ácido ascórbico e as enzimas como a glutatona redutase, a glutatona peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase (Bianchini-Pontuschka & Penteado, 2003). Os tocoferóis, quando não esterificados, protegem as membranas celulares por terem a habilidade para atuar como antioxidante por quelar radicais livres pela doação de hidrogênio fenólico e elétron (Gregory, 1996). Parece oferecer proteção contra os efeitos da superdosagem de vitamina A, além disso, acentua a atividade do retinol no intestino prevenindo assim sua oxidação (Youngson, 1995).

É importante frisar que existem antioxidantes certos para cada tipo de radical livre. Deve-se conhecer o tipo de radical livre lesivo e qual o mecanismo que este age para poder definir o antioxidante adequado para combatê-lo (Youngson, 1995).

Estudos recentes sugerem que os antioxidantes são eficazes na prevenção de DCNT associadas ao estresse oxidativo quando aplicados em grupos que apresentam concentrações plasmáticas inadequadas desses compostos (Hercberg et al., 2004; Knoop et al., 2004). Não existem evidências de que o consumo de alimentos ricos em antioxidantes ao longo da vida acarrete efeitos prejudiciais. Ao contrário, há fortes evidências epidemiológicas de que estejam associados a um envelhecimento saudável e à longevidade funcional (Hercberg et al., 2004; Knoop et al., 2004). A maioria dos estudos que apresentam resultados controversos utilizam antioxidantes em doses de suplementos (Asare et al., 2009, Young, Lowe, 2001).

Asare et al. (2009) estudaram o efeito da combinação das vitaminas A e E sobre o câncer hepático iniciado por EROs, em ratos tratados com sobrecarga de ferro na dieta. Os animais foram divididos em quatro grupos, um grupo controle (dieta AIN-93G), três grupos com sobrecarga de ferro (2,5% de ferro pentacarbonil), sendo um sem uso de antioxidante e dois outros tratados com diferentes doses de vitamina A e E (42xRDA e 10xRDA, respectivamente), e um quarto grupo com dieta deficiente em vitaminas A e E. O estudo teve duração de 32 meses, sendo sacrificados cinco animais de cada grupo após 2 meses, 4 meses e em seguida a cada 4 meses até os 2 anos e ao final de 32 meses. Os autores observaram que a suplementação de vitamina A e E reduziu os efeitos do estresse oxidativo por um período limitado (20 meses), entretanto, um longo período com altas doses dessas vitaminas não foi capaz de reduzir o efeito tóxico dos produtos de reações de oxidação e conseqüentemente os danos hepáticos. Porém estudos com doses fisiológicas são necessários para avaliar o potencial antioxidantes dessas vitaminas.

2.4.4.2.2.1 Ação Antioxidante dos retinóides e carotenóides

Na literatura tem sido proposto o papel antioxidante do retinol em sistemas biológicos, vários estudos procuram esclarecer o mecanismo da vitamina A em alguns processos envolvendo doenças relacionadas a oxidação de biomoléculas, e a relação entre a ingestão de vitamina A e a proteção contra DCNT. Bjelke, em 1975, relatou pela primeira vez algumas evidencias epidemiológicas sugestivas de que a vitamina A poderia ter um efeito protetor contra o câncer de pulmão. Entretanto no

início de 1980 tornou-se mais forte a associação entre o β -caroteno e a redução de câncer de pulmão, mas não para o retinol (Moreno, 1999).

Uma revisão de estudos epidemiológicos publicados na literatura descreveu que em animais a vitamina A apresenta uma ação preventiva no desenvolvimento de tumores da bexiga, mama, estômago e pele. Estudos epidemiológicos também mostraram que o consumo regular de alimentos ricos em vitamina A pode diminuir a incidência de câncer retal e de cólon (Bianchi, Antunes, 1999; WCRF, 1999). A atividade quimiopreventiva dos retinóides observada tanto em modelos experimentais de carcinogênese quanto em alguns tipos de cânceres em humanos, tem sido atribuída à ação do ácido retinóico sobre a expressão de genes envolvidos com a diferenciação e proliferação celular (Asare et al., 2009; Lotan, 1996).

O processo carcinogênico é caracterizado por um estado oxidativo crônico, especialmente na etapa de promoção. Além disso, a fase de iniciação está associada com dano irreversível no material genético da célula, muitas vezes devido ao ataque de radicais livres. Desse modo, os nutrientes antioxidantes podem reduzir o risco de câncer inibindo danos oxidativos ao DNA, sendo, portanto considerados como agentes potencialmente quimiopreventivos (Pool-Zobel et al., 1997).

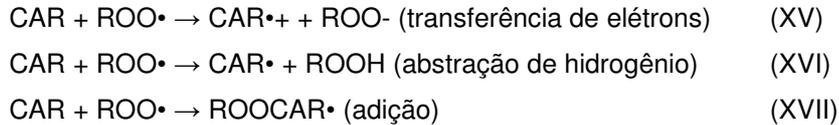
A atividade antioxidante da vitamina A ainda não está bem definida, porém é sugerido que a vitamina A é capaz de interagir com radicais livres, como o radical peroxil, interrompendo a propagação da peroxidação lipídica e a geração de hidroperóxidos (Palace et al, 1999). Tesoriere et al (1993) demonstraram em células lisossomais que o retinol é um eficaz seqüestrador de radicais peroxil, sendo capaz de inibir a peroxidação em soluções oxidáveis. Neste experimento quando as espécies radicalares foram colocadas em ambientes lipídicos o retinol teve melhor efeito antioxidante que o tocoferol, comparados a meios aquosos. Essa propriedade do retinol foi atribuída a sua estrutura química menor que a do tocoferol, o que permitiria ter uma maior mobilidade e uma menor habilidade de interagir com os radicais peroxil nas membranas. Além de estabilizar os radicais peroxil, a vitamina A pode ser oxidada diretamente por espécies radicalares estabilizando o radical lipídico. DAS & PEREIRA (1990) estudaram o uso de antioxidantes naturais em óleos comestíveis, e observaram que a vitamina A e seus análogos, retinal, ácido retinóico, acetato e palmitato de retinol, mostraram efeitos antioxidantes expressivos, podendo ser usados como uma alternativa na inibição da peroxidação lipídica.

A atividade pró-vitamínica dos carotenóides vem sendo estudada desde a década de 50, mas foi no início da década de 90 que surgiu o interesse no papel antioxidante destes compostos relacionados a proteção das DCNT (Hercberg et al., 2004). O β -caroteno, o mais importante precursor da vitamina A, está amplamente distribuído nos alimentos e possui ação antioxidante. Os carotenóides são considerados quimiopreventivos, porque inibem, principalmente, a iniciação e propagação da carcinogênese (Peres et al, 2003). O β -caroteno, apresenta propriedade de interceptar certos radicais livres e desativar moléculas reativas de oxigênio singleto, que são geradas como subprodutos de muitos processos metabólicos normais. Logo, é possível que o β -caroteno livre circulante tenha efeito protetor na carcinogênese, independente de sua conversão a retinol, desativando estes tipos de moléculas ou prevenindo dano oxidativo (Peres et al, 2003).

Os mecanismos de ação dos carotenóides capazes de proteger as células contra danos oxidativos resumem-se na habilidade destas moléculas funcionarem tanto como agentes fotoprotetor, contra os efeitos nocivos da luz e oxigênio, quanto como moléculas reativas contra espécies químicas geradas dentro das células, capazes de induzir danos oxidativos (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007; Young, Lowe, 2001). A habilidade dos carotenóides com a molécula de O_2 fundamenta-se na estrutura desses compostos, principalmente as duplas ligações conjugadas que possivelmente captam radicais livres. Enquanto como agentes fotossensíveis os carotenóides possuem a habilidade de suprimir as formas tripleto e singleto gerados nas células, via transferência de energia destas, transformando-as na molécula de oxigênio em seu estado fundamental. A energia então absorvida pelo carotenóide é dissipada na forma de calor, retornando a molécula ao seu estado basal (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007; Young, Lowe, 2001). O carotenóide excitado resultante libera pouca energia e, portanto, é inofensiva ao meio celular (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007; Young, Lowe, 2001).

Diversos fatores, tais como, a estrutura da molécula oxidável, tipo de carotenóide; a localização e sítio de atuação do carotenóide; a capacidade de interagir com outros carotenóides e antioxidantes; a concentração do carotenóide e a pressão parcial de oxigênio influenciam a capacidade antioxidante dos carotenóides em sistemas biológicos (Young, Lowe, 2001). Entre as reações *in vitro* bem estabelecidas dos antioxidantes carotenóides (CAR), encontram-se as reações

com radical peroxil (ROO^\bullet) que se dão ao menos por três vias (reações XV a XVII) (Cerqueira, Medeiros, Augusto, 2007, Young, Lowe, 2001):



As reações de transferência de elétrons resultam em carotenóides radicalares na forma de cátion ($\text{CAR}^{\bullet+}$), anion ($\text{CAR}^{\bullet-}$) ou de um radical alquil (CAR^\bullet) (Young, Lowe, 2001). A adição de radicais livres, como radicais peróxidos (ROO^\bullet) pode ocorrer em qualquer ponto da molécula de carotenóide (CAR), resultando na formação de um carotenóide carbono radicalar. O radical seria estabilizado interferindo, portanto, na fase de propagação da oxidação, por exemplo, na peroxidação lipídica (Young, Lowe, 2001).

In vivo, o conteúdo e a composição tecidual de carotenóides são heterogêneos. Em ambientes apolares, como tecido adiposo e interior de membranas plasmáticas, a separação de carga é termodinamicamente desfavorável, e a reação (transferência de elétrons) é improvável para licopeno e β -caroteno (hidrocarbonetos). Contudo, carotenóides, como zeaxantina, possuem grupamentos polares, e podem, portanto interceptar radicais no meio aquoso e na superfície de membranas. Uma vez que o cátion radical carotenóide ($\text{CAR}^{\bullet+}$) é formado, pode oxidar diferentes compostos no ambiente aquoso (Young, Lowe, 2001).

Os radicais carotenóides podem decair por meio de reações com outros radicais, formando produtos estáveis; ou podem ser estabilizados por ressonância e, portanto, são pouco reativos. Contudo, os diferentes mecanismos pelos quais os carotenóides podem captar radicais levam a uma variedade de radicais carotenóides que, por sua vez, levam a múltiplos produtos finais. O potencial protetor ou deletério destes produtos finais depende da natureza do radical, de seu meio ambiente (aquoso ou lipídico) e de características estruturais, como terminal cíclico ou acíclico, grupos finais polares ou apolares, propriedades redox, entre outras (Young, Lowe, 2001).

A proteção sinérgica dos diversos carotenóides depende da razão molar entre estes antioxidantes. Um aumento ou decréscimo de um destes componentes

proporciona um desequilíbrio, podendo gerar uma ação pró-oxidante. O aumento excessivo na concentração de carotenóides resulta na formação de carotenóides radicalares (CAR[•]) muito acima da concentração de ascorbato e tocoferol. O acúmulo de CAR[•] propicia a reação com os carotenóides presentes, produzindo o efeito pró-oxidante nas células (reação XVIII) (Young, Lowe, 2001; Russel, 2000):



Embora estudos com animais demonstrem que a suplementação com β -caroteno protege contra o câncer em algumas situações, estudos populacionais mostraram efeitos nulos ou negativos. O estudo populacional CARET (“The Beta Carotene and Retinol Efficacy Trial”) realizado com 18000 fumantes norte-americanos no qual foi administrado β -caroteno e vitamina A na forma de suplementos, previsto para durar 5 anos, encerrou-se na metade do tempo devido a uma tendência de aumento no desenvolvimento de câncer de pulmão e da mortalidade nos indivíduos suplementados (Omen et al., 1996). O estudo anterior, ATBC “Alpha-Tocopherol Beta- Carotene”, também realizado em fumantes, apresentou igual tendência nos grupos suplementados com β -caroteno e β -caroteno e α -tocoferol, o que não foi observado na suplementação apenas com α -tocoferol. Não há consenso entre os pesquisadores em relação à atividade pró-oxidante dos carotenóides, mas sugere-se que em sistemas biológicos existem muitos fatores que podem reduzir a eficácia antioxidante destes compostos (Fields, Soprano, Soprano, 2007).

