

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

**DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A E NÍVEIS DE TRANSCRITO DE
TRANSPORTADORES DE FERRO NO INTESTINO DE RATOS**

DOUGLAS DOS SANTOS MOREIRA

Brasília-DF, 2009

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

DOUGLAS DOS SANTOS MOREIRA

**DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A E NÍVEIS DE TRANSCRITO DE
TRANSPORTADORES DE FERRO NO INTESTINO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Nutrição Humana, do Departamento de Nutrição, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

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

Brasília-DF, 2009

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

**DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A E NÍVEIS DE TRANSCRITO DE
TRANSPORTADORES DE FERRO NO INTESTINO DE RATOS**

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Egle Machado de Almeida Siqueira (orientadora)

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Maria Talá de Souza

Prof^a. Dr^a. Ildinete Silva Pereira

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda (suplente)

Brasília-DF, 2009

“As coisas do mundo existem em uma espécie de comunhão, em que cada uma atua sobre as demais, ainda que a grandes distâncias.”

Giordano Bruno, filósofo italiano, século XVI

“Há um paradoxo no crescimento do saber científico. (...) Fatos desconexos e mistérios impenetráveis se tornam explicações racionais, e a simplicidade surge do Caos.”

Bruce Alberts, bioquímico americano, século XX

DEDICATÓRIA

Àqueles que buscam na razão e na ciência os fundamentos da vida.
Àqueles que encontram na fé e no amor a justificativa da existência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que de uma maneira assombrosa fez o Universo, desde suas ínfimas partículas até o Cosmo inexplorado, por me manter e por criar as oportunidades que aqui me trouxeram.

À minha mãe, Abigail, que moldou meu caráter, sacrificando-se para que eu pudesse ser uma pessoa melhor.

Ao meu pai, Romualdo, a quem a admiração tardia veio por me ensinar que a maior liberdade é a do pensamento.

À minha irmã, Priscila, que me admira e me ama mesmo quando eu não mereço.

À minha família, por se orgulhar do que eu faço, mesmo que às vezes não entendam o que é, e me apoiar em todas as empreitadas.

À minha orientadora, Professora Egle, que, mais do que me ensinar os meandros da Ciência, me deu lições de vida; por ter acreditado no potencial daquele menino de 16 anos na aula de BioBio Experimental.

À Professora Sandra, que mostra que brilhantismo e simplicidade podem caminhar juntos, por ter me acompanhado no dia-a-dia, compartilhando as conquistas e frustrações de cada experimento.

Ao Professor Fernando, que nos contagia com sua paixão pela ciência, por muito mais do que nos ensinar, nos fazer refletir.

À equipe do Laboratório de Biofísica por ter me compreendido, me suportado e me ajudado: Adriana (compartilhando experiências e viagens), Chiquinho (pelas risadas, pelo nitrogênio, pelo rádio,...), Diego (que carregou gelo para cobrir o Polo Norte e tenta me ensinar japonês), Fabiani (incansável e sempre com um presente para todos), Fernanda (paciente, dedicada e eficiente, que dividiu a bancada comigo por dois anos e imensamente me ajudou), Gutto (que

não quer ser meu estagiário, me enrola, mas mesmo assim é competente e um excelente amigo), Juliana (sempre doce, possui uma inteligência incrível), Luciano (que tem superado inúmeros obstáculos para atingir os objetivos), Marcela (uma das pessoas mais intensas que já conheci, e que recebeu o Troféu Cubeta de Ouro) e Silvana (sutil, mas sempre eficiente).

Às amigas Carol, Cibele, Karyne e Renata, por terem me mostrado todo o amor e amizade possível. Vocês estarão sempre comigo. Sem vocês, não teria chegado onde estou, nem seria metade do que sou. Em muito eu as devo.

Aos amigos da República do Frango: Bruna, Carol, Cris, Frank, Jônatas, Laísa, Letícia e Lu, que dividiram comigo as pequenas amarguras e esplendores do dia-a-dia.

Aos amigos da igreja, por fazerem dos meus sábados o melhor dia da semana, especialmente ao Héber e sua família, por me acolherem como se fosse um irmão.

Aos membros da banca, por aceitaram o convite e pelas contribuições ao trabalho.

À Professora Maria Sueli, por ter disponibilizado o Real-Time PCR, e à Lorena Derengowski, por ter, prontamente e sem restrições, dedicado parte do seu tempo para me ensinar a usar o aparelho.

Aos colegas de mestrado e colegas dos outros grupos do Laboratório de Biofísica, pela convivência construtiva.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse projeto de vida se realizasse.

Meu muito obrigado, agora e sempre!

SUMÁRIO

	Página
Lista de siglas e abreviaturas	XI
Lista de figuras	XIV
Lista de tabelas	XVI
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Vitamina A	3
2.1.1. Recomendação de vitamina A	6
2.1.2. Deficiência de vitamina A	8
2.1.3. Excesso de vitamina A	10
2.1.4. Metabolismo de vitamina A	11
2.1.4.1. Absorção	11
2.1.4.2. Transporte	12
2.1.4.3. Armazenamento	13
2.1.5. Carotenoides	14
2.1.6. Vitamina A e gene	18
2.2. Ferro	19
2.2.1. Importância do ferro	19
2.2.2. Deficiência de ferro	19
2.2.3. Excesso de ferro	21
2.2.4. Biodisponibilidade de ferro	22
2.2.4.1. Fatores extrínsecos	22
2.2.4.2. Fatores intrínsecos	23
2.2.5. Recomendação de ferro	23
2.2.6. Balanço corporal de ferro	25
2.2.7. Absorção	26
2.2.8. Transporte e captação celular	31

2.2.9. Armazenamento	34
2.2.10. Excreção	34
2.2.11. Regulação	35
2.2.11.1. Hepcidina	35
2.2.11.2. IRE e IRP	39
2.3. Interação entre vitamina A e ferro	43
3. Objetivos	47
3.1. Objetivo geral	47
3.2. Objetivos específicos	47
4. Metodologia	48
4.1. Animais	48
4.2. Tratamento	48
4.3. Ganho de peso	49
4.4. Consumo de dieta	49
4.5. Extração, tratamento e quantificação de RNA	49
4.6. Síntese da primeira fita de cDNA	50
4.7. Verificação de contaminação por DNA genômico	50
4.8. Amplificação e análise dos genes de interesse	52
4.9. Dosagem de hemoglobina	53
4.10. Teor de ferro nos tecidos	53
4.11. Teor de retinol hepático	54
4.12. Análise estatística	56
5. Resultados	57
6. Discussão	65
7. Conclusão	71
8. Bibliografia	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A _{X nm}	absorbância a (X) nanômetros
AI	ingestão adequada
AIN-93G	dieta padrão para roedores em crescimento
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	ácido retinoico
ARAT	acil coenzima A: retinol-acil-transferase
bp	pares de base
CAR	carotenoide
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília
CRBP 2	proteína celular ligante de retinol 2
CT	controle
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
Dcytb	citocromo duodenal B
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DMT-1	transportador de metal divalente 1
DRI	ingestão dietética de referência
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
e.g.	por exemplo (<i>exempli grati</i>)
EPO	eritropoietina
ER	éster de retinil
ERA	equivalente de atividade de retinol
EROs	espécies reativas de oxigênio
Fe	ferro
FPN	ferroportina
hnRNA	RNA heterogêneo nuclear
HCP	proteína carreadora de heme
HDL	lipoproteína de alta densidade
HFE	proteína alterada na hemocromatose
HJV	hemojuvelina

HO	heme oxigenase
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICP-AES	espectroscopia de emissão atômica
IOM	Instituto de Medicina dos Estados Unidos da América
IRE	elemento responsivo a ferro
Ireg-1	proteína reguladora de ferro 1, FPN, MTP-1
IRP	proteína reguladora de ferro
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPL	lipase lipoproteica
LRAT	lecitina: retinol-acil-transferase
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
MTP-1	proteína transportadora de metal 1, FPN, Ireg-1
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAS	Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	reação de polimerização em cadeia
RT-PCR	PCR semiquantitativa
qRT-PCR	PCR quantitativa (em tempo real)
pH	potencial hidrogeniônico
QM	quilomícron
QMR	quilomícron remanescente
RAL	retinal
RAR	receptor nuclear ligante de todo- <i>trans</i> -ácido retinoico
RARE	elemento responsivo de retinoide
RBP	proteína ligante de retinol
RDA	ingestão diária recomendada
RNA	ácido ribonucleico
ROH	retinol
rpm	rotação por minuto
RXR	receptor nuclear ligante de ácido retinoico do tipo X
RXRE	elemento responsivo de retinoide do tipo X
SLC	carreador solúvel
STEAP3	antígeno epitelial seis-transmembrana da próstata 3

SFT	estimulador de transporte de ferro
T ₀	período basal
T ₁₅	15 dias de tratamento
T ₃₀	30 dias de tratamento
T ₄₅	45 dias de tratamento
TEB	tampão tris, EDTA e borato
Tf	transferrina
TfR	receptor de transferrina
UL	limite de ingestão máxima tolerável
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UTR	região não traduzida
-VA	deficiente em vitamina A
VCM	volume celular médio
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	Organização Mundial de Saúde, OMS

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química da vitamina A	4
Figura 2. Estrutura do <i>todo-trans</i> -retinol	4
Figura 3. Palmitato de retinil, o éster de retinil mais frequente nos animais	4
Figura 4. Esquema do 11- <i>cis</i> -retinal existente na retina e ligado à rodopsina	5
Figura 5. Isoformas mais comuns do ácido retinoico	5
Figura 6. Absorção do β -caroteno e do retinol pelos enterócitos	12
Figura 7. Ação nos tecidos extra-hepáticos e armazenamento no fígado da vitamina A adquirida na dieta	14
Figura 8. Anel de β -ionona de alguns dos carotenoides presentes na dieta	15
Figura 9. Absorção, metabolismo e transporte de carotenoides	17
Figura 10. Homeostase sistêmica de ferro	26
Figura 11. Esquema simplificado da absorção e exportação celular do ferro no enterócito	28
Figura 12. Recepção celular de ferro via transferrina – receptor de transferrina	32
Figura 13. Transporte de ferro no hepatócito	33
Figura 14. Modelo de regulação da expressão de hepcidina	38
Figura 15. Sistema regulador de ferro IRP/IRE	41
Figura 16. Concentração de retinol hepático dos grupos Controle e Deficiente em vitamina A (-VA)	57
Figura 17. Consumo diário de dieta dos animais dos grupos Controle e Deficiente em vitamina A (-VA), peso seco, após 15, 30 e 45 dias de tratamento	58
Figura 18. Ganho de peso dos animais dos grupos Controle e Deficiente em vitamina A (-VA) após 15, 30 e 45 dias de tratamento	59
Figura 19. Concentração de hemoglobina nos grupos Controle, Deficiente em vitamina A (-VA) e período basal (T_0)	60

Figura 20. Concentração de ferro no intestino (A), fígado (B) e baço (C) para os grupos Controle, Deficiente em vitamina A (-VA) e Linha de base (T ₀)	62
Figura 21. Efeito da deficiência de vitamina A nos níveis de mRNA do transportador de metal divalente do intestino de ratos, tratados com dieta Controle e Deficiente em vitamina A, por 0, 15, 30 e 45 dias	63
Figura 22. Efeito da deficiência de vitamina A nos níveis de mRNA de ferroportina do intestino de ratos, tratados com dieta Controle e Deficiente em vitamina A, por 0, 15, 30 e 45 dias	64
Figura 23. Mecanismo proposto para a diminuição de absorção de ferro induzida pela hepcidina	69

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Ingestão dietética de referência (DRI – <i>Dietary Reference Intakes</i>) para vitamina A	7
Tabela 2. Ingestão dietética de referência (DRI – <i>Dietary Reference Intakes</i>) para o mineral ferro	24
Tabela 3. Principais proteínas envolvidas na absorção, transporte, liberação e regulação do metabolismo de ferro, e suas funções	42
Tabela 4. Sistema da RT-PCR	51
Tabela 5. Sequências de oligonucleotídeos empregados na qRT-PCR e RT-PCR	52
Tabela 6. Sistema da qRT-PCR	53

RESUMO

Introdução: As deficiências de vitamina A e de ferro encontram-se entre as deficiências nutricionais de maior impacto sobre a Saúde Pública no Brasil e no mundo, atingindo, nos países em desenvolvimento, entre 140 a 250 milhões de adultos e cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo, respectivamente. Estudos têm evidenciado uma relação entre o *status* de vitamina A e de ferro, havendo um acúmulo de ferro em tecidos de animais deficientes em vitamina A. A ação hormonal da vitamina na regulação da expressão de vários genes tem sido amplamente divulgada, e é possível que o efeito da vitamina A sobre a homeostase do ferro seja mediada por essa ação hormonal. **Objetivo:** Avaliar o efeito da deficiência de vitamina A sobre a expressão gênica dos transportadores de ferro (DMT-1 e ferroportina) no enterócito e no *status* de ferro em ratos. **Metodologia:** Foram utilizados 35 ratos Wistar, separados em dois grupos: Controle e Deficiente em Vitamina A, que foram tratados com dieta padrão e dieta isenta de vitamina A, respectivamente, e sacrificados aos 0, 15, 30 e 45 dias de tratamento. Os parâmetros avaliados foram: ganho de peso, consumo de dieta, hemoglobina, retinol hepático, concentração de ferro no intestino, fígado e baço, e níveis de transcritos DMT-1 e ferroportina intestinais por qRT-PCR. **Resultados:** Os teores de retinol hepático do grupo Deficiente em vitamina A reduziram-se a níveis não detectáveis a partir dos 30 dias de tratamento; ao final do tratamento houve redução no consumo de dieta dos animais deficientes em vitamina A; os animais dos dois grupos apresentaram aumento de peso, porém redução do ganho de peso ao longo do tempo; os níveis de hemoglobina aumentaram durante a primeira quinzena, mantendo-se constantes até o final do tratamento; os ratos tratados com dieta deficiente em vitamina A apresentaram níveis de ferro intestinal e esplênico diferentes do grupo Controle aos 15 e 30 dias de tratamento; não foi observada alteração nos níveis de mRNA do DMT-1 e da ferroportina intestinais, nos ratos Deficientes em relação ao grupo Controle ao longo do experimento. **Conclusão:** Os resultados sugerem que a deficiência de vitamina A altera a homeostase de ferro no intestino e baço desses animais, não alterando os níveis de transcrito, mas em nível traducional e/ou pós-traducional, possivelmente mediado pela hepcidina. **Palavras-chave:** ferro, deficiência de vitamina A, DMT-1, ferroportina, PCR em tempo real, intestino, rato.

ABSTRACT

Introduction: Vitamin A and iron deficiencies are the major nutritional deficiencies in Brazil and in the world, with high impact on Public Health, affecting from 140 to 250 million people in developing countries (vitamin A deficiency) and around 2 billions people in the world (iron deficiency). Studies have shown a close relationship between vitamin A and iron status. A tissue iron accumulation has been reported among vitamin A deficient animals. The hormonal effect of vitamin A on the regulation of several genes expression has been widely reported, thus, the effect of vitamin A on the iron homeostasis could be mediated by its hormonal properties on the regulation of gene expression of proteins involved on iron metabolism. **Objective:** To evaluate the effect of vitamin A deficiency on the expression of iron transporters (DMT-1 and ferroportin) in the enterocyte, and on the iron status in rats. **Methodology:** 35 Wistar rats were separated into two groups: Control and Vitamin A Deficient, that were treated with standard diet and vitamin A free diet, respectively, and sacrificed at 0, 15, 30 and 45 days of treatment. The parameters evaluated were: weight gain, diet intake, haemoglobin, hepatic retinol, iron concentration in gut, liver and spleen, and intestinal mRNA expression of DMT-1 and ferroportin by real time PCR. **Results:** The hepatic retinol reduced to undetectable levels from 30 treatment days on, in the Vitamin A Deficient group; the vitamin A Deficient animals showed a reduction of diet intake at the end of the treatment period; both groups increase body weight, however, weight gain rates decreased during the treatment; the levels of haemoglobin increased during the first 15 days, and kept constant until the end of the treatment period; vitamin A Deficient rats presented different gut and spleen iron levels compared to the Control group; it was not observed alterations in mRNA levels of intestinal DMT-1 and ferroportin when comparing Control and Vitamin A Deficient groups along the experiment. **Conclusion:** These results suggest that vitamin A deficiency modifies the iron homeostasis in gut and spleen of rats, not at the transcriptional level, but at translational and/or post-translation level, possibly mediated by hepcidin. **Keywords:** iron, vitamin A deficiency, DMT-1, ferroportin, real time PCR, gut, rat.

1. INTRODUÇÃO

As deficiências de vitamina A e de ferro encontram-se entre as deficiências nutricionais de maior impacto sobre a Saúde Pública no Brasil e no mundo. Estima-se que, nos países em desenvolvimento, a deficiência de vitamina A atinja entre 140 a 250 milhões de indivíduos, muitos dos quais apresentando deficiência subclínica, sendo que, desse total, cerca de 43 milhões são crianças menores de cinco anos de idade (WHO, 1996). Em relação à deficiência de ferro, as estimativas são de que cerca de 2 bilhões de pessoas sejam afetadas em todo o mundo (Shils *et al.*, 2003).

Estudos publicados nas duas últimas décadas têm evidenciado uma estreita relação entre os *stati* de vitamina A e de ferro no organismo humano, em que a deficiência de vitamina A prejudicaria o metabolismo de ferro (Jang *et al.*, 2000). Embora o mecanismo desse efeito ainda não seja claro, estudos em crianças deficientes em ferro e vitamina A revelaram que a suplementação com vitamina A promove a mobilização de ferro dos estoques existentes e aumenta a produção de eritropoietina (EPO), hormônio estimulador da eritropoiese (Zimmerman *et al.*, 2006).

Baseando-se em estudos com modelos animais, ainda não se chegou a um consenso quanto à ocorrência de anemia induzida por deficiência de vitamina A, entretanto os estudos evidenciam um acúmulo de ferro em tecidos de animais vitamina A-deficientes (Arruda *et al.*, 2004).

O ferro constitui o quarto elemento químico mais abundante na crosta terrestre. Paradoxalmente, a deficiência de ferro constitui um dos maiores problemas de Saúde Pública no mundo. O ferro é necessário em vários mecanismos e processos vitais nos seres vivos, incluindo o homem, entretanto, sua absorção 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. A maior parte do ferro corporal está ligada: à hemoglobina no sangue, e em menor quantidade, à mioglobina nos músculos; às enzimas; e aos citocromos e proteínas com centro ferro-enxofre (Fe-S) envolvidas nas transferências de elétrons na cadeia respiratória. O ferro não é excretado na urina, sendo, em grande parte, reaproveitado e, por isso, a necessidade individual de ferro deve ser suficiente para repor apenas as perdas diárias do organismo (1 mg/d) (Shils *et al.*, 2003;

Ponka, 2000).

Por ser um metal de transição catalisador de reações geradores de espécies reativas de oxigênio (EROs), via reação de Fenton, uma sobrecarga de ferro é extremamente danosa às células (Crichton *et al.*, 2002), resultando em danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Arruda e colaboradores (2004) observaram que ratos submetidos à deficiência de vitamina A apresentavam aumento nos níveis de oxidação de lipídios e proteínas no fígado e coração. Os autores sugeriram que o acúmulo de ferro na deficiência de vitamina A pode ser responsável pelo aumento do estresse oxidativo observado nos animais deficientes em vitamina A.

Portanto, além dos efeitos ocasionados diretamente pela deficiência de vitamina A, como baixa imunidade, xerofthalmia e outros, a hipovitaminose A pode estar envolvida indiretamente na etiologia de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, entre outros processos patológicos, devido à produção de radicais livres catalisados pelo ferro (Bozho e Conner, 2004; Kruszewski, 2003; Crichton *et al.*, 2002).

A ação hormonal da vitamina A, na forma de ácido retinoico, responsável pela regulação da expressão de vários genes, tem sido amplamente descrita (McClintick *et al.*, 2006) e, considerando-se a relação sinérgica entre a vitamina A e o metabolismo de ferro, é possível que o efeito da vitamina A sobre a homeostase deste metal seja mediada por essa ação hormonal. O ácido retinoico poderia regular a absorção e exportação de ferro nos tecidos diretamente por meio da regulação da síntese das proteínas DMT-1 e ferroportina, ou indiretamente, regulando a expressão de hepcidina no fígado, hormônio que regula a absorção e exportação endógena de ferro no organismo (Oates, 2007).

A investigação de possíveis mecanismos moleculares de interação da vitamina A na homeostase do ferro em animais se faz necessária, devido ao papel fundamental desses dois nutrientes no metabolismo e no estado nutricional e fisiológico dos indivíduos, bem como a importância em Saúde Pública que ambos representam em praticamente todos os países, desenvolvidos e em desenvolvimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vitamina A

Vitamina A é uma vitamina lipossolúvel que pode ser obtida da dieta como vitamina A pré-formada (retinal) e de alguns pigmentos, os carotenoides, que podem ser clivados pelo organismo, originando retinol (Underwood, 2004).

A vitamina A pré-formada ocorre naturalmente apenas em animais e as fontes dietéticas mais ricas são fígado, óleo de peixes, gema de ovo e laticínios. Os carotenoides pró-vitamina A são obtidos de alimentos como tubérculos, hortaliças e frutas diversas, como a abóbora, a cenoura, o espinafre, a manga e o mamão (Giugliani e Victora, 2000).

Algumas das formas de utilização destes vegetais fontes de carotenoides é a ingestão *in natura*, a manufatura de sucos, óleos e doces. Exemplos de utilizações destas fontes carotogênicas no Brasil são: o óleo de dendê (Campos e Rosado, 2005) e o doce de buriti, que teve sua utilização sugerida como forma de se combater a deficiência de vitamina A em pré-escolares no Nordeste Brasileiro (Mariath *et al.*, 1989).

Estima-se que, em países desenvolvidos, 25 a 35% da vitamina A dietética seja proveniente dos carotenoides (Van den Broek, 2003). Nas Américas, segundo a OMS (WHO, 1995), cerca de 60% da vitamina A obtida na alimentação é originada de carotenoides pró-vitamínicos A.

Embora o termo vitamina A possa ser utilizado para se referir a um composto químico específico, como o retinol ou seus ésteres, ele é mais empregado para designar a família dos retinoides, ou seja, para denominar compostos lipossolúveis que contenham um anel de β -ionona e uma cadeia de hidrocarboneto, com saturações alternadas, ligada a um grupo funcional que exibam as propriedades biológicas do retinol (Figura 1) (Souza e Villas Boas, 2002; Musib, 2000). Assim, o termo vitamina A inclui o éster de retinil, o retinol, o retinal e o ácido retinoico em suas diversas isoformas. A variação de um retinoide para outro está em suas diferentes formas de oxidação do grupo funcional.



Figura 1. Estrutura química da vitamina A. Adaptado de Musib, 2000.

O retinol é a forma alcoólica da vitamina A, possuindo o grupo hidroxila (OH) ligado ao carbono 15 (Figura 2). Ele é a principal forma de transporte da vitamina A pelo plasma.

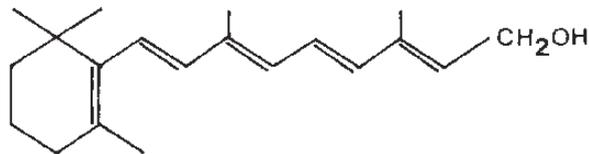


Figura 2. Estrutura do todo-*trans*-retinol. Adaptado de Senoo, 2004.

Os ésteres de retinil são as formas ésteres da vitamina A (Figura 3) resultante da reação do retinol com ácidos graxos. É a principal forma presente em alimentos de origem animal. Os ésteres de retinil são armazenados juntamente com os lipídios. As isoformas mais comuns são palmitato de retinil, esteroato de retinil, oleato de retinil e linoleato de retinil (Piantedosi *et al.*, 2005).

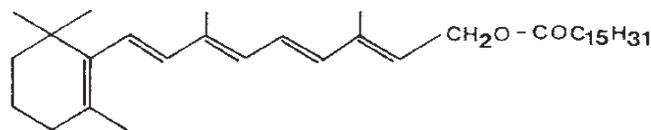


Figura 3. Palmitato de retinil, o éster de retinil mais frequente nos animais. Adaptado de Senoo, 2004.

O retinal (Figura 4) é fundamental no processo visual dos vertebrados, ligando-se à opsina, e formando a rodopsina, que é a proteína responsável pela captação da energia luminosa e está presente nos bastonetes da retina.

No processo de captação da imagem, quando a molécula de rodopsina é excitada por luz visível, o 11-*cis*-retinal sofre uma série de reações fotoquímicas que o convertem em todo-*trans*-retinal, forçando uma mudança na forma estrutural da rodopsina. A rodopsina ativada por essa mudança estrutural na molécula do retinal leva à geração de uma diferença de potencial, que é transmitida ao cérebro pelos neurônios do globo ocular e é a base da transdução visual (Nelson e Cox, 2000).

