

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FABIANI LAGE RODRIGUES BEAL

DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A LEVA AO AUMENTO DE TRANSCRITOS DE
HEPCIDINA NO FÍGADO E ACÚMULO DE FERRO NO BAÇO DE RATOS
MACHOS RECÉM-DESMAMADOS

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

Tese apresentada à Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em
Ciências da Saúde. Área de Concentração: Bioquímica
Nutricional.

BRASÍLIA - DF
2012

FABIANI LAGE RODRIGUES BEAL

DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A LEVA AO AUMENTO DE TRANSCRITOS DE
HEPCIDINA NO FÍGADO E ACÚMULO DE FERRO NO BAÇO DE RATOS
MACHOS RECÉM-DESMAMADOS

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Bioquímica Nutricional.

Aprovada em 30 de março de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. PhD. Egle Machado de Almeida Siqueira – (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. PhD. Antônio Cláudio Goulart Duarte – (1º membro)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. PhD. Andréa Sugai Mortoza – (2º membro)
Universidade de Brasília

Profa. PhD. Sandra Fernandes Arruda – (3º membro)
Universidade de Brasília

Profa. PhD. Marie Togashi – (4º membro)
Universidade de Brasília

Profa. PhD. Patrícia Costa Bezerra – (Suplente)
Instituto Brasiliense de Análise do Comportamento

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus filhos Juliana e Pedro e ao meu grande companheiro de jornada Enio, pelo amor e por sempre acreditarem que esta conquista um dia chegaria;

Aos meus queridos pais Bete e Irineu, pelos conhecimentos e dignidade adquiridos ao longo da minha existência;

Aos meus outros familiares, em especial meus irmãos Miesher e Hugo, e aos meus amigos, que sempre acreditaram e torceram por mim;

À Prof^a. Dr^a. Egle Siqueira, pela dedicação, amizade, por sua orientação sempre presente, exemplo de profissionalismo e engrandecimento profissional e pessoal;

À Prof^a. Dr^a. Sandra Arruda, pelos ensinamentos, pelo tempo dispendido, pelos incentivos, por compartilhar a experiência e pela oportunidade do contato com a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Fernando Fortes, pelos conhecimentos compartilhados, pela força e pelo exemplo de amor a ciência;

Aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Biofísica: ao Chiquinho, pelos cafezinhos e pelo nitrogênio; à Lorena, pela ajuda com os experimentos finais; aos companheiros Silvana, Luciano, Gustavo, Fernanda e Douglas, pela contribuição com as análises; às colegas Marcela, Juliana, Azadeh, Adriana, Tarsila e Nathália, pelo carinho, contribuições, organização e tantos momentos de bancada e descontração;

Aos Professores Antônio Cláudio Duarte, Marie Togashi, Andréa Sugai e Patrícia Bezerra, pela participação na banca, contribuições valiosas ao trabalho e pelo apreço; e

À CAPES, ao CNPQ e ao DPP, pela concessão do indispensável auxílio financeiro.

RESUMO

BEAL. Fabiani Lage Rodrigues. **Deficiência de vitamina A leva ao aumento de transcritos de hepcidina no fígado e acúmulo de ferro no baço de ratos machos recém-desmamados: Brasília, DF. 2012. 111p.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde, Bioquímica Nutricional). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

Este trabalho avaliou o impacto da deficiência de vitamina A na expressão gênica dos transcritos de hepcidina e ferroportina hepáticos, em ratos, submetidos à depleção dietética de vitamina A por 45 dias. Também foram avaliados o teor de ferro nesses órgãos, os valores séricos de ferro e os de retinol hepático. Os 52 animais foram divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de dieta: o grupo de animais alimentados com dieta controle (CT) e o grupo de animais alimentados com dieta deficiente em vitamina A (-VA). Em cada grupo de tratamento, quatro subgrupos foram criados, para que a avaliação dos parâmetros fosse realizada em diferentes momentos de acompanhamento: no tempo inicial (T₀), aos 15 dias de tratamento (T₁₅), aos 30 dias de tratamento (T₃₀) e aos 45 dias de tratamento (T₄₅). Aos 15 dias de tratamento, os animais do grupo -VA, quando comparados com o grupo CT, apresentaram uma redução de 57% no nível de retinol hepático; menores concentrações de ferro no intestino; bem como menores valores de ferritina sérica. Aos 30 dias de tratamento, o grupo VA apresentou valores de retinol sérico indetectáveis; de transcritos de hepcidina no fígado mais elevados; e menores valores dos transcritos de ferroportina no intestino e baço, quando comparados aos animais do grupo CT. Houve ainda uma redução no teor de ferro hepático dos animais do grupo-VA entre o T₃₀ e T₄₅; porém, os níveis de ferroportina séricos não se alteraram significativamente durante o período de tratamento, em ambos os grupos. Os resultados sugerem que a deficiência de vitamina A altera a expressão gênica da hepcidina no fígado e a homeostase do ferro no organismo. Também parece que a absorção intestinal do ferro independe dos níveis de hepcidina.

Palavras-chave: Hepcidina. Homeostase. Vitamina A. Ferro.

ABSTRACT

BEAL. Fabiani Lage Rodrigues. **Vitamin A deficiency leads to the increase of hepcidin transcripts in the liver and the build up of Iron in the spleen on young male rats: Brasília, DF.** 2012. 111p. Thesis (Doctorate in Health Sciences, Nutritional Biochemistry). Program of Postgraduate in Health Sciences, Department of Health Sciences, Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, 2012.

This study evaluated the influence of the deficiency of vitamin A in the gene expression of hepatic hepcidin and ferroportin and in the expression of ferroportin and DMT1 in the spleen and intestine of rats over the course of hepatic vitamin A depletion for 45 days. It was also assessed the amount of iron on these organs, and the values of serum iron and hepatic retinol. Animals were divided in two groups, according to their diet: animals fed with control diet (CT) and animals fed with a diet deficient in vitamin A (-VA). In each group, four subgroups were created, to allow the evaluation to be made in different moments: initial (T₀); 15 days of treatment (T₁₅); 30 days of treatment (T₃₀); and 45 days of treatment (T₄₅). At 15 days, rats that were fed a vitamin A-deficient diet, when compared with the control group, showed a reduction of 57% in serum retinol concentrations, lower concentrations of iron on the intestine, and lower levels of serum ferritin. On day 30, the -VA rats showed undetectable levels of hepatic retinol; higher hepcidin transcripts in the liver; and lower levels of ferroportin transcripts in the intestine and spleen, when compared with the control group. There was also a reduction in the quantity of hepatic iron in the -VA group between T₃₀ and T₄₅; however, the levels of serum ferroportin did not change significantly during the period of treatment, in both groups. The results suggest that vitamin A deficiency abrogates the iron-mediated regulation of hepcidin expression in the liver, impairing iron homeostasis in the body. In addition, it seems that intestinal absorption of iron is independent of hepcidin levels.

Key words: Hepcidin. Homeostasis. Vitamin A. Iron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Homeostase sistêmica do ferro.....	25
Figura 2 – Estrutura química do grupo heme	26
Figura 3 – Esquema simplificado da absorção e exportação do ferro no enterócito	30
Figura 4 – Recepção celular via transferrina e receptor de transferrina.....	31
Figura 5 – Transporte de ferro no hepatócito	33
Figura 6 – Modelo de regulação da expressão de hepcidina	39
Figura 7 – Modelo de regulação da expressão de hepcidina	40
Figura 8 – Sistema regulador de ferro IRP/IRE	44
Figura 9 – Estrutura química da vitamina A	45
Figura 10 – Estrutura do todo-trans-retinol.....	45
Figura 11 – Palmitato de retinil.....	46
Figura 12 – Esquema do 11-cis-retinal ligado à rodopsina	46
Figura 13 – Isoformas mais comuns do ácido retinoico	47
Figura 14 – Absorção do β - caroteno do retinol pelos enterócitos	53
Figura 15 – Ação nos tecidos extra-hepáticos e armazenamento no fígado da vitamina A dietética.....	54
Figura 16 – Perfil eletroforético das amostras de RNA total em agarose a 1%.....	63
Figura 17 – Perfil eletroforético das amostras de cDNA sem transcriptase reversa em agarose a 1%.....	66
Figura 18 – Curva padrão do sistema qRT- PCR para os genes actina (Actb) e hepcidina (Hamp).....	68
Figura 19 – Curva de validação do $\Delta\Delta CT$ versus o log [cDNA] de hepcidina (Hamp) e actina (Actb).....	69
Figura 20 – Concentração de ferro no fígado, baço e intestino para os grupos Controle e Deficiente em vitamina A.....	75

Figura 21 – Análise dos valores de hepcidina (Hamp) no fígado por qRT-PCR para os grupos Controle e Deficiente em vitamina A durante os períodos basal e de tratamento	76
Figura 22 – Análise dos valores de ferroportina (Fpn) no fígado por qRT-PCR para os grupos Controle e Deficiente em vitamina A durante os períodos basal e de tratamento	77
Figura 23 – Análise dos valores de ferroportina (Fpn) no baço por qRT-PCR para os grupos Controle e Deficiente em vitamina A durante os períodos basal e de tratamento.....	81
Figura 24 – Análise dos valores de Dmt1 no baço por qRT-PCR para os grupos Controle e Deficiente em vitamina A durante os períodos basal e de tratamento.....	82
Figura 25 – Análise dos valores de ferroportina (Fpn) no intestino por qRT-PCR para os grupos Controle e Deficiente em vitamina A durante os períodos basal e de tratamento	83
Figura 26 – Análise dos valores de Dmt1 no intestino por qRT-PCR para os grupos Controle e Deficiente em vitamina A durante os períodos basal e de tratamento.....	83
Figura 27 – Mecanismo proposto para a diminuição da absorção de ferro induzido pela hepcidina.....	85
Figura 28 – Modelo de regulação do metabolismo celular do ferro.....	86
Figura 29 – Modelo de regulação da expressão de hepcidina (Hamp) pela inflamação.....	88
Figura 30 – Resultados encontrados no grupo deficiente em vitamina A aos 30 dias de tratamento	90
Figura 31 – Regulação molecular da expressão dos transcritos de hepcidina (Hamp).....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingestão dietética de referência para ferro.....	23
Tabela 2 – Principais proteínas envolvidas na absorção, transporte, liberação e regulação do metabolismo do ferro e suas funções.....	35
Tabela 3 – Ingestão dietética de referência para vitamina A.....	48
Tabela 4 – Sistema reacional RT-PCR	65
Tabela 5 – Sequência de oligonucleotídeos empregados na qRT-PCR e na RT- PCR	67
Tabela 6 – Sistema reacional qRT-PCR	69
Tabela 7 – Ganho de peso, ingestão total da dieta e retinol hepático em animais Controle e Deficientes em vitamina A nos tempos 0,15, 30 e 45 dias de depleção	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>Actb</i>	<i>Gene da Actina</i>
<i>A_{nm}</i>	<i>Absorbância a</i>
<i>Apo-Tf</i>	<i>Apotransferrina</i>
<i>AIN-93G</i>	<i>Dieta para roedores em fase de crescimento</i>
<i>AR</i>	<i>Ácido retinoico</i>
<i>ARAT</i>	<i>Acyl CoA: Retinol Acyl Transferase</i>
<i>BMP</i>	<i>Proteína morfogenética óssea</i>
<i>°C</i>	<i>Graus Celsius</i>
<i>CAR</i>	<i>Carotenóide</i>
<i>CBRP-2</i>	<i>Proteína celular ligante de retinol</i>
<i>COOH</i>	<i>Grupo funcional carboxila- ácido carboxílico</i>
<i>CT</i>	<i>Grupo Controle</i>
<i>DCNT</i>	<i>Doenças Crônicas não Transmissíveis</i>
<i>Dcytb</i>	<i>Citrocomo b duodenal redutase</i>
<i>DEPC</i>	<i>Dietil pirocarbonato</i>
<i>DMT1</i>	<i>Proteína transportadora de metal divalente</i>
<i>Dmt1</i>	<i>Gene da proteína transportadora de metal divalente</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>DRI</i>	<i>Ingestão Dietética de Referência</i>
<i>e⁻</i>	<i>Elétron</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etileno diamino tetracético</i>
<i>EPO</i>	<i>Eritropoietina</i>
<i>ER</i>	<i>Éster de retinil</i>
<i>EROs</i>	<i>Espécies reativas oxigênio</i>

<i>ERK</i>	<i>Proteína quinase de regulação de sinal</i>
<i>Fe²⁺ ou Fe II</i>	<i>Ferro reduzido ou ferroso</i>
<i>Fe³⁺ ou Fe III</i>	<i>Ferro oxidado ou férrico</i>
<i>Fe-S</i>	<i>Ferro - enxofre</i>
<i>FPN</i>	<i>ferroportina</i>
<i>Fpn</i>	<i>Gene da ferroportina</i>
<i>H⁺</i>	<i>Hidrogênio</i>
<i>Hamp</i>	<i>Gene da hepcidina</i>
<i>HCl</i>	<i>Ácido clorídrico</i>
<i>HCP</i>	<i>Proteína carreadora do heme</i>
<i>HFE</i>	<i>Proteína da hemocromatose</i>
<i>HJV</i>	<i>Hemojuvelina</i>
<i>HO</i>	<i>Heme oxigenase</i>
<i>hnRNA</i>	<i>Ácido ribonucléico heterogêneo</i>
<i>HNO₃</i>	<i>Ácido nítrico</i>
<i>H₂SO₄</i>	<i>Ácido sulfúrico</i>
<i>H₂O₂</i>	<i>Peróxido de hidrogênio</i>
<i>HPLC</i>	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
<i>IL-6</i>	<i>Interleucina-6</i>
<i>IRE</i>	<i>Elemento responsivo ao ferro</i>
<i>IRP</i>	<i>Proteína reguladora de ferro</i>
<i>JAK</i>	<i>Proteína Jannus kinase</i>
<i>KOH</i>	<i>Hidróxido de potássio</i>
<i>LIP</i>	<i>Pool livre de ferro</i>
<i>log [cDNA]</i>	<i>Logaritmo da concentração do DNA constitutivo</i>
<i>LPL</i>	<i>Lipase lipoproteica</i>

<i>LRAT</i>	<i>Lecitina retinol-acil transferase</i>
<i>MAPK</i>	<i>Proteína de ativação mitogênica</i>
<i>mRNA</i>	<i>Ácido ribonucleico mensageiro</i>
<i>MgCl₂</i>	<i>Cloreto de magnésio</i>
<i>mm</i>	<i>Milímetro</i>
<i>μm</i>	<i>Micrômetro</i>
<i>MT-2</i>	<i>Matriptase 2</i>
<i>MS</i>	<i>Ministério da Saúde</i>
<i>nm</i>	<i>Nanômetro</i>
<i>*OH</i>	<i>Radical hidroxil</i>
<i>OMS</i>	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
<i>PCR</i>	<i>Reação em cadeia de polimerase</i>
<i>pH</i>	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
<i>ppm</i>	<i>Partes por milhão</i>
<i>QM</i>	<i>Quilomícrons</i>
<i>QMR</i>	<i>Quilomícron remanescente</i>
<i>qPCR-RT</i>	<i>Reação quantitativa em cadeia de polimerase por transcriptase reversa em tempo real</i>
<i>RA</i>	<i>Ácido retinoico</i>
<i>RAR; RXR</i>	<i>Receptor de ácido retinoico</i>
<i>RARE</i>	<i>Elemento responsivo ao ácido retinoico</i>
<i>RBMP</i>	<i>Receptor de proteína morfogenética óssea</i>
<i>RBP</i>	<i>Proteína ligante de retinol</i>
<i>RE</i>	<i>Éster de retinil</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>RNAsin</i>	<i>Inibidor de RNase</i>