A participação dos carotenóides nos processos de comunicação celular, regulação da transcrição de alguns genes e conversão em retinóides pode ser tão ou mais importante que a atividade antioxidante nos efeitos fisiológicos atribuídos aos radicais livres (Englberger et al., 2009; Young, Lowe, 2001). Um dos mecanismos propostos para o efeito antineoplásico do RA quando associado aos seus receptores (RAR e RXR), seria que o complexo RA-RAR-RXR se ligaria a proteína ativadora 1 (AP-1) inibindo sua atividade. A AP-1 compreende um complexo protéico, codificado pelos genes c-Fos e c-Jun, que medeia a sinalização de fatores de crescimento, oncogenes e promotores de tumores, que usualmente resulta em proliferação celular. Desta forma a perda da homeostase do RA por indução das CYPs levaria conseqüentemente a uma diminuição da sinalização celular por ação

do RA, e conseqüente aumento da expressão de AP-1 (Russel, 2000). Assim, estudos adicionais são necessários para confirmar se os benefícios dos carotenóides relacionam-se às propriedades antioxidantes ou a outras atividades biológicas.

Apesar de fortes evidências epidemiológicas estabelecerem essas associações, o mecanismo de inibição da carcinogênese pela vitamina A e carotenóides não está completamente elucidado. Assim, o uso de vitaminas e outros antioxidantes na prevenção e modulação das conseqüências patológicas dos radicais livres precisa da definição de doses e de protocolo de tratamento, sendo necessários mais estudos sobre o mecanismo de ação desses agentes antes da sua prescrição em larga escala (Kabat et al., 2009).

3 Objetivos

3.4 Objetivo geral

Avaliar *in vivo* o efeito da deficiência de vitamina A na concentração de ferro e no dano oxidativo em tecidos de ratos em diferentes estágios de depleção.

3.5 Objetivos específicos

- Avaliar a concentração de vitamina A no fígado dos ratos submetidos a dietas com diferentes concentrações de vitamina A e em diferentes estágios de depleção;
- Avaliar a concentração de ferro no fígado, baço e intestino dos ratos submetidos a dietas com diferentes concentrações de vitamina A e em diferentes estágios de depleção;
- Avaliar a peroxidação lipídica e protéica nos tecidos (intestino, baço, fígado) de ratos submetidos a dietas com diferentes concentrações de vitamina A e em diferentes estágios de depleção;
- Verificar possíveis associações entre os níveis de peroxidação lipídica e protéica com a concentração de vitamina A e ferro nos diferentes tecidos estudados em diferentes estágios de depleção.

4 Materiais e Métodos

4.4 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 $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. 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 n° 18996/2008.

No início do estudo (T_0), após três dias de aclimatização, foram sacrificados por deslocamento cervical 10 animais para determinação dos parâmetros basais (Grupo T_0). 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, 1993).
- Grupo Deficiente em Vitamina A (VA): dieta AIN-93G com 35 mg de Fe/kg dieta e sem fonte de vitamina A (Reeves, 1993).

Após 15 (T_{15}), 30 (T_{30}) e 45 (T_{45}) dias de tratamento com uma das dietas descritas anteriormente, 7 animais de cada grupo foram sacrificados. O fígado, baço e intestino delgado foram retirados e lavados com solução salina para retirada do excesso de sangue, o excesso de salina removido em papel toalha; pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até a realização das análises.

4.5 Variáveis Analisadas

Ganho de peso: Os animais foram pesados semanalmente em balança de precisão com capacidade mínima de 0,5g e máxima de $500\text{g} \pm 0,001\text{g}$.

Consumo de dieta: foi determinado diariamente através da diferença entre a quantidade de dieta ofertada e a sobra.

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. Brevemente, uma amostra de aproximadamente 0,1 g de fígado foi macerada em homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax T8, IKA®- Werke, Alemanha) à temperatura de 4°C, posteriormente ressuspendido em etanol (1,5 × volume) e agitado durante 15 segundos em vortex. Ao homogeneizado foi acrescentado KOH 50% (0,8 × volume), 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 (2 x volume/3 vezes). A extração foi feita da seguinte forma: após a adição do hexano, a amostra foi homogeneizada em vortex durante 30 segundos sendo posteriormente centrifugada a 1000xg 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 leitura no HPLC.

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, filtrada em filtro de membrana de nylon 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore), o filtrado foi colocado no injetor automático e aplicado 20 µL para análise. As análises foram feitas em duplicata.

Para quantificação foi construída uma curva padrão utilizando o all-trans-retinol sintético (Fluka Biochemika, retinol ≥ 99% - HPLC) diluído em etanol. A concentração da solução anterior foi calculada a partir da absorbância obtida a 325 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Brasil), utilizando o valor de $A^{1\%}_{325\text{nm}} = 5248$. A solução concentrada foi então diluída 0, 2, 5, 4 e 10 vezes e aplicada no HPLC pelo injetor manual (20 µL), com fluxo de 1 mL/min de metanol/água (95:5). 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, $y = 0,031 - 2,3574x + 43,162$; $r^2 = 0,9998$.

Peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica no fígado, baço e intestino foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), segundo Candan e Tuzmen (2008) com modificações. Brevemente, cerca de 0,1g de tecido foi homogeneizado em ácido sulfúrico 1%, com diluição final de tecido : solução de 1:10 (p/v) utilizando homogeneizador elétrico Ultraturrax (Ultra-Turrax T8, IKA®- Werke, Alemanha). Posteriormente, foi retirada uma alíquota para dosagem de proteína total e a outra parte do homogeneizado foi centrifugado a 11.000 x g, a temperatura de 4°C, por 15 minutos. A uma alíquota de 500µL do sobrenadante do homogeneizado foram adicionados 750µL de ácido fosfórico 440 mmol/L e 250µL de ácido tiobarbitúrico 42 mmol/L, a mistura foi então agitada no vortex, aquecida a 100°C durante 1 hora em banho-maria para formação do complexo ácido tiobarbiturico e malondialdeído (TBA-MDA). Após resfriamento das amostras, retirou-se uma alíquota de 500 µL e acrescentou-se mais 500 µL de solução metanol pureza HPLC : hidróxido de sódio 1 mol/L (91:9). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 11.000 x g, o sobrenadante filtrado em filtro de membrana de nylon 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore), e aplicadas em sistema HPLC (Shimadzu) utilizando coluna Shim-park C₁₈ CLC-ODS 25 cm, e detector de fluorescência. O comprimento de onda de excitação utilizado foi 553nm e a emissão monitorada a 532nm. O volume de amostra injetado foi de 20 a 30 µL de acordo com o tecido. A eluição do complexo MDA-TBA foi realizada utilizando fase móvel metanol : tampão fosfato 50 mmol/L, na proporção de 60:40 com fluxo mantido em 0,6 mL/min, temperatura de 30 °C, e tempo de corrida de seis minutos por amostra.

A curva padrão de MDA foi feita a partir da hidrólise do composto 1,1,3,3-tetraethoxy-propano 97% (Sigma) em H₂SO₄ 1% e diluído em água para obtenção das seguintes concentrações: 1,62; 4,04; 8,08; 16,16 nmol/mL. As soluções padrões ficaram a temperatura ambiente por 2 horas, e em seguida foram submetidos ao mesmo protocolo descrito anteriormente para os homogeneizados de tecido. A concentração de MDA foi expressa em nmol de MDA por mg de proteína total. ($y = 2,63^{-7} x + 0,01851$; $r^2: 0,9986$).

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados de tecidos utilizados para as dosagens MDA foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972). ($y = 0,0127x + 0,0022$; $r^2: 0,9978$).

Proteína carbonilada

Amostras de aproximadamente 0,1g de fígado, baço e intestino foram homogeneizadas (Ultra-Turrax T8, IKA[®]- Werke, Alemanha) na proporção de 1:20 (p/v) em tampão Tris HCl 25 mmol/L contendo uréia 6 mol/L (pH 9,0). Foram retiradas 4 alíquotas do homogenizado, 2 para dosagem de proteína carbonilada, uma para o branco do tecido e outra para determinação de proteína total. Esta última foi imediatamente congelada até o momento da análise. As outras três alíquotas de 200 μ L de homogeneizado foram transferidas para microtubos e 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 20 % adicionados para precipitação das proteínas. Os tubos foram rapidamente agitados e em seguida centrifugados a 11.000 x g / 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 μ L do tampão de homogeneização. Aos tubos contendo amostra foram adicionados 0,7 mL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) 0,2% em HCl 2 mol/L e aos brancos 0,7 mL de HCl 2 mol/L. As amostras foram agitadas por 15 min a 4°C, após agitação foram adicionados 0,7 mL de TCA 20% e novamente centrifugadas a 11.000 x g / 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de proteínas foi lavado três vezes com 1 mL de solução de acetato de etila : etanol (1:1) e centrifugado a 11.000 x g / 2 min. O precipitado foi deixado a temperatura ambiente por 10 min, para evaporação do excesso de acetato de etila:etanol, e posteriormente ressuspendido em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 500 mmol/L (pH 2,5), contendo 6 mol/L de cloreto de guanidina, e incubado a 4°C por 30 min em um agitador. Após agitação os tubos foram novamente centrifugados a 11.000 x g / 2 min. A absorbância foi então lida a 375nm. Os cálculos foram realizados retirando o branco de cada tecido e utilizando o coeficiente de extinção molar do complexo proteína - dinitrofenil-hidrazina de 22 mM⁻¹cm⁻¹ a 375 nm (Richert et al. 2002). A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol de proteína carbonilada por mg de proteína total.

A concentração de proteínas totais no sobrenadante dos homogeneizados de tecidos utilizados para as dosagens de proteína carbonilada foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972). ($y = 0,0127x + 0,0022$; $r^2: 0,9978$).

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 5mL 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 – 330W; 6 min – 700W ; 1 min – 800W; 20 min – 0W (resfriamento).

Após a digestão, o volume das amostras foi completado para 25 mL com HNO₃ 0,1 mol/L, e filtrado em papel de filtro quantitativo faixa preta e armazenados em tubos sob refrigeração. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP-AES-Shapes-Spectroflame Modulates – Spectro Analytical Instruments - Kleve-Germany) induzido por plasma, 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 uma 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 deixadas em HCl 10% por 3 h, e posteriormente lavadas com H₂O deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation). (Baranowska, Czernicki, Aleksandrowicz, 1995).

4.3 Análise Estatística

A análise estática da normalidade dos dados foi realizada pelo teste Kolmogorov-Smirnov, utilizando o software SPSS (versão 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para análise das diferenças intra-grupo (mesmo tratamento ao longo do período de tratamento) foi utilizado o teste ANOVA múltiplas comparações com correção de Bonferroni, e para comparação entre grupos foi utilizado o teste ANOVA fator único, no programa Excel Office 2003. As análises de correlações entre concentração de ferro e malondialdeído ou proteína carbonilada nos tecidos foram realizadas utilizando os testes de Pearson e Spearman, de acordo com a distribuição apresentada pelos dados, normal ou não-normal, respectivamente, no software SPSS (versão 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

5 Resultados

Os grupos controle (CT) e deficiente em vitamina A (VA) apresentaram um aumento significativo no ganho de peso durante os 45 dias de tratamento. A deficiência de vitamina A não alterou o ganho de peso e o consumo de dieta dos animais (Tabela 1).

Após 15 dias de depleção, os animais apresentaram uma redução da concentração de retinol hepático (57%) em relação ao grupo controle ($p = 0,0007$). E após 30 dias de depleção não foi mais possível quantificar a concentração de retinol no fígado dos animais pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Tabela 1; Figura 13). No tempo basal (T_0) os níveis de hemoglobina foram significativamente menores em relação aos demais períodos de tratamento, em ambos os grupo CT e VA.

Tabela 1: Ganho de peso, ingestão total de dieta e retinol hepático de animais controle e deficientes em vitamina A nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias de depleção.