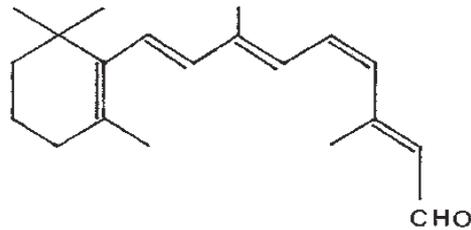


Figura 4. Esquema do 11-*cis*-retinal existente na retina e ligado à rodopsina. Adaptado de Senoo, 2004.

O ácido retinoico possui em sua estrutura o grupo COOH ligado ao carbono 15 e inclui várias isoformas como o todo-*trans*-ácido retinoico, o 13-*cis*-ácido retinoico e o 9-*cis*-ácido retinoico (Figura 5).

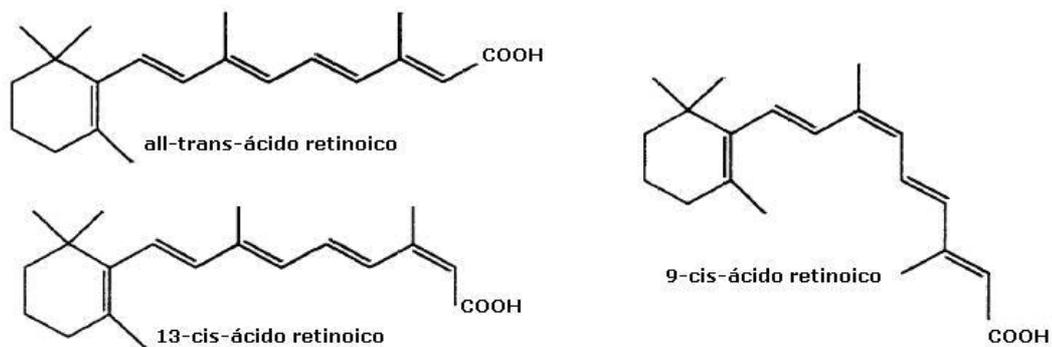


Figura 5. Isoformas mais comuns do ácido retinoico. Adaptado de Musib, 2000.

A vitamina A, em suas várias formas, desempenha três funções principais: proliferação e diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e ciclo visual. As duas primeiras funções são desempenhadas apenas pelo ácido retinoico, enquanto que apenas a forma retinal atua no processo da visão (Morriss-Kay e Sokolova, 1996; Vieira, 1995; De Luca, 1991; Blomhoff *et al.*, 1990). Um papel anti-infeccioso também foi proposto para a vitamina A, pois as

infecções estão associadas com diminuição dos níveis de ferro sérico, eritropoiese suprimida e menores concentrações de hemoglobina, que ocorrem na deficiência de vitamina A (Van den Broek, 2003).

Normalmente, a avaliação do *status* de vitamina A é feito pela dosagem do retinol sérico. Entretanto, o retinol no soro sanguíneo sofre um controle homeostático rígido, não sendo, portanto, um bom indicador do *status* nutricional individual de vitamina A. Atualmente, têm-se utilizado testes de dose-resposta para avaliar os estoques vitamina A no fígado, sendo um método mais acurado (Van den Broek, 2003).

Acredita-se que a vitamina A seja essencial na embriogênese, hematopoiese, crescimento e diferenciação epitelial. Durante a gestação, quantidades extras de vitamina A são necessárias para o crescimento e manutenção tecidual do feto, para abastecê-lo de reservas e para o metabolismo da mãe. A vitamina A é essencial para a hematopoiese. Há relatos na literatura que uma dieta desprovida de vitamina A resulta em decréscimo dos níveis de hemoglobina (Allen *et al.*, 2009).

2.1.1. Recomendação de vitamina A

A recomendação individual de vitamina A varia de acordo com a idade, o sexo e o momento fisiológico do indivíduo, como indicado na Tabela 1.

Tabela 1. Ingestão dietética de referência (DRI – *Dietary Reference Intakes*) para vitamina A. Adaptado de NAS, 2001.

Faixa etária	Ingestão diária recomendada¹ (µg/d)[#]	Limite máximo tolerável² (µg/d)[#]
Crianças		
0-6 meses	400 ³	600
7-12 meses	500 ³	600
1-3 anos	300	600
4-8 anos	400	900
Homens		
9-13 anos	600	1700
14-18 anos	900	2800
> 13 anos	900	3000
Mulheres		
9-13 anos	600	1700
14-18 anos	700	2800
> 13 anos	700	3000
Gestantes		
≤ 18 anos	750	2800
>19 anos	770	3000
Lactantes		
≤ 18 anos	1200	2800
>19 anos	1300	3000

¹- RDA, *Recommended Dietary Allowances*

²- UL, *Tolerable Upper Intake Levels*

³- AI, *Adequate Intake*, recomendação quando não há RDA determinada

[#]- Incluem carotenoides pró-vitamina A que são precursores de retinol. Valores expressos como equivalente de atividade de retinol (RAE) = 1 µg de retinol = 12 µg de β-caroteno = 24 µg dos demais carotenoides pró-vitamina A.

2.1.2. Deficiência de vitamina A

A deficiência de vitamina A é um problema de Saúde Pública que tem se destacado no panorama mundial. A OMS inclui esta deficiência, juntamente com a anemia, como um dos fatores que oferecem maiores riscos à saúde humana (Bloem, 1995).

Os principais grupos de risco da deficiência de vitamina A são as crianças com idade menor que cinco anos (WHO, 1996; Stoltzfus e Underwood, 1995), gestantes e lactantes (WHO, 1996).

Segundo o Sistema de Informações de Deficiência de Micronutrientes (*Micronutrient Deficiency Information System*) da OMS (WHO, 1995), cerca de 251 milhões de pessoas em todo mundo, apresentavam deficiências severas ou moderadas desta vitamina ainda em estágio subclínico (WHO, 1996), ou seja, quando a deficiência só pode ser detectada por meio de testes bioquímicos, mas que pode trazer graves problemas à saúde, promovendo o aumento da morbidade e mortalidade (Kabat *et al.*, 2009; Sommer *et al.*, 1984).

Em casos de deficiência de vitamina A marginal, as demandas extras geradas pela gestação podem resultar em um quadro sintomático de deficiência de vitamina A, como a manifestação da cegueira noturna. Durante a gestação, como um resultado das mudanças fisiológicas que causam altas demandas nutricionais, os níveis de retinol sérico caem a valores inferiores às concentrações de não-gestantes (Van den Broek, 2003). Entre gestantes, cerca de 5% sofrem de cegueira noturna durante a gravidez (WHO, 2002).

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 250 milhões de crianças em idade pré-escolar são deficientes em vitamina A e que entre 250 mil e 500 mil crianças se tornam cegas por deficiência de vitamina A anualmente, metade das quais morrem em até 12 meses após a perda da visão (WHO, 2009).

Devido ao tamanho e diversidade da população brasileira, a dimensão deste problema é pouco conhecida no Brasil e são poucas as informações disponíveis na literatura sobre óbito e incapacitações causadas pela falta de vitamina A. No Brasil, as áreas consideradas endêmicas para deficiência de vitamina A são a região Nordeste e o Vale do Jequitinhonha-MG, onde é feito um programa de suplementação infantil com megadoses de vitamina A (Souza e Vilas Boas, 2002; Ferraz *et al.*, 2000).

Contudo, até a data atual, não existe um sistema nacional de vigilância epidemiológica sobre a hipovitaminose A e a xeroftalmia, logo, não é possível avaliar o impacto das medidas de prevenção pelo Programa Nacional de Controle da Deficiência de Vitamina A no Brasil (Martins *et al.*, 2007a; Martins *et al.*, 2007b). Há apenas, alguns estudos regionais antigos, feitos principalmente na região Nordeste, como na Paraíba em 1982 e outros estados da região em 1976 (Martins *et al.*, 2007a; Simmons, 1976)

As principais enfermidades causadas pela hipovitaminose A estão associadas à visão. A cegueira noturna, causada pela diminuição da rodopsina nos bastonetes da retina, é uma delas, assim como as doenças ligadas à queratinização da conjuntiva e da córnea, como a ceratomalácea (Tanumihardjo, 2004), que consiste na cegueira irreversível 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 (Vauclair *et al.*, 2007).

Até o final da década de 70 a deficiência de vitamina A era unicamente associada a sintomas ou sinais clínicos como a descamação da pele e a doenças associadas à visão. No entanto, Souza e Vilas Boas (2002) demonstraram, em um trabalho realizado com 4600 crianças, uma relação entre o aumento na incidência de doenças respiratórias e diarreia naqueles que apresentavam doenças oculares.

A deficiência de vitamina A pode ser causada principalmente por um longo período de ingestão inadequada de vitamina A, comprometendo algumas funções fisiológicas, ainda que os sinais de carência não sejam evidentes (Morriss-Kay e Sokolova, 1996) e é uma doença comum em diversos países em desenvolvimento.

Os números de pessoas em risco para deficiência de vitamina A são frequentemente estimativas e aproximações, contudo, sabe-se que é um problema de Saúde Pública em grande parte da África, no Sul e no Sudeste Asiático, e em algumas áreas da América Latina e do Pacífico Ocidental (Van den Broek, 2003).

Os principais sinais da deficiência de vitamina A são: perda de apetite, retardo no crescimento, alterações nervosas, alterações na pele,

queratinização do tecido epitelial, aumento no risco de infecções, cegueira noturna, xerofthalmia, malformação fetal, nefrite, cegueira e morte (Darlow e Graham, 2000; Ball, 1998; Scrimshaw *et al.*, 1998; Coelho e Ramalho, 1995).

A prevenção da deficiência de vitamina A pode ser feita por meio da suplementação medicamentosa, da fortificação de alimentos ou pela diversificação da dieta. O fato da vitamina A ser armazenada no fígado permite que a suplementação com hiperdoses em cápsulas seja eficaz na prevenção e combate da hipovitaminose A.

No entanto, apesar do custo com a suplementação ser reduzido em relação à fortificação de alimentos, essa é uma medida de curto prazo. Assim, fortificação de alimentos tem sido utilizada com sucesso em áreas onde a vitamina A é escassa, como no caso da fortificação do açúcar, na Guatemala (Mejia e Arroyave, 1982) e do glutamato de sódio, na Indonésia (Semba *et al.*, 1992).

A obtenção da vitamina A sintética possibilitou a fortificação de alimentos e a disponibilidade de suplementos em países em desenvolvimento, resultando em uma redução significativa da deficiência nestes países, onde, no entanto, a deficiência de vitamina A continua sendo um problema de Saúde Pública. Atualmente, a OMS recomenda suplementação rotineira de vitamina A durante a gestação e lactação em áreas endêmicas de deficiência de vitamina A (onde há ocorrência de cegueira noturna) (WHO, 2009).

2.1.3. Excesso de vitamina A

O excesso de vitamina A em humanos é uma condição mais rara do que a deficiência e geralmente ocorre em situações de suplementação constante com megadoses de vitamina A. Seus efeitos estão relacionados à sua hepatotoxicidade e desregulação do controle da divisão e proliferação celular realizados pela vitamina A (Shils *et al.*, 2003).

Tem-se sugerido que uma alta incidência de malformação fetal esteja relacionada com alta ingestão de vitamina A, acima de 10000 UI/dia (Van den Broek, 2003).

2.1.4. Metabolismo da vitamina A

2.1.4.1. Absorção

A digestão e absorção de vitamina A estão intimamente relacionadas com a quantidade de lipídios na dieta, que interfere na biodisponibilidade, tanto da vitamina A como dos carotenoides pró-vitamínicos A (Van den Broek, 2003).

Biodisponibilidade é definida como a proporção do nutriente nos alimentos que é efetivamente absorvida e assim se tornam disponíveis para serem utilizados em funções fisiológicas ou armazenados no organismo. Esse conceito engloba o processo de assimilação, transporte e conversão de um nutriente em suas formas biologicamente ativas (Krebs, 2001; Castanmiller *et al.*, 1999; Cozzolino, 1997).

A absorção da vitamina A e dos carotenoides ocorre por difusão passiva, por ser determinada pelo gradiente de concentração entre as micelas advindas da alimentação e a membrana plasmática, da mesma forma e juntamente com a absorção do colesterol e de produtos da lipase de triglicerídeos (Parker, 1996). Desta forma, quanto maior a concentração de gordura ingerida com a vitamina A, maior será sua capacidade de ser absorvida pelo intestino.

A vitamina A presente no leite materno, por exemplo, é altamente biodisponível por estar associada à gordura do leite. Assim, existe uma alta correlação entre o que a mãe secreta de vitamina A no leite materno e o que a criança absorve (Fustinoni, 2008).

Uma vez dentro do enterócito, o retinol associa-se à proteína celular ligante de retinol 2 (CRBP 2 - *cellular retinol binding protein 2*), sendo então esterificado a éster de retinil pelas enzimas LRAT (lecitina: retinol-acil-transferase) e ARAT (acil coenzima A: retinol-acil-transferase), e incorporado aos quilomícrons (Piantedosi *et al.*, 2005; Senoo, 2004).

Os carotenoides pró-vitamina A, como β -caroteno, α -caroteno e a criptoxantina, são clivados na mucosa intestinal a retinal, pela enzima β -caroteno-15,15'-oxigenase, reduzidos a retinol e depois transformados a éster de retinil (Underwood, 2004; Yeum e Russell, 2002; Parker, 1996).

2.1.4.2. Transporte

Ésteres de retinil recém esterificados, alguns carotenoides intactos e aqueles convertidos a éster de retinil são incorporados aos quilomícrons, os quais são exocitados no sistema linfático (Yeum e Russell, 2002; Parker, 1996).

Os quilomícrons são agregados lipoproteicos recobertos por fosfolipídios, que são capazes de circular pela corrente sanguínea, sendo formados por triacilgliceróis, colesterol, apolipoproteínas, ésteres de colesterol e outras moléculas lipossolúveis oriundas da digestão (Hultin e Olivecrona, 1998).

Os quilomícrons saem do enterócito para o meio extracelular e, por meio do sistema linfático, chegam à circulação sanguínea, onde sofrem remoção de triacilgliceróis. Os ésteres de retinil presentes nos quilomícrons remanescentes são absorvidos pelo fígado e armazenados nas células estreladas (Figura 6) (Underwood, 2004; Shils *et al.*, 2003; Yeum e Russell, 2002; Parker, 1996).

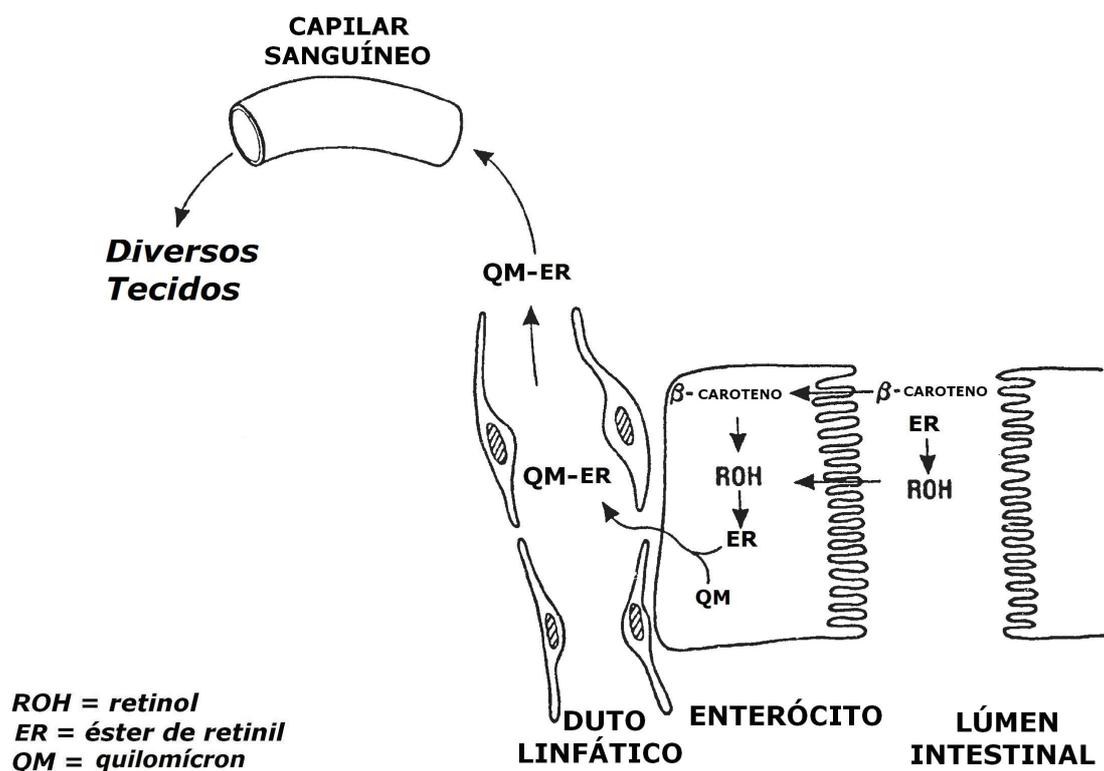


Figura 6. Absorção do β -caroteno e do retinol pelos enterócitos. O β -caroteno absorvido pode ser clivado a retinol. O retinol é esterificado a éster de retinil, sendo incorporado aos quilomícrons e transportado por meio da corrente sanguínea para os diversos tecidos do organismo. Adaptado de Senoo, 2004.

Quando há demanda de vitamina A nos tecidos, os ésteres de retinil são convertidos a retinol nas células parenquimais do fígado e transferidos para uma proteína ligante de retinol (RBP) no plasma, através da qual são transportados para os tecidos. Após captação pelos tecidos alvos, o retinol pode ser oxidado a retinal e, subsequentemente, à sua forma mais ativa, o ácido retinoico (Underwood, 2004; Yeum e Russell, 2002; Parker, 1996).

2.1.4.3. Armazenamento

Na corrente sanguínea os quilomícrons sofrem ação das lipases lipoproteicas (LPL - *lipoprotein lipase*), localizadas na membrana dos endotélios que irrigam os tecidos adiposo, cardíaco, muscular e glândulas, permitindo a liberação de ácidos graxos, carotenoides e dos retinoides livres para estes tecidos (Nelson e Cox, 2000).

Os carotenoides provenientes dos quilomícrons são armazenados em todos os tecidos do corpo, mas estão presentes principalmente no fígado e no tecido adiposo, sendo responsável por sua coloração amarelada (Shils *et al.*, 2003).

Após sofrerem ação da lipase lipoproteica, os quilomícrons resultantes são denominados quilomícrons remanescentes e são pobres em triacilglicerídeos, mas ainda contém colesterol, apolipoproteínas e alguns ésteres de retinil. Ao chegarem ao fígado, os quilomícrons remanescentes liberam os ésteres de retinil restantes, os quais são incorporados às células parenquimais hepáticas.

Nas células parenquimais os ésteres de retinil se ligam principalmente a CRBP 2, onde, pela ação da LRAT, são oxidados a retinol (Figura 7) (Senoo, 2004). As células parenquimais sintetizam a proteína ligante de retinol (RBP - *retinol binding protein*), responsável por transportar o retinol no plasma e para as células estreladas, onde é novamente convertido a éster de retinil, sendo então armazenado (Senoo, 2004; Vogel *et al.*, 2002).

A RBP tem um papel fundamental no controle da vitamina A no organismo, por ser responsável pela mobilização da vitamina A dos órgãos-estoque (Tsutsumi *et al.*, 1992).

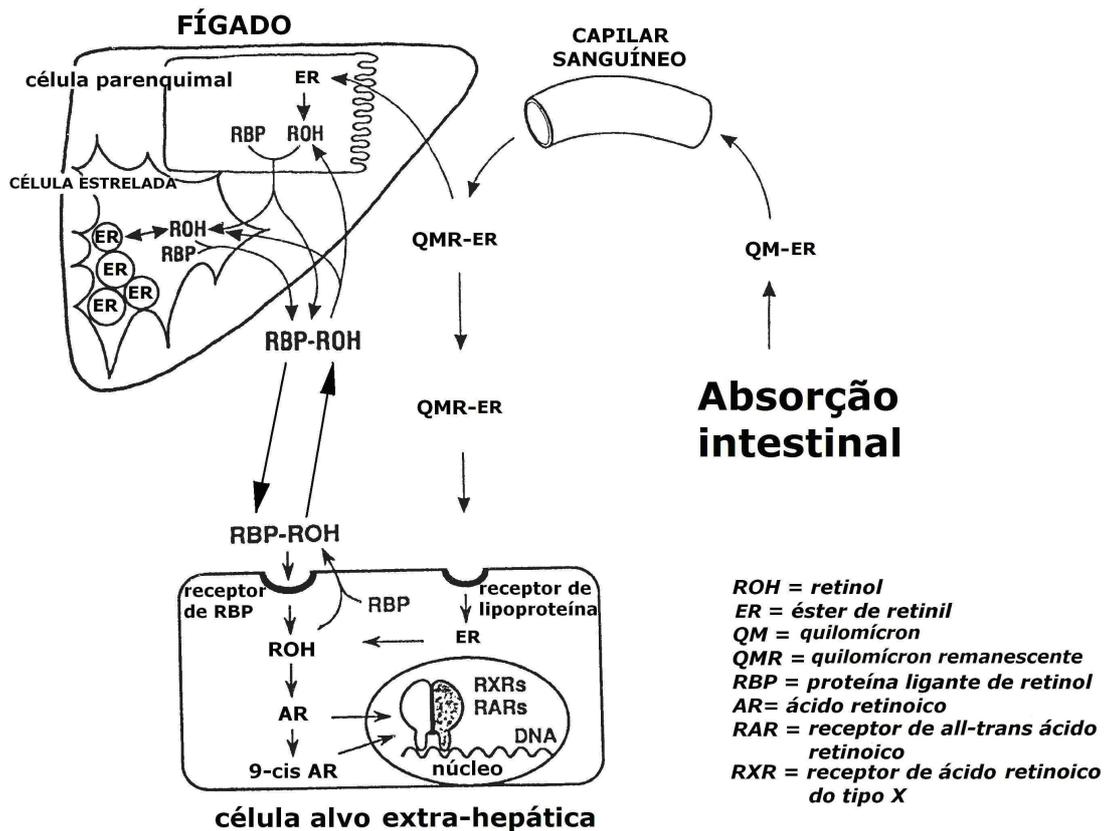


Figura 7. Ação nos tecidos extra-hepáticos e armazenamento no fígado da vitamina A adquirida na dieta. A vitamina A atua principalmente como um hormônio nuclear, na forma de ácido retinoico. No fígado a vitamina A é estocada no interior das células estreladas na forma de éster de retinil, até que seja transportada ao restante do organismo ligada a proteína ligante de retinol (RBP) como retinol. Adaptado de Senoo, 2004.

A concentração de retinol-RBP plasmática permanece relativamente constante até que o fígado esteja praticamente depletado (Davila *et al.*, 1985).

2.1.5. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais que conferem diferentes cores, do amarelo ao vermelho, sendo empregados como corantes naturais ou idênticos aos naturais em alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Possuem um grupo cromóforo em sua molécula, ocorrendo tanto em plantas fotossintéticas como em tecidos animais (Penteado, 2003; Yeum e Russell, 2002; Olson, 1999).

Cerca de 600 carotenoides já foram isolados e caracterizados na natureza, entretanto apenas cerca de 10% podem ser metabolizados e

convertidos a vitamina A nos animais. Tanto carotenoides pró- como não pró-vitamínicos A estão presentes no sangue e tecidos humanos, com diferentes funções, como sequestradores de radicais livres, imunomodulação, redução do risco de doenças cardíacas e cânceres específicos, comunicação célula-célula, diferenciação celular, proteção do tecido ocular e reprodução (Shils *et al.*, 2003; Yeum e Russell, 2002; Olson, 1999).

A principal importância nutricional dos carotenoides se deve ao fato de que alguns possuem atividade pró-vitamínica A, sendo responsável por 68% da vitamina A da dieta na população mundial e chegando a 82% da vitamina A dietética nos países em desenvolvimento. Estratégias de Saúde Pública que promovem um aumento na ingestão de frutas e hortaliças ricas em carotenoides são consideradas como sendo a solução mais adequada para diminuir a incidência de deficiência de vitamina A (Penteado, 2003; Rock *et al.*, 1998).