ROH	Retinol
RT PCR	Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa em tempo real
SHJV	Hemojuvelina solúvel
SMAD	Proteína homóloga decapentaplégica
STAT	Sinal de tradução ativador de transcrição protéica
STEAP 3	Antígeno eptelial seis-transmembrana da próstata 3
STF	Estimulador de transporte de ferro
TAE	Tampão tris acetato
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina
TfR1	Receptor de transferrina 1
TfR2	Receptor de transferrina 2
TMPRSS6	Protease transmembrana serina-6
T ₀	Tempo inicial (basal)
T ₁₅	Tempo 15 dias de tratamento
T ₃₀	Tempo 30 dias de tratamento
T ₄₅	Tempo 45 dias de tratamento
UI/dia	Unidades internacionais por dia
- VA	Grupo Deficiente em vitamina A
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	<u>FERRO</u>	18
2.1.1	IMPORTÂNCIA DO FERRO	18
2.1.2	DEFICIÊNCIA DE FERRO	19
2.1.3	EXCESSO DE FERRO	20
2.1.4	BIODISPONIBILIDADE DE FERRO	21
2.1.4.1	<u>Fatores Extrínsecos</u>	22
2.1.4.2	<u>Fatores intrínsecos</u>	23
2.1.5	RECOMENDAÇÃO DE FERRO	23
2.1.6	BALANÇO CORPORAL DE FERRO	24
2.1.7	ABSORÇÃO	25
2.1.8	TRANSPORTE E CAPTAÇÃO CELULAR	30
2.1.9	ARMAZENAMENTO	33
2.1.10	EXCREÇÃO	34
2.1.11	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DOS METABOLISMOS INTRACELULAR E SISTÊMICO DO FERRO	35
2.1.11.1	<u>Regulação sistêmica da homeostase do ferro</u>	36
2.1.11.2	<u>Regulação celular da homeostase de ferro</u>	41
2.2	<u>VITAMINA A</u>	44
2.2.1	RECOMENDAÇÃO DE VITAMINA A	48
2.2.2	DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A	48
2.2.3	EXCESSO DE VITAMINA A	51
2.2.4	METABOLISMO DA VITAMINA A	51
2.2.4.1	<u>Absorção</u>	51
2.2.4.2	<u>Transporte</u>	52
2.2.4.3	<u>Armazenamento</u>	54
2.2.5	AÇÃO HORMONAL DA VITAMINA A	55
2.3	<u>INTERAÇÃO ENTRE VITAMINA A E FERRO</u>	56

3	OBJETIVOS	60
3.1	<u>OBJETIVO GERAL</u>	60
3.2	<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	60
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1	<u>ANIMAIS</u>	61
4.2	<u>TRATAMENTO</u>	61
4.3	<u>GANHO DE PESO</u>	62
4.4	<u>CONSUMO DE DIETA</u>	62
4.5	<u>EXTRAÇÃO, ELETROFORESE, TRATAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA</u>	62
4.6	<u>SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA</u>	64
4.7	<u>VERIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR DNA GENÔMICO</u>	65
4.8	<u>DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE mRNA DE HEPCIDINA(Hamp) E FERROPORTINA (Fpn) POR qPCR</u>	67
4.8.1	EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR PCR	67
4.8.2	VALIDAÇÃO DO EXPERIMENTO: VERIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA REAÇÃO DE qPCR SOBRE A EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS.....	68
4.9	<u>QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE mRNA DE HEPCIDINA (Hamp) E FERROPORTINA (Fpn) POR qPCR</u>	69
4.10	<u>DOSAGEM DE HEMOGLOBINA</u>	70
4.11	<u>TEOR DE FERRO NOS TECIDOS</u>	70
4.12	<u>TEOR DE RETINOL HEPÁTICO</u>	71
4.13	<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	72
5	RESULTADOS	73
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	111

1. INTRODUÇÃO

A adequada ingestão de micronutrientes é de fundamental importância para a manutenção dos diversos processos vitais do organismo. A deficiência de vitamina A e de ferro são problemas de Saúde Pública mundial, uma vez que aparecem de forma endêmica, principalmente em países em desenvolvimento (Fujita *et al.*, 2009). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram uma estimativa de que a deficiência de vitamina A atinja entre 140 a 250 milhões de indivíduos. Ainda segundo a OMS (1996), do total de casos estimados, cerca de 43 milhões são de crianças menores de cinco anos de idade. Em relação à deficiência de ferro, as estimativas são de que cerca de dois bilhões de indivíduos em todo o mundo tenham essa deficiência (Fairbanks, 2003). No Brasil, dados do Ministério da Saúde divulgados em 2009 mostram que a anemia ferropriva atinge mais de 20% das crianças menores de 5 anos, enquanto que a de vitamina A atinge cerca de 17% dessa população.

Nas últimas décadas, estudos têm evidenciado uma relação importante entre os níveis de vitamina A e de ferro no organismo humano, sugerindo haver uma relação entre a deficiência de vitamina A e a perda da homeostase no metabolismo de ferro (Jang *et al.*, 2000). Mesmo ainda não sendo claro o mecanismo dessa possível interação, estudos em crianças com deficiência em ferro e vitamina A revelaram que a suplementação com essa vitamina promoveu a mobilização de ferro dos estoques existentes e aumentou a produção de eritropoietina (EPO), hormônio estimulador da eritropoiese (Zimmerman *et al.*, 2006).

No caso de estudos com modelos animais, a literatura não apresenta um consenso quanto à ocorrência de anemia induzida pela deficiência de vitamina A; entretanto, existe concordância quanto ao acúmulo de ferro em tecidos de animais Deficientes em vitamina A (Arruda, Siqueira e Valência, 2009; Arruda, Siqueira e Souza, 2004; Templenton e Liu, 2003; Strube, Beard e Ross, 2002).

O ferro é necessário em vários mecanismos e processos vitais nos seres vivos, incluindo o homem; sua absorção nos mamíferos é controlada por mecanismos moleculares, eficazes na manutenção do equilíbrio entre demanda e oferta, que estabelecem a homeostase desse metal no organismo. A maior parte do

ferro corpóreo está ligada à hemoglobina no sangue e, em menor quantidade, à mioglobina nos músculos; às enzimas; aos citocromos; e às proteínas com centro ferro-enxofre (Fe-S) envolvidas nas reações de transferências de elétrons. O ferro não é excretado na urina, sendo, em grande parte, reaproveitado. Por esse motivo, a necessidade individual de ferro deve ser suficiente para repor apenas as perdas diárias do organismo (cerca de 1 mg/dia) (Iolascon, De Falco e Beaumont, 2009; Ponka, 2000).

Por ser um metal de transição catalisador de reações geradoras de espécies reativas de oxigênio (EROs), via reação de Fenton, uma sobrecarga de ferro é extremamente prejudicial às células (Crichton *et al.*, 2002), resultando em danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Arruda e colaboradores (2004) observaram que ratos que receberam dieta deficiente em vitamina A apresentavam aumento nos níveis de oxidação lipídica e protéica no fígado e no baço. 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.

Assim, além dos efeitos conhecidos da deficiência de vitamina A no organismo, como a baixa imunidade e a xeroftalmia, 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 excesso de ferro (Bozho e Conner, 2004; Kruszewski, 2003; Crichton *et al.*, 2002).

Na forma de ácido retinoico, a vitamina A tem sido amplamente estudada devido à sua ação hormonal regulando a expressão de vários genes (McClintick *et al.*, 2006). Observando-se a relação sinérgica entre a vitamina A e o metabolismo de ferro, parece ser possível que o efeito da vitamina A sobre a homeostase deste metal seja mediado por sua ação hormonal. O ácido retinoico regularia a absorção e exportação de ferro nos tecidos diretamente por meio do controle da síntese das proteínas DMT1 (transportador de metal divalente) e ferroportina; e/ou indiretamente, por meio da regulação da expressão de hepcidina no fígado, hormônio que controla a absorção e exportação endógena de ferro no organismo (Oates, 2007; Soe-Lin *et al.*, 2009).

A investigação de possíveis mecanismos moleculares de interação entre a vitamina A e a homeostase do ferro em animais se faz necessária, já que há um papel fundamental desses dois nutrientes no metabolismo humano, bem como no seu estado nutricional e fisiológico. Além disso, ainda hoje, tanto a hipovitaminose A quanto a anemia ferropriva são problemas mundiais de Saúde Pública.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERRO

2.1.1 IMPORTÂNCIA DO FERRO

Um dos metais mais abundantes no planeta Terra, o ferro, elemento químico de número atômico 26 e massa atômica 56, é quase todo insolúvel, existindo sob a forma de óxidos de ferro e ferro metálico. Por esse motivo, mesmo em grande quantidade, resta pouco desse mineral para as necessidades biológicas (Fairbanks, 2003).

Elemento-chave no metabolismo dos organismos vivos, o ferro é necessário para que haja a fotossíntese, para a reação do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa do metabolismo energético. Esse elemento também participa da síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e faz parte do grupo heme, o local ativo de transporte de elétrons nos citocromos. Além disso, o ferro trabalha na captação de oxigênio celular e protege as enzimas fixadoras de nitrogênio da inativação oxidativa nas raízes de leguminosas (Dunn, Rahmanto e Richardson, 2006).

Por representar um elemento essencial em diversos processos fisiológicos e relativamente indisponível, apesar de abundante, os organismos vivos armazenam o 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 ocorre, majoritariamente, nos estados 2^+ , 3^+ e 4^+ , anteriormente chamados de ferro ferroso, férrico e ferril, respectivamente (NAS, 2001).

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

2.1.2 DEFICIÊNCIA DE FERRO

A deficiência de ferro afeta cerca de 40% da população mundial (aproximadamente 2 bilhões de pessoas), colocando-se como o segundo maior problema nutricional no mundo, atrás apenas da fome, apesar deste ser o quarto elemento mais abundante no planeta (Arredondo *et al.*, 2006).

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).

Embora no Brasil não haja estudos que representem o País como um todo, as pesquisas pontuais existentes mostram um aumento progressivo na prevalência da anemia por deficiência de ferro, tornando-a um grave problema de Saúde Pública que está disseminado em todas as classes de renda (MS/UNICEF, 2007). Dados do Ministério da Saúde divulgados em 2009 mostram que a deficiência de ferro no Brasil atinge mais de 20% das crianças menores de cinco anos de idade.

Assim, por determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde 2004 todas as farinhas de trigo refinadas e as de milho são fortificadas com 4,2 mg de Fe e 150 µg de ácido fólico /100 g de farinha, o que visa reduzir os índices de prevalência e prevenir um aumento de deficiência de ferro (MS/UNICEF, 2007).

A anemia ferropriva é diagnosticada 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). A microcitose, que é a diminuição do volume celular médio (VCM), é também um achado comum nesses casos (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 microorganismos patogênicos invasores ferro dependentes (Cronje e Bornman, 2005; Collins, 2003; Weiss, 2002).

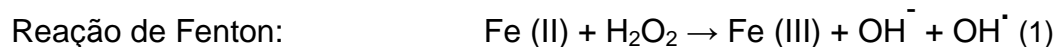
Acredita-se que a deficiência de ferro na raça humana teve início com a revolução agrícola, há cerca de dez mil anos, quando o homem começou a cultivar plantas e a domesticar os animais. Com isso vieram as mudanças alimentares em decorrência da ingestão de alimentos calóricos (cereais) em substituição ou adição aos alimentos ricos em ferro (carnes de caça), o que tornou o ferro da dieta menos biodisponível também (Denic e Agarwal, 2007).

Na deficiência de ferro, com ou sem anemia concomitante, pode haver prejuízo para o crescimento e o desenvolvimento intelectual de crianças, 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 registros na literatura de picamalácia (desejo de ingerir substâncias estranhas) e geofagia; porém, esses sintomas ainda não são bem explicados (Fairbanks, 2003). Outras características da deficiência de ferro são palidez cutânea, da conjuntiva, dos lábios, da língua e das palmas das mãos; dispnéia (respiração ofegante); disfagia (dificuldade na deglutição); e astenia (fraqueza orgânica) (MS/UNICEF, 2007; Andrews, 2000).

2.1.3 EXCESSO DE FERRO

Devido a sua capacidade de mudança do estado oxidativo, doando e recebendo elétrons, o ferro se torna um componente essencial para os citocromos (grupo heme), moléculas ligantes de oxigênio (ex.: hemoglobina e mioglobina) e inúmeras enzimas catalíticas (grupos prostéticos Fe-S). Entretanto, essa característica é responsável também pela toxicidade desse metal (Reddy e Clark, 2004; Fraga e Oteiza, 2002; Andrews, 2000).

A reação de Fenton, (Reação 1), na qual o peróxido de hidrogênio é convertido a radical hidroxil (radical livre mais danoso em sistemas biológicos), tem como seu principal catalisador o ferro (Halliwell e Gutteridge, 2007).



Para o organismo, é interessante que as concentrações de ferro livre estejam baixas, pois o Fe (III) não é solúvel em água e o Fe (II) participa da geração de radicais livres (Oliveira, de Sousa e Pinto, 2011; Papanikolaou e Pantopoulos, 2005).

Os radicais livres produzidos pela reação de Fenton podem interagir com outras moléculas, levando à formação em cadeia de outros radicais e espécies reativas. Dessa forma, um aumento nas concentrações de ferro intra e extracelulares pode resultar em uma maior produção de espécies reativas de oxigênio; peroxidação lipídica e estresse oxidativo; e danos a membranas celulares, proteínas e DNA. Assim, o organismo mantém quase sempre o ferro presente no corpo ligado a proteínas, impedindo-o que, de forma livre, catalise a produção de espécies reativas (Ganz e Nemeth, 2011a; Papanikolaou e Pantopoulos, 2005; Urso e Clarkson, 2003; Fang, Yang e Wu, 2002; Andrews, 2000).

A hemocromatose é uma condição clínica hereditária que tem como característica ser um defeito genético autossômico recessivo relativamente comum em caucasianos. Essa doença é causada por uma absorção de ferro aumentada no intestino, com conseqüente acúmulo desse metal em órgãos parenquimais, de modo destacado no fígado, pâncreas, coração e glândula pituitária. Entre pacientes com hemocromatose, é alta a prevalência de diabetes tipo 2, de doenças cardiovasculares e de outras doenças relacionadas a estados de estresse oxidativo (Trombini *et al.*, 2011; Piperno *et al.*, 2007; Limdi e Crampton, 2004).

Dentre as principais condições clínicas associadas ao excesso de ferro, destacam-se neoplasias, cardiomiopatia, aterosclerose, maior severidade de infartos, doenças hepáticas crônicas, diabetes tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, falência renal aguda, desenvolvimento de tireoidite subaguda e maior gravidade de infecções (Puntarulo, 2005).

2.1.4 BIODISPONIBILIDADE DE FERRO

A biodisponibilidade de ferro dietético varia de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos; sendo assim, é correto afirmar que nem todo o ferro contido nos alimentos é absorvido. 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 na biodisponibilidade (Beard e Han, 2009).

2.1.4.1 Fatores Extrínsecos

Na dieta, o ferro está presente sob duas formas fundamentais: heme (orgânico) e não heme (inorgânico); e em dois estados de oxidação, ferroso e férrico, que respectivamente podem facilmente doar ou receber elétrons. Embora o ferro hêmico seja mais biodisponível, a forma inorgânica (Fe^{3+}) está presente em maior concentração na dieta (Vander *et al.*, 2005; Martínez-Navarrete *et al.*, 2002). O ferro hêmico está presente principalmente nas carnes, enquanto o ferro não-hêmico encontra-se presente nos alimentos de origem vegetal e alimentos fortificados (Beard e Han, 2009; MS/UNICEF, 2007).

O ferro não-hêmico responde 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; além disso, a absorção do ferro depende, em grande parte, das reservas corporais e da sua solubilidade na parte proximal do intestino delgado (Hunt, 2003; Reddy, Hurrell e Cook, 2000).

Dentre os fatores que, quando presentes, aumentam a solubilidade do ferro, estão o ácido ascórbico e outros ácidos orgânicos, como o cítrico, o málico e o tartárico; a fonte de proteína de origem animal; e a presença dos peptídeos que contenham cisteína e o etanol. Há, contudo, fatores dietéticos que diminuem essa solubilidade, dificultando, assim, sua absorção e utilização pelo organismo: os fitatos, polifenóis, flavonoides, taninos, fosfato, oxalato e a própria suplementação de ferro (Hunt e Roughead, 2000; Roughead e Hunt, 2000; Fairweather-Tait, 1997).