Grupos	Ganho de peso (g)	Consumo de dieta (g/período)	Retinol hepático ($\mu\text{g/g}$ de tecido)	Hemoglobina (g/dL)
T_0	-	-	$43,0 \pm 10,6^{\text{ab}; (a)}$	$8,6 \pm 1,1^{\text{b}}$
CT 15	$142,9 \pm 11,2^{\text{c}}$	$323,5 \pm 24,39^{\text{c}}$	$34,8 \pm 8,0^{\text{b}}$	$12,3 \pm 1,4^{\text{a}}$
VA 15	$149,1 \pm 12,0^{(c)}$	$348,81 \pm 23,5^{(c)}$	$15,1 \pm 3,8^{(b)*}$	$12,6 \pm 0,7^{\text{a}}$
CT 30	$233,5 \pm 20,3^{\text{b}}$	$584,6 \pm 45,1^{\text{b}}$	$47,3 \pm 7,6^{\text{ab}}$	$13,2 \pm 1,7^{\text{a}}$
VA 30	$239,1 \pm 28,6^{(b)}$	$635,4 \pm 58,2^{(b)}$	$< \text{LD}^{(c)*}$	$12,3 \pm 2,1^{\text{a}}$
CT 45	$289,4 \pm 22,0^{\text{a}}$	$869,6 \pm 72,8^{\text{a}}$	$51,7 \pm 5,5^{\text{a}}$	$14,2 \pm 0,8^{\text{a}}$
VA 45	$289,9 \pm 36,0^{(a)}$	$886,3 \pm 73,6^{(a)}$	$< \text{LD}^{(c)*}$	$13,7 \pm 1,1^{\text{a}}$

LD (limite de detecção) = $0,0011 \mu\text{g/g}$. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, durante os 45 dias de tratamento ($p < 0,05$). * Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p \leq 0,05$). CT: controle; VA: deficiente em vitamina A. T_0 : tempo inicial. Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

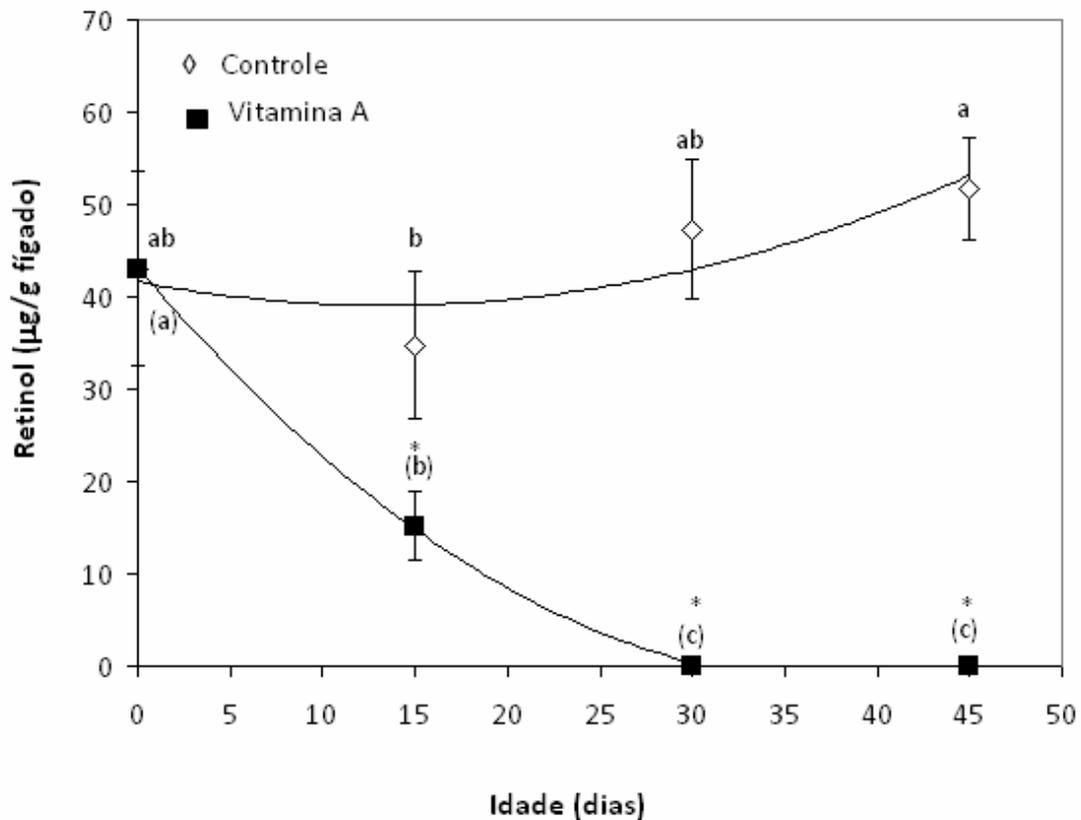


Figura 13: Concentração hepática de retinol ($\mu\text{g/g}$) dos ratos controle e deficientes em vitamina A, durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo CT e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, entre os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p \leq 0,001$). Controle: $y = 0,014x^2 - 0,3753x + 41,597$; $r^2 = 0,7306$. Deficiente em vitamina A ($y = 0,031 - 2,3574x + 43,162$; $r^2 = 0,9998$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

Na Figura 14 observa-se um aumento significativo na concentração de ferro hepático entre 15 e 30 dias nos grupos CT e VA ($p = 0,0309$; $p < 0,0001$ respectivamente). O grupo VA apresentou uma redução neste teor entre 30 e 45 dias de tratamento. Entretanto, não foi observada diferença significativa no teor hepático de ferro entre os dois grupos nos três períodos de tratamento (Figura 14; Figura 17).

No baço, dos ratos do grupo CT pode ser observada uma oscilação significativa na concentração de ferro, aumentou no início do tratamento (T_0 a T_{15} – $p = 0,0029$), com redução significativa com 30 dias (T_{15} a T_{30} – $p = 0,01080$) e aumentou novamente com 45 dias de tratamento (T_{45}). No grupo VA, é observado claramente um acúmulo gradual de ferro no baço, durante os 45 dias de tratamento (T_0 , T_{15} e T_{30}). Com 30 dias o grupo VA apresentou um aumento de ferro em relação ao grupo

controle ($p = 0,0046$), entretanto, após 45 dias, não foi observada diferença significativa nos níveis de ferro, entre os dois grupos (Figura 14, Figura 18).

No intestino dos animais controle também foi observada uma oscilação no conteúdo de ferro durante todo o período de tratamento. No início do tratamento, aos 15 dias, os ratos do grupo controle apresentaram um aumento na concentração de ferro em relação ao tempo basal ($p < 0,0001$), havendo uma redução significativa com 30 dias ($p = 0,0307$) para, novamente, aos 45 dias, retornar ao valor encontrado com 15 dias de tratamento ($p = 0,0038$). Os níveis de ferro intestinal nos animais do grupo VA mantiveram-se constantes durante os 30 dias de tratamento, sofrendo um aumento significativo aos 45 dias. Entre os grupos, foi observada uma redução significativa nos níveis de ferro no intestino dos ratos VA até o período de 30 dias ($p = 0,0021$; $p = 0,0016$ para T_{15} e T_{30} , respectivamente). Entretanto, após 45 dias de depleção, os ratos deficientes apresentaram níveis de ferro semelhantes aos dos animais do grupo controle (Figura 14; Figura 19).

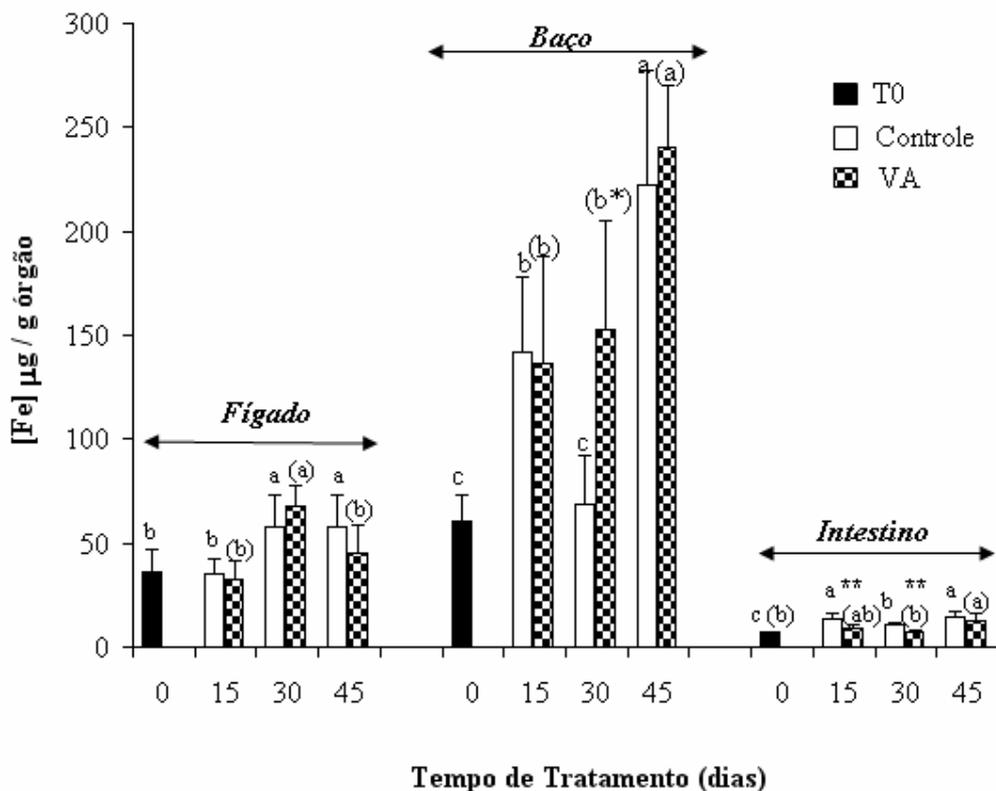


Figura 14: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$) no fígado, baço e intestino de ratos controle e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo CT e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, entre os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p \leq 0,01$). T_0 : tempo inicial. Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

A Figura 15 apresenta os níveis de malondialdeído (MDA) nos três tecidos estudados. Os animais apresentaram maior teor de MDA hepático no tempo basal, em relação aos demais períodos de tratamento, nos dois grupos. Os animais deficientes em vitamina A (VA) apresentaram menor concentração de MDA hepático com 30 e 45 dias de tratamento quando comparados ao grupo controle nos mesmos períodos ($p = 0,0428$; $p = 0,0109$, respectivamente). No baço, os dois grupos apresentaram maior concentração de MDA no tempo 45 em relação aos demais períodos de tratamento, não havendo diferença significativa entre os dois grupos. No intestino houve um acúmulo gradativo de MDA no grupo controle e uma redução gradativa no grupo VA. Com 45 dias de tratamento, o grupo VA apresentou menor estresse oxidativo que o grupo controle ($p = 0,0247$) (Figura 15; Figura 18).

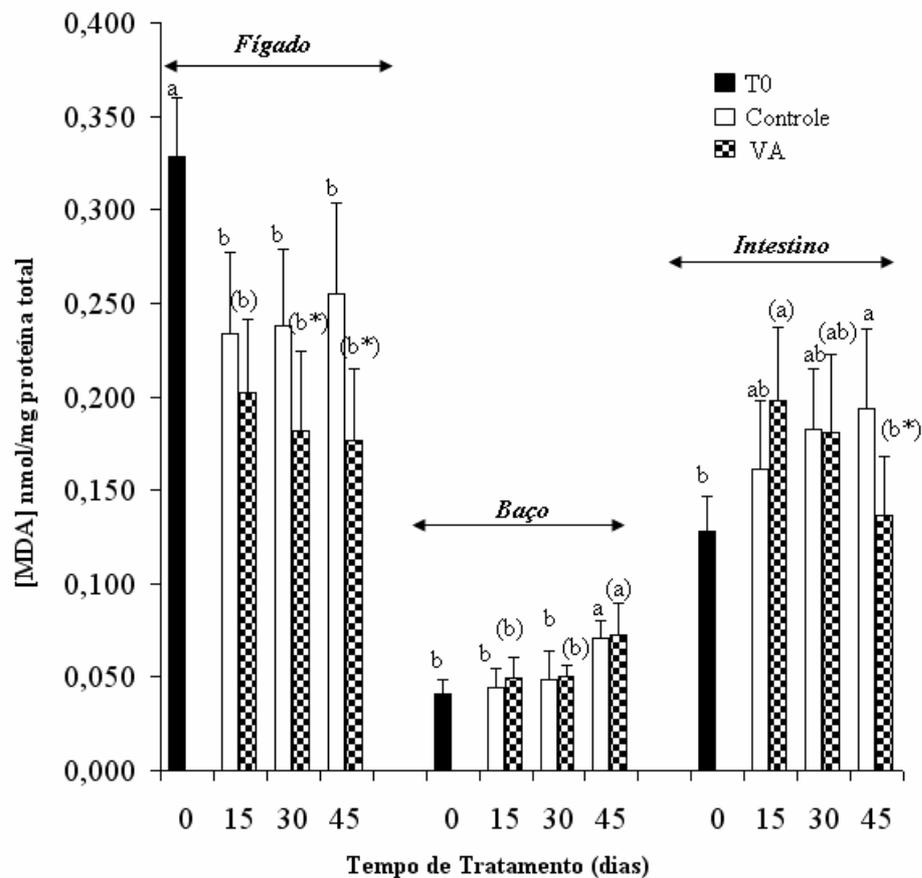


Figura 15: Concentração de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína total) no fígado, baço e intestino de ratos controle e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo CT e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, entre os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). *Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($* p \leq 0,05$). T₀: tempo inicial. Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

A Figura 16 apresenta concentração de proteínas carboniladas nos três tecidos. No fígado, ambos os grupos apresentaram aumento na concentração de proteínas carboniladas após 30 dias de tratamento (T₃₀), havendo uma estabilização em T₄₅. A deficiência de vitamina A não influenciou a concentração de proteínas carboniladas no fígado (Figura 16; Figura 19).