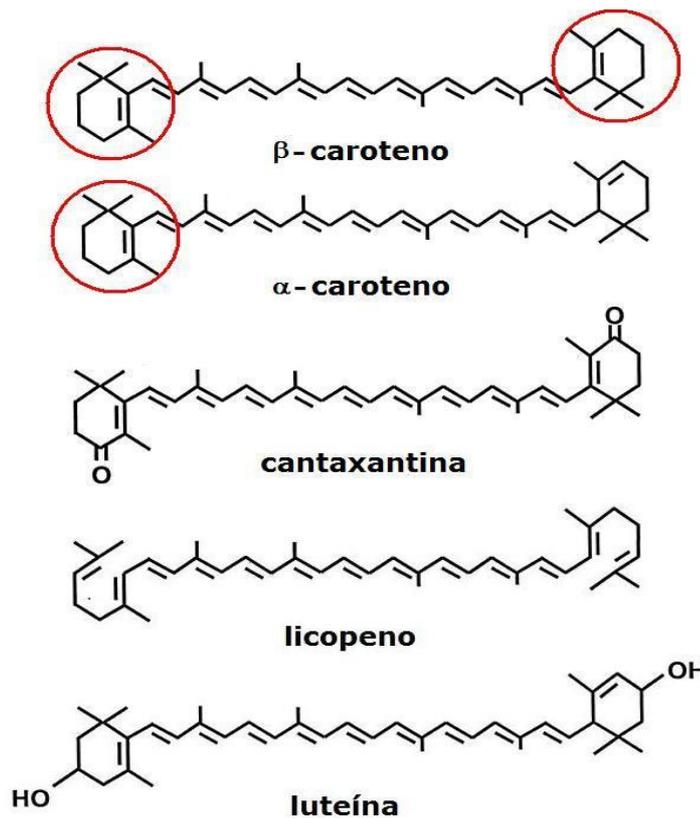


Figura 8. Anel de β -ionona (circulados) de alguns dos carotenoides presentes na dieta. Adaptado de Palace *et al.*, 1999.

Quimicamente os carotenoides se caracterizam como estruturas alifáticas-acíclicas, poli-isoprênicas, apresentando um amplo sistema de duplas ligações conjugadas, contendo geralmente 40 átomos de carbono, com simetria interna. A atividade pró-vitáminica de um carotenoide depende da presença do anel de β -ionona não hidroxilado em sua estrutura (Figura 8) (Shils *et al.*, 2003; Penteado, 2003).

Em animais, os carotenoides pró-vitáminicos A ingeridos na dieta podem ser armazenados em sua forma original, convertidos em vitamina A ou serem degradados pelos radicais livres, agindo como antioxidantes (Olson, 1999; Palace *et al.*, 1999; Stahl e Sies, 1996).

Após serem ingeridos, os carotenoides passam por um processo de absorção e metabolismo semelhante ao da vitamina A, sendo liberados da matriz do alimento, incorporados nas micelas, absorvidos no intestino delgado – principalmente no duodeno – via difusão passiva, passando a compor o quilomícron rico em triacilglicerol (Yeum e Russell, 2002; Parker, 1996).

Deve-se salientar que nem todo o carotenoide presente nos alimentos é absorvido e utilizado pelo organismo. Existem vários fatores dietéticos que influenciam na biodisponibilidade dos carotenoides dietéticos, entre estes estão: a composição da matriz alimentar, os tipos de carotenoide presentes na dieta, o processamento do alimento, a mastigação, a ingestão concomitante de lipídios e a ingestão concomitante de fibras (Van het Hof *et al.*, 2000).

Carotenoides pró-vitamina A, como β -caroteno, α -caroteno e criptoxantina, são parcialmente convertidos a vitamina A, na forma de éster de retinil, na mucosa intestinal, sendo então incorporados no quilomícron, secretados na linfa para distribuição pela circulação sanguínea, de onde são removidos para os outros tecidos. Carotenoides não pró-vitamina A, como a luteína, zeaxantina e o licopeno, são absorvidos intactos e incorporados diretamente no quilomícron (Parker, 1996).

Os carotenoides podem ser convertidos a vitamina A no fígado, onde são armazenados, e, em menor proporção, no intestino, em humanos. Alguns animais, como os ratos, no entanto, convertem totalmente os carotenoides em vitamina A no intestino (Van den Broek, 2003).

O quilomícron remanescente é absorvido pelo fígado, que secreta os carotenoides associados com a lipoproteína de densidade muito baixa (*very*

low density lipoprotein – VLDL). Em situações de jejum, contudo, a maior parte do carotenoide plasmático está associada à lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein* – LDL) e lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein* – HDL) (Figura 9) (Penteado, 2003; Yeum e Russell, 2002).

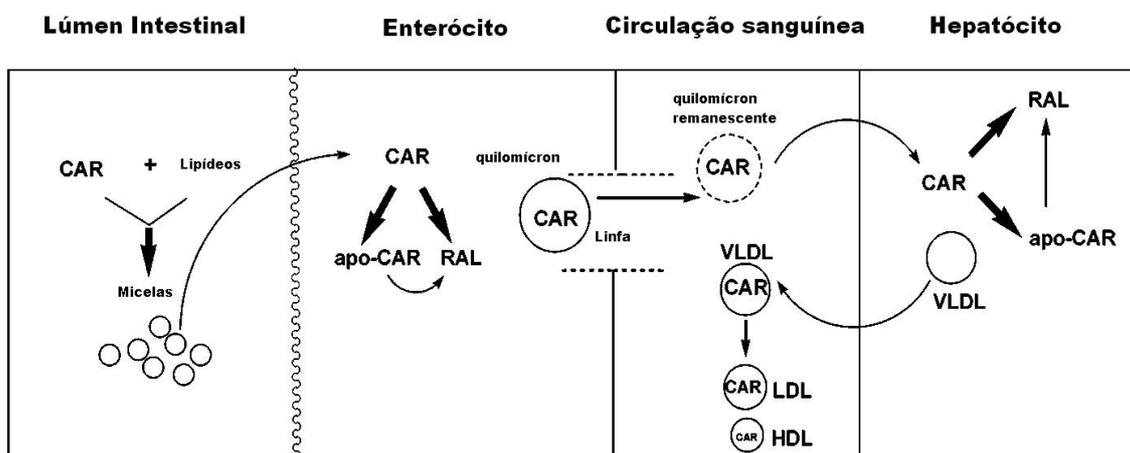


Figura 9. Absorção, metabolismo e transporte de carotenoides. CAR, carotenoides; apo-CAR, apocarotenoides; RAL, retinal; VLDL, *very low density lipoprotein*; LDL, *low density lipoprotein*; HDL, *high density lipoprotein*. Adaptado de Yeum e Russell, 2002.

O β -caroteno e, presumivelmente, os outros carotenoides pró-vitamina A podem sofrer clivagem oxidativa no intestino ou em outros órgãos, como o fígado (Yeum e Russell, 2002). A clivagem central do β -caroteno catalisada pela enzima β -caroteno 15,15'-oxigenase origina duas moléculas de retinaldeído (retinal). Os carotenoides podem também sofrer clivagem assimétrica por ação de outra enzima, diferente da β -caroteno-15,15'-oxigenase, ou por ação de radicais livres produzidos por enzimas como a lipoxigenase. A clivagem central ou randômica do carotenoide depende da presença de antioxidantes no intestino de ratos. (Yeum e Russell, 2002).

Apesar de não haver recomendações dietéticas para carotenoides, o Comitê de Ingestão de Referência Dietética (*Dietary Reference Intake Committee*) divulgou os fatores de conversão de carotenos em vitamina A: 12 μg de β -caroteno ou 24 μg de outros carotenoides pró-vitamina A originam 1 μg de retinol equivalente (Campos e Rosado, 2005; FNB/IOM, 2000).

Entre as principais fontes dietéticas de carotenoides estão: damasco seco, beterraba, cenoura, abóbora, caqui e manga (β - e α -caroteno), brócolis,

couve e espinafre (luteína e zeaxantina), laranja e mamão (criptoxantina) e tomate (licopeno) (Shils *et al.*, 2003).

2.1.6. Vitamina A e gene

Os ácidos retinoicos são responsáveis por ativarem duas famílias de receptores hormonais nucleares, a família de receptores do todo-*trans*-ácido retinoico (RAR) e a família de receptores de ácido retinoico do tipo X (RXR). O todo-*trans*-ácido retinoico é capaz de se ligar com alta afinidade ao RAR dos tipos α , β e γ , enquanto o 9-*cis*-ácido retinoico se liga com alta afinidade aos RXR α , β e γ (Ross, 2003).

Quando associadas a um ácido retinoico, estas proteínas interagem entre si, formando dímeros como RAR/RXR ou RXR/RXR. Estes dímeros são capazes de se ligar a algumas regiões específicas do DNA chamadas de Elementos Responsivos de Retinoides (“RARE” ou “RXRE”) (Blomhoff *et al.*, 1990) localizadas na região 5’ do gene, regulando, desta forma, sua expressão (Ross, 2003).

O ácido retinoico é um potente hormônio que atua na expressão de centenas de genes (Mitro *et al.*, 2007; Ross, 2004; Vogel *et al.*, 2002), como nos responsáveis pela síntese da álcool desidrogenase e da transglutaminase, proteínas transportadoras de retinol, matriz extracelular (laminina), além de genes diretamente envolvidos na diferenciação celular e na inibição da proliferação celular (Vauclair *et al.*, 2007; Shils *et al.*, 2003), podendo estar, também, envolvido na regulação do metabolismo de ferro (Arruda *et al.*, 2009).

2.2. Ferro

2.2.1. Importância do ferro

O ferro é um elemento químico, de número atômico 26 e massa atômica 56. Embora seja um dos metais mais abundantes na Terra (constituindo, inclusive, o núcleo do planeta) e no Universo, quase todo ferro no ambiente é insolúvel, existindo sob a forma de óxidos de ferro e ferro metálico, restando pouco para as necessidades biológicas (Shils *et al.*, 2003).

Mais do que qualquer outro metal, o ferro é um elemento-chave no metabolismo de todos os organismos vivos, sendo necessário em passos essenciais do processo de fotossíntese, no ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa do metabolismo energético, na síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico), faz parte do grupo heme, que é o local ativo de transporte de elétrons nos citocromos e na captação de oxigênio, e protege as enzimas fixadoras de nitrogênio da inativação oxidativa nas raízes de leguminosas (Dunn *et al.*, 2006; Shils *et al.*, 2003).

Por ser essencial em diversos processos fisiológicos, relativamente indisponível, apesar de abundante, os organismos vivos guardam o tesouro de ferro como se ele fosse um elemento-traço, sendo chamado por Fairbanks (2003) de “metal da vida”.

Naturalmente o ferro existe em estados oxidativos que variam de -2 a +6, entretanto, em sistemas biológicos ocorrem, majoritariamente, nos estados +2, +3 e +4, anteriormente chamados de ferro ferroso, férrico e ferril, respectivamente. A interconversão dos estados de oxidação do ferro é o mecanismo pelo qual ele participa na transferência de elétrons e em ligações reversíveis com outros compostos; características que o torna tão essencial aos organismos vivos (NAS/IOM, 2001).

2.2.2. Deficiência de ferro

Apesar de ser o quarto elemento mais abundante no planeta, a deficiência de ferro é amplamente prevalente em humanos, afetando todos os grupos étnicos, sem exceção. A deficiência de ferro afeta cerca de 40% da população mundial (cerca de 2 bilhões de pessoas), colocando-se como o segundo maior problema nutricional no mundo, atrás apenas da fome (Arredondo *et al.*, 2006; Shils *et al.*, 2003).

A prevalência mundial de anemia por deficiência de ferro, ou anemia ferropriva, é de aproximadamente 15%, sendo de cerca de 50% da população em países em desenvolvimento e 10% em países desenvolvidos (Denic e Agarwal, 2007).

No Brasil não se dispõe de uma pesquisa de representatividade nacional que indique a situação dessa carência nas várias regiões, sendo os estudos existentes pontuais, com metodologias distintas. Entretanto, eles revelam aumento progressivo na prevalência da anemia por deficiência de ferro, o que a transforma atualmente como um grave problema de Saúde Pública, ressaltando-se que a anemia está disseminada por todas as classes de renda (MS/UNICEF, 2007).

Visando reduzir os índices de prevalência e prevenir uma maior incidência de deficiência de ferro, por determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde 2004, no Brasil, todas as farinhas de trigo refinadas e de milho são fortificadas com 4,2 mg de Fe e 150 µg de ácido fólico /100 g de farinha (MS/UNICEF, 2007).

O diagnóstico de anemia por deficiência de ferro é feito quando ocorre um decréscimo no nível de hemoglobina a valores inferiores a 13 g/dL para homens, 12 g/dL para mulheres e crianças de 6 a 14 anos, e 11 g/dl para gestantes e crianças de 6 meses a 6 anos (WHO, 2007). Geralmente esse quadro está associado à microcitose, que é a diminuição do volume celular médio (VCM) (Denic e Agarwal, 2007).

Diversos autores têm proposto que a deficiência de ferro é um mecanismo fisiológico adaptativo da espécie humana, que seria benéfico em algumas ocasiões, como na diminuição da virulência de micro-organismos patogênicos invasores, que também dependem de ferro para sua sobrevivência (Cronje e Bornman, 2005; Collins, 2003; Weiss, 2002).

Uma das hipóteses do surgimento da deficiência de ferro propõe que ela começou com a revolução agrícola pela qual o homem passou cerca de dez mil anos atrás, com o início do cultivo de plantas e domesticação dos animais, quando houve uma mudança no padrão alimentar, outrora composto basicamente por carne de caça, para a uma dieta baseada em cereais, aumentando a ingestão calórica, mas diminuindo o consumo de ferro, que também passou a ser de menor potencial absorvivo (Denic e Agarwal, 2007).

A deficiência de ferro, com ou sem anemia concomitante, pode prejudicar o crescimento e o desenvolvimento intelectual em crianças, levar a anormalidades no epitélio do trato gastrointestinal, dificuldade de cicatrização, apatia e letargia, anorexia, desfechos gestacionais indesejados, e, em casos mais graves, hepatoesplenomegalia e morte. Há o registro também, ainda que sem uma explicação plausível, de picamalácia (desejo de ingerir substâncias estranhas) e geofagia (Shils *et al.*, 2003). Outras características da deficiência de ferro são: palidez cutânea, da conjuntiva, dos lábios, da língua e das palmas das mãos, respiração ofegante, disfagia (dificuldade na deglutição) e astenia (fraqueza orgânica) (MS/UNICEF, 2007; Andrews, 2000).

2.2.3. Excesso de ferro

A propriedade do ferro de facilmente receber e doar elétrons, mudando seu estado de oxidação, torna-o um componente essencial em citocromos, moléculas ligantes de oxigênio (e.g. hemoglobina e mioglobina) e inúmeras enzimas catalíticas. Entretanto, essa mesma característica é responsável pela sua toxicidade (Reddy e Clark, 2004; Fraga e Oteiza, 2002; Andrews, 2000).

O ferro é o principal catalisador da reação de Fenton (reação 1), na qual o peróxido de hidrogênio é convertido a radical hidroxil, que é o radical livre mais danoso em sistemas biológicos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Reação de Fenton:



As concentrações de ferro livre no organismo são mantidas baixas por dois motivos principais: o Fe (III) não é solúvel em água e Fe (II) participa na geração de radicais livres. Os radicais livres, gerados pela reação de Fenton, podem reagir com outras moléculas, levando à formação em cadeia de outros radicais e espécies reativas. Dessa forma, um aumento nas concentrações de ferro intra e extracelular pode resultar em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e estresse oxidativo, danos a membranas celulares, proteínas e DNA. Para prevenir esse problema, o ferro presente no corpo apresenta-se, quase sempre, ligado a proteínas, impedindo

que esteja livre e catalise a produção de espécies reativas (Papanikolaou e Pantopoulos, 2005; Urso, 2003; Fang *et al.*, 2002; Andrews, 2000).

As principais condições clínicas associadas ao excesso de ferro são: neoplasias, cardiomiopatia, aterosclerose, maior severidade de infartos, doenças hepáticas crônicas, diabetes tipo 2, hipertensão, falência renal aguda, desenvolvimento de tireoidite subaguda e maior gravidade de infecções. O mecanismo pelo qual o ferro estaria envolvido no surgimento e/ou agravamento dessas doenças é devido ao seu potencial catalítico na produção de radicais livres (Puntarulo, 2005).

Uma doença relacionada ao excesso de ferro, muito estudada recentemente, é a hemocromatose hereditária, que é um defeito genético relativamente comum em populações caucasianas, de herança autossômica recessiva, caracterizando-se por uma absorção de ferro aumentada no intestino, com conseqüente acúmulo de ferro em órgãos parenquimais, de modo destacado o fígado, pâncreas, coração e glândula pituitária. Entre portadores de hemocromatose é alta a prevalência de diabetes, doenças cardiovasculares e outras doenças relacionadas a estados de estresse oxidativo (Piperno *et al.*, 2007; Limdi e Crampton, 2004).

2.2.4. Biodisponibilidade de ferro

Nem todo o ferro contido nos alimentos é absorvido, pois sua biodisponibilidade varia de acordo com fatores extrínsecos e intrínsecos. Os fatores intrínsecos são relacionados ao indivíduo e às suas necessidades, considerando-se sexo, idade, estado nutricional de ferro e situação fisiológica. Os fatores extrínsecos são relativos ao alimento e seus componentes, que também podem interferir positiva ou negativamente.

2.2.4.1. Fatores Extrínsecos

O ferro nos alimentos encontra-se em duas formas: ferro hêmico (ligado a uma protoporfirina, formando o grupo heme) e ferro não-hêmico (geralmente associado a sais e óxidos).

O estado de oxidação do ferro hêmico é 2+, e é derivado principalmente da hemoglobina e da mioglobina presente em carnes, aves e peixes. Apesar de representar uma pequena proporção do conteúdo de ferro da dieta,

desempenha importante papel, pois a porcentagem absorvida é maior e sua absorção é menos afetada pelos demais componentes da dieta (MS/UNICEF, 2007).

Entretanto, quase todo o ferro da dieta é não-hêmico, respondendo por cerca de 85% do total de ferro ingerido. Os fatores dietéticos podem alterar a absorção de ferro de uma única refeição em até 10 vezes. Sua absorção depende, em grande parte, das reservas corporais e da solubilidade do ferro na parte proximal do intestino delgado (Hunt, 2003; Reddy *et al.*, 2000).

Tal solubilidade é alterada por outros componentes da dieta, tais como: ácido ascórbico, proteína animal, peptídeos que contêm cisteína, ácidos cítrico, málico e tartárico, outros ácidos orgânicos e etanol, que aumentam a solubilidade e, portanto, a biodisponibilidade do ferro. Há, contudo, fatores dietéticos que diminuem a solubilidade, dificultando sua absorção e utilização pelo organismo, como: fitatos, polifenóis, flavonoides, taninos, fosfato, oxalato e suplementação de ferro (Hunt e Roughead, 2000; Roughead e Hunt, 2000; Fairweather-Tait, 1997).

A presença de outros minerais na dieta também pode prejudicar a absorção do ferro não-hêmico, como cálcio, zinco, cobre, cobalto, níquel, cádmio e manganês (metais divalentes), pois, provavelmente, utilizam vias comuns de absorção, levando a um mecanismo de competição entre esses minerais (Arredondo *et al.*, 2006).

2.2.4.2. Fatores intrínsecos

Existem determinados momentos fisiológicos em que a necessidade de ferro é maior, alterando o padrão absorptivo do organismo, como nas fases de crescimento (infância e adolescência) e gestação. Situações de deficiência nutricional de ferro também aumentam o potencial absorptivo do ferro, resultando em uma maior biodisponibilidade. Situações de baixa acidez gástrica podem levar a uma menor solubilidade do ferro, reduzindo, assim, sua biodisponibilidade (Fairweather-Tait, 1997).

2.2.5. Recomendação de ferro

A ingestão dietética de referência do ferro está resumida na Tabela 2. Essa recomendação, apesar de ser feita baseada na população norte-

americana, é aceita para outras populações, especialmente as ocidentais (Cuppari, 2003).

Tabela 2. Ingestão dietética de referência (DRI – *Dietary Reference Intakes*) para o mineral ferro. Adaptado de NAS, 2001.

Faixa etária	Ingestão diária recomendada¹ (mg/d)	Limite máximo tolerável² (mg/d)
Crianças		
0-6 meses	0,27 ³	40
7-12 meses	11	40
1-3 anos	7	40
4-8 anos	10	40
Homens		
9-13 anos	8	40
14-18 anos	11	45
> 18 anos	8	45
Mulheres		
9-13 anos	8	40
14-18 anos	15	45
19-50 anos	18	45
> 50 anos	8	45
Gestantes		
≤ 18 anos	27	45
>19 anos	27	45
Lactantes		
≤ 18 anos	10	45
>19 anos	9	45

¹- RDA, *Recommended Dietary Allowances*

²- UL, *Tolerable Upper Intake Levels*

³- AI, *Adequate Intake*, recomendação quando não há RDA determinada

As principais fontes alimentares de ferro são: fígado, carne vermelha, ostras, leguminosas como feijão e lentilha, e melão escuro (Shils *et al.*, 2003).

2.2.6. Balanço corporal de ferro

Adultos normalmente têm cerca de 3 a 4 g de ferro total no corpo. A maior parte desse ferro está envolvida na produção de hemoglobina, no desenvolvimento das células precursoras eritroides e eritrócitos maduros. Cada eritrócito contém mais de um bilhão de átomos de ferro sob a forma de hemoglobina. Do total de ferro restante no corpo, a maioria é armazenada no fígado (Andrews, 2000).

A dieta padrão de um ser humano contém de 13 a 18 mg de ferro por dia. Entretanto, desse total ingerido, apenas cerca de 1 mg é absorvido. Até mesmo em situações de deficiência de ferro, em que a absorção é otimizada, é de apenas 2 a 4 mg diários. Em casos de excesso de ferro, a absorção é reduzida a 0,5 mg Fe/ dia. Evidenciando, assim, um fino controle do metabolismo de ferro na absorção intestinal, considerando-se que não há excreção renal significativa desse metal (Miret *et al.*, 2003).

No processo de formação de células vermelhas, demanda-se cerca de 30 mg de ferro/ dia. Necessidade essa que é suprida pelo fluxo de ferro advindo da degradação de eritrócitos senescentes pelas células do sistema reticuloendotelial do baço e células de Kupffer no fígado (Hentze *et al.*, 2004; Miret *et al.*, 2003).

As perdas corporais de ferro são relativamente pequenas, consistindo de perdas com descamação de células epiteliais (pele, células gastrointestinais, células do trato urinário) e por fluidos (lágrimas, suor e sangue, principalmente a menstruação, em mulheres). Essas perdas contabilizam cerca de 1 mg de ferro por dia (2 mg/ dia em mulheres pré-menopausa), sendo repostas pela absorção de ferro dietético (Miret *et al.*, 2003).

O fígado desempenha um papel central no metabolismo do ferro, sendo responsável por aproximadamente 8% do *turnover* de ferro do plasma em humanos. Os hepatócitos são responsáveis, também, por expressar a maioria dos genes que estão associados com doenças hereditárias relacionadas ao ferro (Graham *et al.*, 2007).

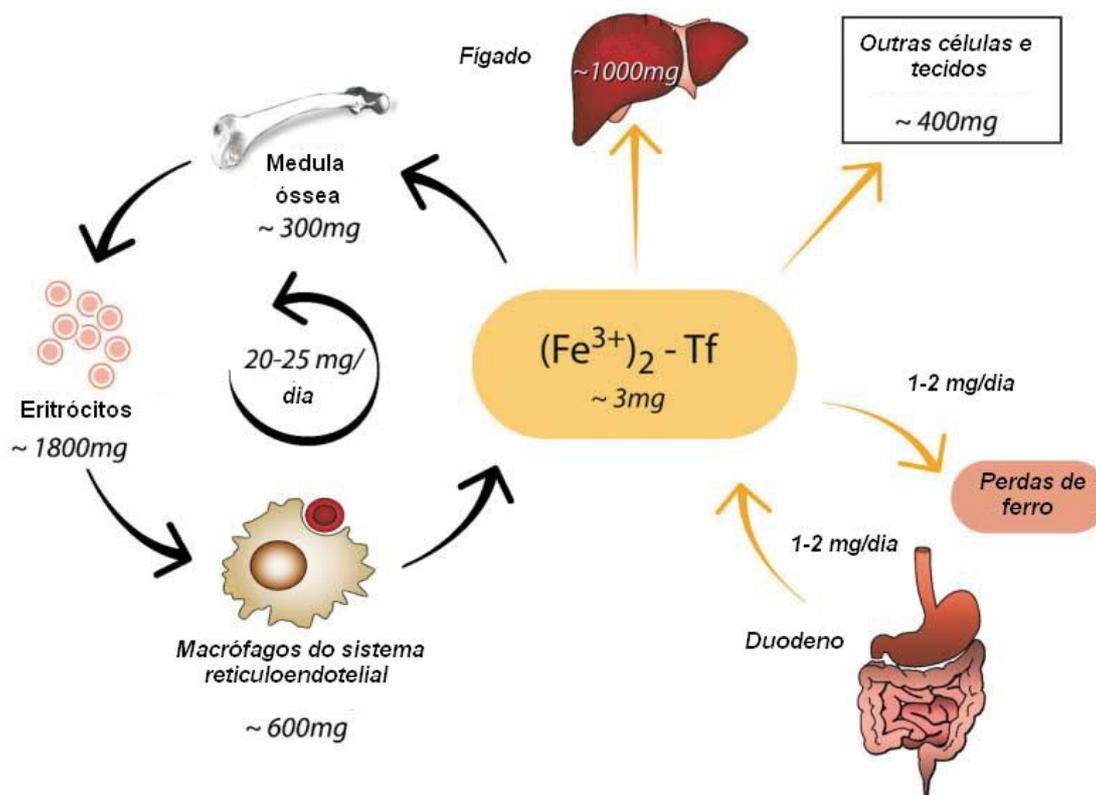


Figura 10. Homeostase sistêmica de ferro. Tf, transferrina. Adaptado de Hentze *et al.*, 2004.