A presença na dieta de metais divalentes, tais como o cálcio, o zinco, o cobre, o cobalto, o níquel, o cádmio e o manganês, pode diminuir a absorção do ferro não-hêmico, pois esses metais parecem utilizar vias comuns de absorção, levando a um mecanismo de competição entre eles (Arredondo *et al.*, 2006).

2.1.4.2 Fatores Intrínsecos

A baixa acidez gástrica pode levar a uma menor solubilidade do ferro, reduzindo, assim, sua biodisponibilidade e absorção. Em contrapartida, em algumas situações fisiológicas, onde a necessidade de ferro é maior, tais como durante o crescimento (infância e adolescência) e a gestação, há uma maior biodisponibilidade e absorção desse mineral. Situações de deficiência nutricional de ferro também aumentam o potencial absorptivo do ferro, resultando em uma maior biodisponibilidade (Fairweather-Tait, 1997).

2.1.5 RECOMENDAÇÃO DE FERRO

A ingestão dietética de referência do ferro está resumida na Tabela 1. Essa recomendação, apesar de ter sido baseada na população norte-americana, é aceita para outras populações, especialmente as ocidentais (NAS, 2001).

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

Faixa etária	Ingestão diária recomendada ¹ (mg/d)	Limite máximo tolerável ² (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 o fígado; a carne vermelha; as ostras; as leguminosas, como o feijão e a lentilha; e o melão escuro (NAS, 2001).

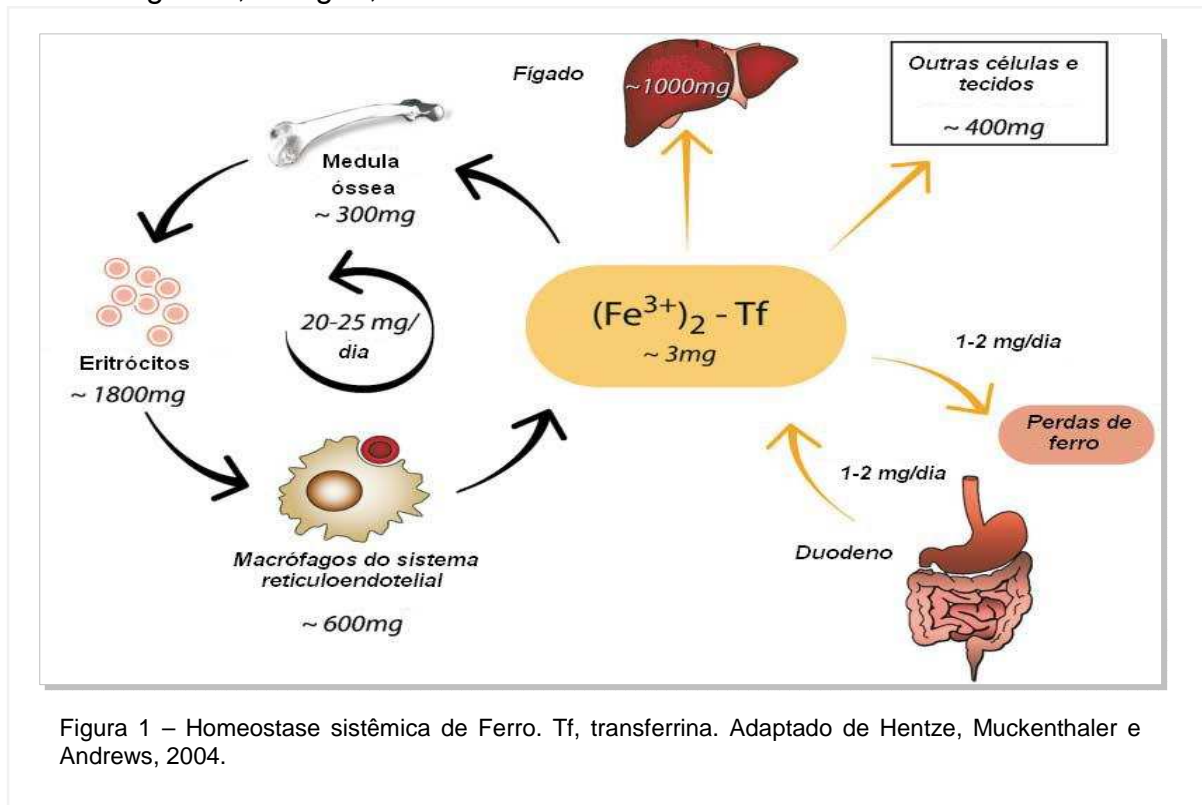
2.1.6 BALANÇO CORPORAL DE FERRO

Indivíduos adultos possuem em média de três a quatro gramas de ferro corporal, sendo que a maior parte desse metal contido no corpo humano está relacionada à hematopoiese, especialmente em relação à produção de hemoglobina, das células eritroides e dos eritrócitos maduros (Andrews, 2000).

Em torno de 1 a 2 mg do ferro dietético são absorvidos diariamente pelos enterócitos duodenais para repor o ferro perdido. Entretanto, estima-se que cerca de 20 a 30 mg de ferro por dia é suprido endogenamente para a eritropoiese e demais funções. Na medula óssea, o ferro é utilizado para a inserção no anel de porfirina, visando a formação de hemoglobina. O *turnover* do ferro é mediado principalmente pela destruição dos eritrócitos senescentes pelo sistema retículo endotelial. Os eritrócitos, que contém cerca de 80% do ferro corporal, apresentam, em seres humanos, uma média de 120 dias de funcionalidade. Ao final de sua vida funcional esses são reconhecidos como senescentes, devido a mudanças na estrutura de suas membranas, e são catabolizados nas células de *Kupffer* e nos macrófagos do baço (Ganz e Nemeth, 2011a; Beard e Han, 2009). As perdas corporais de ferro são relativamente pequenas, cerca de 1 mg de ferro por dia (2 mg/dia em mulheres pré-menopausa), e consistem basicamente da descamação de células epiteliais (pele, células gastrintestinais, células do trato urinário) e das perdas pelos fluidos corpóreos (lágrimas, suor e sangue e, em mulheres, principalmente a menstruação) (Miret, Simpson e McKie, 2003).

O órgão que desempenha um papel central no metabolismo do ferro é o fígado, 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 a doenças hereditárias relacionadas ao ferro (Andrews, 2008; Graham *et al.*, 2007; Collins, 2003).

A Figura 1, a seguir, mostra a homeostase sistêmica do ferro.



2.1.7 ABSORÇÃO

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

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 reduzida (Fe (II)) (Miret, Simpson e McKie, 2003).

O ferro é absorvido na parte proximal do intestino delgado, principalmente no duodeno, já que a solubilidade do ferro é favorecida no pH mais ácido. Com o aumento do pH do bolo alimentar, ocorre a formação de complexos férricos insolúveis, reduzindo, assim, sua absorção (Andrews, 2000).

Por meio do grupamento heme (Figura 2) é que há o transporte de elétrons nos citocromo e citocromo oxigenase; das peroxidases, que protegem as células das lesões oxidativas ao reduzirem peróxidos à água; e também de captação de oxigênio pela mioglobina e hemoglobina (Zhang *et al.*, 2009).

Acredita-se que o anel porfirínico separa-se da globina no lúmen intestinal e o grupo heme intacto (Fe-porfirina) é transportado pelas células da borda em escova pela proteína carreadora do heme (HCP) (Miret, Simpson e McKie, 2003).

As células da mucosa duodenal envolvidas na absorção de ferro são formadas nas criptas de Lieberkühn. Elas migram para o vilo, tornando-se funcionais apenas quando atingem o topo. Após um curto período de funcionalidade, as células são descamadas 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 (NAS, 2001).

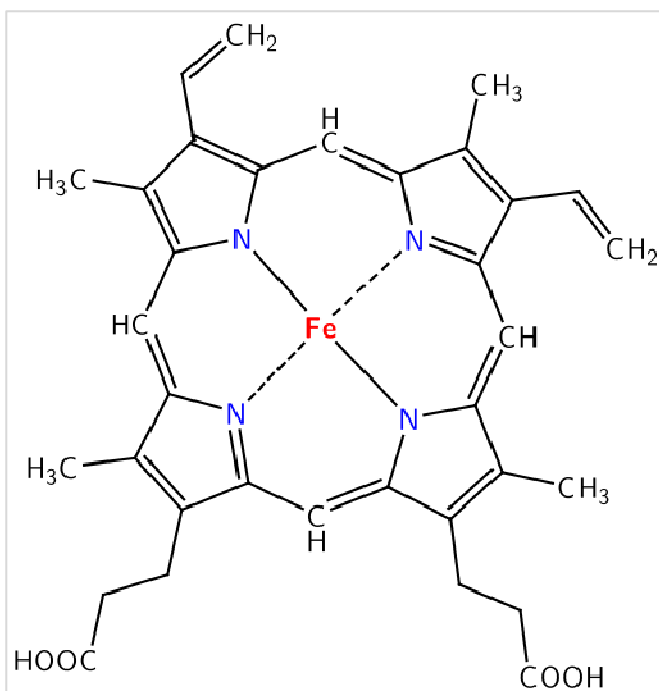


Figura 2 – Estrutura química do grupo heme.
<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---H/Heme-Group.htm>

Na membrana apical dos enterócitos maduros, situados nos microvilos intestinais, encontram-se as proteínas associadas à absorção e exportação de ferro intestinal que são predominantemente:

- o DMT1 (transportador de metal divalente - *divalent metal transporter*);
- a Citocromo b duodenal redutase (Dcytb) e;
- o exportador transmembrânico ferroportina (FPN).

O Fe (III) inorgânico é reduzido pela Dcytb a Fe (II), que transporta elétrons do NADPH citosólico para aceptores extracelulares e é captado pelo enterócito, através do transportador DMT1 (Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009; Kaplan, 2002; Ponka, 2000).

A identificação do DMT1 ocorreu em 1997 por Hediger e seus colaboradores, por meio de um escaneamento funcional de cDNA de ratos que induziu a atividade de transporte de ferro. Essa proteína faz parte da família de carreadores solúveis 11 (SLC11 – *Solute Carrier* 11) (Mackenzie e Hediger, 2004).

O DMT1 é uma glicoproteína com 12 hélices transmembrânicas que possui atualmente quatro isoformas conhecidas (Graham *et al.*, 2007). Essa proteína funciona como um importador de quantidades equivalentes de Fe (II) e H⁺ para dentro do enterócito. Como a maior parte do ferro dietético ingerido é não-hêmico, estando na forma Fe (III), este não pode ser transportado pelo DMT1 sem ter sido reduzido anteriormente (Oates, 2007).

A redução do Fe (III) a Fe (II), que facilitaria a absorção da forma inorgânica via DMT1, se dá por alguns mecanismos, tais como a presença do ácido ascórbico dietético e o baixo pH estomacal. Entretanto, grande parte dessa redução é realizada por ferrirredutases intestinais, como a Dcytb (Dunn, Rahmanto e Richardson, 2006; Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004).

Assim como a maioria das proteínas integrais expressas na membrana apical, o DMT1 é glicosilado, presumivelmente para proteger-se da digestão pelas secreções luminiais e acidez (Oates, 2007).

O DMT1 é expresso ao longo do intestino delgado, principalmente no duodeno proximal. É também encontrado em grandes quantidades nos macrófagos (baço e células de *Kupffer*), nas células precursoras eritroides e, quase que ubíquo, no organismo, estando presente nos endossomas (Mackenzie e Hediger, 2004; Canonne-Hergaux *et al.*, 2001).

Embora o DMT1 seja essencial para a captação e transporte do ferro inorgânico reduzido (Fe (II)) pela membrana apical no intestino delgado, ele é um transportador inespecífico, pois também atua carreando outros metais divalentes,

como o cádmio, o cobalto, o cobre, o manganês, o zinco e, em menores proporções, o níquel e o chumbo (Mackenzie e Hediger, 2004).

Durante a deficiência grave de ferro, o DMT1 encontra-se, quase que exclusivamente, na superfície celular. Entretanto, em condições normais, essa proteína é também encontrada em sítios intracelulares, sugerindo que o ferro e o DMT1 podem interagir também dentro da célula, uma vez que há DMT1 na membrana do endossoma intracelular que é formado quando há captação do ferro pelas proteínas de membrana (Figura 3) (Oates, 2007).

O ferro do grupamento heme é solúvel também em ambiente alcalino, e sua absorção é menos afetada por fatores intraluminais. Em 2005, foi descrita a proteína carreadora do grupamento heme (HCP – *Heme Carrier Protein*), o primeiro transportador intestinal específico para o ferro mais solúvel. 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 HCP, 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, Rahmanto e Richardson, 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 ou armazenado na proteína ferritina (Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009; NAS, 2001).

As características moleculares do *pool* de ferro dos enterócitos permanecem desconhecidas, mas poderiam consistir de quelatos de baixo peso molecular ou de ligação com proteínas chaperonas que transportariam o ferro intracelular (Dunn, Rahmanto e Richardson, 2006).

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

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. Seu papel no metabolismo do ferro é de exportador celular (Oates, 2007; McKie e Barlow, 2004).

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*), posteriormente Ireg-1 (proteína reguladora de ferro-1; *iron regulatory protein-1*) e, mais recentemente, rebatizada como ferroportina (FPN). Essa proteína parece ser o único membro da família de carreadores SLC40 (McKie e Barlow, 2004).

Estudos demonstram que 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 ocorre em células expostas à hepcidina (hormônio regulador da homeostase sistêmica do ferro), a ferroportina é internalizada e encaminhada aos lisossomos onde é degradada, ocorrendo um aumento dos estoques intracelulares de ferro (Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009; Grotto, 2008; 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 esteja prejudicada (Trombini *et al.*, 2011; Oates, 2007).

Mesmo em condições fisiológicas, 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 dos enterócitos, 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). A Figura 3 mostra um esquema simplificado da absorção e exportação celular do ferro no enterócito.

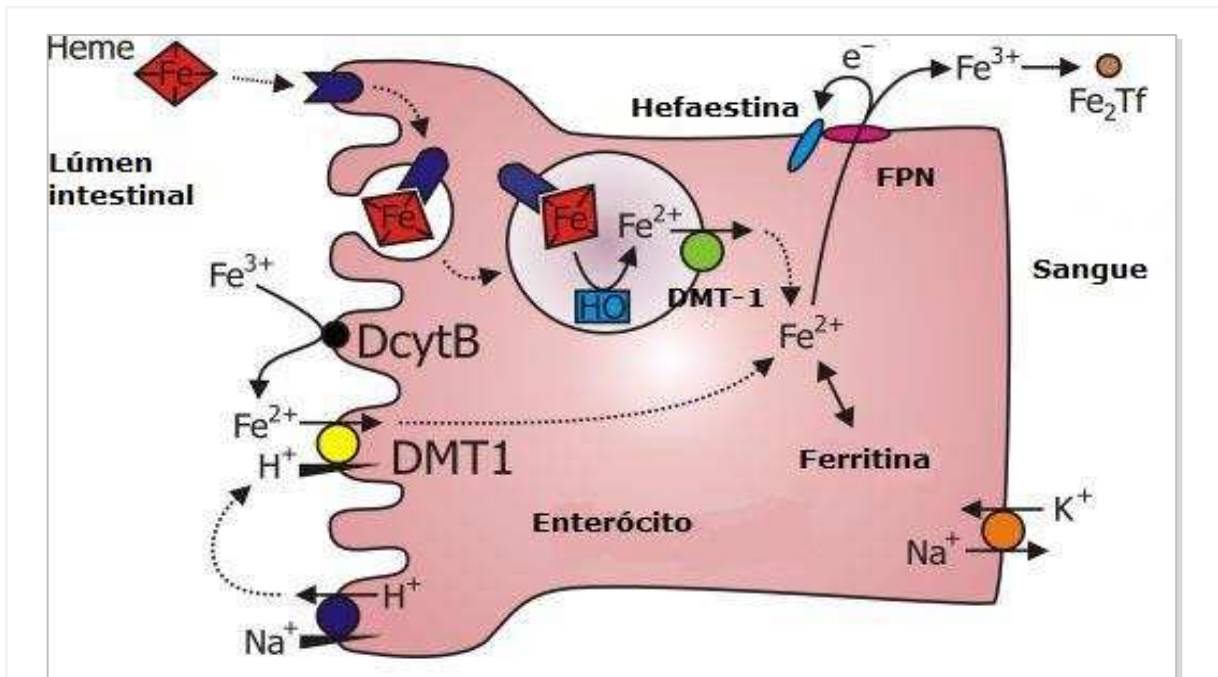


Figura 3 – Esquema simplificado da absorção e exportação celular do Ferro no enterócito. DMT1, transportador de metal divalente 1; Dcytb, Citocromo duodenal B; FPN, ferroportina; HO-1, Heme oxigenase 1; Tf, transferrina, Fe₂Tf,- Transferrina biférrica. Adaptado de Mackenzie e Hediger, 2004.