No baço dos ratos do grupo controle foi observado um decréscimo na concentração de proteínas carboniladas com 30 dias de tratamento, mantendo este nível no T₄₅. No grupo VA foi observada uma redução no teor de proteína carbonilada após 15 dias de tratamento, mantendo-se este nível até 45 dias de tratamento. O grupo VA apresentou menor concentração de proteínas carboniladas em relação ao grupo controle, no período T₁₅, ($p = 0,0002$), não sendo observada diferença significativa entre os dois outros períodos.

No intestino não foi observada diferenças significativas no teor de proteínas carboniladas no grupo VA durante o período de depleção, enquanto no grupo controle, a concentração basal (T₀) de proteína carbonilada foi maior em relação aos demais tempos de tratamento. Apenas com 15 dias de tratamento (T₁₅), o grupo VA apresentou maior teor de proteínas carboniladas no intestino quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,0011$) (Figura 16; Figura 19).

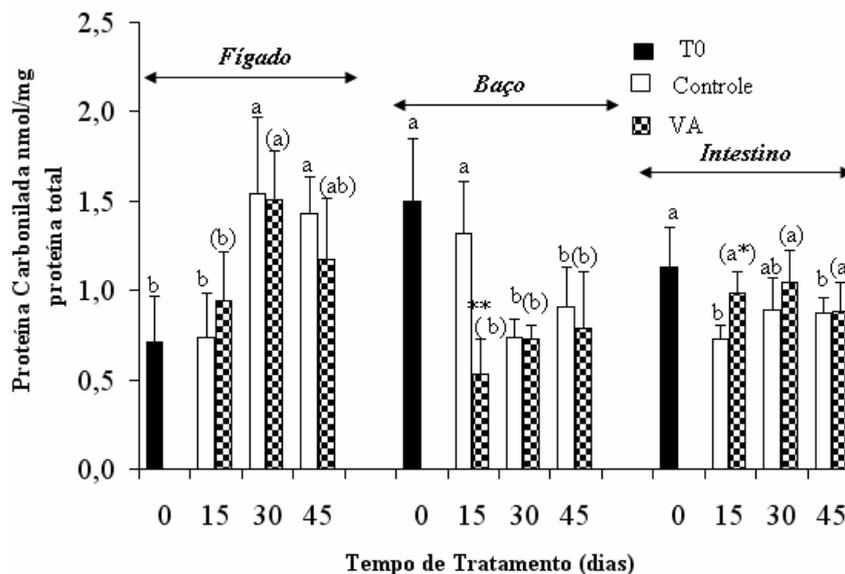


Figura 16: Concentração de proteína carbonilada (nmol/mg de proteína total) no fígado, baço e intestino de ratos controle e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo CT e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, entre os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento (* $p \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$). T₀: tempo inicial. Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

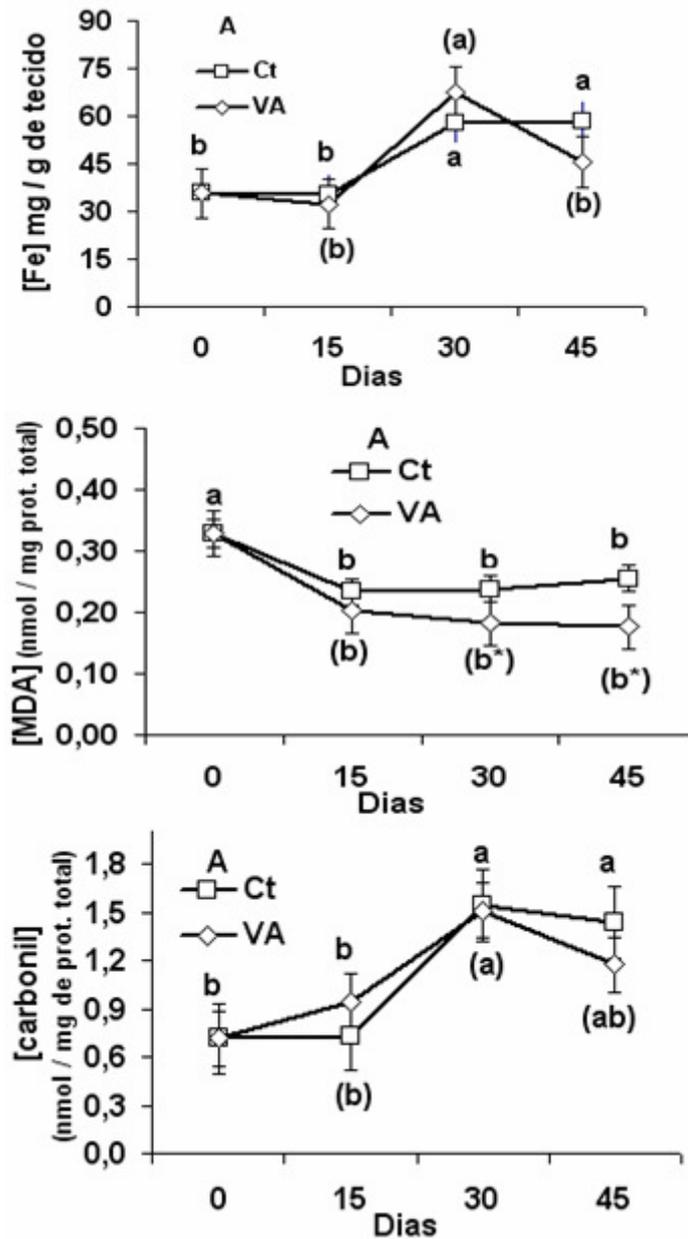


Figura 17: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína total) e proteína carbonilada (nmol/mg de proteína total) no fígado (A), de ratos controle (CT) e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo CT e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, entre os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($*p \leq 0,01$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

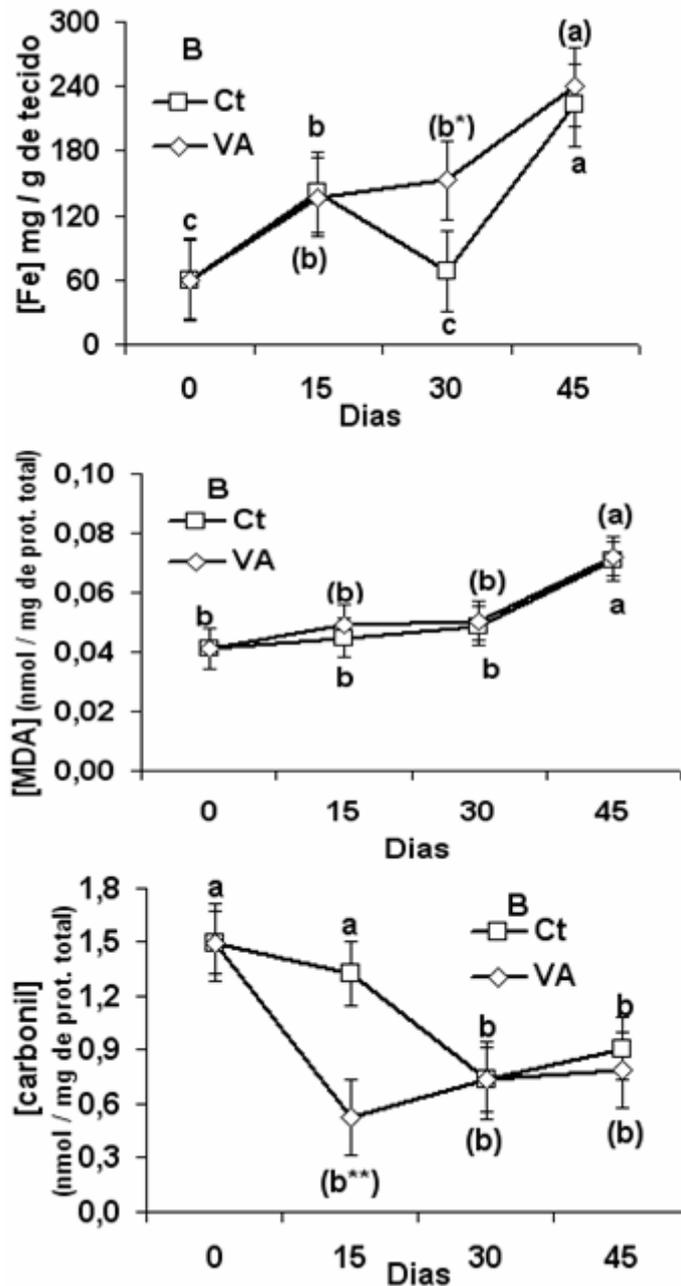


Figura 18: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína total) e proteína carbonilada (nmol/mg de proteína total) no baço (B), de ratos controle (CT) e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo CT e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, entre os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($*p \leq 0,01$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

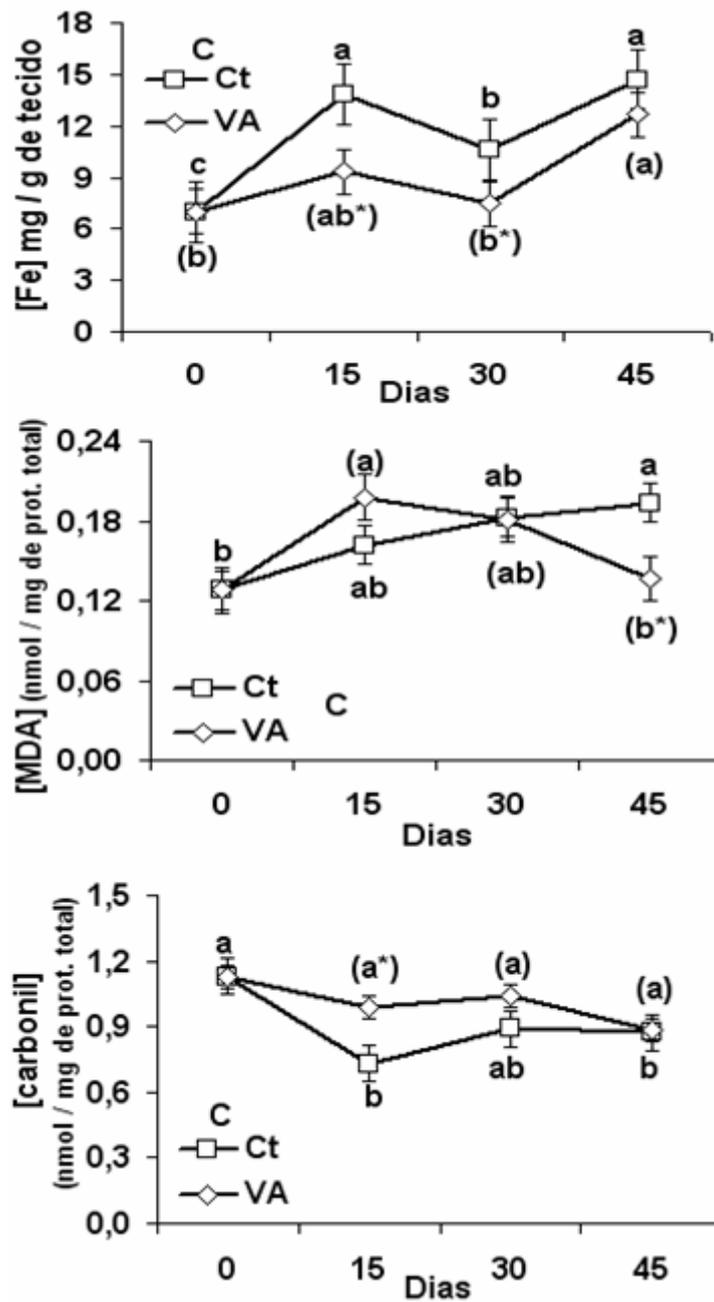


Figura:19: Concentração de ferro ($\mu\text{g/g}$), malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína total) e proteína carbonilada (nmol/mg de proteína total) no intestino (C), de ratos controle (CT) e deficientes em vitamina A (VA) durante os 45 dias de tratamento. Letras diferentes indicam comparação intra-grupo CT e letras diferentes entre parênteses comparação intra-grupo VA, entre os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($*p \leq 0,01$). Os dados correspondem a média e desvio padrão, $n = 6$ animais por grupo.

6 Discussão

Uma relação sinérgica entre o metabolismo de vitamina A e ferro tem sido descrita na literatura (Arruda et al., 2009; Ma et al., 2008; Zimmermann et al., 2006; Kelleher & Lonnerdal, 2005; Walczyk et al., 2003; Strube, Beard, Ross, 2002). Alguns estudos mostram uma alteração nos níveis de hemoglobina em animais deficientes em vitamina A (Arruda et al., 2009; Lechtig et al., 2009; Meija Hodges, Rucker, 1979). Arruda et al (2009) observaram um aumento na concentração de hemoglobina em ratos deficientes em vitamina A comparados ao controle, após 57 dias de depleção. No entanto outros estudos mostram uma redução na concentração de hemoglobina em ratos e humanos (Zimmermann, 2006; Meija et al., 1979). No presente estudo a deficiência de vitamina A não alterou os níveis de hemoglobina (tabela 1), sugerindo que o tempo e o grau de deficiência são fatores determinantes para alteração dos níveis de hemoglobina.