2.2.7. Absorção

A absorção de ferro envolve a movimentação do metal do lúmen intestinal através da membrana do enterócito (importação ou influxo), a movimentação dentro da célula (processamento ou fluxo intracelular) e a movimentação através da membrana basal (exportação ou efluxo) para a corrente sanguínea (Oates, 2007).

O ferro dietético absorvido pode se apresentar sob duas formas diferentes: ferro hêmico, presente nas carnes vermelhas, e ferro não-hêmico, proveniente principalmente de hortaliças, cereais e leguminosas.

O ferro não-hêmico (ou inorgânico) presente nos alimentos pode estar na forma reduzida (Fe II) ou oxidada (Fe III). Em condições fisiológicas normais o Fe (II) é rapidamente oxidado, podendo então formar precipitados não-absorvíveis. Vários fatores dietéticos podem alterar o estado de oxidação do ferro, aumentando ou diminuindo sua biodisponibilidade. É importante salientar que o ferro é absorvido em sua forma Fe (II) (Miret *et al.*, 2003).

Ferro não-hêmico é absorvido cedo no processo digestivo, principalmente no duodeno, onde o pH baixo favorece a solubilidade do ferro.

Ao longo do tubo digestivo, com o aumento do pH alimentar, ocorre a formação de complexos férricos insolúveis, reduzindo sua absorção.

O outro tipo de ferro presente nos alimentos é o ferro hêmico, presente em carnes. Apesar de ser mais biodisponível, a quantidade ingerida é menor. Acredita-se que o anel porfírico se separa da globina no lúmen e o grupo heme intacto (Fe-porfirina) é transportado pelas células da borda em escova do intestino (Miret *et al.*, 2003; Andrews, 2000).

As células da mucosa duodenal envolvidas na absorção de ferro são formadas nas criptas de Lieberkühn. Elas migram para o vilão, tornando-se funcionais apenas quando atingem o topo. Após um curto período de funcionalidade, as células são perdidas no lúmen intestinal juntamente com o ferro que havia entrado na célula, mas que ainda não havia sido transferido para o plasma (NAS, 2001, Roy e Enns, 2000).

Em humanos, o *turnover* dos enterócitos dura entre 48 e 72 horas. As células são programadas para regular a absorção de ferro quanto atingem o topo dos vilões pela quantidade de ferro que recebem do plasma enquanto ainda estão nas criptas, no seu desenvolvimento primário (NAS, 2001).

Na membrana apical dos enterócitos maduros, situados nos microvilos intestinais, encontram-se predominantemente as proteínas DMT-1 (transportador de metal divalente - *divalent metal transporter*), a ferro reductase duodenal (Dcytb) e o exportador transmembrânico ferroportina (FPN), proteínas associadas à absorção e exportação de ferro intestinal. O Fe(III) inorgânico é reduzido pela Dcytb, que transporta elétrons do NADPH citosólico para aceptores extracelulares, como o Fe(III), sendo captado pelo enterócito, através do transportador DMT-1 (Kaplan, 2002; Ponka, 2000).

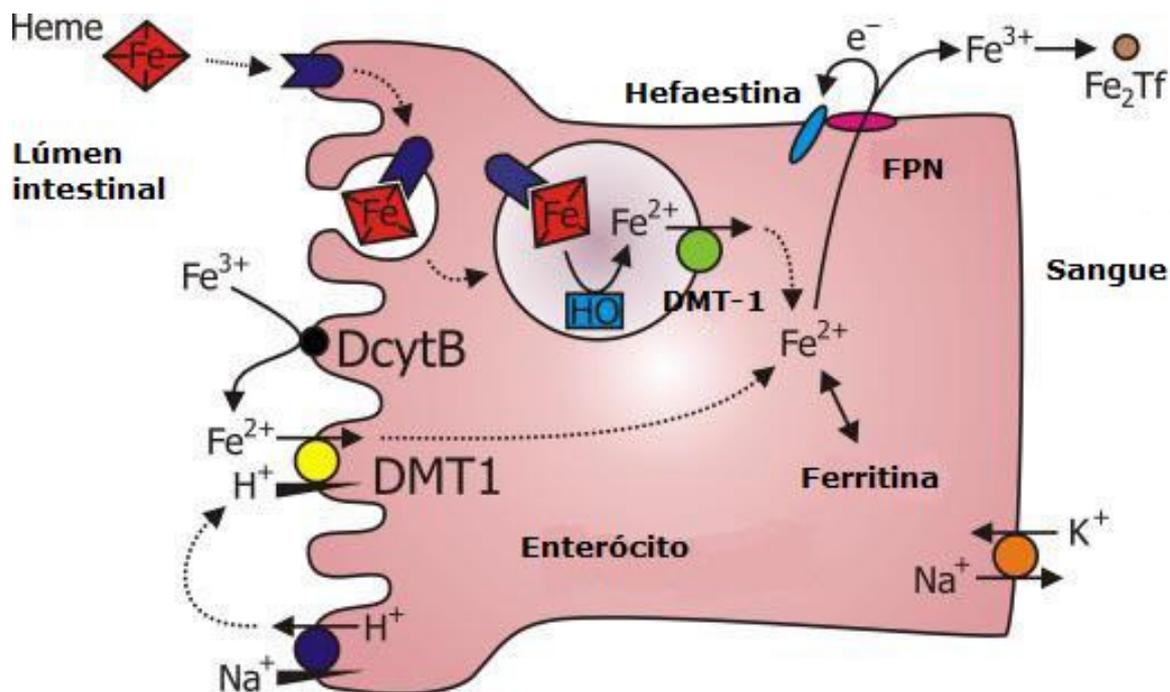


Figura 11. Esquema simplificado da absorção e exportação celular do ferro no enterócito. DMT1, transportador de metal divalente 1; Dcytb, Citocromo duodenal B; FPN, ferroportina; HO-1, Heme oxigenase 1; Tf, transferrina. Adaptado de Mackenzie e Hediger, 2004.

A identificação do DMT-1 ocorreu em 1997 por Hediger e sua equipe, através de um escaneamento funcional de cDNA de rato que induziu a atividade de transporte de ferro, sendo classificado na família de carreadores solúveis 11 (SLC11 – *solute carrier* 11) (Mackenzie e Hediger, 2004).

O DMT-1 é uma glicoproteína com 12 hélices transmembrânicas e há, atualmente, quatro isoformas conhecidas (Graham *et al.*, 2007), funcionando como um simportador: quantidades equivalentes de Fe(II) e H⁺ são cotransportados para dentro do enterócito. Contudo, a maior parte do ferro dietético ingerido é não-hêmico, estando na forma Fe(III), e não pode ser transportado pelo DMT-1, devendo ser reduzido antes (Oates, 2007).

A redução do Fe(III) a Fe(II), que possibilita a absorção do ferro inorgânico via DMT-1 pode ser realizada de diversas maneiras, como pelo ácido ascórbico dietético e baixo pH estomacal (esse último com menor relevância). Entretanto, grande parte dessa redução é realizada por ferrirredutases intestinais, como a Dcytb (Dunn *et al.*, 2006; Hentze *et al.*, 2004).

Assim como a maioria das proteínas integrais expressas na membrana apical, o DMT-1 é glicosilado, presumivelmente para proteger-se da digestão pelas secreções luminiais e acidez (Oates, 2007).

No enterócito, o DMT-1 é essencial para a captação e transporte do Fe(II) pela membrana apical. Entretanto, ele é um transportador promíscuo, atuando também no carreamento de outros metais divalentes como cádmio, cobalto, cobre, manganês, zinco e, em menores proporções, níquel e chumbo (Mackenzie e Hediger, 2004).

O DMT-1 é expresso ao longo do intestino delgado, principalmente no duodeno proximal. Também é encontrado em grandes quantidades nos macrófagos (baço e células de Kupffer), células precursoras eritroides, e quase que ubiquamente no organismo, estando presente nos endossomas (Mackenzie e Hediger, 2004; Canonne-Hergaux *et al.*, 2001).

Durante a deficiência severa de ferro, o DMT-1 encontra-se, quase que exclusivamente, na superfície da célula. Entretanto, em condições normais, ele também é encontrado em sítios intracelulares, sugerindo que o ferro dietético e o DMT-1 podem interagir dentro da célula (Oates, 2007).

O heme é solúvel em ambiente alcalino e sua absorção é menos afetada por fatores intraluminiais. Em 2005 foi descrita a proteína carreadora de heme (HCP – *heme carrier protein*), o primeiro transportador intestinal específico de heme. A atividade ligante de heme da HCP é maior no duodeno e diminui ao longo do intestino delgado (Atanasiu, 2006).

Após se ligar ao receptor, o complexo heme-HCP é internalizado por endocitose. Sugere-se que a vesícula endossomal migre para o retículo endoplasmático, onde o ferro é liberado do heme pela heme oxigenase (HO), localizada na superfície do retículo, produzindo também monóxido de carbono e bilirrubina-IXa. O ferro absorvido por essa via passa a fazer parte, dentro do enterócito, do *pool* lábil de ferro, e entra na via comum de exportação de ferro pela ferroportina (Dunn *et al.*, 2006; NAS, 2001).

O mecanismo pelo qual o ferro é transportado dentro do enterócito ainda não foi completamente elucidado. O ferro absorvido passa a fazer parte do *pool* lábil de ferro, que é transportado até a membrana basolateral do enterócito, onde é exportado pela ferroportina e ligado à transferrina para transporte no plasma até as outras células (NAS, 2001), ou armazenado na proteína ferritina.

As características moleculares do *pool* de ferro dos enterócitos permanecem desconhecidas, mas poderia consistir de quelatos de baixo peso molecular ou proteínas chaperonas que se ligariam e transportariam o ferro intracelular (Dunn *et al.*, 2006).

Há evidências consideráveis que mostram que, após ser absorvido na membrana apical, ocorrem interações com diversas organelas no processamento intracelular do ferro, antes de ser exportado pela ferroportina. Entretanto esse mecanismo ainda é desconhecido (Oates, 2007).

A ferroportina, ou SLC40 (*solute carrier 40*), foi descoberta no ano de 2000 por três grupos independentes, sendo primeiramente chamada de proteína transportadora de metal-1 (MTP-1, *metal transporter protein-1*), depois Ireg-1 (proteína reguladora de ferro-1; *iron regulatory protein-1*) e, mais recentemente, rebatizada como ferroportina (FPN), e parece ser o único membro da família de carreadores SLC40 (McKie e Barlow, 2004).

A ferroportina é uma proteína transmembrânica expressa em tecidos envolvidos no *turnover* e na manutenção dos estoques de ferro corporal, como enterócitos, macrófagos, placenta e hepatócitos e moderadamente nos rins e pulmões, e seu papel no metabolismo do ferro é de exportador celular (Oates, 2007; McKie e Barlow, 2004).

A superexpressão de ferroportina resulta em um fenótipo de deficiência de ferro intracelular, indicando que a ferroportina é a responsável pelo efluxo celular de ferro. Quando a superexpressão de ferroportina ocorreu em células expostas à hepcidina, a ferroportina foi internalizada e encaminhada aos lisossomos, onde foi degradada, ocorrendo um aumento dos estoques intracelulares de ferro (Oates, 2007; Nemeth *et al.*, 2004).

Mutações na ferroportina têm sido descritas como causadoras de um fenótipo da hemocromatose, sugerindo que a liberação de ferro das células está prejudicada ou que a ferroportina não é responsiva à hepcidina (Oates, 2007).

Mesmo em condições de funcionamento normais, a ferroportina dos macrófagos e dos enterócitos pode responder de modo distinto aos estímulos recebidos, possivelmente por interações com outras proteínas de membrana específicas de cada órgão (Oates, 2007).

A ceruloplasmina, proteína plasmática, e a hefaestina, proteína presente na membrana basolateral, também estão envolvidas no metabolismo do ferro, atuando como ferroxidases e promovendo a oxidação do Fe(II) a Fe(III), que se liga à glicoproteína plasmática transportadora de ferro, transferrina (Tf) (NAS, 2001; Andrews, 2000; Ponka, 2000).

2.2.8. Transporte e captação celular

O transporte de ferro entre as células é conduzido pela ligação reversível do ferro à proteína de transporte, transferrina (Tf). Um átomo de ferro pode se ligar a cada um dos dois sítios de ligação que a transferrina possui. As células possuem em sua superfície um receptor de transferrina (TfR) altamente específico, que se complexa com a transferrina ligada ao ferro (Graham *et al.*, 2007; Frazer e Anderson, 2003).

As três formas possíveis de transferrina têm diferentes afinidades pelo TfR: a Tf diférrica (ligada a 2 átomos de ferro) possui 4 vezes mais afinidade que a Tf monoférrica (ligada a um átomo de ferro) e 24 vezes mais afinidade que a apotransferrina (não ligada a ferro) (Atanasiu *et al.*, 2006).

Por ser a principal proteína circulante ligada a ferro, os níveis de saturação de transferrina refletem o *status* de ferro no organismo e podem agir como sinalizadores para mecanismos que mantêm o balanço de ferro (Atanasiu *et al.*, 2006).

A expressão de TfR é regulada primariamente pelos níveis de ferro do organismo, através de um mecanismo pós-transcricional. Outros fatores que regulam, secundariamente, a sua síntese são a hipóxia, citocinas e fatores de crescimento (Graham *et al.*, 2007).

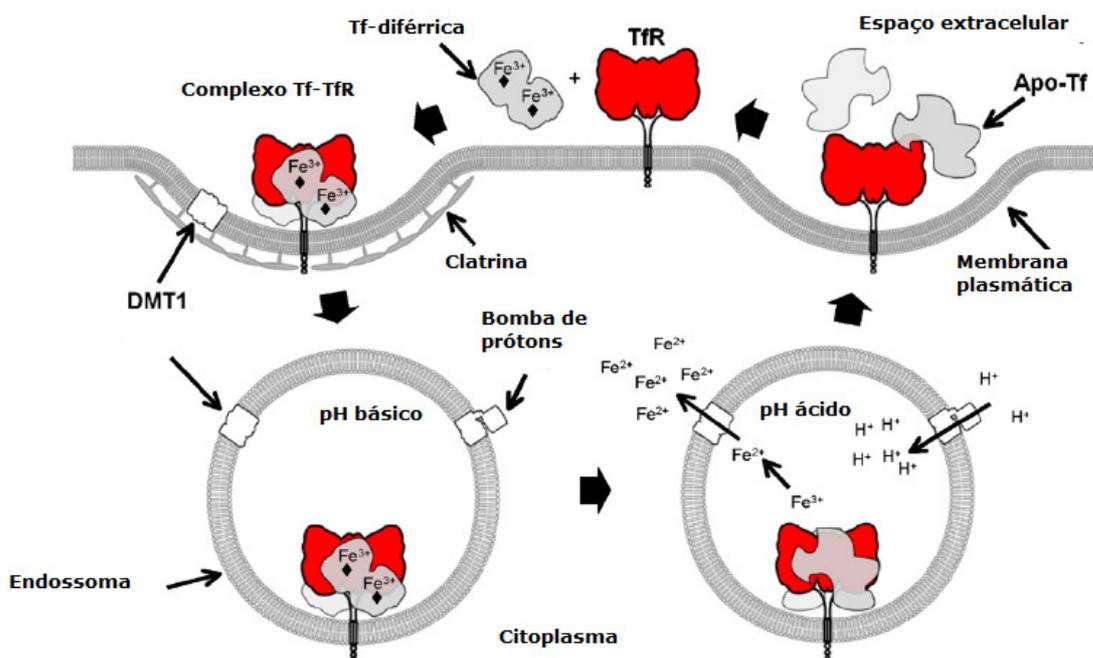


Figura 12. Recepção celular de ferro via transferrina – receptor de transferrina. TfR, receptor de transferrina; Tf, transferrina; Apo-Tf, apotransferrina; DMT1, transportador de metal divalente 1. Adaptado de Daniels *et al.*, 2006.

Na figura 12 é apresentada de forma esquemática a captação celular de ferro. O complexo transferrina-receptor de transferrina (Tf – TfR) é internalizado, resultando na formação de uma vesícula endossomal, onde ocorre uma acidificação do meio. Em pH de aproximadamente 5,5 o ferro perde a sua afinidade de ligação com a transferrina, sendo liberado dentro do endossoma. Esse ferro, que se encontra na forma Fe (III), sofre redução pela enzima STEAP3 (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3* – antígeno epitelial seis-transmembrana da próstata 3), presente na membrana do endossoma (não representada na Figura 12). Também presente na superfície endossomal encontra-se o DMT-1 que realiza o transporte do Fe (II) do interior do endossoma para o citoplasma. O complexo Tf-TfR, sem o ferro, retorna à superfície da célula, onde a apotransferrina (transferrina não ligada a ferro) é liberada na circulação para novo transporte (Graham *et al.*, 2007; Daniels *et al.*, 2006; Dunn *et al.*, 2006; Hentze *et al.*, 2004; Andrews, 2000).

O gene de um segundo transportador presente no endossoma, estimulador de transporte de ferro (SFT – *stimulator of iron transport*), foi clonado e caracterizado como um transportador exclusivo de ferro, tanto na

forma férrica como ferrosa, do endossoma para o citoplasma (Gutierrez *et al.*, 1997).

Outras formas de captação celular têm sido descritas, entretanto são expressivas apenas no fígado. São elas: ferritina, lactoferrina, complexo heme-hemopexina e complexo hemoglobina-haptoglobina. A ferritina circulante contém pouca quantidade de ferro e não é, portanto, uma fonte majoritária de ferro em humanos (Graham *et al.*, 2007). Os principais processos de captação celular do ferro pelo fígado estão representados na Figura 13.

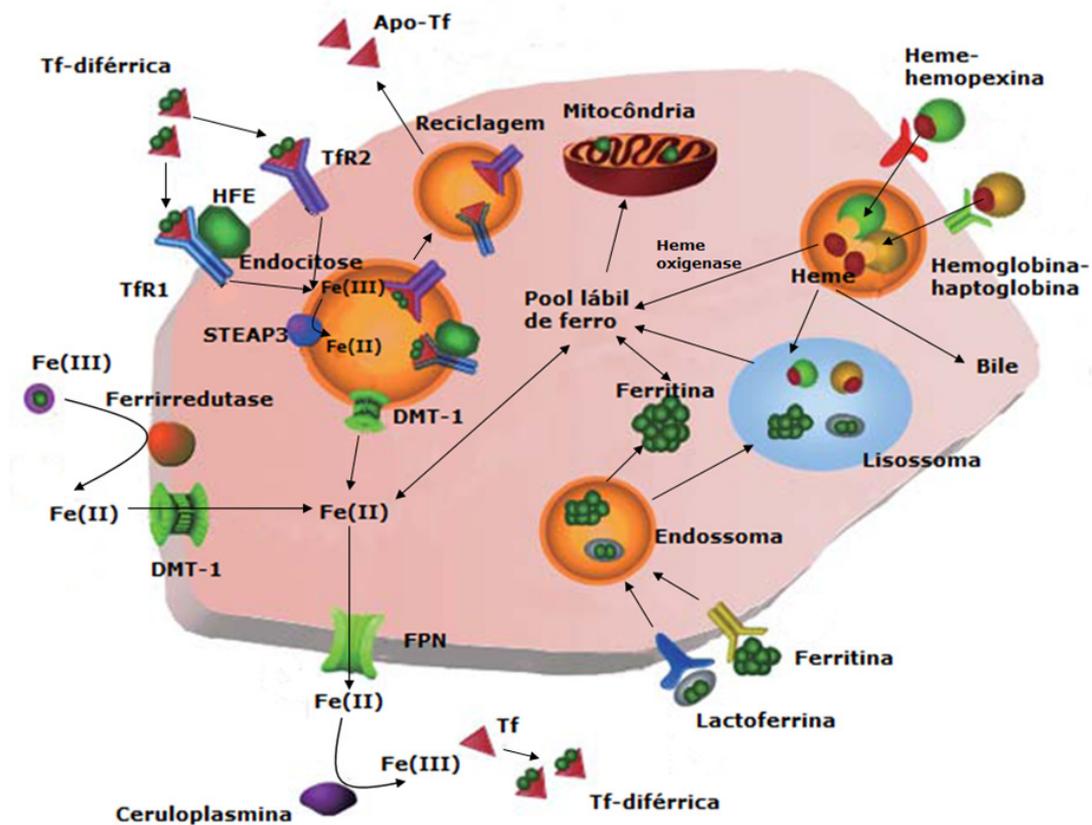


Figura 13. Transporte de ferro no hepatócito. Apo-Tf, apotransferrina; Tf-diférrica, transferrina ligada a dois átomos de ferro; TFR1 e TFR2, receptor de transferrina 1 e 2; HFE, proteína alterada na hemocromatose; STEAP3, antígeno epitelial seis-transmembrana da próstata 3; DMT-1, transportador de metal divalente 1; FPN, ferroportina. Adaptado de Graham *et al.*, 2007.

Após entrar nas células o ferro pode ser incorporado em compostos funcionais, armazenado como ferritina ou utilizado para regulação futura do metabolismo de ferro através da atividade moduladora das IRPs. A regulação de proteínas de armazenamento, transporte e metabolizadoras de ferro sofre regulação pós-transcricional pelo próprio *pool* de ferro intracelular (NAS, 2001).

2.2.9. Armazenamento

A disponibilidade de ferro intracelular é regulada pelo aumento na expressão de receptores de transferrina por células deficientes em ferro e pelo aumento na produção de ferritina quando o fornecimento de ferro excede às necessidades funcionais da célula (Hentze *et al.*, 2004).

Após entrar na célula, a porção de ferro que não é necessária para uso imediato é armazenada sob a forma de ferritina, uma proteína multimérica ubíqua e altamente conservada. Em vertebrados, a ferritina possui duas subunidades: leve (L) e pesada (H), podendo se ligar a até 4500 átomos de ferro (Hentze *et al.*, 2004).

A ferritina sequestra o ferro do *pool* lábil, ligando-se a ele de uma forma menos reativa. A subunidade H possui ferroxidases que transformam o Fe(II), mais reativo, em Fe(III), sendo assim armazenado. A degradação da ferritina e consequente liberação do ferro ajudam na mobilização do ferro para uso extracelular (Hentze *et al.*, 2004).

Outra forma de armazenamento do ferro intracelular é a hemossiderina, que é um produto da degradação da ferritina, sendo insolúvel em água. A quantidade de ferro na hemossiderina é variável e, por ser insolúvel, possui menor importância biológica (NAS, 2001).

Virtualmente, todas as células são capazes de armazenar ferro. Entretanto, em humanos, essa atividade é desenvolvida principalmente pelo fígado, baço e células da medula óssea (NAS, 2001).

A associação do ferro com proteínas, dentro do sistema biológico, constitui uma estratégia bioquímica capaz de proteger as células contra possíveis danos oxidativos catalisados por ferro livre, evitar a perda do ferro por filtração glomerular e, ainda, facilitar a captação deste pelos demais tecidos (Hentze *et al.*, 2004; Crichton *et al.*, 2002).

2.2.10. Excreção

Não há um mecanismo de excreção de ferro em humanos. Na ausência de sangramento, incluindo a menstruação, ou gravidez, apenas uma pequena quantidade de ferro é perdida diariamente, por descamação de células, sendo, portanto, o ferro corporal altamente conservado (Hentze *et al.*, 2004).

As perdas diárias de ferro atingem de 0,9 a 1,02 mg/dia em mulheres que não menstruam. A maior parte do ferro perdido é eliminada pelas fezes. Diariamente, as perdas urinárias, do trato gastrointestinal e descamação da pele são de 0,08 mg, 0,6 mg, e 0,2 mg, respectivamente. As perdas basais podem diminuir a 0,5 mg/ dia na deficiência de ferro e aumentarem até 2 mg/ dia no excesso de ferro (NAS, 2001).

2.2.11. Regulação

A regulação do metabolismo do ferro pode ser feita por um mecanismo de controle da tradução (IRP/IRE) ou pós-traducional (hepcidina).