2.1.8 TRANSPORTE E CAPTAÇÃO CELULAR

O ferro transportado entre as células é conduzido pela ligação reversível do ferro à proteína de transporte, transferrina (Tf). Tendo em vista que a transferrina é a principal proteína circulante ligada ao ferro, os níveis de saturação dessa proteína refletem os níveis de ferro no organismo e podem agir como sinalizadores para mecanismos que mantêm o balanço do metal (Atanasiu, Manolescu e Stoian, 2006).

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, Manolescu e Stoian, 2006).

A expressão de TfR é regulada primariamente pelos níveis de ferro do organismo, por intermédio de um mecanismo traducional já que o IRE nessa proteína encontra-se na posição 3' do mRNA. Outros fatores que regulam, secundariamente, a sua síntese são a hipóxia, as citocinas e os fatores de crescimento (Ganz e Nemeth, 2011b; Graham *et al.*, 2007). A Figura 4 mostra de forma esquemática a captação celular de ferro.

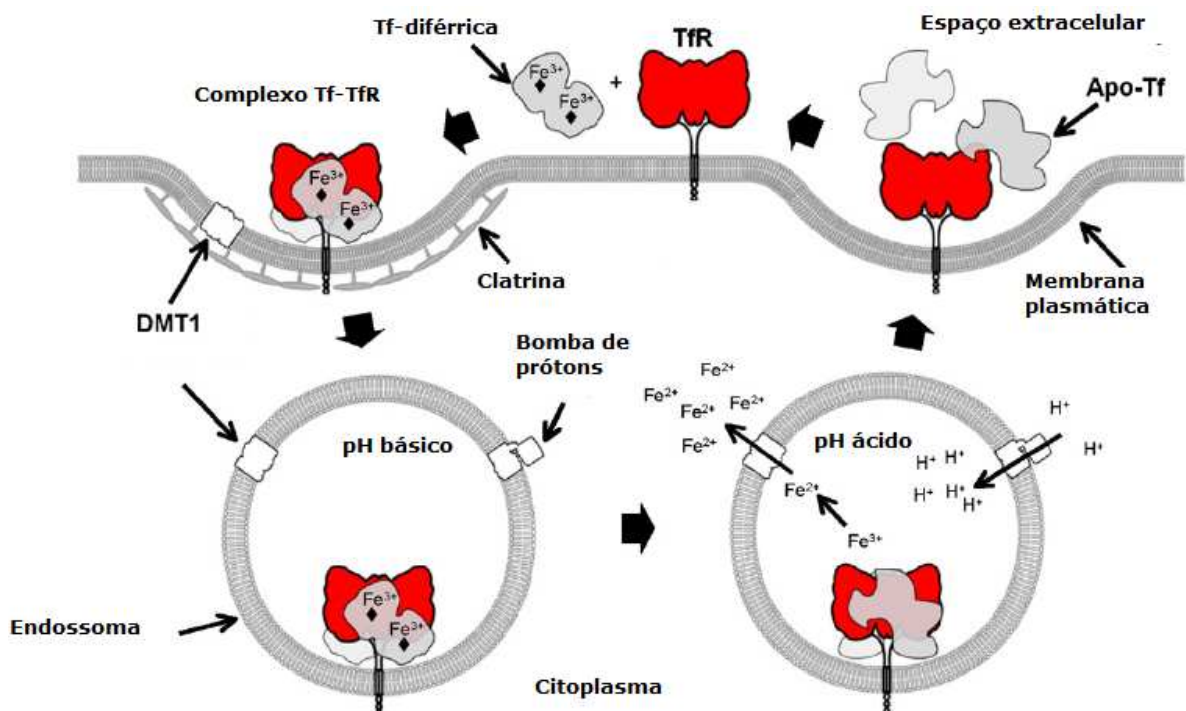


Figura 4 –Captação celular de Ferro via transferrina – receptor de transferrina. TfR, receptor de transferrina; Tf, transferrina; Apo-Tf, apotransferrina; DMT1, transportador de metal divalente 1. Adaptado de Daniels *et al.*, 2006.

O complexo transferrina-receptor de transferrina (Tf-TfR) é então internalizado, formando uma vesícula endossomal, e assim ocorre a acidificação do meio. Em pH ácido (aproximadamente 5,5), o ferro perde sua afinidade de ligação com a transferrina sendo então liberado dentro do endossoma. Nesse momento, o

ferro encontra-se na forma Fe (III), sofrendo redução pela enzima STEAP 3 (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3* – antígeno epitelial seis-transmembranal da próstata 3), presente na membrana do endossoma (não há representação dessa etapa na figura). O DMT1, que também se encontra presente na superfície endossomal, 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, Rahmanto e Richardson, 2006; Hentze, Muckenthaler e Andrews, 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).

Além das formas de captação celular de ferro supracitadas, outras formas expressas somente no fígado têm sido descritas. São elas:

- a ferritina (proteína responsável pelo armazenamento do ferro);
- a lactoferrina (proteína da família das transferrinas com ação bactericida que se liga ao ferro);
- o complexo heme-hemopexina (proteína que se liga ao grupamento heme do *turnover* das hemoglobinas, transportando-os para o fígado); e
- o complexo hemoglobina-haptoglobina (proteína hepática que se liga à hemoglobina livre no plasma, transportando-a para o fígado).

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 5.

O ferro, então, após ser internalizado pelas células, pode ser incorporado em compostos funcionais (proteínas Fe-S, citocromos, entre outros), armazenado como ferritina ou utilizado para regulação futura do metabolismo de ferro por meio da atividade moduladora das IRP (*Iron Regulatory Protein* - Proteína Reguladora de ferro), que em excesso de ferro intracelular, se transforma em aconitase e vai ao

ciclo de Krebs. E, por sua vez, em deficiência de ferro, liga-se aos IRE (*Iron Responsive Proteins* – proteínas responsivas ao ferro), onde agirá na expressão gênica das proteínas DMT1, FPN, FTN e RTf (Figura 8) . A regulação de proteínas de armazenamento, transporte e metabolizadoras de ferro sofre modulação traducional pelo próprio *pool* de ferro intracelular (NAS, 2001).

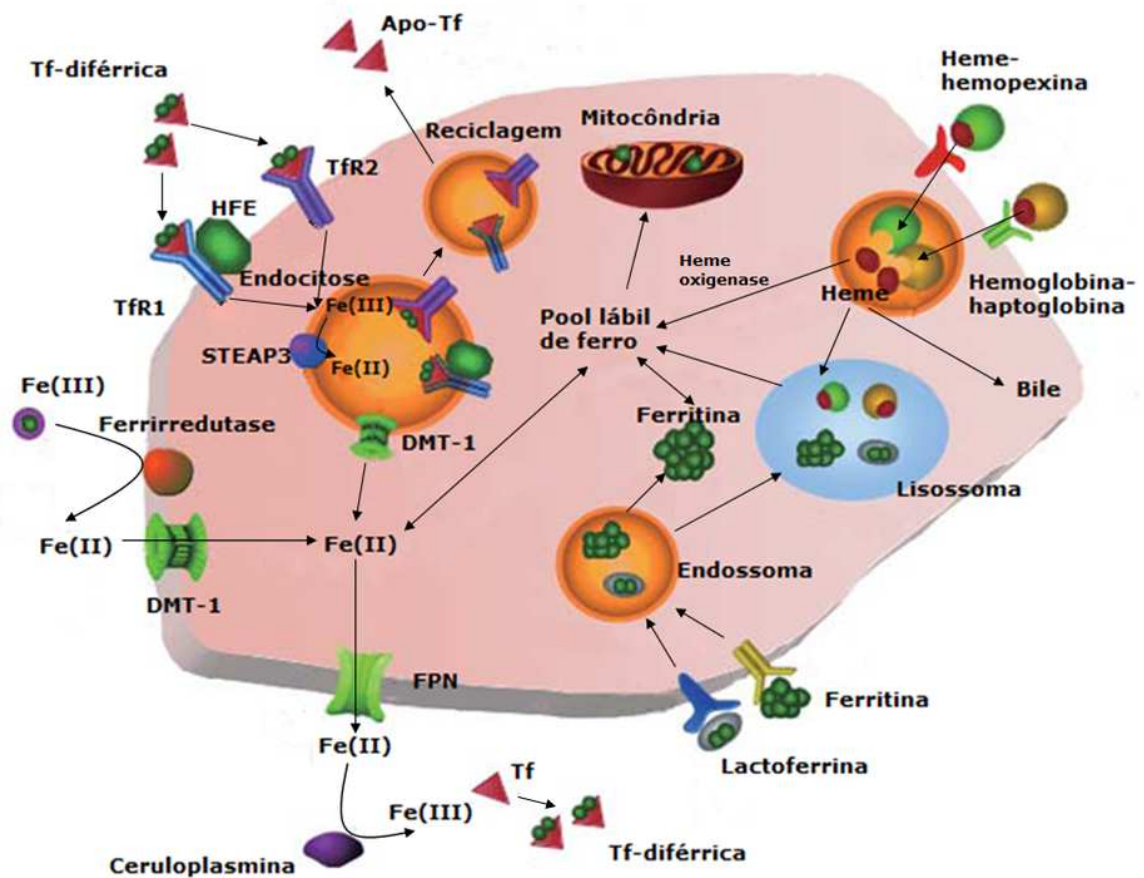


Figura 5 – Transporte de Ferro no hepatócito. Apo-Tf, apotransferrina; Tf-diférrica, transferrina ligada a dois átomos de Ferro; TfR1 e TfR2, receptor de transferrina 1 e 2; HFE, proteína alterada na hemocromatose; STEAP3, antígeno epitelial seis-transmembrana da próstata 3; DMT1, transportador de metal divalente 1; FPN, ferroportina. Adaptado de Graham *et al.*, 2007.

2.1.9 ARMAZENAMENTO

A regulação da disponibilidade de ferro intracelular acontece de acordo com as concentrações sistêmica, o que se reflete no aumento ou na diminuição da expressão de receptores de transferrina e, conseqüentemente, da hepcidina. O

aumento na produção de ferritina acontece nas células hepáticas, quando o fornecimento de ferro excede suas necessidades funcionais (Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004).

A ferritina, proteína multimérica ubíqua e altamente conservada, é a forma em que o ferro que não é necessário para uso imediato é armazenado dentro da célula. Em vertebrados, a ferritina possui duas subunidades: leve (L) e pesada (H), podendo se ligar a até 4500 átomos de ferro (Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004). Para que o ferro seja sequestrado pela ferritina, esse metal, proveniente do *pool* lábil, se liga à proteína, porém de forma menos reativa. A subunidade H possui ferroxidasas que transformam o Fe (II), mais reativo, em Fe (III), sendo esta a forma armazenada. Já a subunidade L da ferritina tem um importante papel na nucleação do ferro e na estabilidade da proteína. Com a degradação da ferritina e consequente liberação do ferro no *pool* intracelular é que acontece a mobilização desse metal para suas funções extracelulares (Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004).

O ferro também pode ser armazenado no interior da célula pela hemossiderina, que é um produto da degradação da ferritina e é insolúvel em água. A quantidade de ferro na hemossiderina é variável e, por sua insolubilidade possui menor importância biológica (NAS, 2001).

Dentro do sistema biológico, a presença do ferro associado à proteínas constitui uma estratégia bioquímica capaz de proteger as células contra possíveis danos oxidativos catalisados por ferro livre. Além disso, essa associação evita a perda do ferro por filtração glomerular e facilita a captação do metal pelos demais tecidos (Ganz e Nienmeth, 2011b; Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004; Crichton *et al.*, 2002).

2.1.10 EXCREÇÃO

Como não existe uma maneira de eliminação do ferro em humanos e apenas uma pequena quantidade desse mineral é perdida diariamente por descamação celular, o ferro corporal mantém-se conservado, exceto em situações específicas, tais como sangramento, gravidez ou menstruação (Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004).

As perdas basais de ferro podem diminuir a 0,5 mg/ dia na deficiência e aumentar até 2 mg/ dia no excesso desse metal. Em mulheres que não menstruam, as perdas diárias de ferro atingem de 0,9 a 1,02 mg/dia, sendo que a maior parte do metal que é excretada é liberada nas fezes. Diariamente, as perdas urinárias, do trato gastrointestinal e da descamação da pele são de 0,08 mg, 0,6 mg, e 0,2 mg, respectivamente (NAS, 2001).

2.1.11 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DOS METABOLISMOS INTRACELULAR E SISTÊMICO DO FERRO

A regulação do metabolismo do ferro intracelular e sistêmico pode ser feita por um mecanismo de controle da tradução de outras proteínas via IRP/IRE (*Iron Regulatory Proteins* – Proteínas reguladoras de ferro; *Iron Responsive Elements* – Elementos Responsivos ao ferro) a nível intracelular ou a nível sistêmico (pós-traducional), via hepcidina (Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009). A tabela 2 mostra as principais proteínas envolvidas na absorção, transporte, liberação e regulação no metabolismo do ferro, suas funções e principais locais de expressão.

Tabela 2 – Principais proteínas envolvidas na absorção, transporte, liberação e regulação do metabolismo de ferro, suas funções e principais locais onde são expressas. Adaptado de Oates, 2007.

Proteína	Função	Expressão
DMT1 ¹	Importa Fe(II) para o citoplasma	Intestino delgado, células eritroides, macrófagos e endossomas
Dcytb ²	ferroredutase	Intestino delgado
STEAP3 ³	ferroredutase	Fígado
Ferritina	Armazena Fe(III)	Ubíqua
ferroportina	Exporta Fe(II)	Fígado, baço, intestino delgado, macrófagos, placenta, rins e pulmões
Hefaestina	ferroxidase	Intestino delgado
Transferrina (Tf)	Transporte plasmático de Fe(III)	Ubíqua
Receptor de transferrina (TfR)	Liga-se à HFE e Tf diférrica; modula a captação de ferro	Ubíqua ⁵
HFE ⁴	Liga-se ao TfR; modula síntese de hepcidina	Fígado e intestino delgado
Hepcidina	Hormônio regulador	Fígado ⁶

¹ Transportador de metal divalente-1

² Citocromo duodenal B

³ Antígeno epitelial seis-transmembrana da próstata 3

⁴ Proteína da hemocromatose

⁵ Receptor de transferrina tipo 2 expresso somente no fígado

⁶ Expressa também em menor quantidade no coração, músculo, intestino delgado.

2.1.11.1 Regulação sistêmica da homeostase do ferro

O fígado é o órgão responsável por regular o fluxo e a absorção de ferro do organismo por intermédio do controle de, pelo menos, quatro proteínas: a hepcidina, a proteína da hemocromatose (HFE), a hemojuvelina (HJV), o receptor de transferrina 2 (TfR2). Tanto a HFE quanto a HJV e o TfR2 têm a função de regular a expressão de hepcidina. Essa proteína é um mediador humoral que determina a quantidade de ferro a ser absorvido pelos enterócitos e disponibilizado pelos macrófagos (Muñoz, García-Erce e Remacha, 2010b; Tsuchiya *et al.*, 2009; Oates, 2007; Frazer e Anderson, 2003).