No presente estudo com 30 dias de depleção a concentração de retinol apresentou-se abaixo do limite de detecção, indicando que a reserva de retinol hepático foi esgotada entre 15 e 30 dias da ausência de ingestão dietética (tabela 01; Figura 13). Sendo o fígado o órgão estoque de vitamina A, e conseqüentemente responsável pela manutenção de sua homeostase sistêmica (Nobili et al., 2009), as funções dependentes de vitamina A deveriam somente estar comprometidas quando as reservas hepáticas estivessem completamente esgotadas. Ghenimi et al. (2009) observaram que após três semanas de indução da deficiência de vitamina A em ratos, os níveis séricos de retinol eram significativamente menores em relação ao grupo controle, e após aproximadamente cinco a seis semanas os níveis séricos estavam praticamente esgotados (0.36 ± 0.13 e 2.4 ± 0.08 $\mu\text{mol/L}$ deficiente e controle, respectivamente). Estes resultados sugerem que a concentração de retinol de outros tecidos é dependente da concentração de retinol hepática.

Embora alguns autores demonstrem uma redução no crescimento de animais deficientes em vitamina A (Ghenimi, 2009; Husson et al, 2004, Arruda et al, 2009), no presente estudo, com 45 dias de depleção, não foi observada diferença no ganho de peso entre os ratos controle e VA (tabela 1). Estes resultados sugerem que os animais foram acompanhados em um estágio inicial de depleção, 45 dias, não sendo suficiente para alterar o ganho de peso. Nos estudos citados anteriormente os

autores somente obtiveram redução significativa do ganho de peso dos animais deficientes em vitamina A a partir de 7 semanas de depleção.

A vitamina A apresenta uma capacidade antioxidante direta *in vitro*, no entanto, sua ação antioxidante *in vivo*, assim como seu efeito sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, ainda não são bem estabelecidos (Lars, 2008). Um mecanismo de ação antioxidante direto, no qual a vitamina A seria capaz de reduzir moléculas radicais ou formar um aduto (complexo) com espécies radicais, estabilizando os elétrons desemparelhados por ressonância tem sido sugerido pela literatura (Peres et al, 2003; Palace et al, 1999).

Um estudo recente desenvolvido por nosso grupo (Arruda et al, 2009) demonstrou um aumento na concentração de ferro, MDA e carbonil no baço, e um aumento da expressão de hepcidina hepática em animais submetidos a deficiência de vitamina A por 57 dias. Sugerindo que as mudanças no estado oxidativo provocadas pela deficiência de vitamina A sejam mediadas pela perda da homeostase de ferro. Em altas concentrações, o ferro é capaz de catalisar reações de oxidação, como a de Fenton, gerando radicais hidroxil e conseqüentemente promovendo danos a biomoléculas (Maoka, 2009; Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 2004).

Estudos anteriores evidenciaram que a deficiência de vitamina A promove um aumento da concentração de ferro em alguns órgãos, possivelmente pela redução da mobilização do ferro armazenado (Maoka, 2009; Bolem, Wendell, 1990; Meija, Chew, 1988). Embora o mecanismo de manutenção da homeostase do ferro não esteja totalmente elucidado, a concentração de ferro nos tecidos é controlada pelo peptídeo hepcidina, que é secretado principalmente pelo fígado (Beard, 2009). Um aumento dos níveis de ferro nos tecidos promove um aumento da secreção de hepcidina, que por sua vez induz a internalização e degradação da ferroportina intestinal, promovendo um acúmulo de ferro nos enterócitos e inibição da absorção de ferro via DMT-1. Mecanismo contrário acontece quando ocorre redução dos níveis de ferro tecidual (Beard, 2009; Nemeth et al., 2004; Nicolas et al., 2002; Weinstein, et al., 2002). No presente estudo, os dados do grupo controle mostram um acúmulo do ferro intestinal nos animais com 15 dias de tratamento, enquanto no fígado os níveis de ferro se mantiveram estáveis nesse período. Considerando a brusca mudança na biodisponibilidade de ferro dietético (do leite para a ração) durante os primeiros dias de tratamento dos ratos, a maior oferta e absorção

repentina de ferro dietético, acarretariam no aumento dos níveis de ferro séricos, resultando na indução da secreção da hepcidina hepática e, conseqüentemente, na internalização da ferroportina. O acúmulo de ferro intestinal e manutenção dos níveis de ferro hepático sugerem uma redução na exportação do ferro do enterócito para o sangue, e, portanto, uma redução na função da ferroportina. O aumento repentino e significativo na concentração de hemoglobina observado nos primeiros quinze dias de tratamento corrobora com esta teoria da maior oferta e absorção de ferro dietético no início do tratamento. Após 30 dias houve uma redução nos níveis de ferro intestinal e simultâneo aumento no fígado, sugerindo um aumento na exportação do ferro do enterócito e, conseqüente, armazenamento no fígado (Figura 14).

O fígado tem sido identificado como o principal órgão responsável pela secreção de hepcidina (Beard, 2009). No entanto, os níveis de ferro no fígado parecem não responderem à auto-regulação via hepcidina, conforme resultados obtidos por Arruda et al (2009). Quando o fígado está com altas reservas de ferro ocorre a estimulação da expressão de hepcidina, que então irá impedir a exportação de ferro pelo intestino e baço, o que explica um aumento simultâneo da concentração de ferro nesses órgãos, suportando os resultados obtidos no presente estudo (Figura 14, Figura 20).

Portanto os resultados sugerem que a homeostase do ferro no organismo é mantida através de uma comunicação entre os diferentes órgãos, que respondem de acordo com suas funções específicas. O conteúdo de ferro no baço parece responder a variação do ferro intestinal de modo diferenciado ao proposto para o fígado.

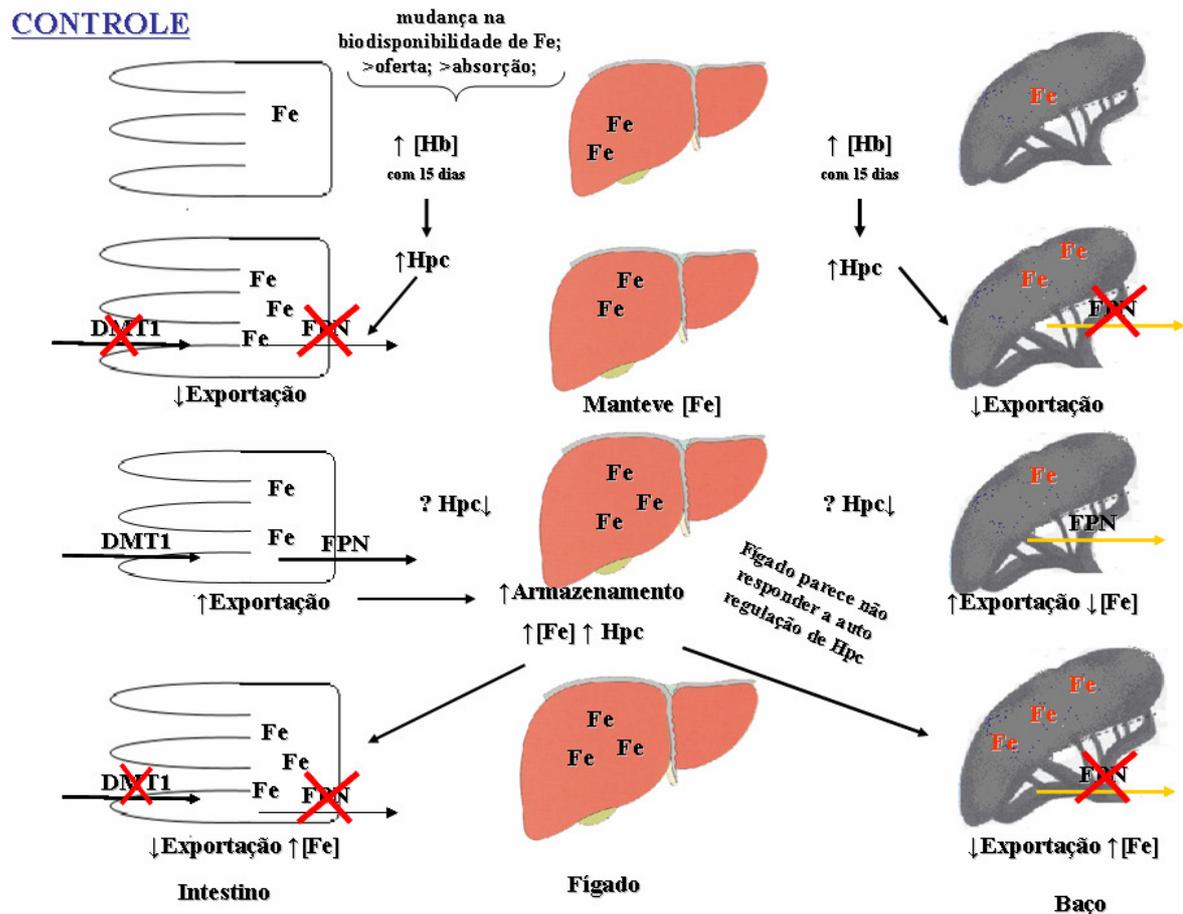


Figura 20: Representação do mecanismo de homeostase de ferro em animais controles durante 45 dias de tratamento. A princípio (T₀ ao T₁₅) há uma mudança na biodisponibilidade do ferro, com maior oferta e maior absorção de ferro e um aumento na concentração de ferro sérico, confirmado com aumento na concentração de hemoglobina (Hb), o que leva ao aumento da expressão de hepcidina (Hpc) hepática e internalização da ferroportina (FPN) intestinal e esplênica e retém ferro nesses tecidos. Aos 30 dias, com a redução na concentração de ferro no intestino e baço sugere uma redução na expressão da hepcidina, e liberação da ferroportina, com aumento na exportação de Fe pelos tecidos, aumentando o armazenamento hepático. O aumento da concentração de ferro hepático sugere ao aumento na expressão de hepcidina e novamente internalização da ferroportina e retenção de ferro nos tecidos como observado aos 45 dias. Hb: hemoglobina; Fe: ferro; Hpc: hepcidina; FPN: ferroportina; DMT1: transportador de metal divalente.

A deficiência de vitamina A alterou o perfil da concentração de ferro nos três órgãos ao longo do período de tratamento. No grupo VA os níveis de ferro intestinal ao longo dos 30 dias de tratamento se mantiveram estáveis, ao contrário do grupo controle que apresentou uma oscilação. Embora não tenham ocorrido variações nos níveis de ferro intestinal até 30 dias foi observado um aumento de ferro hepático aos 30 dias e no baço aos 15 dias (Figura 14), sugerindo que a deficiência de vitamina A promove uma perda da homeostase do ferro mediada pelo aumento da expressão

da hepcidina pelo fígado, que promove a internalização da ferroportina e conseqüente retenção de ferro no baço (Beard, 2009; Nemeth et al., 2004; Arruda et al, 2009).

A redução significativa dos níveis de retinol hepático nos ratos deficientes, após 15 dias de depleção foi acompanhada de uma redução da concentração de ferro no intestino quando comparado ao grupo controle, o mesmo foi observado aos 30 dias quando os estoques de retinol hepático estavam esgotados (Figura 13). Apesar da literatura sugerir que a redução do nível de ferro intestinal induziria um aumento de sua absorção (Beard, 2009; Strube et al., 2002), não foi observado acúmulo de ferro no fígado dos animais deficientes em vitamina A, enquanto no baço foi observado acúmulo de ferro apenas aos 30 dias quando comparado ao grupo controle (Figura 14). Aos 45 dias foi observada uma redução da concentração de ferro hepático no grupo VA em relação ao obtido ao período anterior. Esses dados sugerem que a deficiência de vitamina A promova a retenção de ferro no baço, e redução da importação e exportação do ferro do intestino (Figura 21).