2.2.11.1. Hepcidina

O fígado regula o fluxo e absorção de ferro do organismo através do controle de pelo menos quatro proteínas: a proteína da hemocromatose (HFE), hemojuvelina (HJV), receptor de transferrina 2 (TfR2) e hepcidina. Os papéis da HFE, HJV e TfR2 são de regular a expressão adequada e liberação de hepcidina, que é o mediador humoral que determina a quantidade de ferro liberado pelos enterócitos e pelos macrófagos (Oates, 2007; Frazer e Anderson, 2003).

A hepcidina (*hepcidin* - **hepatic bactericidal protein**) foi isolada inicialmente como um peptídeo circulante antimicrobiano, a partir da urina de humanos, em 2000, por Krause e sua equipe, e posteriormente nomeada por Park. Sua expressão ocorre majoritariamente no fígado, como pró-hepcidina, com pequenos níveis sendo encontrados nos músculos, intestino, estômago, cólon, pulmões e coração (Atanasiu *et al.*, 2006). A síntese de hepcidina é estimulada pelo excesso de ferro e por processos inflamatórios (interleucinas), sendo inibida na anemia e na hipóxia (Atanasiu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2002b). Após ser clivada, a forma madura bioativa é secretada na circulação como um peptídeo formado por 25 aminoácidos (Wang *et al.*, 2005).

Estudos indicam que a hepcidina desempenha um papel essencial na manutenção do *status* de ferro através da regulação da sua absorção, principal ponto de controle da homeostase do ferro (Leong e Lönnnerdal, 2004;

Templeton e Liu, 2003; Kaplan, 2002; Park *et al.*, 2001), por meio de interações com a ferroportina (Nemeth *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2004).

A falta de expressão de hepcidina tem sido associada com acúmulo de ferro, enquanto sua superexpressão resulta em anemia por deficiência de ferro, em ratos. Algumas mutações no gene da hepcidina, em humanos, têm sido reportadas como causadoras de hemocromatose juvenil severa (Wang *et al.*, 2005; Yamaji *et al.*, 2004).

Pesquisas apontam a hepcidina como a molécula responsável pela sinalização humoral das informações do fígado ao duodeno, regulando a absorção de ferro de acordo com os níveis sistêmicos (Nicolas *et al.*, 2002a) e com a demanda de ferro, para a produção de eritrócitos (Pigeon *et al.*, 2001).

A hepcidina plasmática regula negativamente a absorção de ferro nas células duodenais e inibe a liberação de ferro dos macrófagos (Wang *et al.*, 2005). O mecanismo de inibição da absorção ainda não está esclarecido, porém, foi postulado, recentemente, um mecanismo no qual a hepcidina induz a internalização e degradação da proteína exportadora de ferro nas células, a ferroportina, resultando na retenção de ferro nos enterócitos, macrófagos e hepatócitos (Ganz, 2005; Nemeth *et al.*, 2004).

Em um estudo de Rivera e colaboradores (2005), a ativação da expressão de hepcidina reduziu os níveis plasmáticos de ferro em um prazo de cerca de 6 horas. Uma resposta mais rápida foi vista após a administração parenteral de hepcidina-25 (forma bioativa) recombinante em camundongos. A diferença de tempo de resposta representa o tempo necessário para ativar a transcrição, tradução e modificações pós-traducionais do peptídeo, e sua secreção, antes de produzir algum efeito.

A regulação da expressão da ferroportina parece ser diferenciada no fígado e nos tecidos extra-hepáticos. No fígado tal regulação parece ocorrer independentemente dos níveis de hepcidina (Chaston *et al.*, 2008; Constante *et al.*, 2006).

Outras proteínas como a transferrina (Tf), os receptores de transferrina (TfR1 e TfR2), a ferritina, a HFE (proteína modificada na hemocromatose) e a hemojuvelina (proteína modificada na hemocromatose juvenil) também estão envolvidas na sinalização celular do *status* de ferro mediada pela hepcidina (Oates, 2007; Ganz, 2005).

A mutação do gene da HFE foi a primeira a ser comprovada como causadora da hemocromatose, que leva a uma produção constantemente baixa de hepcidina, e conseqüente acúmulo de ferro nos órgãos, sugerindo que a HFE regula positivamente a expressão de hepcidina (Wang *et al.*, 2005). A HFE também está envolvida na captação celular de ferro pelo TfR1, possivelmente limitando a quantidade de ferro liberada da transferrina (Graham *et al.*, 2007).

O *status* corporal de ferro alto é refletido em altos níveis de Tf diférrica, levando a um aumento na interação entre a Tf e o TfR1, e um subsequente aumento na quantidade de HFE livre na superfície do hepatócito. Maiores quantidades de HFE livre estimulam um sinal de transdução ainda desconhecido que leva a um aumento da expressão de hepcidina (Atanasiu *et al.*, 2006; Frazer e Anderson, 2003).

A diminuição dos estoques corporais de ferro produzida pela hepcidina leva a uma retenção mais eficiente de ferro. A saturação de transferrina diminui, a proporção de Tf monoférrica aumenta em relação à Tf diférrica, a expressão de TfR1 aumenta. O TfR1 produzido se liga à HFE na superfície do hepatócito, restando poucas moléculas de HFE livres e cessando o estímulo para produção de hepcidina (Atanasiu *et al.*, 2006; Frazer e Anderson, 2003).

O mecanismo atualmente aceito para a regulação da expressão de hepcidina hepática encontra-se exemplificado na Figura 14.

A necessidade de ferro do organismo é detectada pelas alterações na razão de transferrina diférrica e receptor de transferrina 1. A Tf-diférrica tem preferência na ligação com o TfR1, em relação à HFE. Em situações normais (Figura 14A), há Tf-diférrica suficiente para se ligar ao TfR1. A HFE livre sinaliza o núcleo para a produção de hepcidina. Tf-diférrica também se liga ao TfR2, produzindo um sinal redundante. Na deficiência de ferro (Figura 14B), os níveis de Tf-diférrica são reduzidos drasticamente, liberando o TfR1 e permitindo a ligação deste à HFE, diminuindo o sinal para produção de hepcidina. Em condições de excesso de ferro (Figura 14C), os níveis de Tf-diférrica aumentam e a quantidade de TfR1 livre na superfície da célula diminui, liberando a HFE, que induz a secreção de hepcidina no plasma. Simultaneamente, o excesso de Tf-diférrica se liga ao TfR2, potencializando o sinal para produção de hepcidina (Frazer e Anderson, 2003).

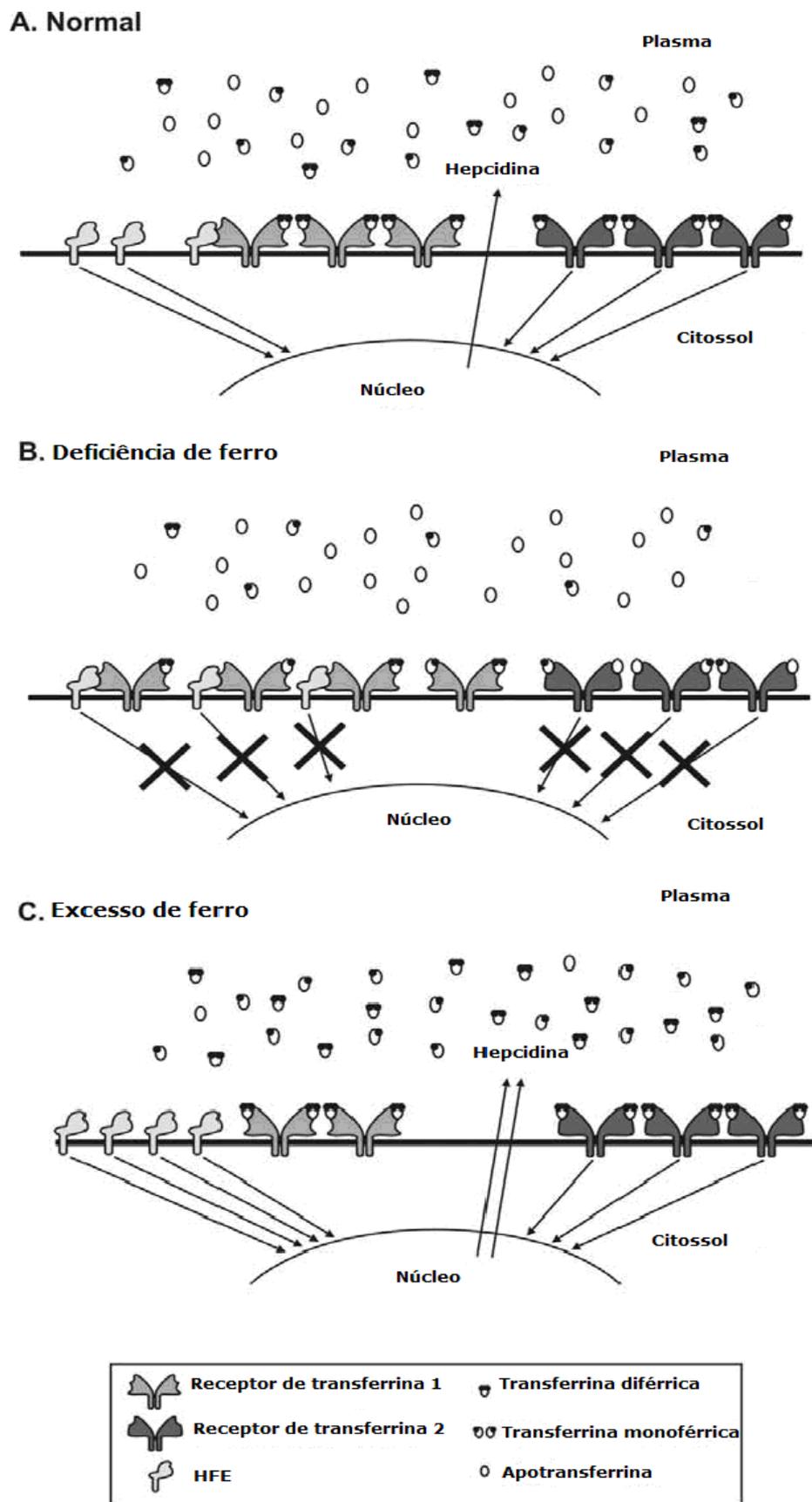


Figura 14. Modelo de regulação da expressão de hepcidina. Adaptado de Frazer e Anderson, 2003.

2.2.11.2. IRE e IRP

A quantidade de diversas proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro é diretamente relacionada à quantidade de ferro intracelular. A síntese dessas proteínas pode sofrer modulação da transcrição, estabilidade do mRNA, tradução e modificações pós-traducionais (Hentze *et al.*, 2004).

O mecanismo de regulação melhor caracterizado para o ferro é o de controle após a transcrição, aumentando ou diminuindo a estabilidade do mRNA, envolvendo proteínas reguladoras de ferro (IRP – *iron regulatory proteins*) e elementos responsivos a ferro (IRE – *iron responsive elements*) no mRNA (NAS, 2001).

O maquinário de transporte de ferro nas células da borda em escova do intestino (DMT-1 e Dcytb) é significativamente induzido pela privação de ferro, enquanto os genes que codificam proteínas basolaterais necessárias na exportação de ferro (ferroportina e hefaestina) não foram consistentemente regulados em um estudo de Collins e colaboradores (2005). Entretanto essa menor regulação na expressão de ferroportina e hefaestina pode ser explicada por uma regulação na atividade da proteína, pós-traducional (NAS, 2001).

Os níveis de mRNA de DMT-1 no intestino de ratos e humanos sofrem um aumento em resposta à privação de ferro, sugerindo uma regulação da estabilidade do mRNA pela concentração de ferro intracelular (Mackenzie e Hediger, 2004; Zoller *et al.*, 2001), chegando a aumentos da ordem de 10 vezes, nos estados de deficiência de ferro (Andrews, 2000).

No estudo de Aydemir e outros (2009), houve um aumento paralelo nos níveis de mRNA e hnRNA (RNA heterogêneo nuclear) de ferroportina, em resposta a um aumento nas concentrações de ferro. Entretanto, é possível que esse aumento não seja resultado de uma maior ativação transcricional, mas de uma maior estabilidade do pré-mRNA.

Na ausência de hepcidina, os mecanismos celulares são os principais controladores da expressão de ferroportina, sendo a regulação pós-transcricional, via IRP/IRE, um dos mais ativos (Aydemir *et al.*, 2009).

IREs são um grupo de sequências de cerca de 30 nucleotídeos que ocorrem em regiões não-traduzidas do mRNA, tanto na porção 5' como na 3'. A estrutura dessas sequências é similar a um tronco de bases pareadas, com cerca de 10 pares de base (bp) de comprimento, formando um *loop* central de

bases não pareadas com a sequência CAGUGX. Há uma região anterior ao *loop* com 5 bases C que formam o ponto em que as proteínas reguladoras de ferro (IRPs) se ligam (Hentze *et al.*, 2004; Templeton e Liu, 2003).

IREs na região 5' UTR (não-traduzida) do transcrito ocorrem em cópias únicas e são encontrados no mRNA da ferritina e da ferroportina, entre outras proteínas. Sua ligação aos IRPs é aumentada pela deficiência de ferro. A complexação IRP-IRE em uma região pré-codificadora bloqueia o progresso do maquinário de tradução, diminuindo a síntese de proteínas de armazenamento e exportação celular (ferritina e ferroportina, respectivamente), em casos de deficiência de ferro (Templeton e Liu, 2003; Martini *et al.*, 2002).

IREs na região 3' UTR são encontrados em cópias múltiplas no mRNA do receptor de transferrina e DMT-1, e não são posicionadas de forma a bloquear a tradução. Pelo contrário, ao se complexarem aos IRPs, o mRNA é protegido da degradação pelas endonucleases celulares, aumentando a quantidade de proteína sintetizada. Fica evidente a necessidade de transportadores como o TfR e o DMT-1 em casos de deficiência de ferro, aumentando a capacidade absorptiva e de captação celular de ferro (Templeton e Liu, 2003).

O mecanismo pelo qual os IREs regulam a estabilidade do mRNA é por meio da interação com a IRP1 e IRP2. Essas proteínas possuem um centro Fe-S. Em altas concentrações intracelulares de ferro, 4 átomos de Fe se ligam a 4 resíduos de cisteína da molécula de IRP, formando um centro 4Fe-4S. Essa configuração molecular converte IRP1 em uma proteína que tem atividade catalítica, a aconitase, porém perdendo a afinidade pelos IREs. A IRP2 é degradada em altas concentrações de ferro. Entretanto, em baixas concentrações de ferro o centro 4Fe-4S perde átomos de Fe, e a molécula assume a conformação dos IRPs ativos, que se ligam aos IREs na molécula de mRNA das proteínas ferritina, TfR, DMT-1 e ferroportina. Conforme a posição do IRE no mRNA, 5' UTR ou 3' UTR, após a formação do complexo IRE/IRP a tradução é bloqueada ou o mRNA é estabilizado, diminuindo ou aumentando, respectivamente, a tradução da proteína regulada (Dupic *et al.*, 2002; Eiseinstein, 2000; Eiseinstein e Blemings, 1998).

Tabela 3. Principais proteínas envolvidas na absorção, transporte, liberação e regulação do metabolismo de ferro, e suas funções. Adaptado de Oates, 2007.

Proteína	Função
DMT-1 ¹	Importa Fe(II) para o citoplasma
Dcytb ²	Ferorredutase
STEAP3 ³	Ferorredutase
Ferritina	Armazena Fe(III)
Ferroportina	Exporta Fe(II)
Hefaestina	Feroxidase
Transferrina (Tf)	Transporte plasmático de Fe(III)
Receptor de transferrina (TfR)	Liga-se à HFE e Tf diférrica; modula a captação de ferro
HFE ⁴	Liga-se ao TfR; modula síntese de hepcidina
Hepcidina	Hormônio regulador

¹- Transportador de metal divalente-1

²- Citocromo duodenal B

³- antígeno epitelial seis-transmembrana da próstata 3

⁴- Proteína alterada na hemocromatose

2.3. Interação entre vitamina A e ferro

Desde a década de 1920 alguns estudos vinham observando uma associação entre a deficiência de vitamina A e anemia, em humanos e em animais (Koessler *et al.*, 1926; Blackfan e Wolbach, 1933), sem, no entanto, encontrar uma explicação metabólica e fisiológica para essa associação que foi novamente confirmada em 1978 por Hodges e colaboradores (Hodges *et al.*, 1978). No fim da última década alguns autores sugeriram a existência de um sinergismo entre o metabolismo de vitamina A e a homeostase de ferro no organismo (Garcia-Casal e Layrisse, 1998; Roodenburg *et al.*, 1996; Roodenburg *et al.*, 1994; Findlay e MacKenzie, 1992).

Dados experimentais em humanos e animais têm mostrado que os metabolismos de ferro e vitamina A podem interagir entre si. Essa interação foi primeiramente demonstrada com o efeito da vitamina A sobre o metabolismo de ferro, em que a deficiência da vitamina A resulta em anemia moderada, resposta imune fraca e dificuldade no reparo a danos epiteliais, tanto em animais quanto em humanos (Ameny *et al.*, 2002).

Nos indivíduos que sofrem de deficiência de vitamina A o ferro não é adequadamente incorporado pelas células vermelhas do sangue como em indivíduos saudáveis (Walczyk *et al.*, 2003), mostrando que a vitamina A é necessária para a eritropoiese. Uma correlação positiva entre os valores de retinol sérico e hemoglobina foi observada em crianças de alguns países como a Índia (Mohanram *et al.*, 1977), Guatemala (Mejia *et al.*, 1977), Indonésia (Semba *et al.*, 1992), África do Sul (Beynen *et al.*, 1992) e em modelos animais (Sijtsma e Van den Berg, 1993).

A suplementação com ferro e vitamina A aumentou significativamente a concentração de hemoglobina em crianças (Mejia e Chew, 1988) e em mulheres grávidas e anêmicas (Suharno *et al.*, 1993; Panth *et al.*, 1990) quando comparada à suplementação apenas com ferro.

Estudos têm demonstrado que a deficiência de vitamina A pode estar associada à anemia (Ettyang *et al.*, 2003; Bloem, 1995). Hodges e colaboradores (1978), ao analisarem alguns estudos feitos em pessoas cuja ingestão de vitamina A era baixa e a ingestão de ferro era adequada, encontraram uma correlação positiva entre os níveis de hemoglobina e os níveis de vitamina A no sangue, enquanto não foi observada relação entre os

níveis de hemoglobina e a ingestão de ferro. Além disso, a suplementação de vitamina A demonstrou aumentar os níveis de hemoglobina e ferritina no plasma (Zimmerman *et al.*, 2006; Semba *et al.*, 1992). A suplementação simultânea de vitamina A e de ferro apresentou uma melhor resposta no aumento da taxa de hemoglobina do que a suplementação separada destes dois nutrientes (Mwanri *et al.*, 2000).

Alternativamente, foi sugerido que a alta prevalência de infecções, frequentemente detectadas durante a deficiência de vitamina A, seja indiretamente responsável pela baixa concentração de hemoglobina, já que o organismo sequestra o ferro durante o processo de infecção (Thurnham, 1993).

Além do efeito que a vitamina A exerce sobre o processo de absorção, armazenamento, transporte e utilização do ferro no organismo, o ferro parece também atuar sobre o estado nutricional de vitamina A (Ameny *et al.*, 2002). A redução da ingestão de ferro resultou em uma redução nas concentrações de vitamina A plasmática (Jang *et al.*, 2000; Rosales *et al.*, 1999), enquanto que a suplementação com altas doses de Fe em gestantes demonstrou exercer um efeito similar sobre o estado nutricional de vitamina A quando comparado a mulheres que foram suplementadas apenas com vitamina A (Shatrugna *et al.*, 1997).

Tendo por base que em diversas áreas as deficiências de vitamina A e ferro ocorrem simultaneamente, Ameny e colaboradores (2002) realizaram um estudo simulando a recuperação da co-ocorrência dessas duas carências, com uma suplementação de vitamina A, ferro ou uma combinação dos dois, havendo melhora no quadro de ambas as deficiências e identificando uma forte interação entre esses micronutrientes.

Têm-se observado também que em condições de deficiência de vitamina A a severidade de algumas doenças infecciosas é aumentada, em especial aquelas associadas à diarreia. Estes resultados acarretam em inúmeros problemas de saúde em países em desenvolvimento, que recorrem a programas de suplementação (Ameny *et al.*, 2002).

Tais resultados são de importantes consequências nutricionais em países em que ocorre a dupla prevalência dessas deficiências, no que concerne à suplementação de ambos os nutrientes, como política pública em Saúde (Ameny *et al.*, 2002).

O mecanismo pelo qual a vitamina A melhora os *stati* de hemoglobina e ferro ainda não está completamente elucidado, mas os estudos sugerem que a vitamina A é necessária para a mobilização e utilização do ferro para síntese de hemoglobina (Van den Broek, 2003).

Vários mecanismos têm sido descritos na tentativa de explicar esta interação: a deficiência de vitamina A poderia diminuir a síntese de transferrina e assim reduzir o transporte de ferro, prejudicaria a captação de ferro pela medula óssea (Beynen *et al.*, 1992; Sijma e Van Den Berg, 1993), afetaria a mobilização de ferro armazenado (Mejia e Arroyave, 1982); esse último sendo corroborado por um estudo recente de Zimmerman e colaboradores (2006).

A hipovitaminose A promove o acúmulo do ferro nos tecidos e, conseqüentemente, aumenta a sua disponibilidade para a catálise de reações de oxidação, como a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). O fenótipo apresentado na deficiência de vitamina A é similar ao de indivíduos portadores de hemocromatose, ou seja, acúmulo de ferro em tecidos (Arruda *et al.*, 2009). Estes indivíduos apresentam frequentemente complicações como cirrose hepática, cardiomiopatia, diabetes e outras patologias, associadas aos danos oxidativos catalisados por ferro (Crichton *et al.*, 2002).

Arruda e colaboradores (2004) observaram que ratos com deficiência de vitamina A apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo que os ratos controle, e que a suplementação dos animais deficientes com uma fonte de β -caroteno reduziu significativamente o estresse oxidativo. 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 os outros achados que mostraram que a vitamina A de alguma maneira afeta o metabolismo de ferro e, ainda, que a vitamina A é um antioxidante, cujo mecanismo de ação pode ser mediado pela regulação do *status* de ferro no organismo.

A diminuição das concentrações de ferro e de hemoglobina no sangue, causados pela deficiência em vitamina A, parece estar ligada ao acúmulo deste mineral em alguns tecidos, como no baço e fígado. No entanto, esse mecanismo de acúmulo ainda está sendo investigado, possivelmente relacionado ao aumento na expressão de hepcidina, também observado nos animais deficientes em vitamina A (Arruda *et al.*, 2009).

As diversas alterações observadas na deficiência de vitamina A são devidas, possivelmente, à reduzida disponibilidade de receptores ligantes de ácido retinoico (RAR e RXR), amplificados pelas mudanças na expressão de diversos fatores de transcrição e do estado nutricional e endócrino dos animais (McClintick *et al.*, 2006), podendo ser esse, então, o mecanismo pelo qual a vitamina A interagiria com o metabolismo do ferro.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da deficiência de vitamina A, durante o período de depleção, nos níveis de transcrito dos transportadores de ferro no enterócito e no *status* de ferro em ratos.

3.2. Objetivos específicos

Analisar os níveis de transcrito do importador celular de ferro, DMT-1, em ratos com deficiência de vitamina A.

Analisar os níveis de transcrito do exportador celular de ferro, ferroportina, em ratos com deficiência de vitamina A.

Avaliar o efeito da deficiência de vitamina A sobre a concentração de ferro no intestino, fígado e baço, em ratos.

Avaliar o *status* de hemoglobina e a evolução ponderal de animais deficientes em vitamina A.

Analisar a evolução da concentração hepática de retinol dos ratos submetidos à deficiência de vitamina A.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram adquiridos do Biotério Central da Universidade de Brasília (Brasília-DF) 35 ratos machos, da raça Wistar, recém-desmamados, com 21 dias de idade. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, em biotério com ciclos de luz / escuridão de 12/12 horas e temperatura de 22 ± 2 °C. As dietas foram oferecidas no período das 16:00 às 8:00, com livre acesso à água.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB, UNBDOC nº 18996/2008.

4.2. Tratamento

Os animais passaram por um período de três dias de aclimação, ingerindo dieta padrão AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993), correspondendo à recomendação para roedores em crescimento.

No início do estudo, após o período de aclimação, cinco animais foram sacrificados, para determinação dos parâmetros basais (T_0). Os demais ratos foram aleatoriamente separados em dois grupos (15 ratos / grupo) e tratados com uma das seguintes dietas:

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

Todos os componentes da dieta foram fornecidos por Rhoster (São Paulo, SP, Brasil).