A hepcidina (*hepcidin* - ***hepatic bactericidal protein***) foi isolada inicialmente como um peptídeo antimicrobiano circulante, a partir da urina de humanos, em 2000, por Krause e colaboradores, e posteriormente foi renomeada por Park (Atanasiu, Manolescu e Stoian, 2006). Sua expressão ocorre majoritariamente no fígado, como pró-hepcidina, porém os músculos, o tecido adiposo, o intestino, o estômago, o cólon, os pulmões e o coração possuem pequenos níveis desse peptídeo (Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009; Grotto, 2008). Tanto os processos inflamatórios, especialmente as interleucinas pró-inflamatórias, quanto o excesso de ferro são responsáveis pela síntese de hepcidina, sendo a anemia e a hipóxia responsáveis por sua inibição (Wang *et al.*, 2008; Atanasiu, Manolescu e Stoian, 2006; Nicolas *et al.*, 2002b). Essa proteína somente é secretada na circulação após ser clivada à sua forma madura, bioativa, como um peptídeo formado por 25 aminoácidos (Hentze *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2005).

Vários estudos mostram que a hepcidina tem um importante papel na manutenção dos níveis de ferro por meio da regulação da sua absorção, principal ponto de controle da homeostase do ferro (Ganz e Nemeth, 2011a; Leong e Lönnnerdal, 2004; Templeton e Liu, 2003; Kaplan, 2002; Park *et al.*, 2001), o qual acontece por meio de interações com a ferroportina (Nemeth *et al.*, 2004; Yeh, Yeh e Glass, 2004). Os resultados de 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 desse elemento (Nicolas *et al.*, 2002a), bem como a demanda de ferro, para a produção de eritrócitos (Pigeon *et al.*, 2001).

Prentice e colaboradores em 2012 realizaram um estudo com crianças de Gambia portadoras de anemia que foram suplementadas com ferro. Os autores concluíram que a hepcidina controla de maneira eficiente a utilização do ferro proveniente da dieta.

Estudos em ratos demonstram que o aumento na expressão da hepcidina tem sido associado ao acúmulo de ferro nos tecidos, enquanto sua deficiência resulta em anemia por deficiência de ferro. Em humanos, algumas mutações no gene da hepcidina têm sido reportadas como causadoras de hemocromatose juvenil severa (Ramos *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005; Yamaji *et al.*, 2004).

A regulação da absorção de ferro pelas células duodenais, bem como a inibição da liberação do ferro contido nos macrófagos, acontece por meio da regulação negativa que a hepcidina plasmática exerce no mecanismo de absorção e liberação deste mineral (Fernandes *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005). Embora o mecanismo de inibição da absorção do ferro ainda não esteja completamente elucidado, recentemente postulou-se um mecanismo por meio do qual a hepcidina parece induzir a internalização e a degradação da proteína exportadora de ferro nas células (a ferroportina), resultando assim na retenção de ferro nos enterócitos, macrófagos e hepatócitos (Ganz, 2005; Nemeth *et al.*, 2004).

Em 2005, Rivera e colaboradores mostraram, por intermédio de um estudo, que a ativação da expressão de hepcidina reduziu os níveis plasmáticos de ferro em um prazo de cerca de 6 horas. Os autores também verificaram uma resposta mais rápida quando a hepcidina-25 (forma bioativa) recombinante foi administrada por via parenteral em camundongos. Os autores concluíram que a diferença de tempo de resposta da expressão de hepcidina nos níveis plasmáticos de ferro representou o tempo necessário para ativar a tradução e as modificações pós-traducionais desse peptídeo, e com isso, sua secreção, antes mesmo de produzir algum efeito.

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 mediado pela hepcidina (Ganz, 2011c; Trombini *et al.*, 2011; Oates, 2007; Ganz, 2005).

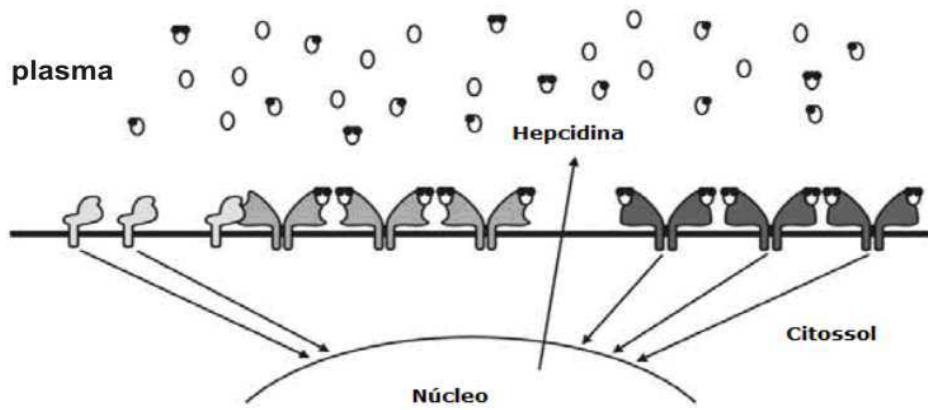
A mutação do gene da HFE foi a primeira a ser relacionada com a hemocromatose, doença que leva a uma produção constantemente baixa de hepcidina, e conseqüente acúmulo de ferro nos órgãos. Sugere-se, então, que o mecanismo de regulação da hepcidina via HFE seria resultante da regulação positiva que a HFE tem sobre a expressão de hepcidina (Fernandes *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005), além de estar envolvida também na captação celular de ferro pelo TfR1, limitando assim, a quantidade de ferro liberada pela transferrina (Muñoz, García-Erce e Remacha, 2010a; Graham *et al.*, 2007).

O *status* corporal aumentado de ferro é refletido em altos níveis de Tf diférrica, levando a um aumento da afinidade entre a Tf e o TfR1, e um subsequente aumento na quantidade de HFE livre na superfície do hepatócito. Maiores quantidades de HFE livre provocam um estímulo de tradução ainda desconhecido, que leva a um aumento da expressão de hepcidina (Ramos *et al.*, 2011; Atanasiu, Manolescu e Stoian, 2006; Frazer e Anderson, 2003).

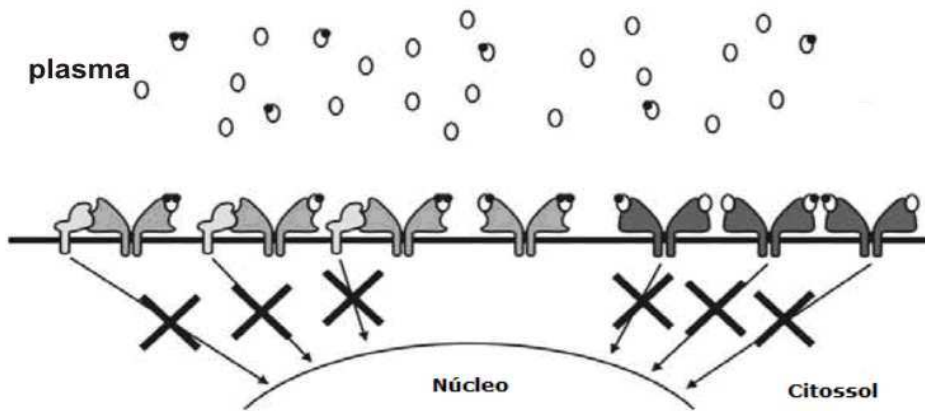
A diminuição dos estoques corporais de ferro produzido pela hepcidina leva a uma captação mais eficiente de ferro, já que a saturação de transferrina diminui. Assim, a proporção de Tf monoférrica aumenta em relação à Tf diférrica, enquanto que a expressão de TfR1 aumenta. O TfR1 produzido se liga à HFE na superfície do hepatócito, restando poucas moléculas de HFE livres e cessando/ diminuindo o estímulo para produção de hepcidina (Muñoz, García-Erce e Remacha, 2010a; Gao *et al.*, 2010; Atanasiu, Manolescu e Stoian, 2006).

A Figura 6 mostra o mecanismo proposto por Frazer e Anderson em 2003, um dos modelos para a regulação da expressão de hepcidina hepática, via receptores de transferrina e HFE.

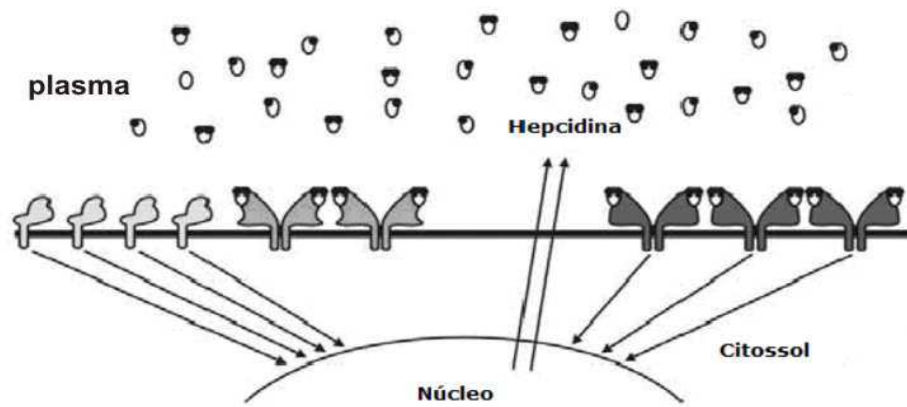
A. Normal



B. Deficiência de ferro



C. Excesso de ferro



	Receptor de transferrina 1		Transferrina diférrica
	Receptor de transferrina 2		Transferrina monoférrica
	HFE		Apotransferrina

Figura 6 – Modelo de regulação da expressão de hepcidina. Adaptado de Frazer e Anderson, 2003.

A necessidade de ferro no organismo é detectada pelas alterações na razão de transferrina diférrica e receptor de transferrina 1. A Tf-diférrica tem maior afinidade com o TfR1, em relação à HFE. Em situações normais (Figura 6A), há Tf-diférrica suficiente para se ligar ao TfR1. A HFE livre sinaliza o núcleo para a produção de hepcidina. A Tf-diférrica também se liga ao TfR2, produzindo um sinal redundante. Na deficiência de ferro (Figura 6B), os níveis de Tf-diférrica são reduzidos drasticamente, diminuindo a afinidade do TfR1 e permitindo a ligação deste à HFE, diminuindo o sinal para produção de hepcidina. Em condições de excesso de ferro (Figura 6C), os níveis de Tf-diférrica aumentam e a quantidade de TfR1 livre na superfície da célula diminui, liberando a HFE, que induz a expressão de hepcidina no plasma. Simultaneamente, o excesso de Tf-diférrica se liga ao TfR2, potencializando o sinal para produção de hepcidina (Gao *et al.*, 2010; Hentze *et al.*, 2010; Frazer e Anderson, 2003).

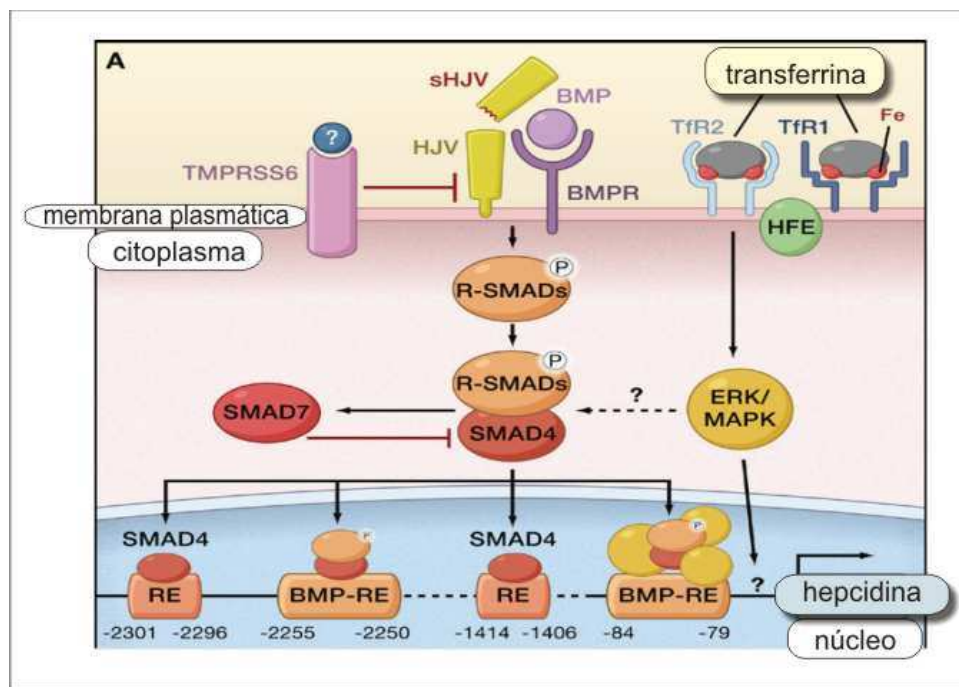


Figura 7 – Modelo de regulação da expressão de hepcidina.

Adaptado de Hentze *et al.*, 2010.

Hentze e colaboradores (2010) em sua revisão, propuseram um modelo complementar ao de Frazer e Anderson (2003), onde a ativação da transcrição da hepcidina via Tf-diférrica ligada ao TfR2 aconteceria via sinalização ERK/MAPK (complexo proteínas quinase de regulação da tradução de sinal e de ativação mitogênica, respectivamente) e BMP (proteína morfogenética óssea), um correceptor

de hemojuvelina (HJV) que, por sua vez, interage tanto com os receptores tipo I quanto com os tipo II da BMP (BMPR). Na membrana plasmática haveria, então, a fosforilação do receptor de SMAD4 (R-SMAD) e subsequentemente ativação transcricional dos complexos envolvidos nas cascatas de sinais do SMAD4. Essa sinalização seria inibida pela hemojuvelina solúvel (sHJV), onde a protease transmembrana serina-6 (TMPRSS6) interagiria fisicamente com a HJV, fragmentando-a. O SMAD7 também parece interferir na ativação da hepcidina via SMAD4 (Figura7).

Ganz e Nemeth em 2011 acrescentaram ao modelo supracitado a neogenina, proteína receptora de netrinas, que também parece interagir com a HJV e BMPR juntamente com o complexo de proteínas EPK/MAPK. Entretanto, os autores ainda desconhecem o real mecanismo dessa interação.

2.1.11.2 Regulação celular da homeostase de ferro

A quantidade de ferro intracelular determina a síntese das proteínas relacionadas ao seu metabolismo e a modulação da síntese protéica pode se dar a nível de estabilidade da tradução do mRNA e em nível pós-traducional (Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004).

O mecanismo de regulação que se aplica à síntese das proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro a nível traducional é o que estabiliza o mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) das proteínas ferroportina, ferritina, transferrina e DMT1 por meio da interação entre as proteínas reguladoras de ferro (IRP – *iron regulatory proteins*) e os elementos responsivos a ferro (IRE – *iron responsive elements*) (Hentze *et al.*, 2010; NAS, 2001).

Os IREs, grupo de sequências de cerca de 30 nucleotídeos, aparecem 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, Muckenthaler e Andrews, 2004; Templeton e Liu, 2003).

Os IREs na região 3' UTR (não traduzida) são encontrados em cópias múltiplas no mRNA do receptor de transferrina e do DMT1 e não se posicionam de forma a bloquear a tradução. Pelo contrário, ao se complexarem aos IRPs, o mRNA é protegido da degradação pelas nucleases celulares, aumentando a quantidade de proteína sintetizada. Assim, fica evidente a necessidade de transportadores como o TfR e o DMT1 em casos de deficiência de ferro, a fim de que haja um aumento da capacidade absorptiva e da captação celular desse metal no intestino (Hentze *et al.*, 2010; Templeton e Liu, 2003).

Os IREs na região 5' UTR (não traduzida) do transcrito aparecem em cópias únicas e são encontrados no mRNA da ferritina e da ferroportina, dentre outras proteínas. Sua ligação aos IRPs é aumentada pela deficiência de ferro e a complexação IRP-IRE em uma região pré-codificadora bloqueia o progresso do maquinário de tradução. Esse processo diminui a síntese de proteínas de armazenamento (ferritina) e exportação celulares (ferroportina) (Andrews, 2008; Templeton e Liu, 2003; Martini, Tchack e Wood, 2002).