Em estudo anterior foi obtido resultado semelhante ao descrito no presente estudo, aos 57 dias de deficiência de vitamina A houve um acúmulo significativo de ferro no baço, mas não no fígado de animais deficientes em vitamina A quando comparados a ratos controle (Arruda et al., 2009; Asare et al., 2009). Os autores ainda observaram um aumento na expressão de hepcidina no fígado, sugerindo que a liberação de ferro do baço seja inibida pela hepcidina, através da internalização e degradação da ferroportina, resultando no acúmulo desse mineral (Chaston et al., 2008). Outros estudos consubstanciam a tese de que a hepcidina não regule a ferroportina hepática, (Constante et al.; 2006; Wang et al., 2006; Rivera et al., 2005), Strube et al (2002) não observaram acúmulo de ferro hepático em ratos com deficiência marginal de vitamina A, mesmo quando os estoques de ferro do baço e da medula óssea estavam aumentados. Os autores sugerem que os efeitos da deficiência de vitamina A nos níveis de ferro teciduais são dose e/ou tempo dependentes, e que alguns biomarcadores do estado nutricional de ferro sejam mais responsivos que outros.

concentração de ferro nos tecidos, que está associado ao aumento da peroxidação lipídica e outros danos oxidativos (Valko et al., 2007; Mecocci et al., 1999; Cook & Yu, 1998).

Os dados obtidos no presente estudo mostram um aumento significativo na concentração de ferro e MDA, e uma redução nos níveis de proteína carbonilada no baço e intestino dos animais controle no tempo 45 em relação ao tempo basal (T0) (Figura 14- 19). Uma correlação positiva foi encontrada entre idade do animal e níveis de MDA no baço e intestino dos animais controle ($r = 0,6173$, $p = 0,0010$; $r = 0,6060$, $p = 0,0017$; respectivamente), enquanto uma correlação negativa foi observada entre idade e proteína carbonilada nestes órgãos ($r = - 0,4466$, $p = 0,0326$; $r = - 0,4129$, $p = 0,050$; respectivamente). Esses resultados sugerem que os danos oxidativos a lipídeos aumentam com a idade do animal e são dependentes da concentração de ferro nesses tecidos. Xu et al (2008) observaram um aumento gradativo na concentração de ferro e de danos oxidativos ao DNA com a idade dos animais.

Contrariando a tendência observada no baço e intestino dos animais controle, no fígado, apesar dos níveis de ferro terem aumentado em função direta da idade dos animais, foi observada uma correlação inversa entre idade e MDA ($r = - 0,4312$; $p = 0,0399$) e direta entre idade e proteína carbonilada ($r = 0,7263$; $p = 0,00006$). Esse aumento na concentração de proteínas carboniladas foi também observado em outro estudo no fígado de animais submetidos a deficiência de vitamina A por 57 dias, embora não tenha sido observado maior acúmulo de ferro no fígado em relação a animais controle (Arruda et al, 2009). Esses achados sugerem que o mecanismo de oxidação das proteínas seja ferro independente. Um estudo que investigou a exatidão da resposta dos biomarcadores (MDA, TBARs, proteína carbonilada e Free 8-iso-PGF₂) ao estresse oxidativo induzido por administração de tetracloreto de carbono (CCl₄), os autores verificaram que os biomarcadores de danos oxidativos a proteínas não refletiram com exatidão os danos causados por CCl₄. Não foram obtidas respostas com carbonil e de outros marcadores de aminoácidos oxidados, sugerindo que não existe um consenso quanto à resposta dos diferentes marcadores de estresse oxidativo frente aos diferentes modelos de indução do estresse (Kadiiska et, 2005).

Os danos oxidativos são causados a partir da perda do balanço entre a quantidade de oxidantes gerado e a capacidade antioxidante do organismo (Valko et

al., 2007). A deficiência de vitamina A induziu a redução dos níveis de ferro intestinal aos 15 e 30 dias de tratamento, mas não foram observadas diferenças em relação aos níveis de MDA nesse tecido entre os grupos. Embora a capacidade antioxidante dos ratos do grupo VA estivesse menor em função da menor concentração de retinol, a quantidade do elemento oxidante, ferro, também foi menor, mantendo, portanto, o balanço entre antioxidante e oxidante, o que poderia explicar a obtenção de níveis de MDA similar entre os grupos nos tempos de tratamento 15 e 30 dias.

A capacidade antioxidante total dos organismos vivos é mantida por uma série de diferentes agentes incluindo, enzimas antioxidantes, proteínas quelantes de metais, e compostos de baixa massa molecular seqüestradores de EROs provenientes principalmente da dieta (Halliwell & Gutteridge, 2001; Hercberg et al., 2004; Knoop et al., 2004). A composição das defesas antioxidantes difere de tecido para tecido e entre tipos celulares em um determinado tecido.

Apesar dos grupos Controle e deficiente em vitamina A (VA) apresentarem níveis hepáticos de ferro similares ao longo do tempo de tratamento, as concentrações hepáticas de MDA foram significativamente menores nos ratos deficientes em vitamina A a partir de 30 dias de tratamento. Um aumento na concentração do antioxidante GSH foi descrito em camundongos sem pêlos (hairless) submetidos a estresse oxidativo por deficiência de vitamina A. Os autores sugeriram que um aumento da concentração de vitamina E nos tecidos causado pela deficiência de vitamina A, pode ter poupado o uso de GSH, promovendo o aumento desse nos tecidos (Pélissier et al, 1997). Portanto o menor dano oxidativo a lipídeos observado no grupo VA pode ser explicado por um aumento na concentração de outros antioxidantes induzido pela deficiência de vitamina A.

Comportamento semelhante foi observado no baço, onde os animais com 30 dias de deficiência de vitamina A apresentaram acúmulo de ferro nesse órgão, mas tinham igual nível de dano a lipídeos e a proteínas em relação ao controle. E aos 15 dias de tratamento embora o grupo deficiente em vitamina A tivesse nível de ferro e níveis de MDA semelhantes, os níveis de proteínas carboniladas foram menores que os obtidos para o grupo controle. Portanto um aumento nas defesas antioxidantes induzido pela deficiência de vitamina A ou ainda o fato da quantidade de ferro acumulada no tecido não ter sido suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante do organismo desses animais podem explicar esses resultados. Ainda, as variações decorrentes da mudança abrupta na biodisponibilidade do ferro

dietético, no início do estudo (ferro proveniente do leite e da ração), somado as demandas específicas, durante o processo de amadurecimento dos órgãos do rato recém desmamado podem ter exercido efeito nos resultados obtidos no presente estudo. A utilização de ratos adultos e um aumento no período de tratamento dos animais poderiam confirmar os resultados obtidos no presente estudo.

7. Conclusão

Os resultados obtidos sugerem que a deficiência de vitamina A altera a homeostase de ferro do baço e intestino, sendo essas alterações dependentes do período de depleção e tecido específica. A correlação positiva entre os níveis de ferro e danos oxidativos a lipídeos observada no baço dos animais dos dois grupos sugerem um efeito do ferro no mecanismo de oxidação dos lipídeos, não sendo observado este efeito nos danos a proteínas. Considerando que as reservas de vitamina A foram esgotadas com trinta dias de tratamento, o reduzido período de deficiência (15 dias) pode ter sido responsável por uma alteração moderada nos níveis de ferro e, conseqüentemente, menor resposta dos danos oxidativos a biomoléculas obtidas no presente estudo. Parece que a oxidação de proteínas e lipídeos se comporta de maneira diferenciada em cada tecido, sugerindo uma proteção específica de cada órgão. Também observamos que a deficiência de vitamina A, durante 45 dias de depleção, não alterou o consumo de dieta e o ganho de peso dos animais.

Estudos empregando uma cinética com maior tempo de duração e menor intervalo de análises, bem como animais adultos são necessários para verificar melhor a correlação entre deficiência de vitamina A, o acúmulo de ferro e danos oxidativos nos tecidos desses animais. Entretanto, salvaguardados os limites inerentes ao modelo de estudo empregado, a deficiência de vitamina A influencia a homeostase de ferro podendo contribuir para a etiologia de patologias associadas ao acúmulo de ferro nos tecidos.

7 Referências Bibliográficas

1. Almeida-Muradian L. B. De; Penteadó M.V.C. Vitamina A IN: Penteadó, M.V.C. Vitaminas – Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos – Barueri, SP: Manole, 2003, 51-74.
2. Amado L.L.; Garcia M.L.; Ramosa P.B.; Freitas R.F.; Zafalona B.; Ferreira J.L.; Yunesc J.S; Monserrata J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. Science Of The Total Environment, 2009, 407:2115– 2123.
3. Anderson J. J. B. Over supplementation of vitamin A and osteoporotic fractures in the elderly: to supplement or not to supplement with vitamin A. Journal of Bone and Mineral Research, 2002, 17:1359–1362.
4. Arnhold T.; Nau, H.; Meyer, S.; Rothkoetter H.J. Porcine intestinal metabolism of excess vitamin A differs following vitamin supplementation and liver consumption. Journal of Nutrition, 2002, 132, 97–203.
5. Arruda, S.F.; Siqueira. E.M.A.; Valência, F.F. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. Nutrition, 2009, 25: 472–478.
6. Asare G.A.; Kew M.C.; Mossanda K.S.; Paterson A.C.; Siziba K.; Kahler-Venter C.P. Effects of Exogenous Antioxidants on Dietary Iron Overload. J. Clin. Biochem. Nutr., 2009, 44: 85–94.
7. Babior, B.M. Chronic granulomatous disease. Semin Hematol, 1990, 27: 247-258.
8. Bachmann H.; Desbarats A.; Pattison P.; Sedgewick M.; Riss G.; Wyss A.; Cardnault N.; Dusza C.; Goralczyk R.; Grolier P. Feedback regulation of $\beta\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. J Nutr, 2002, 132, 3616-3622.
9. Baranowska I, Czernicki K, Aleksandrowicz R. The analysis of lead, cadmium, zinco, copper, and nickel content in human bones from the Upper Silesian industrial district. The Science Total Environment, 1995, 159:155-162.
10. Barros H. L. C. Química Inorgânica: Uma Introdução. Primeira ed. Editora UFMG, Belo Horizonte, 1992.
11. Batista-Filho M.; Rissin, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. Cad. Saúde Pública, 2003, 19(1):s181-s191.
12. Bauer G. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. Anticancer Res., 2000, 20 (6B): 4115-4139.

13. Beard J.; Han O. Systemic iron status. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1790: 584–588.
14. Beynen A.C.; Sijtsma K.W.; Van den Berg G.J. Iron status in rats fed a purified diet without vitamin A. Biol Trace Elem Res, 1992; 35:81-4.
15. Bianch M.L.P.; Antunes L.M.G.. Radicais Livres E Os Principais Antioxidantes da Dieta. Rev. Nutr., Campinas, 1999, 12(2): 123-130.
16. Bianchini-Pontuschka, R.; Penteado, M.V.C. Vitamina E In: Penteado, M. V.C.P. Vitaminas – Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos – Barueri, SP: Manole, 2003, p. 121-164.
17. Bjelke E. Dietary vitamin A and human lung cancer. Int. J. Cancer, 1975, 15: 561-565.
18. Block, G.; Dietrich, M.; Norkus, E.P.; Morrow, J.D.; Hudes, M.; Caan, B.; Packer, L. Factors associated with oxidative stress in human populations. American Journal of Epidemiology, 2002, 156(3):274-285.
19. Blomhoff R.; Green M.H.; Berg T.; Norum K.R. Transport and storage of chemical carcinogens. Cancer Letters, 2008, 266:73–83.
20. Bolem M.W.; Wendell M. Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. Am J Clin Nutr., 1990, 51:76-9.
21. Brasil. Ministério da Saúde e Unicef, Cadernos de atenção básica: Carências de micronutrientes, Bethsáida de Abreu Soares Schmitz. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.
22. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de atenção à saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
23. Britton G.; Liaaen-Jensen S.; Pfander H. Carotenoids HandBook, Birkhäuser, Basel, Switzerland, 2004.
24. Buchli, L. Radicais livres e antioxidantes. Cosmetics & Toiletries, 2002 14(2): 54-57
25. Burria, B.J.; Cliffordb A.J. Carotenoid and retinoid metabolism: insights from isotope studies. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 430:110–119.
26. Burton, G.W. Antioxidant action of carotenoids. J Nutr, 1989, 119:109-111.
27. Candan N.; Tuzmen N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. NeuroToxicology, 2008, 29:708–713.