Após 15 (T_{15}), 30 (T_{30}) e 45 (T_{45}) dias de tratamento com uma das dietas descritas anteriormente, sacrificaram-se 5 animais de cada grupo por deslocamento cervical. O fígado, o baço e o intestino delgado foram retirados e lavados com solução salina a 4 °C para retirada do excesso de sangue. Os órgãos foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 ° C até a realização das análises.

O intestino delgado foi retirado descartando-se cerca de 1 cm após o piloro e 1 cm antes da válvula ileocecal, por se tratar de tecido de transição, e todo o tecido mesentérico e pancreático que envolve o intestino delgado dos ratos. O lúmen intestinal foi lavado com solução salina 0,9% a 4 °C.

Os reagentes e materiais utilizados nesse estudo eram livres de RNase ou ficaram imersos por 8 horas em solução de dietilpirocarbonato - DEPC (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) 0,1%, e posteriormente lavados três vezes em solução de DEPC 0,01% antes de serem utilizados.

4.3. Ganho de peso

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

4.4. Consumo de dieta

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

4.5. Extração, tratamento e quantificação de RNA

Os órgãos foram macerados em nitrogênio líquido em gral mortalha livre de RNase e amostras foram alíquotadas para extração do RNA.

O RNA total do intestino delgado dos animais foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), utilizando-se as recomendações do fabricante, como se segue: 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de TRIzol, utilizando-se um homogeneizador elétrico (Ultra-Turrax T8, IKA - Werke, Staufen, Alemanha). Após extração com clorofórmio (J. T. Baker, México) (0,2 mL/ 1 mL TRIzol), o RNA da fase aquosa foi precipitado com álcool isopropílico (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) (0,5 mL/100 mg de tecido), os tubos centrifugados a 10000g/4 °C (1200rpm) (centrífuga Eppendorf, 5415R, Hamburgo, Alemanha), o RNA foi lavado com etanol (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) 70%, e depois de secar foi dissolvido em água deionizada (MilliQ Plus, Millipore, São Paulo, Brasil).

Após extração, as amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 RNase Free- DNase Kit; Promega, Madison, WI, EUA), utilizando-se o protocolo do fabricante: 10 µL da amostra foram transferidos para um novo tubo e tratados com 10 µL de tampão 10x; RQ1 RNase-free DNase (1 u/µg RNA) e água livre de nuclease para um volume final de 100 µL. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min e a reação interrompida através da adição de 10 µL de RQ1 DNase Stop Solution e incubação a 65 °C por 10 min, para inativação da DNase. O RNA foi extraído novamente com reagente TRIzol, como descrito anteriormente, quantificado a 260 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV-Visible, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra), e o grau de pureza determinado pela razão de densidade óptica 260/280nm.

Determinação da concentração de RNA:

$$[\text{RNA}] = 40 \times A_{260} \times D$$

Onde:

[RNA]: concentração de RNA total, em µg/mL,

A₂₆₀: = leitura espectrofotométrica de absorbância no comprimento de onda 260nm,

D: diluição empregada, em número de vezes diluídas.

4.6. Síntese da primeira fita de cDNA

Posteriormente foi sintetizado o DNA complementar (cDNA), a partir do RNA tratado com DNase, utilizando-se o Kit Improm II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EUA): a 10 µg de RNA foram adicionados os oligos (dT) e a mistura foi submetida a desnaturação a 70 °C por 5 min. Em seguida, a enzima Improm-IITM transcriptase reversa foi adicionada e a reação incubada a 42 °C por 50 min. A reação foi interrompida com incubação a 70 °C por 15 min.

4.7. Verificação de contaminação por DNA genômico

Quando da síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa, realizaram-se os mesmos procedimentos com um controle sem a enzima para cada amostra. Uma alíquota desta reação controle (sem transcriptase reversa)

foi submetida a RT-PCR, empregando-se o sistema de reação apresentado na Tabela 4 e os oligonucleotídeos mostrados na Tabela 5:

Tabela 4. Sistema da RT-PCR

Reagente	Quantidade (µL)	Fornecedor
Tampão 10x	1	Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil
Taq Polimerase (5 u/µL)	1	Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil
MgCl ₂ (50 µmol/L)	0,3	Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil
dNTP (10 mmol/L)	0,5	Sigma, Saint Louis, MO, EUA
Oligonucleotídeo iniciador <i>forward</i> (10 µmol/L)	0,1	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, EUA
Oligonucleotídeo iniciador reverso (10 µmol/L)	0,1	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, EUA
cDNA	0,4	-
Água deionizada	6,6	-
Volume final	10	-

As amostras foram submetidas a PCR em termociclador (Esco, Swift Maxi, Hatboro, PA, EUA), utilizando-se os seguintes parâmetros de amplificação:

- DMT-1: desnaturação inicial a 94 °C / 1 min, seguida de desnaturação a 94 °C / 30 s, hibridação a 50 °C / 40 s e alongação a 72 °C / 40 s, por 40 ciclos.
- FPN: desnaturação inicial a 94 °C / 1 min, seguida de desnaturação a 94 °C / 30 s; hibridação a 60 °C / 30 s e alongação a 70 °C / 2 min, por 40 ciclos.

Uma alíquota da reação de RT-PCR foi submetida a eletroforese (Thermo Scientific, Owl Easycast B1, Portsmouth, NH, EUA) em gel de agarose 1% (Invitrogen, Espanha), em tampão TEB 0,5x (tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; EDTA: Sigma, Saint Louis, MO, EUA; boro: Vetec), corado com 0,2 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Os produtos da reação foram analisados utilizando-se o *software* LabImage 1D (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Alemanha) para confirmar a ausência de material genético amplificado.

Tabela 5. Sequências de oligonucleotídeos empregados na qRT-PCR e RT-PCR

Gene	Oligonucleotídeo (5' - 3')	Transcrito (bp)	Código no GeneBank
DMT ¹ -1	CTGATTTACAGTCTGGAGCAG (<i>forward</i> ²)	134	NM_013173
	CACTTCAGCAAGGTGCAA (<i>reverso</i> ²)		
Ferroportina	TTCCGCACTTTTCGAGATGG (<i>forward</i> ³)	106	AF394785
	TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT (<i>reverso</i> ³)		
β-actina	GTCGTACCACTGGCATTGTG (<i>forward</i> ⁴)	181	NM_031144
	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA (<i>reverso</i> ⁴)		

¹ - Transportador de metal divalente

²- Desenhado no *software* PrimeTime qPCR Assay, disponível em URL: <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/>

³- Retirado de Christiansen *et al.*, 2007.

⁴- Retirado de Wang *et al.*, 2008.

4.8. Amplificação e análise dos genes de interesse

Os genes de interesse, DMT-1 e ferroportina, e o gene constitutivo, β-actina, foram amplificados utilizando-se a reação de polimerização em cadeia em tempo real (qRT-PCR) (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura), empregando-se o sistema de reação descrito na Tabela 6 e as sequências de oligonucleotídeos descritas na Tabela 5.

Tabela 6. Sistema da qRT-PCR

Reagente	Quantidade (μL)	Fornecedor
Fast SYBR® Green Master Mix 2x	5	Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA
Oligonucleotídeo <i>forward</i> (10 $\mu\text{mol/L}$)	0,2	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, EUA
Oligonucleotídeo reverso (10 $\mu\text{mol/L}$)	0,2	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, EUA
cDNA	4,6	-
Volume final	10	-

Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação a 95 °C / 20 s; hibridação 60 °C / 3 s e alongação a 60 °C / 20 s, por 50 ciclos. Após a amplificação foi realizada a curva de dissociação do produto amplificado para verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos e/ou outros produtos não específicos.

Foi feita, então, a análise dos valores para um limiar de amplificação T (*threshold*) de 0,2 (unidades arbitrárias de fluorescência), ou seja, a quantidade de ciclos de amplificação em que a amostra atingia um valor de intensidade de fluorescência igual a 0,2. Os valores obtidos para β -actina foram subtraídos dos valores para DMT-1 e ferroportina, e determinado o ΔC_t . Utilizou-se a razão dos ΔC_t como parâmetro de comparação dos níveis de transcrito, conforme Peinnequien e colaboradores (2004).

4.9. Dosagem de hemoglobina

A concentração de hemoglobina foi determinada em contador de células (Coulter Corporation, T-890, Miami, FL, EUA).

4.10. Teor de ferro nos tecidos

Foram utilizados aproximadamente 0,1 g de fígado e baço, e 0,4 g de intestino para determinação da concentração de ferro. Na cápsula de digestão foram adicionados às amostras 5 mL de HNO_3 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e

2,5 mL de H₂SO₄ (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As amostras foram então digeridas em forno micro-ondas (Provecto Analítica, DGT 100 Plus, São Paulo, SP, Brasil), de acordo com a metodologia descrita por Baranowska *et al.* (1995), utilizando-se o seguinte programa: 5 min – 330 W; 6 min – 700 W ; 1 min – 800 W; 20 min – 0 W (resfriamento).

Após a digestão, o volume das amostras foi ajustado para 25 mL com HNO₃ 0,1 mol/ L, filtradas em papel de filtro quantitativo faixa preta (J. Prolab, JP41, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e armazenadas em tubos sob refrigeração. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP-AES, Spectro Analytical Instruments, Shapes-Spectroflame Modulates, Kleve, Germany), utilizando-se uma curva padrão construída com padrão de ferro (Titrisol, Merck, Darmstadt, Alemanha) nas seguintes concentrações 0,04; 0,4; 2,5; 5,0; 10 ppm e comprimento de onda 238 nm. 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, MD, EUA), analisada em triplicata. A exatidão obtida foi de 86%. Todas as vidrarias utilizadas na realização das análises foram imersas em HCl 10% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 3 h, e posteriormente lavadas com água deionizada (MilliQ Plus, Millipore, São Paulo, Brasil).

4.11. Teor de retinol hepático

A concentração de retinol hepático foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), segundo método descrito por Tanumihardjo e Penniston (2002). Todo processo foi realizado à meia-luz.

Uma amostra de aproximadamente 0,1 g de fígado foi macerada em homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax T8, IKA - Werke, Staufen, Alemanha) à temperatura de 4 °C, posteriormente ressuspendido em etanol (J. T. Baker, México) (1,5x volume) e agitado durante 15 segundos em vortex (B. Braun Biotech International, Certomat MV, Melsungen, Alemanha). Ao

homogeneizado foi acrescentado KOH 50% (J. T. Baker, México) (0,8x volume), em seguida agitado durante 15 segundos e depois incubado em banho-maria (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 50 °C, durante 30 minutos. As amostras foram homogeneizadas a cada 15 minutos por aproximadamente 15 segundos durante o período de incubação. Após a saponificação, o retinol foi extraído com hexano pureza HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha) (2x volume) por 3 vezes.

A extração foi feita da seguinte forma: após a adição do hexano, a amostra foi homogeneizada em vortex durante 30 s, sendo, posteriormente, centrifugada a 1000g (centrífuga Janetzki, T24, Engelsdorf-Leipzig, Alemanha) durante 3 minutos para a separação das fases. A fase menos densa, que continha o hexano, foi retirada e transferida para um tubo limpo, onde o hexano foi evaporado com nitrogênio gasoso e o extrato estocado a -70 °C em microtubos protegidos da luz, para evitar oxidação, até leitura no HPLC.

A separação e identificação da molécula de retinol foram feitas utilizando o Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), em coluna CLC-ODS (M) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), com fluxo de 1 mL/ min, fase móvel metanol/ água (95:5) e detecção em 325 nm. Para obtenção do perfil cromatográfico, o extrato foi diluído em 2 mL de etanol pureza HPLC (J. T. Baker, México), filtrada em filtro de membrana de nylon 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Whatman, Maidstone, Inglaterra). 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 *trans*-retinol sintético (retinol ≥ 99% - HPLC, Fluka Chemika, Buchs, Suíça) diluído em etanol. A concentração da solução anterior foi calculada a partir da absorbância obtida a 325 nm em espectrofotômetro, 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 ($y = 3,8547 \cdot 10^{-9}x + 0,001188$; $R^2 = 0,9998$).

4.12. Análise estatística

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

5. RESULTADOS

A partir do 15º dia de tratamento o Grupo -VA apresentou redução significativa na concentração de retinol hepático em relação ao grupo Controle ($p = 0,0007$). Após o 30º dia de tratamento, não foi mais possível quantificar a concentração de retinol no fígado dos animais -VA pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Tanumihardjo e Penniston, 2002). O grupo Controle apresentou um aumento significativo no teor de retinol hepático após 45 dias de tratamento em relação a T₁₅ ($p = 0,0106$) (Figura 16).

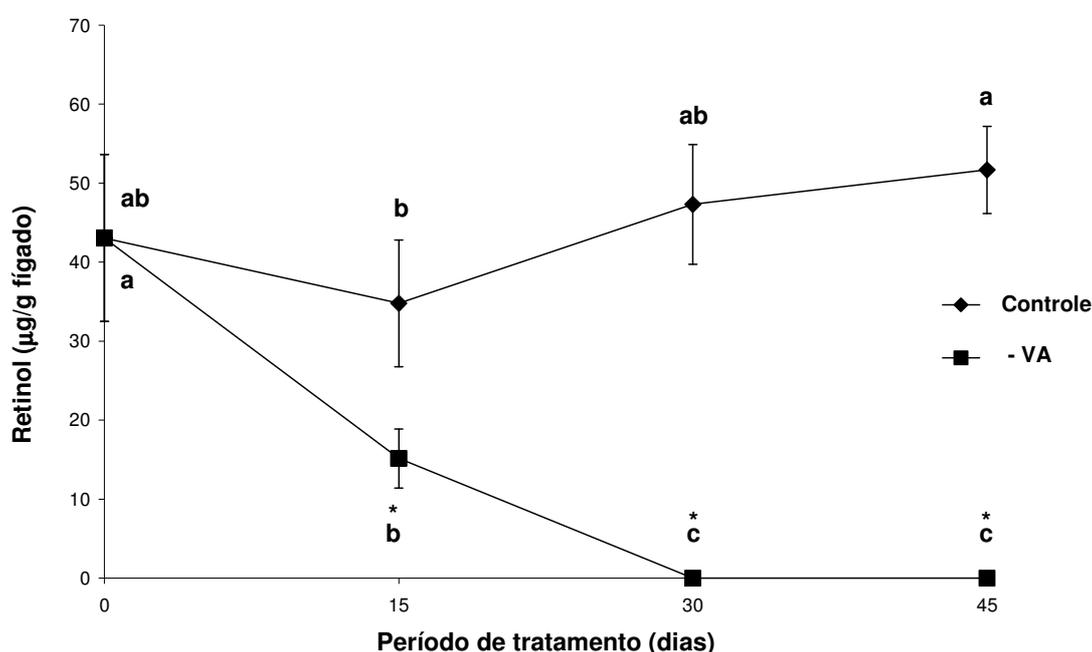


Figura 16. Concentração de retinol hepático dos grupos Controle e Deficiente em vitamina A (-VA). Média \pm desvio padrão, $n = 5$. Letras diferentes: comparação intragrupo, para os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento ($p < 0,001$).

Não houve diferença significativa no consumo diário de dieta entre os tipos de tratamento. No grupo Deficiente em vitamina A, a ingestão de dieta

aos 45 dias foi significativamente menor do que aos 15 dias ($p = 0,0111$) (Figura 17).

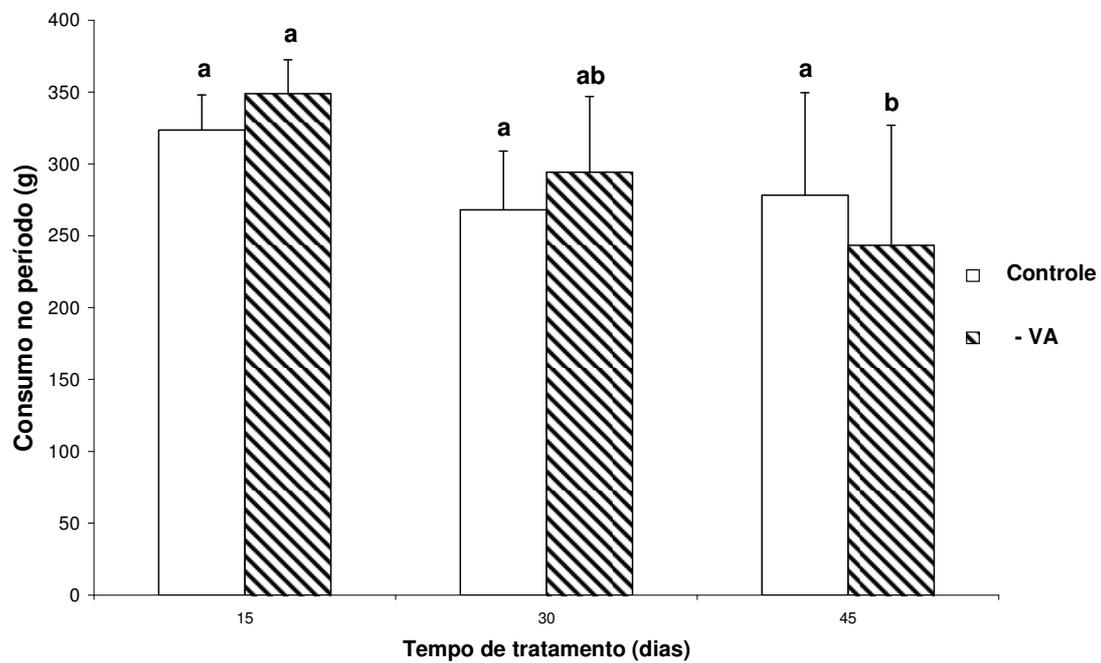


Figura 17. Consumo diário de dieta dos animais dos grupos Controle e Deficiente em vitamina A (-VA), peso seco, após 15, 30 e 45 dias de tratamento. Média \pm desvio padrão, $n = 5$. Letras diferentes: comparação intragrupo, para os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos, no mesmo período de tratamento.

Houve uma redução do ganho de peso dos animais Controle e Deficiente em vitamina A ao longo do tratamento (Figura 18).

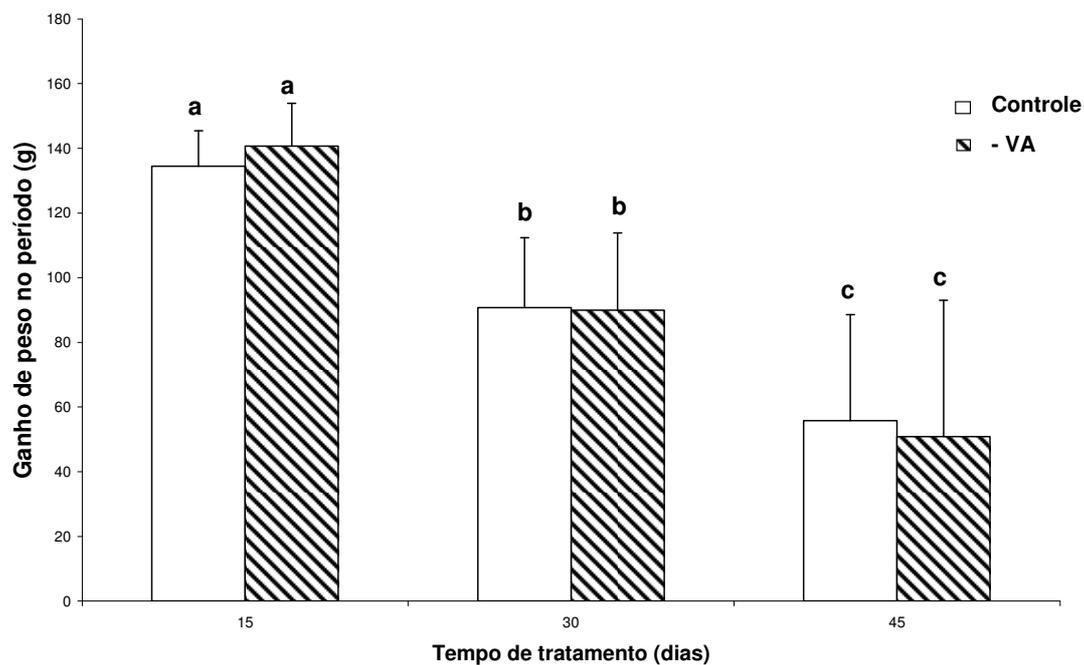


Figura 18. Ganho de peso dos animais dos grupos Controle e Deficiente em vitamina A (-VA) após 15, 30 e 45 dias de tratamento. Média \pm desvio padrão, $n = 5$. Letras diferentes: comparação intragrupo, para os diferentes períodos de tratamento ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os tipos de tratamento.

Houve um aumento significativo na concentração de hemoglobina dos ratos, após 15 dias de tratamento, mantendo-se constante durante os 45 dias de tratamento, em ambos os grupos CT e -VA (Figura 19).

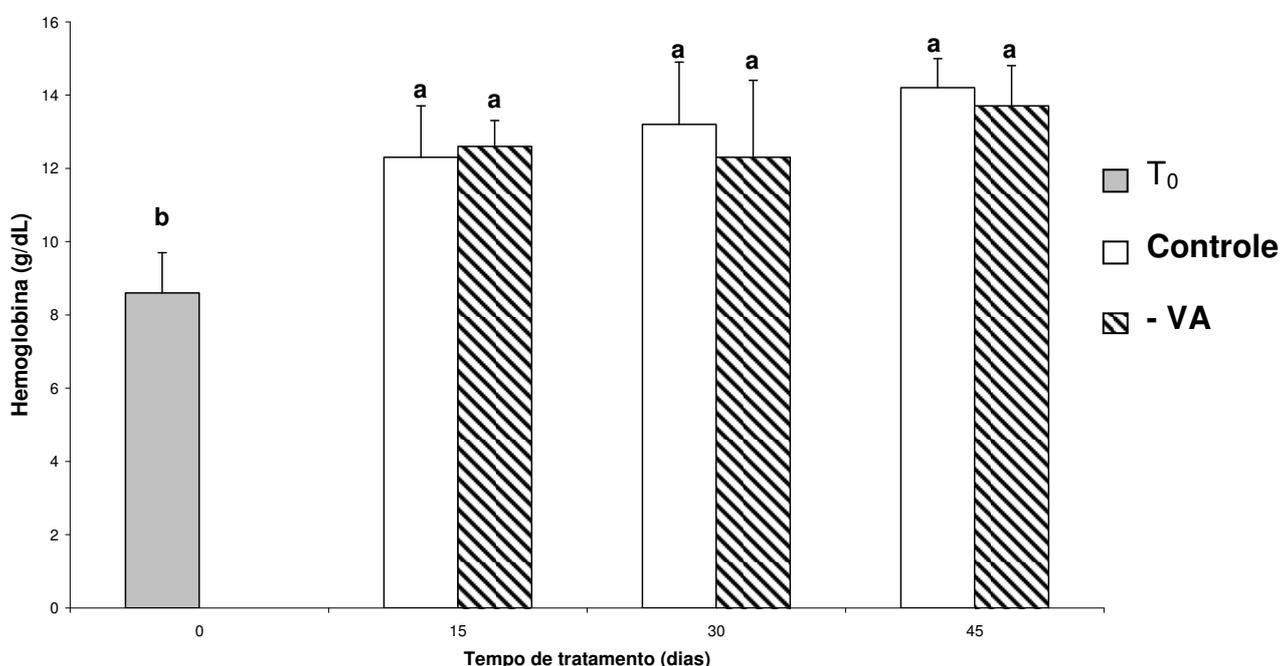


Figura 19. Concentração de hemoglobina nos grupos Controle, Deficiente em vitamina A (-VA) e período basal (T₀). Média ± desvio padrão, $n = 5$. Letras diferentes: comparação intragrupo, para os quatro períodos de tratamento ($p < 0,05$). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento ($p < 0,05$).

A Figura 20A apresenta os níveis intestinais de ferro dos ratos tratados com dieta Controle e Deficiente nos quatro períodos de tratamento. Na figura pode ser observado que o grupo controle apresenta uma oscilação no conteúdo de ferro intestinal durante todo o período de tratamento. No início do tratamento, aos 15 dias, houve um aumento significativo na concentração de ferro intestinal em relação ao período basal ($p < 0,0000$). Entretanto aos 30 dias ocorreu uma redução significativa em relação a T₀ e ao 15º dia de tratamento ($p = 0,0071$ e $p = 0,0308$, respectivamente), retornando no 45º dia ao valor encontrado com 15 dias de tratamento. Nos animais do grupo -VA os teores de ferro nos enterócitos se mantiveram constante durante os 30 dia de tratamento, tornando-se significativamente maior aos 45 dias ($p = 0,0007$). Na comparação entre os grupos, pode ser observado que os animais deficientes

em vitamina A apresentaram menor concentração de ferro intestinal em relação aos animais do grupo Controle, durante os 30 primeiros dias de tratamento ($p = 0,0021$ e $p = 0,0016$; para T_{15} e T_{30} , respectivamente). Entretanto, 45 dias após a depleção, os ratos Deficientes em vitamina A apresentaram um aumento significativo na concentração de ferro intestinal, atingindo os níveis de ferro encontrados nos animais do grupo Controle (Figura 20A).