É por meio da interação com as IRP1 com os IRE que há regulação da estabilidade do mRNA, já que 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, e com isso perde 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 (IRP1). Esses IRPs ativos então se ligam aos IREs na molécula de mRNA das proteínas ferritina, TfR, DMT1 e ferroportina. Assim, quem determina se após a formação do complexo IRE/IRP a tradução é bloqueada ou o mRNA é estabilizado, diminuindo ou aumentando a tradução da proteína regulada, é a posição do IRE no mRNA, 5' UTR ou 3' UTR (Ganz e Nemeth, 2011a; Dupic *et al.*, 2002; Eiseinstein, 2000; Eiseinstein e Blemings, 1998). A Figura 8 mostra o sistema regulador do ferro via IRP/IRE.

Em um estudo, Collins e colaboradores (2005) demonstraram que o DMT1, responsável pelo transporte de ferro nas células da borda em escova do intestino, foi significativamente induzido pela privação desse metal e o gene que codifica a

ferroportina (proteína basolateral necessária na exportação de ferro) foram menos expressos. Assim, os autores sugeriram que a menor regulação na expressão de ferroportina poderia ser explicada por uma regulação na atividade da proteína pós-traducional (NAS, 2001).

Os níveis de mRNA de DMT1 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 (Andrews, 2008; Mackenzie e Hediger, 2004; Zoller *et al.*, 2001). Esses aumentos chegam à ordem de 10 vezes nos estados de deficiência de ferro (Andrews, 2000).

O estudo de Aydemir e colaboradores de 2009 mostrou que houve um aumento paralelo nos níveis de mRNA e hnRNA (RNA heterogêneo nuclear) de transcritos de ferroportina (Fpn) no intestino em resposta a um aumento nas concentrações de ferro. Os autores ainda ressaltaram ser possível que esse aumento não resulte somente de uma maior ativação transcricional da ferroportina, mas sim também de um bloqueio na tradução dessa proteína por uma maior estabilidade do pré-mRNA.

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

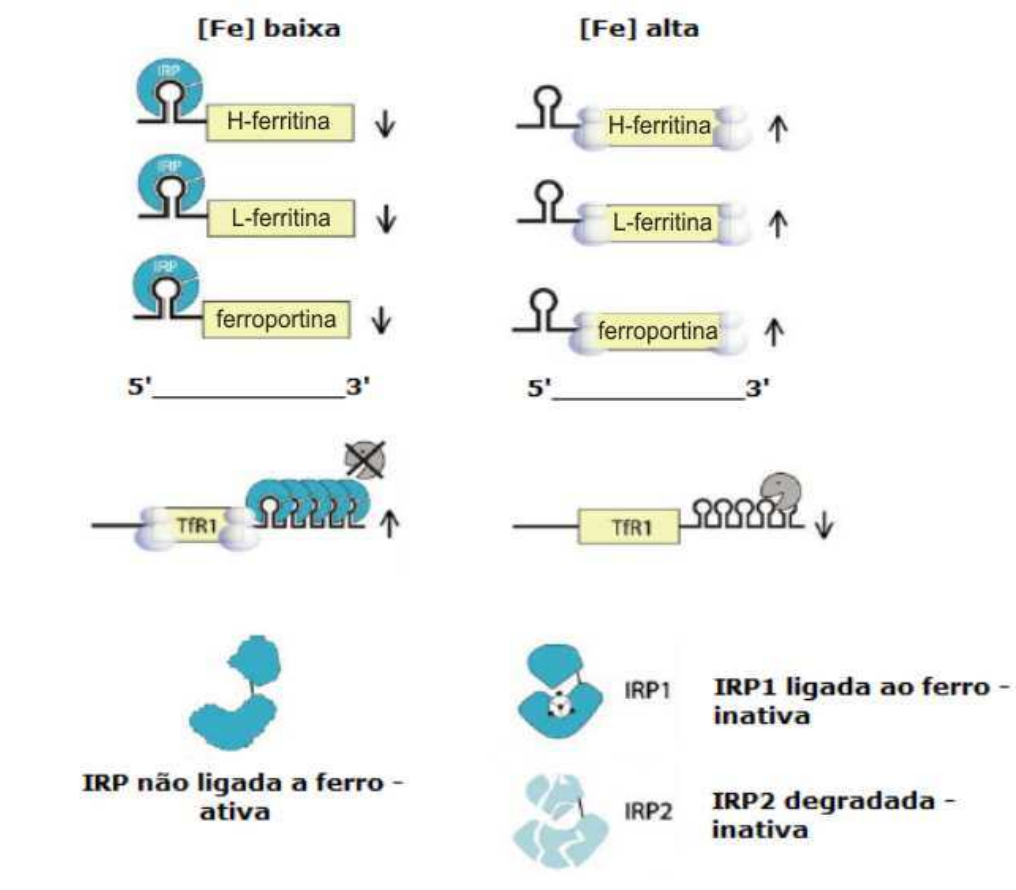


Figura 8 – Sistema regulador de Ferro IRP/IRE. Em situações de baixas concentrações de Ferro, a tradução de proteínas de armazenamento e exportação celular (ferritina e ferroportina, respectivamente) é bloqueada pela ligação da IRP ao IRE na posição 5'-UTR, enquanto que proteínas de captação do Ferro (Tfr1) e absorção (não mostrado na figura) têm seu mRNA estabilizado contra degradação por endonucleases pela ligação IRP/IRE na posição 3'-UTR. H-ferritina, subunidade pesada da ferritina; L-ferritina, subunidade leve da ferritina; Ferroportina; Tfr1, receptor de transferrina 1; IRP, proteína reguladora de Ferro; IRE, elemento responsivo a Ferro. Adaptado de Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004.

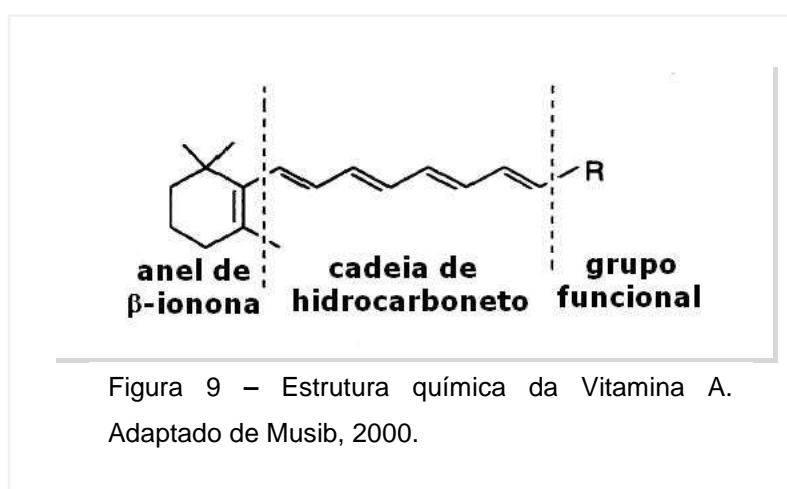
2.2 VITAMINA A

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel que pode ser obtida diretamente da dieta, como vitamina A pré-formada (éster de retinol), ou por meio de alguns pigmentos – os carotenoides, que podem ser clivados pelo organismo, dando origem ao retinol (Underwood, 2004).

A vitamina A pré-formada é obtida apenas em fontes animais, sendo as fontes dietéticas mais ricas o fígado, o óleo de peixe, a gema de ovo e os laticínios. Os carotenoides pró-vitamina A são obtidos a partir 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 desses vegetais como fontes de carotenoides seriam a ingestão *in natura* ou na forma de sucos, ou em óleos e doces. Exemplos de utilizações dessas fontes de carotenoides 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, Lima e Santos, 1989).

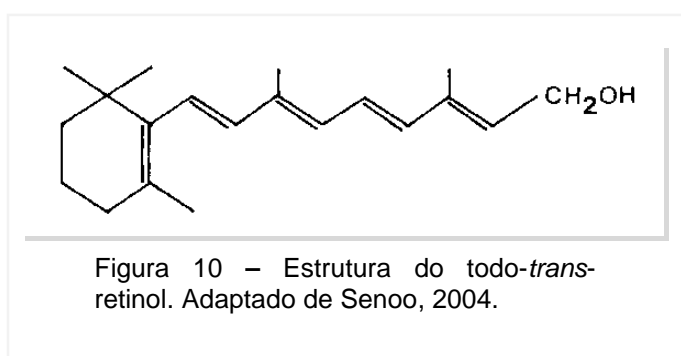
Em países desenvolvidos, estima-se que 25 a 35% da vitamina A dietética



seja proveniente dos carotenoides (Van den Broek, 2003). No continente americano, segundo a OMS, cerca de 60% da vitamina A obtida na alimentação é originada de carotenoides pró-vitamínicos A (WHO, 1995).

O termo retinoide é o mais empregado para designar a família dos 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 9) (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 nas suas diversas isoformas. Vale ressaltar que a variação de um retinoide para outro está em suas diferentes formas de oxidação do grupo funcional (Senoo, 2004).

O retinol é a forma alcoólica da vitamina A, possuindo o grupo hidroxila (OH) ligada ao carbono 15 (Figura 10). É uma das principais formas de transporte da vitamina A pelo plasma juntamente com os quilomícrons que transportam ésteres de retinil (Souza e Villas Boas, 2002).



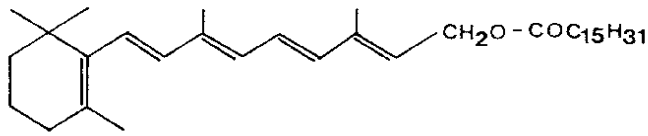


Figura 11 – Palmitato de retinil, o éster de retinil mais frequente nos animais. Adaptado de Senoo, 2004.

Os ésteres de retinil são as formas ésteres da vitamina A (Figura 11) 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).

O retinal (Figura 12) é fundamental no processo visual dos vertebrados, ligando-se à opsinina, e formando a rodopsina, que é a proteína responsável pela captação da energia luminosa e está presente nos bastonetes da retina (Senoo, 2004).

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).

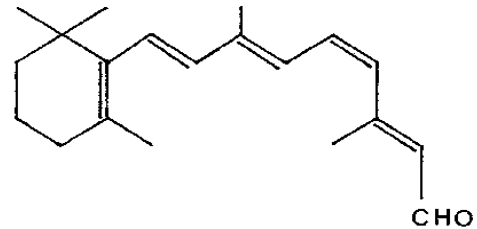


Figura 12 – Esquema do 11-*cis*-retinal existente na retina e ligado à rodopsina. Adaptado de Senoo, 2004.

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 13) (Musib, 2000).

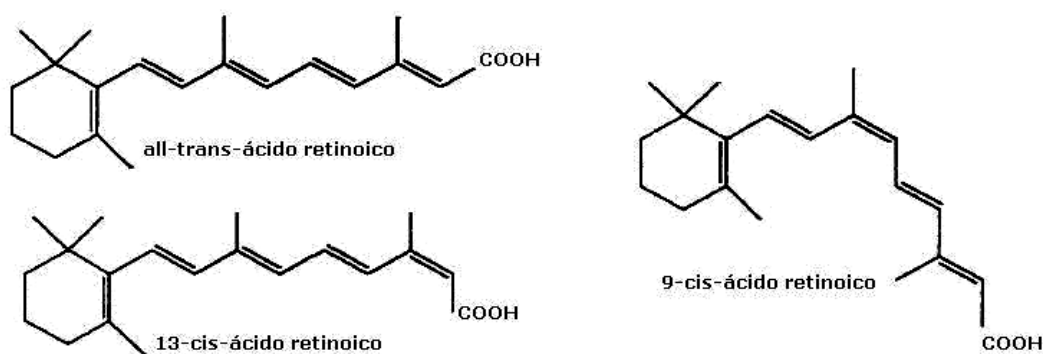


Figura 13 – Isoformas mais comuns do ácido retinoico. Adaptado de Musib, 2000.

Os retinoides em suas várias formas desempenham três funções principais: proliferação e diferenciação celulares, 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, Schnider e Vieira, 1995; De Luca, 1991; Blomhoff *et al.*, 1990). Um papel antifeccioso 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 da quantidade de vitamina A corpórea é feita 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 dos métodos mais acurados cientificamente já que não há variação em relação à homeostase (Van den Broek, 2003).

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. Há também relatos na literatura que uma dieta desprovida de vitamina A resulta em decréscimo dos níveis de hemoglobina, uma vez que a ação hormonal da vitamina A, via ácido retinoico, parece modular a expressão de vários genes, incluindo os envolvidos no metabolismo do ferro (Allen, Peerson e Olney, 2009; Arruda, Siqueira e Valência, 2009; Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009).

2.2.1 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 3.

Tabela 3 – 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.

2.2.2 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A

A deficiência de vitamina A juntamente com a anemia ferropriva são consideradas pela OMS como problemas de Saúde Pública que tem se destacado no panorama mundial. A OMS inclui essa deficiência, juntamente com a anemia, como fatores que oferecem maiores riscos à saúde humana (Bloem, 1995).

Os principais grupos de risco de 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 dessa vitamina ainda em estágio subclínico (WHO, 1996); ou seja, forma em que a deficiência só pode ser detectada por meio de exames bioquímicos, quadro que pode trazer graves problemas à saúde, aumentando ainda mais o risco de morbi-mortalidade desses indivíduos (Kabat *et al.*, 2009; Sommer, Katz e Tarwotjo, 1984).

A deficiência marginal pode acontecer pela demanda extra de vitamina A gerada pela gestação, resultando em um quadro sintomático de deficiência com diversas manifestações clínicas das mais simples as mais complexas, tais como a xeroftalmia (cegueira noturna). Durante a gestação, como 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). Dados mundiais mostram que, 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. Anualmente, entre 250 mil e 500 mil crianças se tornam cegas por deficiência de vitamina A, metade das quais morrem em até 12 meses após a perda da visão (WHO, 2010). O número de pessoas em risco para deficiência de vitamina A no mundo é frequentemente estimado por aproximações; contudo, sabe-se que esse 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).

No Brasil, a carência de vitamina A na população ainda é pouco conhecida. Relatos na literatura mostram que, devido ao tamanho e diversidade da população brasileira, são poucas as informações disponíveis sobre óbito e incapacitações causadas pela falta de vitamina A. Entretanto, as áreas consideradas endêmicas

para deficiência de vitamina A são a região Nordeste e o Vale do Jequitinhonha-MG, onde há um programa de suplementação infantil com megadoses de vitamina A (Souza e Vilas Boas, 2002; Ferraz, Daneluzzi e Vannucchi, 2000; Simmons, 1976). Dentre as principais doenças causadas pela hipovitaminose A estão aquelas associadas à visão. A cegueira noturna, causada pela diminuição da rodopsina nos bastonetes da retina, é uma delas (Tanumihardjo, 2004). Outro exemplo é a ceratomalácea, cegueira irreversível causada pela cicatrização da córnea em uma região que compromete a passagem da luz para a retina (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 trabalho realizado com 4600 crianças, uma relação entre o aumento na incidência de doenças respiratórias e diarreia naqueles que apresentavam doenças oculares.

Atualmente, 23% das mortes por diarreia em crianças brasileiras são reconhecidamente associadas à deficiência de vitamina A, sendo o Brasil classificado pela OMS como área de carência subclínica grave. Calcula-se que o número de crianças com carência marginal de vitamina A seja de cinco a dez vezes maiores do que o número de crianças com carência clínica (Martins *et al.*, 2007a; Kobori e Amaya, 2008; Ramalho, Flores e Saunders, 2002). Estudos realizados na região nordeste têm indicado a deficiência de vitamina A como um grave problema de Saúde Pública, registrando 14,7 a 54,7% de inadequação dos níveis séricos de retinol (Prado *et al.*, 1995). Inquéritos bioquímicos confirmam que há deficiência de vitamina A também nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Martins *et al.*, 2007b; Ramalho, Flores e Saunders, 2002). Os grupos populacionais mais susceptíveis são as gestantes, nutrizes e crianças, sendo a faixa etária 3 a 5 anos (Batista-Filho e Rissin, 2003; Ramalho, Flores e Saunders, 2002; Semba, Muhalil e West, 1992).