28. Cerqueira F.M.; Medeiros M.H.G.; Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Quim. Nova, 2007, 30 (2): 441-449.
29. Chaston T.; Chung B.; Mascarenhas M.; Marks J.; Patel B.; Srai S,K.; et al. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. Gut., 2008, 57:374–82.
30. Constante M.; Jiangm W.; Wang D.; Raymond V.A.; Bilodeau M.; Santos M.M. Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidina levels in iron overload and inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291:G229–37.
31. Cook C.I.; Yu B.P. Iron accumulation in aging: modulation by dietary restriction. Mech. Ageing Dev., 1998, 102: 1–13.
32. Cooke M.S.; Evans M.D.; Dizdaroglu M.; Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB Journal , 17(10):1195-1214.
33. Crichton R.R.; Wilmet S.; Legssyer R.; Ward R. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. J Inorg Bio, 2002; 91: 9-18.
34. Das, N.P.; Pereira T.A . Effects of flavonoids on thermal autooxidation of palm oil: structure-activity relationships. J. Am. Oil Chem. Soc., Champaing, 67(4):255-8, 1990.
35. Davey M.W.; Saeys W.; Hof E.; Ramon H.; Swennen R.L.; Keulemans J. Application of Visible and Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (Vis/NIRS) to Determine Carotenoid Contents in Banana (*Musa spp.*) Fruit Pulp. J. Agric. Food Chem., 2009, 57:1742–1751.
36. Davila M.E.; Norris L.; Cleary M.P.; Ross A.C. 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. Journal of Nutrition, 1985, 115: 1033-1041.
37. De Oliveira M.R.; Oliveira M.W.S.; Rocha R.F.; Moreira J.C.F. Vitamin A supplementation at pharmacological doses induces nitrosative stress on the hypothalamus of adult Wistar rats. Chemico-Biological Interactions, 2009.
38. Dias M.G.; Filomena G.F.C.; Camões M.; Oliveira L. Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. Food Chemistry, 2009, 113:808–815.
39. Dragsted L.O. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. Eur J Nutr, 2008, 47(2):3–18.
40. Dupic F.; Fruchon S.; Bensaid M.; Borot N.; Radosavljevic M.; Loreal O.; Brissot P.; Gilfillan S.; Bahram S.; Coppin H.; Roth M.P. Inactivation of the

- hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. Gastroenterology. 2002, 122: 745-751.
41. Emerit I. Reactive oxygen, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. Free Rad Biol Med, 1994, 16:99-109.
 42. Englberger L.; Schierle J.; Hofmann P.; Lorens A.; Albert K.; Levendusky A.; Paul Y.; Lickaneth E.; Elymore A.; Maddison M.; Brum I.; Nemra J.; Alfred J.; Velde N.V.; Kraemer K. Carotenoid and vitamin content of Micronesian atoll foods: Pandanus (*Pandanus tectorius*) and garlic pear (*Crataeva speciosa*) fruit. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22:1–8.
 43. Esteban-Pretel G., Marín M.P.; J. Renau-Piqueras; Barber T.; J. Timoneda. Vitamin A deficiency alters rat lung alveolar basement membrane Reversibility by retinoic acid. Journal of Nutritional Biochemistry, 2009. In press.
 44. Fairweather-Tait S.J. From absorption and excretion of minerals, to the importance of bioavailability and adaptation. Br. J. Nutr., 1997; 78: S95-S100.
 45. Fenaux P.; Chomienne C.; Degos L. Treatment of acute promyelocytic leukaemia, Best Pract. Res. Clin. Haematol., 2001, 14:153–174.
 46. Fidge N.H.; Smith F.R.; Goodman, D.S. Vitamin A and carotenoids. The enzymic conversion of beta-carotene into retinal in hog intestinal mucosa. J. Biochem., 2001, 114: 689–694.
 47. Fields A.L.; Soprano D.R.; Soprano K.J. Retinoids in Biological Control and Cancer. Journal of Cellular Biochemistry, 2007, 102:886–898.
 48. Fleming D.L.; Tucker K.L.; Jacques P.F.; Dallal G.E.; Wilson P.W.F.; Wood R.J. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. Am J Clin Nutr. 2002; 76: 1375 - 1384.
 49. Fraser P.D.; Enfissi E.M.A.; Bramley P.M. Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009, 483:196–204.
 50. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. The Journal of Experimental Biology, 1998, 201(8), 1203-1209.
 51. Fujita M.; Brindle E.; Rocha A.; Shell-Duncan B.; Ndemwa P.; O'Connor K.A. Assessment of the relative dose-response test based on serum retinol-binding protein instead of serum retinol in determining low hepatic vitamin A stores. Am J Clin Nutr., 2009, 90:217–24.
 52. Ghenimi N.; Beauvieux M.C.; Biran M.; Pallet V.; Higuieret P.; Gallis J.L. Vitamin A Deficiency in Rats Induces Anatomic and Metabolic Changes Comparable with Those of Neurodegenerative Disorders. J. Nutr., 2009, 139: 696–702.

53. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res, 1998, 39:1529-1542.
54. Glenn E. Bartley. Book Review of Carotenoids, Volume 4: Natural Functions. J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (10):3788.
55. Goetz M.E.; Luch A. Reactive species: A cell damaging route assisting to chemical carcinogens. Cancer Lett. , 2008, 266(1):73-83.
56. Goswami B.C.; Ivanoff K.D.; Barua A.B. Absorption and Conversion of 11,12-3H-Carotene to Vitamin A in Sprague-Dawley Rats of Different Vitamin A Status. J. Nutr, 2003, 133 (1): 148.
57. Gregory III, J. F. Vitamins. IN: Fennema O. R. Food Chemistry. 3^a ed. Series Food Science and Technology; v. 76. 1996. p. 531-616.
58. Griffiths H.R.; Moler L.; Bartosz G.; Bast A.; Bertoni-Freddari C.; Collins A.; Cooke M.; Coolen S.; Haenen G.; Hoberg A.M.; Loft S.; Lunec J.; Olinski R.; Parry J.; Pompella A.; Poulsen H.; Verhagen H.; Astley S.B. Biomarkers. Molecular Aspects of Medicine, 2002, 23: 101 - 208.
59. Guven M.; Ozturk B.; Sayal A.; Ozet A. Lipid peroxidation and antioxidant system in blood of patients with Hodgkin's disease. Clin Biochem, 2000, 33:209–12.
60. Halliwell, B.; Gutteridge, J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. Oxford University Press, 2007.
61. Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem, 1972, 48, 2, 422.
62. Henle E.S.; Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. J Biol Chem, 1997, 272:19095-19098.
63. Hercberg S.; Galan P.; Preziosi P.; Bertrais S.; Mennen L.; Malvy D.; Roussel A.F.; Serge A.B. The SU.VI.MAX Study: A Randomized, Placebo-Controlled Trial of the Health Effects of Antioxidant Vitamins and Minerals. Arch. Intern. Med., 2004, 164, 2335-2342.
64. Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: Storey, K.B. Functional metabolism: regulation and adaptation. 1. ed. New Jersey: Wiley-Liss. 2004. p. 319-366.
65. 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.
66. Husson M.; Enderlin V.; Alfos S.; Boucheron C.; Pallet V.; Higuieret P. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. Molecular Brain Research., 2004, 123:7 –17.

67. Jamieson JA & Kuhnlein HV. The paradox of anemia with high meat intake: a review of the multifactorial etiology of anemia in the Inuit of North America Nutrition Reviews, 2008, 66(5):256–271.
68. Johnson-Davis, K. L.; Moore, S.J.; Owen W.E; Cutler, J.M.; Frank, E.L. A rapid HPLC method used to establish pediatric reference intervals for vitamins A and E. Clinica Chimica Acta , 2009. In press.
69. Jones D.P. Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal., 2006, 8:1865–79.
70. Jun L.; Tian Y.X.; Yang F.; Ping Zhang J.; Skibsted L.H. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. Food Chemistry, 2009. in press
71. Kabat G.C.; Kim M.; Adams-Campbell L.L.; Caan B.J.; Chlebowski R.T.; Neuhauser M.L.; Shikany J.M.; Rohan T.E.. Longitudinal study of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenopausal women. Am J Clin Nutr., 2009, 90:162–9.
72. Kadiiska M.B. et al. Biomarkers of oxidative stress study II. Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? Free Radical Biology & Medicine, 2005, 38:698– 710.
73. Kelleher S.L.; Lonnerdal B. Low vitamin A intake affects milk iron level and iron transporters in rat mammary gland and liver. J Nutr, 2005, 135:27–32.
74. Knobel Y.; Gleit M.; Osswald K.; Pool-Zobel B.L. Ferric iron increases ROS formation, modulates cell growth and enhances genotoxic damage by 4-hydroxynonenal in human colon tumor cells. Toxicology in vitro, 2006, 20(6): 793 - 800.
75. Knuops K.T.; de Groot L.C.; Kromhout D.; Perrin A.E.; Moreiras-Varela O.; Menotti A.; Van Staveren W.A. Mediterranean Diet, Lifestyle Factors, and 10-Year Mortality in Elderly European Men and Women: The HALE Project. J. Am. Med. Assoc., 2004, 292:1433-1439.
76. Kobori C.N.; Amaya D.B. Uncultivated Brazilian green leaves are richer sources of carotenoids than are commercially produced leafy vegetables. Food Nutr Bull., 2008, 29(4):320-8.
77. Lahti-Koski M.; Valsta L.M.; Alfthan G.; Tapanainen H.; Aro A. Iron status of adults in the capital area of Finland. Eur J Nutr, 2003, 42: 287 - 92.
78. Lars O. Dragsted. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. Eur J Nutr., 2008, 47: (2):3–18.
79. Lechtig A.; Cornale G.; Ugaz M.E.; Arias L. Decreasing stunting, anemia, and vitamin A deficiency in Peru: results of the Good Start in Life Program. Food Nutr Bull., 2009, (1):37-48.

80. Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention. FASEB J., 1996, 10:1031-1039.
81. Lund E.K; Wharf S.G.; Fairweather-Tait S; Johnson I.T. Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. Am J Clin Nutr., 1999, 69: 250 -255.
82. Luo M.; Estívariz C. F.; Schleicher R.L.; Bazargan N.; Leader L.M.; Galloway J.R.; Ziegler T.R. Prospective analysis of serum carotenoids, vitamin A, and tocopherols in adults with short bowel syndrome undergoing intestinal rehabilitation. Nutrition, 2009, 25:400–407.
83. Lynch SR. Interaction of iron with other nutrients. Nutr Rev., 1997, 55:102–110.
84. Ma A.G.; Schouten E.G.; Zhang F.Z.; Kok F.J.; Yang F.; Jiang D.C.; Sun Y.Y.; Han X.X. Retinol and Riboflavin Supplementation Decreases the Prevalence of Anemia in Chinese Pregnant Women Taking Iron and Folic Acid Supplements. J. Nutr., 2008, 138: 1946–1950.
85. Majchrzak, D.; Fabian, E.; Elmadfa, I. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. Food Chemistry, 2006, 98:704–710.
86. Manicassamy S.; Pulendrana B. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. Seminars in Immunology, 2009, 21:22–27.
87. Maoka T. Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009, 483:191–195.
88. Martínez-Navarrete N.; Camacho M.M.; Martínez-Lahuerta J.; Martínez-Monzó J.; Fito P. Iron deficiency and iron fortified food – a review. Food Research International, 2002; 35: 225 – 23.
89. McClung J.P.; Karl J.P. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. Nutrition Reviews, 2009, 67(2):100–104.
90. Mecocci P; Fano G.; Fulle S.; MacGarvey U.; Shinobu L.; Polidori M.C.; Cherubini A.; Vecchiet J.; Senin U.; Beal M.F. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids and proteins in human skeletal muscle. Free Radic. Biol. Med., 1999, 26: 303–308.
91. Meijia L.A.; Chew F. Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. Am J Clin Nutr, 1988; 48; 595-600.
92. Meijia L.A.; Hodges R.E.; Rucker A.B. Role of vitamin A in the absorption, retention and distribution of iron in the rat. J Nutr ., 1979, 109:129–37.
93. Milman N, Byg KE, Ovesen L, Kirchhoff M, Jürgensen KSL. Iron status in Danish women, 1984- 1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the

- prevalence of iron deficiency and iron overload. Eur J Haematol, 2003, 71: 51 - 61.
94. Milman N, Pedersen AN, Ovesen L, Schroll M. Iron status in 358 apparently healthy 80 years old danish men and women: relation to food composition and dietary and supplemental iron intake. Ann Hematol, 2004, 83: 423 - 29.
95. Milman N.; Byg K.E.; Ovesen L.; Kirchoff M.; Jürgensen K.S.L. Iron status in Danish men, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. Eur J Haematol, 2002; 68: 332 - 40.
96. Mosen, E. R. The ironies of the iron. Am. J. Clin. Nutr. 1999, 69:831-2.
97. Montine K.S.; Quinn J.F.; Montine T.J. Overview: Membrane lipid peroxidation. Advances in Cell Aging and Gerontology, 2003, 12:11-26.
98. Moreno, FS. Efeitos das administrações de beta caroteno e vitamina A em ratos Wistar na etapa de progressão do modelo de hepatocarcinogenese do hepatócito resistente. (Tese de doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. 1999.200p.
99. Mucida D.; Park Y.; Cheroutre H. From the diet to the nucleus: Vitamin A and TGF join efforts at the mucosal interface of the intestine. Seminars in Immunology, 2009, 21:14–21.
100. Myhre A.M.; Carlsen M.H.; Bohn S.K.; Wold H.L.; Laake P.; Blomhoff R. Watermiscible, emulsified, and solid forms of retinol supplements are more toxic than oil-based preparations, Am. J. Clin. Nutr., 2003, 78:1152–1159.
101. National Academy of Science, Dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc 2001. [Acessado em 2009 junho]. Disponível em www.nap.edu.
102. Nemeth E. et al. Hpcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportina and inducing its internalization, Science, 2004, 306 (5704):2090–2093.
103. Nicolas G.; Bennoun M.; Porteu A.; Beaumont C.; Grandchamp B.; Sirito M.; Sawadogo M.; Kahn A.; Vaulont S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99:(7) 4596–4601.
104. Nobili V.; Alkhouri N.; Alisi A.; Ottino S.; Lopez R.; Manco M.; Feldstein A.E. Original Articles—Liver, Pancreas, And Biliary Tract. Retinol-Binding Protein 4: A Promising Circulating Marker of Liver Damage in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Clinical Gastroenterology And Hepatology, 2009, 7:575–579.