No fígado, a concentração de ferro apresentou um aumento significativo aos 30 dias, tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Deficiente em vitamina A em relação ao 15º dia de tratamento ($p = 0,0309$ e $p < 0,0000$; respectivamente). O grupo Deficiente em vitamina A apresentou uma redução no teor de ferro hepático entre 30 e 45 dias de tratamento ($p = 0,0142$). Entretanto, essa redução não produziu alteração significativa no teor de ferro do fígado dos ratos Deficientes, quando comparado com o grupo Controle (Figura 20B).

Semelhantemente ao observado no intestino, no baço dos animais Controle pode ser observada uma visível oscilação na concentração de ferro intestinal. Com 15 dias de tratamento, os ratos apresentaram um aumento significativo em relação ao T_0 ($p = 0,0029$), sofrendo um redução significativa após os 30 dias em relação a 15 dias ($p = 0,0108$) e, novamente, há um aumento, aos 45 dias de tratamento ($p < 0,0000$), em relação a 30 dias. No baço dos animais -VA é observada uma clara tendência no aumento gradativo do teor de ferro. A análise comparativa evidencia que o grupo Controle apresenta menor teor de ferro no baço em relação ao grupo Deficiente em vitamina A ($p = 0,0046$), aos 30 dias, entretanto, após 45 dias de tratamento (T_{45}), não é mais detectada diferença significativa nos níveis de ferro, entre os dois grupos (Figura 20C).

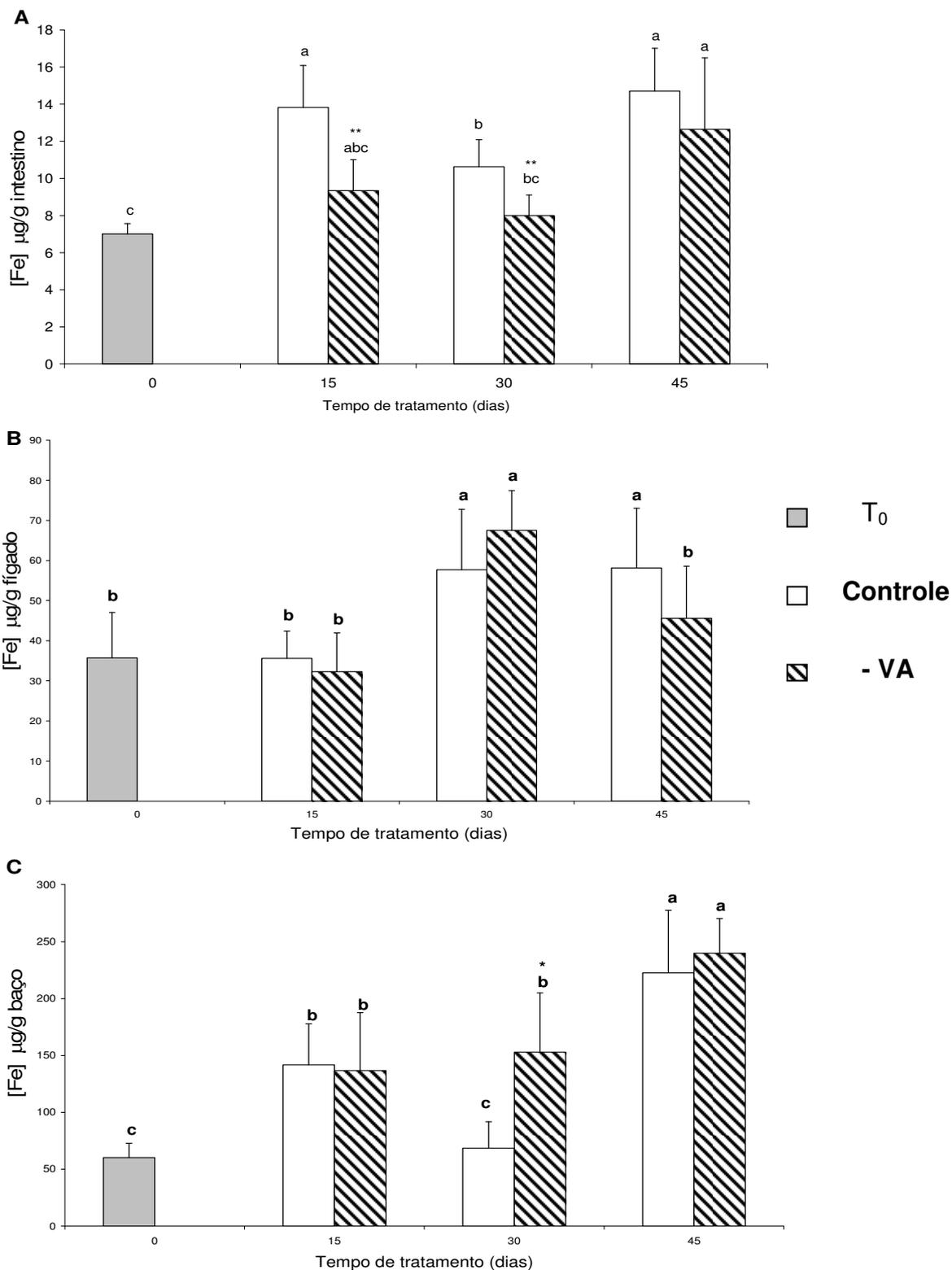


Figura 20. Concentração de ferro no intestino (A), fígado (B) e baço (C) para os grupos Controle, Deficiente em vitamina A (-VA) e Período basal (T₀). Média ± desvio padrão, *n* = 5. Letras diferentes: comparação intragrupo, para os quatro períodos de tratamento (*p*<0,05). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento (**p*<0,05; ***p*<0,001).

Os níveis de mRNA do DMT-1 e da ferroportina, normalizadas em relação à β -actina, não apresentaram diferença significativa quando comparados os diferentes tipos de tratamento (Figuras 21 e 22).

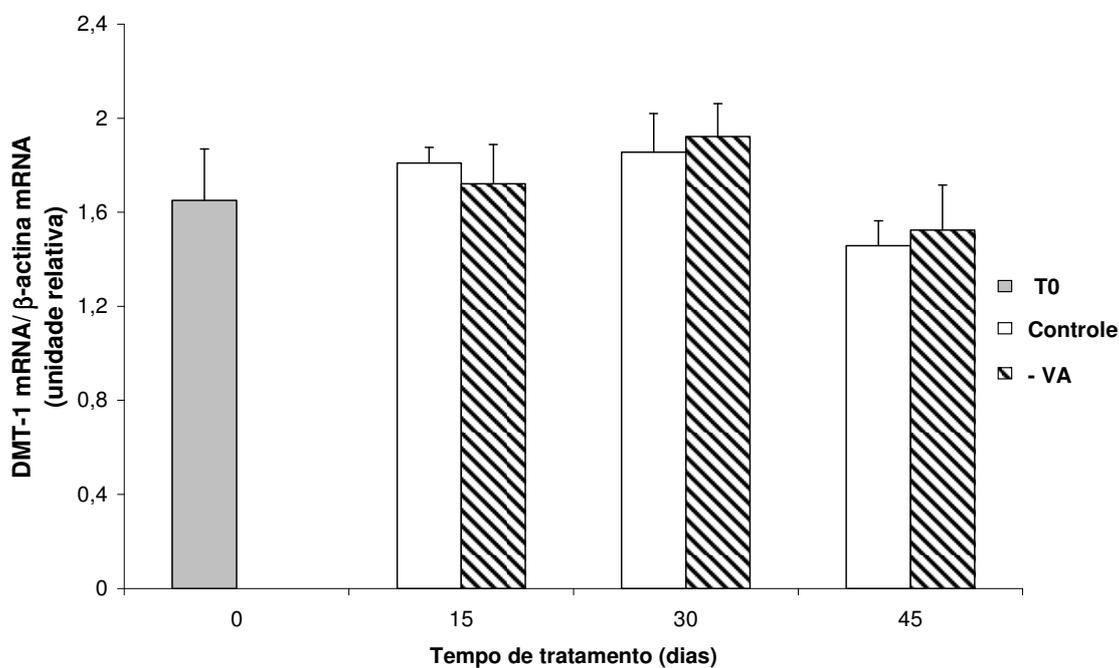


Figura 21. Efeito da deficiência de vitamina A nos níveis de mRNA do transportador de metal divalente do intestino de ratos, tratados com dieta Controle e Deficiente em vitamina A, por 0, 15, 30 e 45 dias. Apresentado como razão entre os C_t de DMT-1 e β -actina, dos grupos Controle, Deficiente em vitamina A (-VA) e Período basal (T_0). Leitura em *threshold* de 0,2. Média \pm desvio padrão, $n = 5$. Não houve diferença significativa nos níveis de DMT-1 entre os grupos nos diferentes períodos de tratamento ou intragrupo em relação ao T_0 .

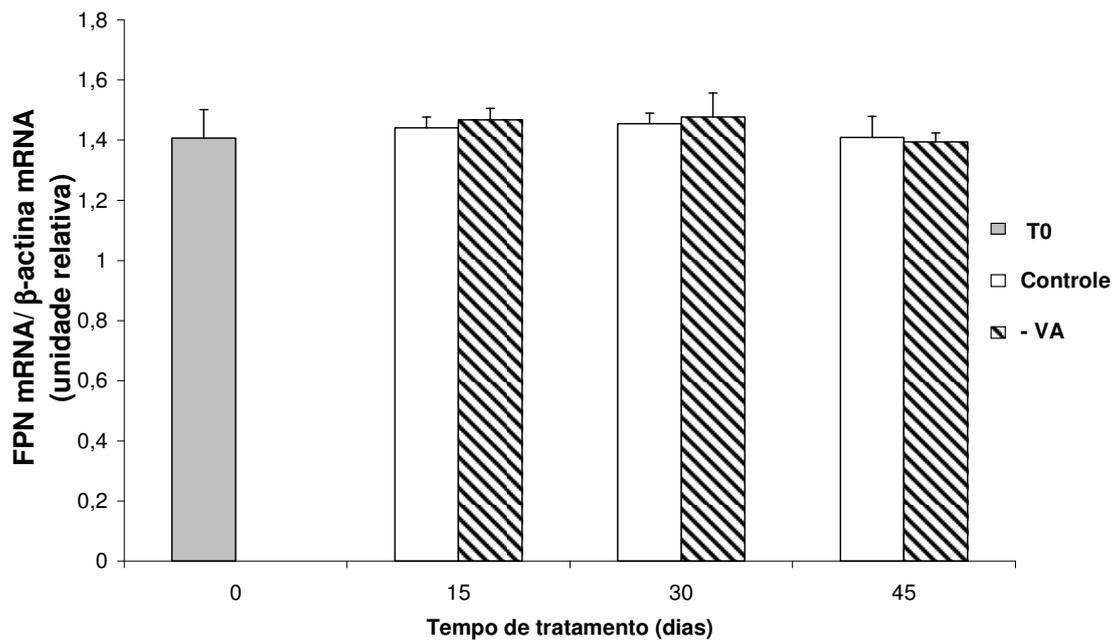


Figura 22. Efeito da deficiência de vitamina A nos níveis de mRNA de ferroportina do intestino de ratos, tratados com dieta Controle e Deficiente em vitamina A, por 0, 15, 30 e 45 dias. Apresentado como razão entre os C_t de FPN e β -actina, dos grupos Controle, Deficiente em vitamina A (-VA) e Período basal (T_0). Leitura em *threshold* de 0,2. Média \pm desvio padrão, $n = 5$. Não houve diferença significativa nos níveis de FPN entre os grupos nos diferentes períodos de tratamento ou intragrupo em relação ao T_0 .

As correlações de Pearson foram calculadas para: DMT-1 e concentração de ferro no intestino; DMT-1 e concentração de ferro no fígado; FPN e concentração de ferro no intestino; FPN e concentração de ferro no fígado; concentração de ferro no fígado e hemoglobina; concentração de ferro no intestino e no fígado; e concentrações hepáticas de ferro e de retinol. Entretanto, nenhum dos dados apresentou significância.

6. DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado uma estreita correlação entre os *status* de ferro e de vitamina A no organismo (Arruda *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 2006; Walczyk *et al.*, 2003; Ameny *et al.*, 2002), entretanto, os mecanismos moleculares dessa interação ainda não estão devidamente esclarecidos.

Nos mamíferos, as células estreladas do fígado constituem o principal reservatório de armazenamento de vitamina A no organismo. Desta forma, a depleção desta reserva, estabelece a deficiência de vitamina A sistêmica.

Em situações de depleção de vitamina A, os níveis de retinol hepático vão sendo reduzidos gradativamente, à medida que ocorre sua liberação para o plasma e consumo nos tecidos, decorrente das demandas fisiológicas (Davila *et al.*, 1985).

No presente estudo, ratos Wistar, recém desmamados, submetidos a uma dieta deficiente em vitamina A, apresentaram, após 15 dias, depleção parcial das reservas hepáticas (redução de cerca de 50%) e total, aos 30 dias de tratamento (Figura 16). Estudos realizados em ratos evidenciam uma redução de retinol sérico também gradativa em animais depletados de vitamina A (Ghenimi *et al.*, 2009). Os efeitos da deficiência de vitamina A são observados apenas após a depleção dos estoques corporais e da consequente diminuição dos níveis de retinol plasmático.

Sendo os alimentos a única fonte de vitamina A em animais, uma baixa biodisponibilidade na dieta pode alterar o *status* desta vitamina no organismo (Zimmerman *et al.*, 2006; Walczyk *et al.*, 2003; Ameny *et al.*, 2002; Yeum e Russell, 2002). No presente estudo a redução na concentração de retinol hepático observada no grupo Controle, durante a primeira quinzena de tratamento, pode ser explicada por uma adaptação fisiológica. Considerando-se que os animais passaram de uma alimentação predominantemente rica em vitamina A na forma de retinil (leite materno), para uma alimentação com dieta sólida, de menor biodisponibilidade de vitamina A. No período posterior, após 30 dias com a dieta Controle, a concentração de retinol hepático atinge os valores basais, sugerindo uma adaptação dos animais, posterior à dieta sólida oferecida, refletida no aumento dos estoques hepáticos de retinol.

Alguns estudos têm demonstrado que a deficiência de vitamina A compromete o desenvolvimento físico (Evan-Brian *et al.*, 1994). No presente

estudo a estreita correlação entre níveis hepáticos de retinol e consumo de dieta sugere um efeito anoréxico da deficiência de vitamina A nos ratos (Figuras 16 e 18). Entretanto, esta redução marginal no consumo de dieta dos ratos depletados em vitamina A durante 45 dias não foi suficiente para provocar redução no ganho de peso dos animais (Figura 18).

Os valores de concentração de hemoglobina variaram de acordo com um perfil fisiológico de desenvolvimento normal, em que os animais do período basal (T_0) apresentaram níveis menores, que se normalizaram a partir do 15º dia, mantendo-se sem alterações ao longo do experimento (Figura 19). Os menores valores observados em T_0 podem ser explicados pelo fato de os animais desse grupo terem se alimentado previamente apenas de leite materno, que possui a maior parte do ferro ligado à lactoferrina, que reduz a biodisponibilidade do ferro proveniente do leite (Dunn *et al.*, 2006), ou seja, durante o período de amamentação o surgimento de uma leve deficiência de ferro é considerado fisiológico.

Após a introdução da alimentação sólida, com teores de ferro mais elevados e apresentando maior biodisponibilidade de ferro, na forma de sulfato ferroso, os valores de hemoglobina aumentaram na primeira quinzena de tratamento, em ambos os grupos, apesar da depleção de vitamina A, e se estabilizaram, não havendo variações ao longo do experimento (Figura 19).

Estes resultados sugerem que a depleção de vitamina A dietética não interfere na síntese de hemoglobina. Entretanto, a depleção total das reservas hepáticas de ferro só foi observada após 30 dias de tratamento com dieta deficiente em vitamina A. Desta forma, os efeitos sobre a hematopoiese podem ter sido postergados pelo eficiente papel do fígado como provedor de vitamina A para as demandas fisiológicas. Os resultados contraditórios na literatura, referentes ao efeito da deficiência de vitamina A na concentração de hemoglobina podem ser devidos a períodos de depleção diferentes (Lechtig *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 2006).

No baço e intestino a oscilação na concentração de ferro observada no grupo Controle na primeira quinzena de tratamento (T_{15}) fortalece a tese de uma maior biodisponibilidade do ferro na dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) em relação ao leite (Figuras 20A e 20C). A variação observada ao longo do período de tratamento na concentração de ferro nestes dois órgãos decorre,

provavelmente, da adaptação fisiológica do intestino e baço – responsáveis pela fonte exógena e endógena de ferro (homeostase do ferro no organismo) –, às necessidades fisiológicas do animal em crescimento.

No fígado dos animais do grupo Controle não foi observado aumento na concentração de ferro na primeira quinzena (T₁₅), mas na segunda quinzena de tratamento (T₃₀). O aumento de ferro no fígado, simultâneo à redução de ferro no intestino e baço, sugere uma eficiência maior na exportação do ferro intestinal e esplênico para os outros órgãos, via corrente sanguínea, ou seja, sugere um aumento de ferro sérico, que deverá ser transportado e absorvido nos outros órgãos, dentre eles o fígado que é o principal órgão de estoque de ferro (Figura 20B).

De acordo com Frazer e Anderson (2003), um aumento nos teores de ferro sérico induziria a secreção de hepcidina hepática, hormônio que regula a homeostase do ferro, induzindo a internalização da ferroportina (Nemeth *et al.*, 2004), proteína exportadora de ferro dos enterócitos e macrófagos do baço.

No presente estudo, o acúmulo de ferro intestinal e no baço, observado no grupo Controle aos 45 dias de tratamento, pode ter sido resultante desse mecanismo de regulação, que responde às concentrações séricas de ferro, ou seja, à saturação de transferrina. Em resumo, a flutuação nos níveis de ferro do intestino e baço, observada no grupo Controle, poderia ser explicada, então, por duas razões principais: 1) aumento da biodisponibilidade do ferro dietético na primeira quinzena e, 2) alterações na concentração de ferro sérico, decorrentes do aumento da demanda (crescimento e manutenção das atividades vitais).

Devido ao envolvimento da vitamina A na regulação da expressão de vários genes, como reportado na literatura (McClintick *et al.*, 2006), associado aos efeitos da deficiência da vitamina A no *status* de ferro, observado em mamíferos (Zimmerman *et al.*, 2006; Ameny *et al.*, 2002; Yeum e Russel, 2002; Thurnham, 1993), as alterações observadas nos níveis de ferro intestinais e no baço dos animais Deficientes em vitamina A em relação ao Controle podem ter sido resultantes da alteração na expressão das duas proteínas transportadoras de ferro, DMT-1 (importador de ferro no lúmen intestinal) e ferroportina (exportador de ferro nos enterócitos e nos macrófagos), mediados pelo ácido retinoico.

Entretanto, apesar da variação nos teores de ferro intestinal e esplênico observada nos animais Deficientes em vitamina A em relação ao Controle (Figuras 20A e 20C), no presente estudo não foi observada alteração significativa nas quantidades de mRNA de DMT-1 e ferroportina intestinais entre os dois grupos (Figura 21 e 22). Estes resultados sugerem que o controle absorptivo mediado pela vitamina A não ocorreria diretamente sobre os níveis de transcrito de DMT-1 e ferroportina.

A relação entre a vitamina A e os níveis de mRNA de hepcidina, em ratos, foi recentemente identificado em nosso laboratório (Arruda *et al.*, 2009). Este estudo mostrou que ratos com deficiência em vitamina A apresentavam aumento dos níveis de transcrito de hepcidina e aumento significativo no teor de ferro no baço. Nemeth e colaboradores (2004) mostraram em cultura de células que o efeito da hepcidina no *status* de ferro ocorreria através da internalização da ferroportina, e não por alteração nos níveis de mRNA dessa proteína ou de DMT-1.

Essa regulação pós-traducional feita pela hepcidina sobre a ferroportina, somaria-se ainda ao esquema proposto por Oates (2007), pelo qual a hepcidina estaria envolvida na diminuição da absorção de ferro (Figura 23).

Em sua revisão, Oates (2007) acrescenta ao modelo de Nemeth e colaboradores (2004) uma interação entre ferroportina e DMT-1, mediada pela hepcidina. Neste modelo, o autor sugere que tanto o DMT-1 quanto a ferroportina apical são constitutivamente internalizados, em um processo cíclico, retornando à membrana apical. Entretanto, quando da presença de hepcidina, a ferroportina da membrana basolateral é internalizada, sendo encaminhada ao mesmo compartimento em que se encontram a ferroportina apical e o DMT-1. No endossoma, as ferroportinas provenientes das membranas apical e basolateral, ligadas à hepcidina, são degradadas. A degradação da ferroportina apical impediria, então, o retorno do DMT-1 à membrana, permanecendo internalizado e reduzindo o potencial absorptivo da célula, conforme mostrado na Figura 23.

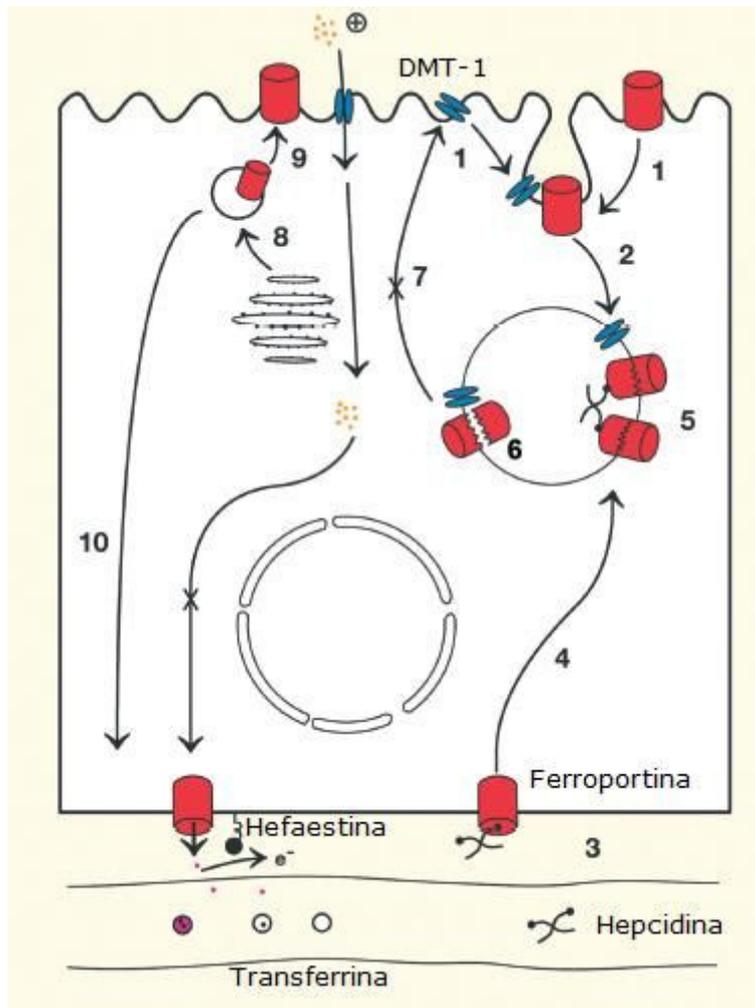


Figura 23. Mecanismo proposto para a diminuição de absorção de ferro induzida pela hepcidina. Em circunstâncias normais, ferroportina e DMT-1 encontram-se na membrana apical e, constitutivamente, sofrem endocitose (1). O endossoma primário se funde ao endossoma tardio (2). A hepcidina bioativa forma oligômeros que se ligam à ferroportina na membrana basal (3), desencadeando a internalização da ferroportina da membrana basal para o mesmo endossoma em que se encontra a ferroportina da membrana apical (4), também se ligando à hepcidina (5). A ferroportina é então encaminhada ao lisossoma para degradação (6). Ao se degradar a ferroportina da membrana apical, isso impediria o DMT-1 de retornar à membrana, resultando em um decréscimo da taxa absorptiva (7). Após a normalização dos níveis de ferro, nova ferroportina é sintetizada pelo retículo endoplasmático rugoso (8), encaminhando-se para as membranas apical (9) ou basolateral (10). Adaptado de Oates, 2007.

Juntando-se o modelo proposto por Oates (2007) e o aumento da expressão de hepcidina hepática em ratos deficientes em vitamina A, observado por Arruda e colaboradores (2009), o acúmulo de ferro no intestino dos animais submetidos à deficiência em vitamina A por 45 dias, observado no presente estudo, poderia ser decorrente do aumento da expressão de

hepcidina, que inicialmente, ao internalizar a ferroportina basolateral, reduziria a exportação de ferro do intestino e do baço, acarretando no acúmulo de ferro nesses dois órgãos. Entretanto, à medida que a ferroportina basolateral é internalizada, o DMT-1 permaneceria impedido de retornar à membrana apical, resultando também na redução da absorção do ferro intestinal. No baço, apenas a exportação estaria comprometida, posto que a entrada de ferro nos macrófagos ocorre principalmente via fagocitose de hemácias senescentes. O aumento mais significativo de ferro no baço que o observado no intestino dos ratos deficientes em vitamina A no período de 30 a 45 dias de tratamento, quando o estoque de ferro está completamente esgotado, e, provavelmente, os níveis de hepcidina já aumentados, favorece o modelo de Oates (2007).