A ingestão deficiente em vitamina A na dieta ou o defeito do metabolismo dessa vitamina são citados como as prováveis causas de distrofias e disfunções visuais (Kabat *et al.*, 2009; Darlow e Graham, 2000). Em alguns casos não é claro se a ocorrência de hipovitaminose A está ligada ao consumo insuficiente ou a outros fatores envolvidos na biodisponibilidade e bioconversão dos carotenoides dietéticos

(Goswami, Ivanoff e Barua, 2003). A causa primária das deficiências vitamínicas é a falta ou aporte deficiente dessas substâncias na dieta (Ramalho, Flores e Saunders, 2002; WHO, 1996).

A hipovitaminose A também tem sido associada a efeitos negativos na hematopoiese, pois parece haver uma relação entre a diminuição na síntese de hemoglobina e consequente agravamento da anemia ferropriva (Davey *et al.*, 2009) além de acúmulo de ferro nos tecidos de animais submetidos à deficiência dessa vitamina (Arruda, Siqueira e Valência., 2009). Isso sugere que a carência de vitamina A diminui a mobilização e/ou aumento da absorção de ferro através da ação hormonal da vitamina A na modulação da expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo de ferro tanto a nível celular, quanto sistêmico (Roodenburg *et al.*, 2000). Esse é um aspecto importante a ser considerado em países em desenvolvimento, já que as anemias nutricionais se constituem em alguns dos principais problemas de Saúde Pública (WHO, 2010).

2.2.3 EXCESSO DE VITAMINA A

A deficiência de vitamina A em humanos é uma condição bem mais frequente do que o seu excesso, que geralmente ocorre quando indivíduos são submetidos à suplementação constante com megadoses dessa vitamina. Os principais efeitos do excesso de vitamina A estão relacionados à sua hepatotoxicidade e à desregulação do controle da divisão e proliferação celulares dos quais a vitamina A participa (Oates, 2007).

Estudos indicam que em locais onde há suplementação de vitamina A observa-se alta incidência de malformação fetal, o que pode estar relacionado à alta ingestão dessa vitamina (acima de 10.000 UI/dia) (Van den Broek, 2003).

2.2.4 METABOLISMO DA VITAMINA A

2.2.4.1 Absorção

Biodisponibilidade é definida como a proporção do nutriente presente nos alimentos que é absorvida, tornando-se disponível para ser utilizada em funções fisiológicas ou armazenada 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 digestão e absorção da vitamina A estão intimamente relacionadas com a quantidade de lipídios da dieta. Esses parecem interferir na biodisponibilidade tanto da vitamina A quanto dos carotenoides pró-vitamínicos A (Van den Broek, 2003).

A absorção da vitamina A e dos carotenoides ocorre por difusão passiva. Assim, tendo em vista que sua absorção pode ser determinada por meio dos gradientes de concentração entre as micelas advindas da alimentação e a membrana plasmática, essa vitamina pode ser absorvida juntamente com o colesterol e com produtos da lipase de triglicerídeos. Dessa forma, quanto maior a concentração de gordura ingerida com a vitamina A, maior será sua capacidade de ser absorvida pelo intestino (Parker, 1996).

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 criptoxantina, são clivados na mucosa intestinal a retinal pela enzima β -caroteno-15,15 - monoxigenase, reduzidos a retinol e depois transformados a éster de retinil (Underwood, 2004; Yeum e Russell, 2002; Parker, 1996).

2.2.4.2 Transporte

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

Agregados lipoproteicos recobertos por fosfolipídios, os quilomícrons são capazes de circular pela corrente sanguínea e são 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 14) (Underwood, 2004; Yeum e Russell, 2002; Parker, 1996).

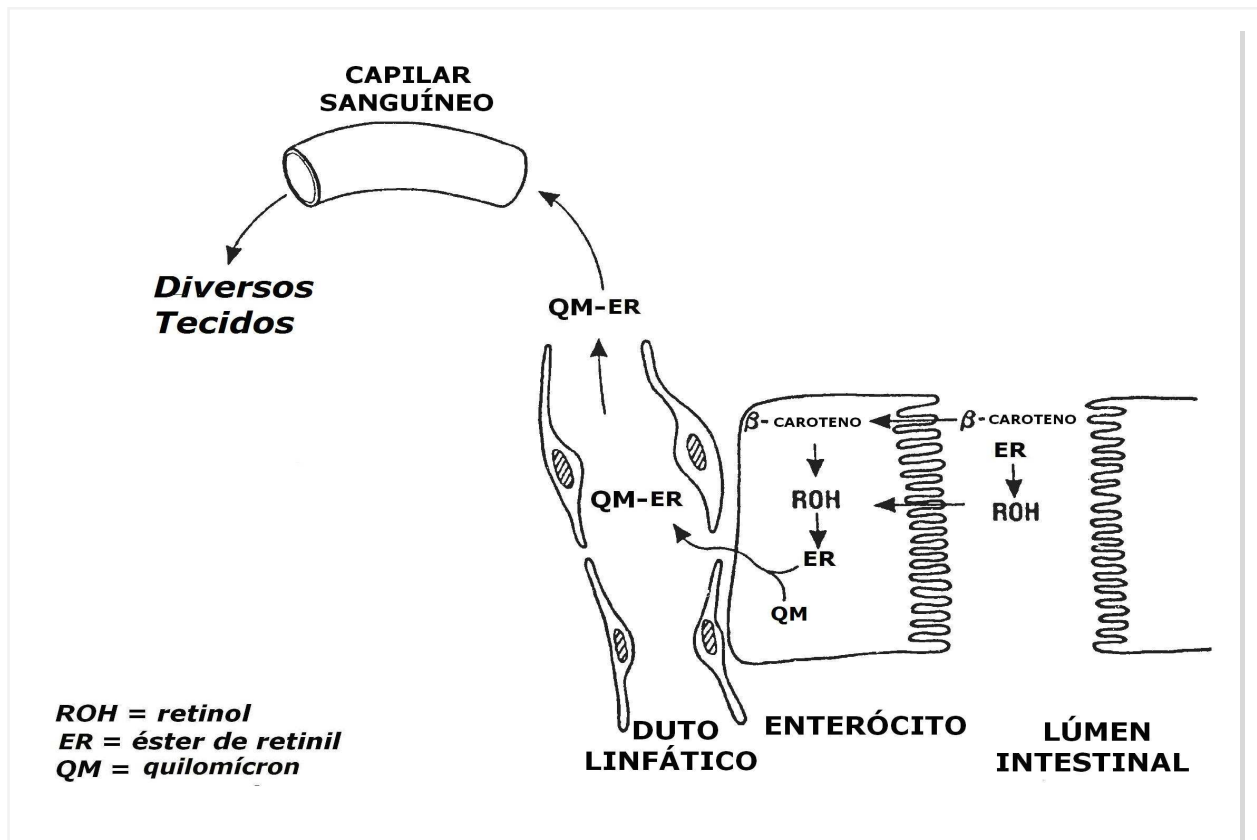


Figura 14 – Absorção do β -caroteno e do retinol pelos enterócitos. O β -caroteno absorvido pode ser clivado a retinol. O retinol é esterificado a éster de retinil, sendo incorporado aos quilomícrons e transportado por meio da corrente sanguínea para os diversos tecidos do organismo. Adaptado de Senoo, 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,

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 (Vogel *et al.*, 2002).

Nas células parenquimais, os ésteres de retinil se ligam principalmente à CRBP 2, onde, pela ação da LRAT, são oxidados a retinol (Figura 15) (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).

A RBP tem um papel fundamental no controle da vitamina A no organismo, uma vez que esta proteína é a responsável pela mobilização da vitamina A dos órgãos-estoque (Tsutsumi *et al.*, 1992). A concentração de retinol-RBP plasmática permanece relativamente constante até que o fígado esteja praticamente depletado de vitamina A (Davila *et al.*, 1985).

2.2.5 AÇÃO HORMONAL DA VITAMINA A

Os ácidos retinoicos são responsáveis por ativar 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, essas proteínas interagem entre si, formando dímeros como RAR/RXR ou RXR/RXR. Esses dímeros são capazes de se ligar a algumas regiões específicas do DNA chamadas Elementos Responsivos de Retinoides (“RARE” ou “RXRE”) (Blomhoff *et al.*, 1990). Essas regiões se localizam na área 5' do gene, regulando, dessa forma, sua expressão (Ross, 2003).

Como já descrito anteriormente, o ácido retinoico é um potente hormônio que atua na expressão de centenas de genes (Mitro *et al.*, 2007; Ross e Zolfaghari, 2004; Vogel *et al.*, 2002), como nos responsáveis pela síntese da álcool desidrogenase e da transglutaminase, proteínas transportadoras de retinol e matriz extracelular (laminina). O ácido retinoico age também nos genes diretamente envolvidos na diferenciação e na inibição da proliferação celulares (Vauclair *et al.*,

2007), mecanismos pelos quais o ácido retinoico parecer estar envolvido na regulação do metabolismo de ferro (Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009; Oates, 2007).

2.3 INTERAÇÃO ENTRE VITAMINA A E FERRO

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

Desde a década de 1920, estudiosos vinham observando uma associação entre a deficiência de vitamina A e anemia ferropriva em humanos e em animais (Blackfan e Wolbach, 1933; Koessler, Maurer e Loughlin, 1926), sem que fosse encontrada uma explicação metabólica e fisiológica para essa associação. Em 1978, Hodges e colaboradores novamente descreveram a possível associação entre a deficiência de vitamina A e a anemia ferropriva. 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).

Trabalhos experimentais em humanos e animais têm demonstrado que os metabolismos de ferro e vitamina A podem interagir entre si. Essa interação foi demonstrada inicialmente por meio da análise do efeito da vitamina A no metabolismo do ferro. A deficiência da vitamina A resultou em anemia moderada, imunossupressão e dificuldade no reparo a danos epiteliais, tanto em animais quanto em humanos (Tsuchiya *et al.*, 2009; Ameny *et al.*, 2002).

Nos indivíduos que sofrem de deficiência de vitamina A, o ferro não é adequadamente incorporado pelas células vermelhas do sangue, o que ocorre naturalmente em indivíduos saudáveis (Walczyk *et al.*, 2003; Cook e Yu, 1998). Esse aspecto é corroborado pelo fato de que a vitamina A é necessária para a eritropoiese. Uma correlação positiva entre os valores de retinol hepático e de hemoglobina foi observada em crianças de alguns países, como Índia (Mohanram, Kulkarni e Reddy, 1977), Guatemala (Mejia e Hodges, 1977), Indonésia (Semba,

Muhalil e West, 1992) e África do Sul (Beynen, Sijtsma e Van den Berg, 1992), bem como em modelos animais (Sijtsma e Van den Berg, 1993).

Quando comparada à suplementação apenas com ferro, 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, West e Karyadi, 1993; Panth, Shatrunga e Yasdohara, 1990).

Estudos têm demonstrado que a deficiência de vitamina A pode estar associada à anemia (Ettyang *et al.*, 2003; Mwanri *et al.*, 2000; Bloem, 1995). Hodges e colaboradores em 1978 analisaram estudos realizados em indivíduos cuja ingestão de vitamina A era deficiente e, de ferro, adequada, tendo encontrado uma correlação positiva entre os níveis séricos de hemoglobina e de vitamina A. Os autores também concluíram que essa relação não foi observada quando correlacionados os níveis de hemoglobina e a ingestão de ferro.

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 (Jimenez *et al.*, 2010; Thurnham, 1993).

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 ferro 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, em 2002, realizaram um estudo simulando a recuperação da coocorrência 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. Strube, Beard e Ross, também em 2002, em um estudo com ratos, investigaram os efeitos da deficiência de ferro e vitamina A isoladamente e combinados, relacionando-os com dados bioquímicos, moleculares e hematológicos marcadores desses micronutrientes. A restrição de ferro reduziu o ganho de peso, a

ingestão alimentar e os níveis de hemoglobina, hematócrito, ferro sérico e saturação de transferrina nos animais. Os autores observaram ainda que a quantidade de ferro dietético afetou a concentração plasmática e hepática de retinol. A deficiência de ferro esteve associada com uma baixa concentração de retinol plasmático e com um aumento na concentração de vitamina A hepática, que indicaria uma insuficiência na mobilização de estoques de vitamina A hepática durante a deficiência de ferro. Porém, a deficiência marginal de vitamina A não agravou os parâmetros de ferro durante a deficiência de ferro.

Têm-se observado também que, em condições de deficiência de vitamina A, a gravidade de algumas doenças infecciosas é aumentada, em especial aquelas associadas à diarreia. Estes resultados acarretam inúmeros problemas de saúde em países em desenvolvimento que recorrem a programas de suplementação para enfrentar o problema. Tais resultados têm importante relevância nutricional, já que em países onde a dupla prevalência dessas deficiências aparece, torna-se imprescindível que as políticas de saúde pública promovam a suplementação de ambos os nutrientes (Ameny *et al.*, 2002).

O mecanismo pelo qual a vitamina A melhora o *status* de hemoglobina e o de ferro ainda não está completamente elucidado, mas 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 literatura na tentativa de elucidar a interação entre os metabolismos do ferro e da vitamina A. Segundo alguns autores, a deficiência de vitamina A parece diminuir a síntese de transferrina e assim reduzir o transporte de ferro, prejudicando sua captação pela medula óssea (Sijtsma e Van Den Berg, 1993; Beynen, Sijtsma e Van den Berg, 1992), o que afetaria a mobilização de ferro armazenado (Jimenez *et al.*, 2010; Mejia e Chew, 1988). Essa teoria foi corroborada pelo estudo de Zimmerman e colaboradores realizado em 2006.

Alguns estudos em ratos mostraram que a hipovitaminose A promove o acúmulo do ferro nos tecidos e, conseqüentemente, aumenta sua disponibilidade para a catálise de reações de oxidação, como a geração de (EROs) (Reação 1).

Essas Espécies Reativas de Oxigênio levam à peroxidação lipídica, danos às membranas celulares, danos às proteínas e ao DNA (Arruda, Siqueira e Valência, 2009; Nicolas *et al.*, 2002a) . Indivíduos com altas concentrações de ferro intra e extracelulares frequentemente apresentam, associadas aos danos oxidativos catalisados por ferro, complicações como cirrose hepática, cardiomiopatia, diabetes tipo 2 entre outras doenças (Crichton *et al.*, 2002). O fenótipo apresentado na deficiência de vitamina A é similar ao de indivíduos portadores de hemocromatose, ou seja, acúmulo de ferro em tecidos (Ghenimi *et al.*, 2009; Andrews, 2000).

Sabe-se ainda que a hipovitaminose A parece desencadear um mecanismo de imunossupressão nos indivíduos e em animais que culmina com um quadro de infecção com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina- 6 (IL-6), a qual está relacionada também aos aumentos dos níveis séricos de hepcidina (Constante *et al.*, 2006; Fraga e Oteiza, 2002; Garcia-Casal e Layrisse, 1998).

Segundo Arruda e colaboradores (2009), a diminuição das concentrações de ferro e de hemoglobina no sangue, causados pela deficiência em vitamina A, parece estar relacionada ao acúmulo desse mineral em alguns tecidos, como no baço e fígado. No entanto, o mecanismo pelo qual acontece esse acúmulo continua sendo investigado, estando possivelmente relacionado ao aumento na expressão de hepcidina que foi observado também nos animais Deficientes em vitamina A.