105. Oliveira M.R.; Oliveira M.W.S., Rocha R.F.; Moreira J.C.F.. Vitamin A supplementation at pharmacological doses induces nitrosative stress on the hypothalamus of adult Wistar rats. Chemico-Biological Interactions, 2009. In press.
106. Oliveros L.B., Domeniconi, M.A.; Veja, V.A.; Gatica, L.V., Brigada, A.M.; Gimenez, M. S. Vitamin A deficiency modifies lipid metabolism in rat liver. British Journal of Nutrition, 2007, 97:263–272.
107. Omenn G.S.; Goodman G.E.; Thornquist M.D.; Balmes J.; Cullen M.R.; Glass A.; Keogh J.P.; Meyskens F.L.; Valanis B.; Williams J.H.; Barnhart S.; Hammar S. Effects of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N Engl J Med, 1996, 334, 1150.
108. Paik J.; During A.; Harrison E.H.; Mendelsohn C.L.; Lai K.; Blaner W.S. Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave beta-carotene: the formation of retinoids. J. Biol. Chem., 2001, 276: 32160– 32168.
109. Palace V.P.; Khaper P.; Qin Q.; Singal P.K. Antioxidant potential of Vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. Free Radic. Biol. Med., 1999, 26:746–761.
110. Papanikolaou G.; Pantopoulos k. Iron metabolism and toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 202:199– 211.
111. Parker R.S. Absorption metabolism and transport of carotenoids. FASB J., 1996, 10:542-551.
112. Peitzman AB, Ford HR, Harbrecht BG, Potoka DA, Townsend RN. Injury to the Spleen. Curr Probl Surg., 2001, 38:921-1008.
113. Pélissier MA, Savouré N, Briand G, Albrecht R. Endogenous glutathione as potential protection against free radicals in the skin of vitamin A deficient mice. Food Chem Toxic. 1997.
114. Peres W.A.F.; Paula T.P.; Silva R.A.N.R.; Coelho H.S.M. A atuação da vitamina A e carotenóides na hepatocarcinogênese. Revista Brasileira de Cancerologia, 2003, 49(2): 113-120.
115. Polla A.S.; Polla L.L.; Polla B. Iron as the malignant spirit in successful ageing. Ageing Research Review, 2003, 2:25 - 37.
116. Ponka P. Iron Metabolism: physiology and Path physiology. The J. Trace Elements in Experimental Medicine, 2000, 13:73-83.
117. Pool-Zobel B.L. et al. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. Carcinogenesis, 1997, 18: 1847-1850.

118. Prado M. S.; Assis A.M.O.; Martins M.C.; Nazaré M.P.A.; Rezende I.F.B.; Conceição M.E.P. Hipovitaminose A em crianças de áreas rurais do semi-árido baiano. Rev. Saúde Pública, 1995, 29 (4): 295-300.
119. Ramalho R.A.; Flores H.; Saunders C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde publica. Rev. Panam. Salud Publica, 2002, 12(2): 117-123.
120. Randolph, R.K.; Ross, A.C. Vitamin A status regulates hepatic licithin:retinol acyltransferase activity in rats. J Biol Chem, 1991, 266, 16453-16457.
121. Reeves P.G.; Nielsen F.H.; Fahey G.C. 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., 1993; 123: 1939-51.
122. Richert, S.; Wehr, N.B.; Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. Arch Bioch Bioph, 2002, 430.
123. Rivera S.; Liu L.; Nemeth E.; Gabayan V.; Sorensen O.E.; Ganz T. Hpcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. Blood, 2005, 105:1797– 802.
124. Roodenburg A.J.C.; West C.E.; Béguin Y.; Van Dijk J.E.; Van Eijk H.G.; Marx J.J.; et al. Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency. J Nutr Biochem, 2000, 11:223–30.
125. 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., 1996, 75: 623-636.
126. Rosales F.J.; Jang J.T.; Pinero D.J.; Erikson K.M.; Beard J.L.; Ross A.C. Iron deficiency in young rats alters the distribution of vitamin A between plasma and liver and between hepatic retinol and retinyl esters. J Nutr., 1999, 129:1223– 1228.
127. Ross A.C.; Pasatiempo A.M.; Green M.H. Chylomicron Margination, Lipolysis, and Vitamin A Uptake in the Lactating Rat Mammary Gland: Implications for Milk Retinoid Content. Society for Experimental Biology and Medicine, 2004, 229: 46 – 55.
128. Ross, A.C. Retinoid production and catabolism: Role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. J Nutr, 2003, 133, 291S-296S.
129. Russell, RM. The vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity. Am J Clin Nutr, 2000, 71: 878-84.
130. Rutkowska J.; Stolyhwo A. Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO₂) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. Food Chemistry, 2009, 115:745–752.

131. Schroeder S.E.; Reddy M.B.; Schalinske K.L. Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory proteins. J Nutr , 2007,137:2686 –90.
132. Senno H. Structure and Function of Hepatic Stellate Cells. Medicin Electron Microscopy, 2004, 37: 3 – 15.
133. Sijtma K.W.; Van den Berg G.J. Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A. Br J Nutr., 1993, 70:777-85.
134. Souza W.A.; Vilas Boas O.M.G.C. A deficiência de vitamina A no Brasil: um panorama. Pan American Journal of Public Health, 2002, 12(3): 173 – 179.
135. Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Protein oxidation. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000, 899:191-208.
136. Strube YN; Beard JL; Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. J Nutr., 2002, 132:3607–3615.
137. Swanson C.A. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. Alcohol, 2003; 30: 99 - 102.
138. Tanumihardjo S.A.; Penniston K.L. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. J. Lipid Res.; 2002, 43(2):350-355.
139. Tanumihardjo SA.. Vitamin A and iron supplementation in pregnant Indonesian women. J Nutr., 2002(a); 132:1909 –12.
140. Tesoriere L.; Ciaccio M.; Bongiorno A.; Riccio A.; Pintaudi A. M.; Livrea M. A. Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogeneous solution and in phosphatidylcholine liposomes. Arch. Biochem. Biophys.,. 307:217–223; 1993.
141. Testa U. Proteins Of Iron Metabolism . *New York: CRC Press; 2002*, ISBN 0-8493-8676-4. 550p.
142. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group (ATBC). The effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N Engl J Med, 1994, 330:1029.
143. Thompsona D.A.; Gal A. Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. Progress in Retinal and Eye Research, 2003, 22: 683–703.
144. Touma S.E.; Perner S.; Rubin M.A.; Nanus D.M.; Gudas L.J . Retinoid metabolism and ALDH1A2 (RALDH2) expression are altered in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. Biochem Pharmacol., 2009, 21.

145. Toyokuni K.; Uchida K.; Okamoto K.; Hattori-Nakakuki Y.; Hiai H.; Stadtman E.R. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:2616-2620.
146. Valko M.; Leibfritz D.; Moncola J.; Cronin M.T.D.; Mazura M.; Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39:44–84.
147. Valko M.; Rhodes C.J.; Moncol J.; Izakovic M.; Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact , 2006; 160: 1-40.
148. Vander A.D.L.; Grobbee D.E.; Roest M.; Marx J.J.M.; Voorbij H.A.; Vander Schouw YT. Serum Ferritin Is a Risk Factor for Stroke in Postmenopausal Women. Stroke, 2005; 36; 1637-1641.
149. Vauclair S.; Majo F.; Durham A.D.; Ghyselinck N.B.; Barrandon Y.; Radtke F. Corneal epithelial cell fate is maintained during repair by notch signaling via the Regulation of Vitamin A. Metabolism, Developmental Cell, 2007, 13: 242 – 253.
150. Vega V. A., Anzulovich A. C., Varas S. M., Bonomi M. R., Giménez M.S., Oliveros L. B. Effect of nutritional vitamin A deficiency on lipid metabolism in the rat heart: Its relation to PPAR gene expression. Nutrition, 2009. In press.
151. Viatte L.; Nicolas G.; Lou D.Q.; Bennoun M.; Lesbordes-Brion J.C.; Canonne-Hergaux F.; et al. Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice. Blood, 2006, 107:2952– 8.
152. Walczyk T.; Davidsson L.; Rossander-Hulthen L.; Hallberg L.; Hurrell R.F. No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans. Am J Clin Nutr., 2003, 77:144–149.
153. Wang R.H.; Li C.; Xu X.; Zheng Y.; Xiao C.; Zerfas P.; et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidina expression. Cell Metab., 2006: 2:399–409.
154. Wei H.; Huang H.M.; Li T.Y.; Qu P.; Liu Y.X.; Chen J. Marginal vitamin A deficiency affects lung maturation in rats from prenatal to adult stage. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2009, 55(3):208-14.
155. Weinstein D.A., et al. Inappropriate expression of hepcidin is associated with ironrefractory anemia: implications for the anemia of chronic disease, Blood, 2002, 100 (10):3776–3781.
156. West Jr, J.P. Vitamin A deficiency disorders in children and women. Food and Nutr Bull , 2003, 24:S78–S90.

157. WHO/FAO. Technical report series 916. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, Switzerland, 28 January - 1 February, 2002.
158. World Cancer Research Foundation (WCRF)/American Institute For Cancer Research. Patterns of cancer. In: Moreno, FS. Efeitos das administrações de beta caroteno e vitamina A em ratos Wistar na etapa de progressão do modelo de hepatocarcinogenese do hepatócito resistente. (Tese de doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. 1999.200p.
159. World Health Organization – Reducing Risks, Promoting Healthy Life. World Health Report, Geneva, 2002, p 56.
160. World Health Organization. Indicators for Assessing Vitamin A Deficiency and their Application in Monitoring and Evaluating Intervention Programmes, World Health Report, Geneva, 1996.
161. Wu T.; Sempos C.T.; Freudenheim J.L.; Muti P.; Smit E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. Ann Epidemiol, 2004, 14: 195 - 201.
162. Xu J, Knutson MD, Carter CS, Leeuwenburgh. Iron accumulation with age, oxidative stress and functional decline. Plos One, 2008, 3 (8): 2865-2872.
163. Yehya A.; Baer J.T.; Smiley W.; Dollar A.; Sperling L. Hypervitaminosis A altering the lipid profile in a hypercholesterolemic patient. Journal of Clinical Lipidology, 2009.
164. Young A.J.; Lowe G.M. Antioxidant and Prooxidant properties of carotenoids. Arch Bioch Bioph, 2001,385, 1, 20-27.
165. Young, A.J.; Lowe, G.M. Antioxidant and Prooxidant properties of carotenoids. Arch Bioch Bioph, 2001, 385, 1, 20-27.
166. Youngson, R. Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes. Rio de Janeiro: Campus, 1995. 151p.
167. Yu, P.B. Celular defenses against damage from reactive oxygen species. Phys Rev, 1994, 74, 1, 141-162.
168. Yuan X.M.; Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. Ann Med, 2003, 35:578 - 591.
169. Zhang Z.; Benabbas A.; Ye X.; Yu A.; Champion P.M. Measurements of Heme Relaxation and Ligand Recombination in Strong Magnetic Fields. J. Phys. Chem. B, 2009. In Press.
170. Zimmermann M.B.; Biebinger R.; Rohner F.; Dib A.; Zeder C.; Hurrell R.F.; Chaouki N. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. Am J Clin Nutr., 2006,84:580 – 6.

171. Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. Lancet, 2007, 370: 511 – 20.
172. Zoller H.; Koch R.O.; Theurl I.; Obrist P.; Pietrangelo A.; Montosi G.; Haile D.J.; Vogel W.; Weiss G. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter and ferroportin in iron deficiency and iron overload. Gastroenterology, 2001, 120: 1412-1419.