Por esse mecanismo, a deficiência de vitamina A não alteraria os níveis de mRNA do DMT-1, conforme demonstrado nesse estudo, mas agiria indiretamente sobre a proteína DMT-1, via hepcidina, em uma regulação pós-traducional.

Pode-se argumentar que a regulação depois da tradução, ou seja, após a proteína formada, visando internalizá-la e/ou desativá-la, em vez de uma regulação transcricional, seria mais dispendiosa ao organismo. Entretanto, deve-se considerar que, por se tratar de um órgão absorptivo, a regulação de proteínas pós-transcrição seria estratégica devido às constantes flutuações nos níveis de nutrientes provenientes da dieta.

A disponibilidade das proteínas transportadoras de ferro permitiria, pois, o ajuste imediato da absorção e exportação de ferro, conforme as modulações dietéticas e fisiológicas do organismo. Ou seja, a regulação dessas proteínas em nível transcricional seria um processo mais demorado (Nelson e Cox, 2000), o que dificultaria a adaptação imediata do animal às flutuações frequentes na dieta. Todavia, a possibilidade de existir uma regulação em nível transcricional em outros órgãos relacionados ao metabolismo do ferro deve ser ainda investigada.

7. CONCLUSÃO

A tese de que o mecanismo de interação molecular da vitamina A no metabolismo de ferro ocorre por meio da regulação da expressão gênica das proteínas transportadoras de ferro no intestino (DMT-1 e ferroportina) foi testada no presente estudo. A análise dos níveis de mRNA por PCR em tempo real mostrou não haver alteração em suas concentrações, tanto do DMT-1 quanto da ferroportina, nos ratos tratados com dieta deficiente em Vitamina A, por 45 dias, em relação ao grupo Controle. Entretanto, foram observadas alterações significativas nas concentrações de ferro intestinal e baço dos animais Deficientes em relação aos do grupo Controle, durante o período de tratamento. Esses resultados sugerem que a vitamina A altera a homeostase de ferro no intestino e baço desses animais, não em nível transcricional, e que, devido à evidência de um aumento na expressão gênica da hepcidina hepática nos animais deficientes em vitamina A observado em estudo anterior, provavelmente esse efeito da vitamina A sobre o metabolismo de ferro ocorre em nível traducional e/ou pós-traducional, mediado pela hepcidina.

O presente trabalho atingiu os objetivos determinados e como perspectiva futura de investigação consideramos a análise da expressão dos genes de DMT-1 e ferroportina em outros órgãos envolvidos no metabolismo de ferro (fígado e baço), a expressão de hepcidina e a análise da síntese proteica, averiguando as possíveis alterações no mecanismo de regulação de tradução.

8. BIBLIOGRAFIA

Allen LH, Peerson JM, Olney DK. *Provision of multiple rather than two or fewer micronutrients more effectively improves growth and other outcomes in micronutrient-deficient children and adults*. The Journal of Nutrition. 139(5): 1022-1030, 2009.

Andrews NC. *Iron Metabolism: iron deficiency and iron overload*. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 01: 75-98, 2000.

Ameny MA, Raila J, Walzel E, Schweigert FJ. *Effect of Iron and/or Vitamin A Re-supplementation of Vitamin A and Iron Status of Rats After a Dietary Deficiency of Both Components*. Journal of Trace Elements. 16: 175-178, 2002.

Arredondo M, Martínez R, Núñez MT, Ruz M, Olivares M. *Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc*. Biology Research. 39: 95-102, 2006.

Arruda SF, Siqueira EMA, Valência FF. *Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress by iron tissues overload*. Nutrition. 25: 472-478, 2009.

Arruda SF, Siqueira EMA, Souza EMT. *Malanga (Xanthosoma sagittifolium) and purslane (Portulaca oleracea) leaves reduce oxidative stress in vitamin A-deficient rats*. Annals of Nutrition and Metabolism. 48(4): 288-95, 2004.

Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. *Hepcidin – central regulator of iron metabolism*. European Journal of Haematology. 78: 1-10, 2006.

Aydemir F, Jenkitkasemwong S, Gulec S, Knutson MD. *Iron loading increases ferroportin heterogeneous nuclear RNA and mRNA levels in murine J774 macrophages*. The Journal of Nutrition. 139: 434-438, 2009.

Baranowska I, Czernicki K, Aleksandrowicz R. *The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the Upper Silesian industrial district*. The Science of the Total Environment, 159(2): 155-162, 1995.

Beynen AC, Sijtsma KW, Van den Berg GJ. *Iron status in rats fed a purified diet without vitamin A*. *Biology of Trace Elements Research*. 35: 81-4, 1992.

Blackfan KD, Wolbach SB. *Vitamin A deficiency in infants, a clinical and pathological study*. *Journal of Pediatrics*. 3: 679-706, 1933.

Bloem MW. *Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anemia control*. *Proceedings of the Nutrition Society*. 54: 501-508, 1995.

Blomhoff R, Green MH, Berg T, Nourm KR. *Transport and storage of vitamin A*. *Science*. 250: 399-404, 1990.

Bozho M, Conner JR. *Redox metals and Alzheimer diseases*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1012: 171-178, 2004.

Campos FM, Rosado GP. *Novos Fatores de Conversão de Carotenóides Provitamínicos A*. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. 25(3): 571-578, 2005.

Canonne-Hergaux F, Levy JE, Fleming MD, Montross LK, Andrews NC, Gros P. *Expression of the DMT1 (NRAMP2/DCT1) iron transporter in mice with genetic iron overload disorders*. *Blood*. 97: 1138-1140, 2001.

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

Christiansen H, Sheikh N, Saile B, Reuter F, Rave-Fränk M, Hermann RM, Dudas J, Hille A, Hess CF, Ramadori G. *X-irradiation in rat liver: consequent upregulation of hepcidin and downregulation of hemojuvelin and ferroportin-1 gene expression*. *Radiology*. 242(1): 189-197, 2007.

Coelho DF, Ramalho RA. *O inquérito dietético na avaliação do estado nutricional de vitamina A em gestantes*. *Clínica Médica*. 6(28): 44-60, 1995.

Collins JF, Franck CA, Kowdley KV, Ghishan FK. *Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum*. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. 288: G964–G971, 2005.

Collins HL. *The role of iron in infections with intracellular bacteria*. *Immunology Letters*. 85:193-195, 2003.

Constante M, Jiang W, Wang D, Raymond VA, Bilodeau M, Santos MM. *Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation*. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. 291: G229-G237, 2006.

Cozzolino SMF. *Biodisponibilidade de minerais*. *Revista Brasileira de Nutrição*. 10(2): 87-98, 1997.

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

Cronje L, Borman L. *Iron overload and tuberculosis: a case of iron chelation therapy*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 9: 2-9, 2005.

Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. *The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer*. *Clinical Immunology*. 121: 144-158, 2006.

Darlow BA, Graham PJ. *Vitamin A supplementation for preventing morbidity & mortality in very low birth weight infants*. *Cochran Database System*. 2: 501-506, 2000.

Davila ME, Norris L, Cleary MP, Ross AC. *Vitamin A during lactation: relationship of maternal diet to milk vitamin A content and to the vitamin A status of lactating rats and their pups*. The Journal of Nutrition. 115: 1033-1041, 1985.

Denic S, Agarwal MM. *Nutritional iron deficiency: an evolutionary perspective*. Nutrition. 23: 603-614, 2007.

De Luca LM. *Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia*. FASEB Journal. 10: 2924-2933, 1991.

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

Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, Borot N, Radosavljevic M, Loreal O, Brissot P, Gilfillan S, Bahram S, Coppin H, Roth MP. *Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains*. Gastroenterology. 122: 745-751, 2002.

Eiseinstein RS. *Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism*. Annual Review of Nutrition. 20: 627-62, 2000.

Eiseinstein RS, Blemings KP. *Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis*. The Journal of Nutrition. 129: 2295-2298, 1998.

Ettyang GA, Lichtenbelt WD, Van M, Oloo A, Saris WHM. *Serum retinol, iron status and body composition of lactating women in Nandi, Kenya*. Annals of Nutrition and Metabolism. 47: 276-283, 2003.

Evain-Brion D, Porquet D, Thérond P, Fjellestad-Paulsen A, Grenèche MO, François L, Czernichow P. *Vitamin A deficiency and nocturnal growth hormone secretion in short children*. Lancet. 343(8889): 87-8, 1994.

Fang YZ, Yang S, Wu G. *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. Nutrition. 18: 872-879, 2002.

Fairbanks VF *apud* Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*. Manole, 9ª Edição, São Paulo, Brasil, 2003.

Fairweather-Tait SJ. *From absorption and excretion of minerals... to the importance of bioavailability and adaptation*. The British Journal of Nutrition. 78: S95-S100, 1997.

Ferraz IS, Daneluzzi JC, Vannucchi H. *Vitamin A deficiency in children aged 6 to 24 months in São Paulo State, Brazil*. Nutrition Research. 20(6): 757-768, 2000.

Findlay GM, MacKenzie RD. *The bone marrow in deficiency diseases*. Journal of Pathology. 25: 402-403, 1992.

Fraga CG, Oteiza PI. *Iron toxicity and antioxidant nutrients*. Toxicology. 180: 23-32, 2002.

Frazer DM, Anderson GJ. *The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?* Blood Cells, Molecules, and Diseases. 30: 288-297, 2003.

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. *Dietary Reference Intake for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. National Academy Press, Washington, DC, USA, 2001.

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

Ganz T. *Hepcidin – a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages*. Best Practice & Research Clinical Haematology. 18(2): 171- 182, 2005.

Garcia-Casal M, Layrisse M. *Food iron absorption: role of vitamin A*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 48: 191-196, 1998.

Graham RM, Chua ACG, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. *Liver iron transport*. World Journal of Gastroenterology. 13(35): 4725-4736, 2007.

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

Giugliani ERJ, Victora CG. *Complementary feeding*. Jornal de Pediatria. 76(S-3): S253 - S262, 2000.

Gutierrez JA, Yu J, Rivera S, Wessling-Resnick M. *Functional Expression Cloning and Characterization of SFT, a Stimulator of Fe Transport*. Journal of Cell Biology, 139(4): 895-905, 1997.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 4^a edição. New York, NY, USA, 2007.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. *Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism*. Cell, 117: 285-297, 2004.

Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JE, Wallace DL, Rucker RB, Mejia LA, Mohanram M. *Hematopoietic studies in vitamin A deficiency*. The American Journal of Clinical Nutrition. 31: 876-885, 1978.

Hultin M, Olivecrona T. *Conversion of chylomicrons into remnants*. Artherosclerosis. 141(S1): S25-S29, 1998.

Hunt JR. *High- but not low-bioavailability diets enable substantial control of women's iron absorption in relation to body iron stores, with minimal adaptation within several weeks.* The American Journal of Clinical Nutrition. 78: 1168-1177, 2003.

Hunt JR, Roughead ZK. *Adaptation of iron absorption in men consuming diets with high or low iron bioavailability.* The American Journal of Clinical Nutrition. 71: 94-102, 2000.

Jang JT, Green JB, Beard JL, Green MH. *Kinetic analysis shows that iron deficiency decreases liver vitamin A mobilization in rats.* The Journal of Nutrition. 130: 1291-1296, 2000.

Kabat GC, Kim M, Adams-Campbell LL, Caan BJ, Chlebowski RT, Neuhausser ML, Shikany JM, Rohan TE. *Longitudinal study of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenopausal women.* The American Journal of Clinical Nutrition. 90:162-9, 2009.

Kaplan J. *Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire.* Cell. 111: 603-606, 2002.

Koessler K, Maurer S, Loughlin R. *The relation of anemia, primary and secondary to vitamin A deficiency.* Journal of the American Medical Association. 87: 476-482, 1926.

Krebs NF. *Bioavailability of dietary supplements and impact of physiologic state: infants, children and adolescents.* The Journal of Nutrition. 131: 1351S-1354S, 2001.

Kruszewski M. *Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress.* Mutation Research. 531: 81-92. 2003.

Lechtig A, Cornale G, Ugaz ME, Arias L. *Decreasing stunting, anemia, and vitamin A deficiency in Peru: results of the Good Start in Life Program*. Food and Nutrition Bulletin. 1: 37-48, 2009.

Leong WI, Lönnerdal B. *Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption*. The Journal of Nutrition. 134: 1-4, 2004.

Limdi JK, Crampton JR. *Hereditary hemochromatosis*. QJM. 97: 315-324, 2004.

Mackenzie B, Hediger MA. *The ABC of Solute Carriers – SLC11 family of H⁺-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1*. Pflugers Archives – European Journal of Physiology. 447: 571-579, 2004.

Mariath JGR, Lima MCC, Santos LMP. *Vitamin A activity of buriti (Mauritia vinifera Mart) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia*. The American Journal Clinical Nutrition. 49: 849-853, 1989.

Martini LA, Tchack L, Wood RJ. *Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells*. The Journal of Nutrition. 132: 693-696, 2002.

Martins MC, Santos LMP, Santos SMC, Araújo MPN, Lima AMP, Santana LAA. *Avaliação de políticas públicas de segurança alimentar e combate à fome no período 1995-2002. 3 – O Programa Nacional de Controle da Deficiência de Vitamina A*. Cadernos de Saúde Pública. 23(9): 2081-2093, 2007a.

Martins MC, Oliveira YP, Coitinho DC, Santos LMP. *Panorama das ações de controle da deficiência de vitamina A no Brasil*. Revista de Nutrição. 20(1): 5-18, 2007b.

McClintick JN, Crabb DW, Tian H, Pinaire J, Smith JR, Jerome RE, Edenberg HJ. *Global effects of vitamin A deficiency on gene expression in rat liver: evidence for hypoandrogenism*. Journal of Nutritional Biochemistry. 17: 345-55, 2006.

McKie AT, Barlow DJ. *The ABC of Solute Carriers - The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1)*. Pflugers Archives – European Journal of Physiology. 447: 801-806, 2004.

Mejia LA, Arroyave G. *The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala*. The American Journal of Clinical Nutrition. 36:87-93, 1982.

Mejia LA, Chew F. *Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron*. The American Journal of Clinical Nutrition. 48; 595-600, 1988.

Mejia LA, Hodges RE, Arroyave G, Viteri F. *Vitamin A deficiency and anemia in Central American Children*. The American Journal of Clinical Nutrition. 30:1175-84, 1977.

Ministério da Saúde, Fundo das Nações Unidas para a Infância. *Cadernos de Atenção Básica: Carências de Micronutrientes*. Ministério da Saúde, 1ª edição. Brasília, DF, Brasil, 2007.

Miret S, Simpson RJ, McKie A. *Physiology and molecular biology of dietary iron absorption*. Annual Review of Nutrition. 23: 283-301, 2003.

Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Andreas K, Saez E. *The nuclear receptor LXR is a glucose sensor*. Nature. 445: 219-223, 2007.

Morriss-Kay GM, Sokolova N. *Embryonic development and pattern formation*. FASEB Journal. 10: 961-968, 1996.

Mohanram M, Kulkarni KA, Reddy V. *Hematological studies in vitamin A deficiency children*. International Journal of Vitamins and Nutrition Research. 47; 389-93, 1977.

Musib LC. *The absorption mechanism of retinoic acids in the intestinal epithelium*. Thesis (Doctor of Philosophy), University of Minnesota Graduate School, Minneapolis, MN, USA, p 205, 2000.

Mwanri L, Worsley A, Ryan P, Masika J. *Supplemental vitamin A improves anemia and growth in anemic school children in Tanzania*. *The Journal of Nutrition*. 130: 2691-2696, 2000.

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

Nelson DL e Cox MM. *Lehninger - Principles of biochemistry*. Worth. New York, NY, USA, 3ª edição, p 343-368, 2000.

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. *Science*. 306: 2090-2093; 2004.

Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Siritto M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S. *Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 4596-4601, 2002a.

Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. *Journal of Clinical Investigation*. 110: 1037- 1044, 2002b.

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

Olson JA. *Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin A*. The American Journal of Clinical Nutrition. 119: 105-108, 1999.

Palace VP, Khaper, Qin Q, Singal PK. *Antioxidant potential of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease*. Free Radical Biology & Medicine. 26: 746-761, 1999.

Panth M, Shatrunga V, Yasdohara P. *Effect of vitamin A supplementation on hemoglobin and vitamin A levels during pregnancy*. British Journal of Nutrition. 64: 351-8, 1990.

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

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. Journal of Biological Chemistry. 276: 7806-7810, 2001.

Parker RS. *Absorption, metabolism, and transport of carotenoides*. FASEB Journal. 10: 542-551, 1996.

Penteado MVC. *Vitaminas – aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. Manole, 1^a. edição. São Paulo, SP, Brasil, 2003.

Peinnequien A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. *Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green*. BMC Immunology. 5(3): 1471-2172, 2004.

Piantedosi R, Ghyselincks N, Blaner WS, Vogel S. *Cellular retinol-binding protein type III is needed for retinoid incorporation into milk*. Journal of Biological Chemistry. 280(24): 24286-24292, 2005.

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload.* Journal of Biological Chemistry. 276: 7811-7819; 2001.

Piperno A, Girelli D, Nemeth E, Trombini P, Bozzini C, Poggiali E, Phung Y, Ganz T, Camaschella C. *Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-hemochromatosis.* Blood. 110(12): 4096-4100, 2007.

PrimeTime qPCR Assay software, Integrated DNA Technologies, disponível em URL:<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/>, acessado em 02 de fevereiro de 2009.

Ponka P. *Iron metabolism: physiology and path physiology.* The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine. 13: 73-83, 2000.

Promega Corporation. *Improm-II™ Reverse Transcription System – Technical Manual.* Madison, WI, USA, 2007.

Puntarulo S. *Iron, oxidative stress and human health.* Molecular Aspects of Medicine. 26: 299-312, 2005.

Reddy MB, Clark L. *Iron, oxidative stress, and disease risk.* Nutrition Reviews. 62(3): 120-124, 2004.

Reddy MB, Hurrell RF, Cook JD. *Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition.* The American Journal of Clinical Nutrition. 71: 937-943, 2000.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet.* The Journal of Nutrition. 123: 1939-51, 1993.

Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz t. *Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs.* Blood. 106: 2196-2199, 2005.

Roughead ZK, Hunt JR. *Adaptation in iron absorption: iron supplementation reduces nonheme-iron but not heme-iron absorption from food.* The American Journal of Clinical Nutrition. 72: 982-989, 2000.

Roodenburg AJC, West CE, Hovenier R, Beynen AC. *Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency.* British Journal of Nutrition. 75: 623-636, 1996.

Roodenburg AJC, West CE, Yu S, Beynen AC. *Comparison between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron.* British Journal of Nutrition. 71: 687-699, 1994.

Rock CL, Lovalvo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW, Schwartz SJ. *Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women.* The Journal of Nutrition. 128: 913-916, 1998.

Rosales FJ, Jang JT, Piñero DJ, Erikson KM, Beard JL, Ross AC. *Iron Deficiency in Young Rats Alters the Distribution of Vitamin A Between Plasma and Liver and Between Hepatic Retinol and Retinyl Esters.* The Journal of Nutrition. 129: 1223-1228, 1999.

Ross AC, Zolfaghari R. *Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status.* American Society for Nutritional Sciences. 269S-275S, 2004.

Ross AC. *Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation.* American Society of Nutritional Sciences. 291S-296S, 2003.

Roy CN, Enns CA. *Iron homeostasis: new tales from the crypt*. Blood. 96(13): 4020-4027, 2000.

Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. *Interaction of nutrition and infection*. World health organization, 57^a edição. Geneve, Switzerland. 1968.

Semba RD, Muhalil, West KP. *Impact of vitamin A supplementation on hematological indicators of iron metabolism and protein status in children*. Nutrition Research. 12: 469-78, 1992.

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

Shatrugna V, Raman L, Uma K, Sujatha T. *Interaction between vitamin A and iron: effects of supplements in pregnancy*. International Journal of Vitamin and Nutrition Research. 67(3): 145-48, 1997.

Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*. Manole, 9^a Edição. São Paulo, SP, Brasil, 2003.

Sijtsma KW, Van den Berg GJ. *Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A*. British Journal of Nutrition. 70: 777-85, 1993.

Simmons WK. *Xerophthalmia and blindness in Northeast Brazil*. The American Journal of Clinical Nutrition. 29: 116-122, 1976.

Sommer A, Katz J, Tarwotjo I. *Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency*. The American Journal of Clinical Nutrition. 40: 1090-1095, 1984.

Souza WA, Vilas Boas OMGC. *A deficiência de vitamina A no Brasil: um panorama*. Pan American Journal of Public Health. 12(3): 173-179, 2002.

Stoltzfus RJ, Underwood BA. *Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants*. Bulletin of the World Health Organization. 73(5): 703-711, 1995.

Stahl W, Sies H. *Perspectives in biochemistry and biophysics*. Archives of Biochemistry and Biophysics 336(1): 1-9, 1996.

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

Tanumidardjo SA. *Assessing vitamin A status: past, present and future*. The Journal of Nutrition. 134(1): 290S-293S, 2004.

Tanumihardjo SA, Penniston KL. *Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations*. Journal of Lipid Research. 43: 350-355, 2002.

Templeton DM, Liu Y. *Genetic regulation of cell function in response to iron overload or chelation*. Biochimica et Biophysica Acta. 1619: 113-124, 2003.

Thurnham DI. *Vitamin A, iron and haematopoiesis*. Lancet. 342: 1312-1313, 1993.

Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M. *Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes*. The Journal of Biological Chemistry. 267(3): 1805-1810, 1992.

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

Urso ML, Clarkson PM. *Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation*. Toxicology. 189: 41-54, 2003.

Van den Broek N. *Anaemia and micronutrient deficiencies*. British Medical Bulletin. 67: 149-160, 2003.

Van het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. *Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids*. The Journal of Nutrition. 130: 503-506, 2000.

Vauclair S, Majo F, Durham AD, Ghyselinck NB, Barrandon Y, Radtke F. *Corneal epithelial cell fate is maintained during repair by notch 1 signaling via the regulation of vitamin A metabolism*. Developmental Cell. 13: 242-253, 2007.

Vieira AV, Schnider WJ, Vieira PM. *Retinoids: transport, metabolism and mechanisms of action*. Journal of Endocrinology. 146: 201-207, 1995.

Vogel S, Piantedosi R, O'Byrne SM, Kako Y, Quadro L, Gottersman ME, Goldberg IJ, Blaner WS. *Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision*. Biochemistry. 41: 15360-15368, 2002.

Walczyk T, Davidsson L, Rossander-Hulthen L, Hallber L, Hurrell RF. *No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans*. The American Journal of Clinical Nutrition. 77:144-9, 2003.

Wang Q, Du F, Qian ZM, Ge XH, Zhu L, Yung WH, Yang L, Ke Y. *Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain*. Endocrinology. 149(8): 3920–3925, 2008.

Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. *A role of SMAD4 in iron metabolism through the positiveregulation of hepcidin expression*. Cell Metabolism. 2: 399-409, 2005.

Weiss G. *Iron and immunity: a double-edge sword*. European Journal of Clinical Investigation. 32: 70-78, 2002.

World Health Organization. *Micronutrient deficiencies: vitamin A deficiency*. Disponível em URL: <http://www.who.int/nutrition/topics/vad/en/index.html> acessado em 08/05/2009.

World Health Organization. *Assessing iron status of populations*. World Health Organization, 2^a edição. Geneva, Switzerland, 2007.

World Health Organization. *Reducing risks, promoting healthy life*. World Health Report. Geneva, Switzerland, 2002.

World Health Organization. *Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes*. World Health Report. Geneva, Switzerland, 1996.

World Health Organization. *Bridging the Gaps*. World Health Report. Geneva, Switzerland, 1995.

Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, Srai SK. *Inhibition of iron transport across human epithelial cells by hepcidin*. Blood. 104: 2178-2180, 2004.

Yeh K, Yeh M, Glass J. *Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat*. American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology. 286: 385-394, 2004.

Yeum KJ, Russell RM. *Carotenoid bioavailability and bioconversion*. Annual Review of Nutrition. 22: 483-504, 2002.

Zimmerman MB, Biebinger R, Rohner F, Dib A, Zeder C, Hurrell R, Chaouki N. *Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increase erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron*. The American Journal of Clinical Nutrition. 84: 580-586, 2006.

Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W, Weiss G. *Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal*

transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload.
Gastroenterology. 120: 1412-1419, 2001.