As alterações detectadas na deficiência de vitamina A parecem ser devidas à reduzida sinalização dos receptores ligantes de ácido retinoico (RAR e RXR), que, quando formam dímeros são capazes de se ligar a algumas regiões específicas do DNA chamadas Elementos Responsivos de Retinoides (RARE) (McClintick *et al.*, 2006). Tsuchiya e colaboradores em 2009, em um estudo com ratos mutantes na região RARE do DNA mostraram que esses animais apresentaram acúmulo de ferro no fígado associado ao aumento da hemojuvelina e hepcidina hepáticas. Os autores sugerem que o ácido retinoico modula a ação da hemojuvelina como coreceptor da proteína BMP6. Assim, ocorre a regulação do sinal de estímulo via SMAD, que, conseqüentemente, aumenta os transcritos de hepcidina (Hamp). Esse seria, então, um dos mecanismos pelo qual a hipovitaminose A interfere na homeostase do ferro.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, por meio de mecanismos moleculares, as alterações na homeostase do ferro mediadas pela deficiência de vitamina A, durante o período de depleção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da depleção vitamina A nos níveis de transcritos de hepcidina hepática em ratos;
- Avaliar os efeitos da depleção vitamina A nos níveis de transcritos de ferroportina hepática em ratos;
- Avaliar o efeito da depleção de vitamina A no *status* de ferro do fígado, baço e intestino delgado em ratos;
- Avaliar o efeito da depleção de vitamina A nos níveis de retinol hepático em ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Cinquenta e dois ratos Wistar machos, com 21 dias de idade, foram alojados no biotério, em gaiolas individuais, com ciclos de luz / escuridão 12/12h, e temperatura de 22 ± 2 °C. A dieta foi oferecida durante o ciclo de escuridão, com livre acesso a água. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB, UNBDOC n° 18996/2008 (Anexo A).

4.2 TRATAMENTO

No início do estudo (T_0), após três dias de aclimatização, dez animais foram sacrificados por deslocamento cervical para determinação dos parâmetros basais (Grupo T_0). Os demais animais foram aleatoriamente separados em dois grupos de tratamento (21 ratos/grupo) e alimentados com uma das seguintes dietas:

- Grupo Controle (CT): dieta AIN-93G com 35 mg de Fe/kg dieta e 4000UI de vitamina A, na forma de éster de retinil. Esses teores correspondem à recomendação de ferro e vitamina A para roedores (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993).
- Grupo Deficiente em vitamina A (-VA): dieta AIN-93G com 35 mg de Fe/kg dieta e sem fonte de vitamina A (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993).

A Dieta AIN-93G é a dieta que atende as necessidades nutricionais dos roedores em fase de crescimento (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993). Todos os componentes da dieta foram comprados da empresa Rhoster (São Paulo/SP, Brasil).

Após quinze (T_{15}), trinta (T_{30}) e 45 (T_{45}) dias de tratamento com uma das dietas descritas anteriormente, sete animais de cada grupo foram sacrificados. O fígado, o baço e o intestino delgado foram retirados e lavados com solução salina a 0,9% a 4°C para retirada do excesso de sangue. Os órgãos foram pesados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C até a realização das análises.

Os reagentes e materiais utilizados nesse estudo eram livres de RNase ou ficaram imersos por 8 horas em solução de dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC) (Sigma,

Saint Louis, MO, EUA) 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 (Sciencetech, SA 210, Boulder, CO, EUA) com capacidade mínima de 0,0001 g e máxima de 210 g \pm 0,0001 g.

4.5 EXTRAÇÃO, ELETROFORESE, TRATAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA

Os órgãos foram macerados em nitrogênio líquido, utilizando gral mortalha. As amostras foram alíquotadas para extração do RNA.

A extração do RNA total do fígado dos animais foi realizada com reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), por intermédio do seguinte protocolo: 50 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de TRIzol, utilizando-se um homogeneizador elétrico (Ultra-Turrax T8, IKA - Werke, Staufen, Alemanha), com as amostras imersas em gelo. Após extração com 0,2 mL de clorofórmio (J. T. Baker, México), o RNA presente na fase aquosa foi precipitado com álcool isopropílico (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) 0,25mL/ 50mg de tecido. As amostras foram então centrifugadas a 10.000x g / 4 °C / 15 minutos (centrífuga Eppendorf, 5415R, Hamburgo, Alemanha), o sobrenadante descartado, o RNA foi lavado com etanol 70%, (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e as amostras novamente centrifugadas a 10.000xg / 4 °C / 5 min (centrífuga Eppendorf, 5415R, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi novamente descartado, colocando-se o *pellet* para secagem a temperatura ambiente, sendo posteriormente dissolvido em água deionizada (MilliQ Plus, Millipore, São Paulo, Brasil) e armazenado a -70 °C.

Após a extração, a integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese, conforme descrito a seguir. Uma alíquota de RNA total equivalente a

aproximadamente 300 ng foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, tampão de corrida TAE 1,0x (tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; EDTA: Sigma, Saint Louis, MO, EUA; ácido acético: Vetec) e corado com 0,2 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). O gel foi analisado utilizando-se o *software* LabImage 1D (Kapelan Bio-Imaging Solutions, Leipzig, Alemanha) para confirmar a ausência de material genético degradado (Figura 16).

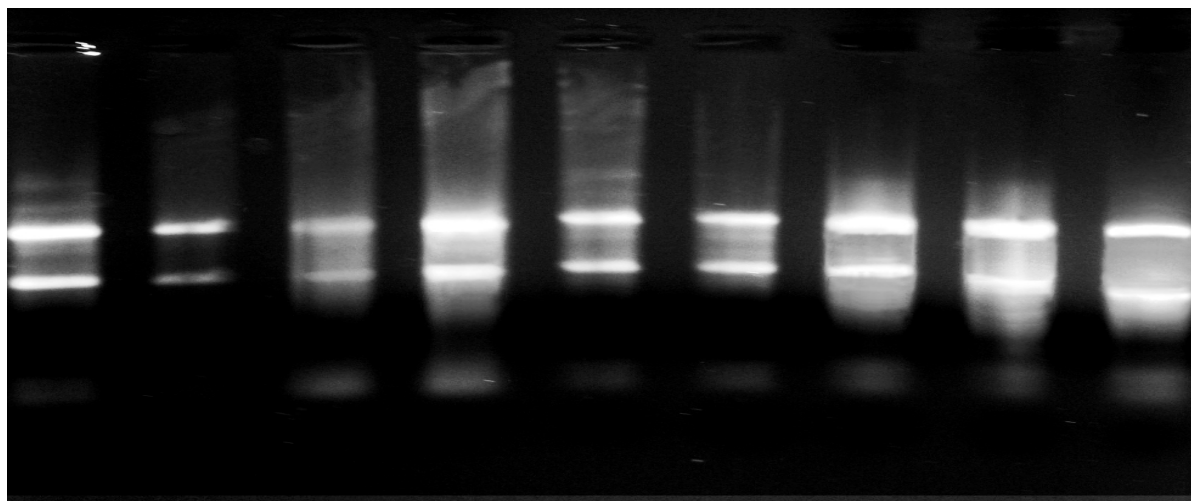


Figura 16 – Perfil eletroforético de amostras de RNA total em agarose 1%.

A determinação da concentração e pureza das amostras de RNA total foi verificada através da determinação das absorvâncias a 230, 260 e 280 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV-Visible, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) (Azevedo *et al.*, 2001).

A concentração de RNA total foi determinada a partir da seguinte fórmula:

[RNA] = 40 x A₂₆₀ x D, onde:

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

A₂₆₀ = leitura espectrofotométrica de absorvância no comprimento de onda 260nm,

D: diluição empregada, em número de vezes diluídas.

A verificação da pureza das amostras de RNA para contaminação de proteínas foi feita por meio da razão 260/280nm, enquanto para contaminação com compostos aromáticos (como fenóis) foi utilizada a razão 260/230 nm. O valor de referência utilizado para avaliar as razões **A₂₆₀/A₂₈₀** e **A₂₆₀/A₂₃₀** foi $\geq 1,8$ (Azevedo *et al.*, 2001), onde:

A₂₈₀ = leitura espectrofotométrica de absorvância no comprimento de onda 280nm;

A₂₃₀ = leitura espectrofotométrica de absorvância no comprimento de onda 230nm.

Posteriormente, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase (RQ1 RNase Free- DNase Kit; Promega, Madison, WI, EUA), utilizando-se o protocolo do fabricante: RNA total 30µg foram tratados com RQ1 RNase-free DNase na proporção de 1 u/µg RNA (30u), em sistema reacional contendo 30µL de tampão 10x e água livre deionizada para um volume final de 300 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 30 min e, posteriormente, interrompida por meio da adição de 30 µL de RQ1 DNase Stop Solution e incubação a 65 °C/10 min, para inativação da DNase. O RNA tratado com DNase foi então tratado com acetato de sódio 3 mol/L, pH 5,2 (0,1 vol) (Sigma, Saint Louis, MO,EUA), etanol 100% (2,5 vol) a 4 °C (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e incubado a -20 °C *overnight*.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000g / 4 °C / 30 min (centrífuga Eppendorf, 5415R, Hamburgo, Alemanha), o sobrenadante descartado e adicionado ao precipitado 1mL de etanol a 75% a 4 °C (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). As amostras foram novamente centrifugadas a 10000g / 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O material foi então secado a temperatura ambiente e posteriormente dissolvido em 20µL de água deionizada (MilliQ Plus, Millipore, São Paulo, Brasil).

Após esse procedimento, as absorbâncias a 230, 260 e 280 nm foram lidas (Ultrospec 3000 UV-Visible, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) e as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} novamente determinadas para avaliação da pureza e determinação da concentração de RNA no material tratado, conforme discutido anteriormente.

4.6 SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA tratado com DNase e acetato de sódio (3 mol/L e pH 5,2/ 0,1 vol)/ etanol 100% (2,5 vol) a 4 °C, utilizando-se o Kit Improm II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EUA). A 2 µg de RNA foram adicionados 1,25µL de oligo (dT)₁₅ (0,5µg/ reação), 2,0µL de água deionizada para volume final de 6,25µL e a reação foi incubada a 70°C por 5 min . Em seguida foram adicionados ao mi x de 18,75µL: água deionizada 7,2µL, tampão 5x (5 µL), NaCl₂ 25nm (3,75µL), dNTP mix 10nm - (0,5nm concentração final de cada dNTP) - 1,25µL, RNAsin (10000U) - 0,3µL e em seguida

1,25µL da enzima Improm-II™ transcriptase reversa (concentração da solução de enzima) e a reação incubada a 42°C/ 50 min. A reação foi interrompida por incubação a 70°C/15 min.

4.7 VERIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR DNA GENÔMICO

Uma reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa foi realizada para cada amostra (controle negativo). Uma alíquota dessa reação controle (sem transcriptase reversa) foi submetida a RT-PCR, empregando-se o sistema de reação apresentado na Tabela 4 e as sequências de oligonucleotídeos descritas na Tabela 5.

Tabela 4 – Sistema reacional da RT-PCR

Reagente	Quantidade (µL)	Fornecedor
Tampão 10x	1	Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil
Taq Polimerase (5 u/µL)	0,4	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> (10µmol/L)	0,2	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, EUA
Oligonucleotídeo iniciador reverso (10µmol/L)	0,2	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, EUA
cDNA	1,0	-
Água MiliQ	6,4	-
Volume final	10	-

As amostras foram submetidas a PCR em termociclador (Esco, Swift Maxi, Hatboro, PA, EUA), utilizando-se o seguinte parâmetro de amplificação, tanto para Hcpidina quanto para ferroportina:

- Desnaturação inicial a 94 ° C /30 s, hibridação a 50 ° C /40 s e alongação a 72°C/ 40s, 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), utilizando tampão TEB 0,5x (pH 8,4) (tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; EDTA: Sigma, Saint Louis, MO, EUA; boro: Vetec), e corado com 0,2 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) (Figura 17). 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. Esse teste foi realizado nos grupos Controle e Deficiente em vitamina A, para cada um dos transcritos dos genes (hepcidina, ferroportina e actina), nos diferentes períodos de tratamento. Todos os resultados apresentaram o mesmo perfil, qual seja o de ausência de material genético amplificado. O exemplo a seguir demonstra o padrão encontrado: apenas o fosso que continha marcador molecular pôde ser visualizado (Figura 17)

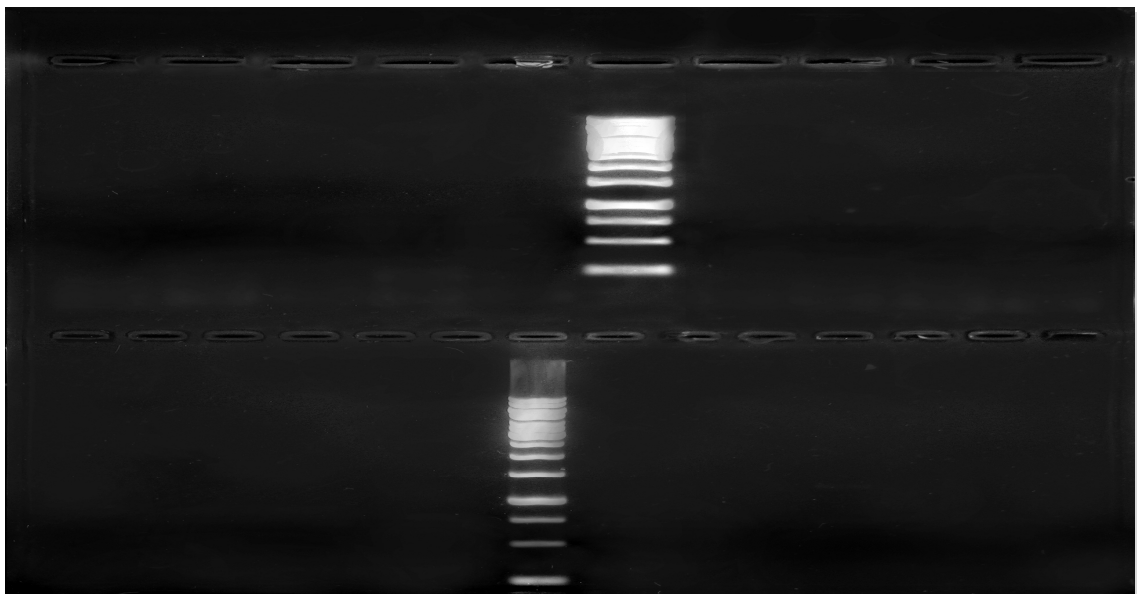


Figura 17 – Perfil eletroforético de amostras de cDNA sem transcriptase reversa em agarose 1%.

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

Gene	Oligonucleotídeo (5' - 3')	Transcrito (pb)	Código no GeneBank
Hamp	TGATGCTGAAGCGAAGGA (<i>forward</i> ²)	135	NM_053469
	TGTGTTGAGAGGTCAGGAC (<i>reverso</i> ²)		
Ferroportina	TTCCGCACTTTTCGAGATGG (<i>forward</i> ²)	106	AF394785
	TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT (<i>reverso</i> ²)		
β-actina	GTCGTACCACTGGCATTGTG (<i>forward</i> ³)	181	NM_031144
	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA (<i>reverso</i> ³)		
Dmt1 ¹	CTGATTTACAGTCTGGAGCAG (<i>forward</i> ⁴)	134	NM_013173
	CACTTCAGCAAGGTGCAA (<i>reverso</i> ⁴)		

¹ Transportador de metal divalente.

² Retirado de Christiansen *et al.*, 2007.

³ Desenhado no software PrimeTime qPCR Assay, disponível em URL: <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/>

⁴ Retirado de Wang *et al.*, 2008.

4.8 DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE mRNA DE HEPCIDINA (Hamp) E FERROPORTINA (Fpn) POR qPCR

4.8.1 EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR PCR

Ensaio de qPCR foram realizados utilizando amostras de cDNA diluídas de 1:100; 1:250; 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:10000 e 1:20000 para determinação da eficiência de amplificação das reações. A eficiência de amplificação foi determinada a partir do coeficiente angular obtido a partir da curva padrão relacionando log [transcrito mRNA] x variação *threshold cycle* (CT), através da equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Segundo Schefe *et al.*, 2006, o valor da eficiência deve ser o mais próximo de 1, ou seja, o mais próximo de 100%.

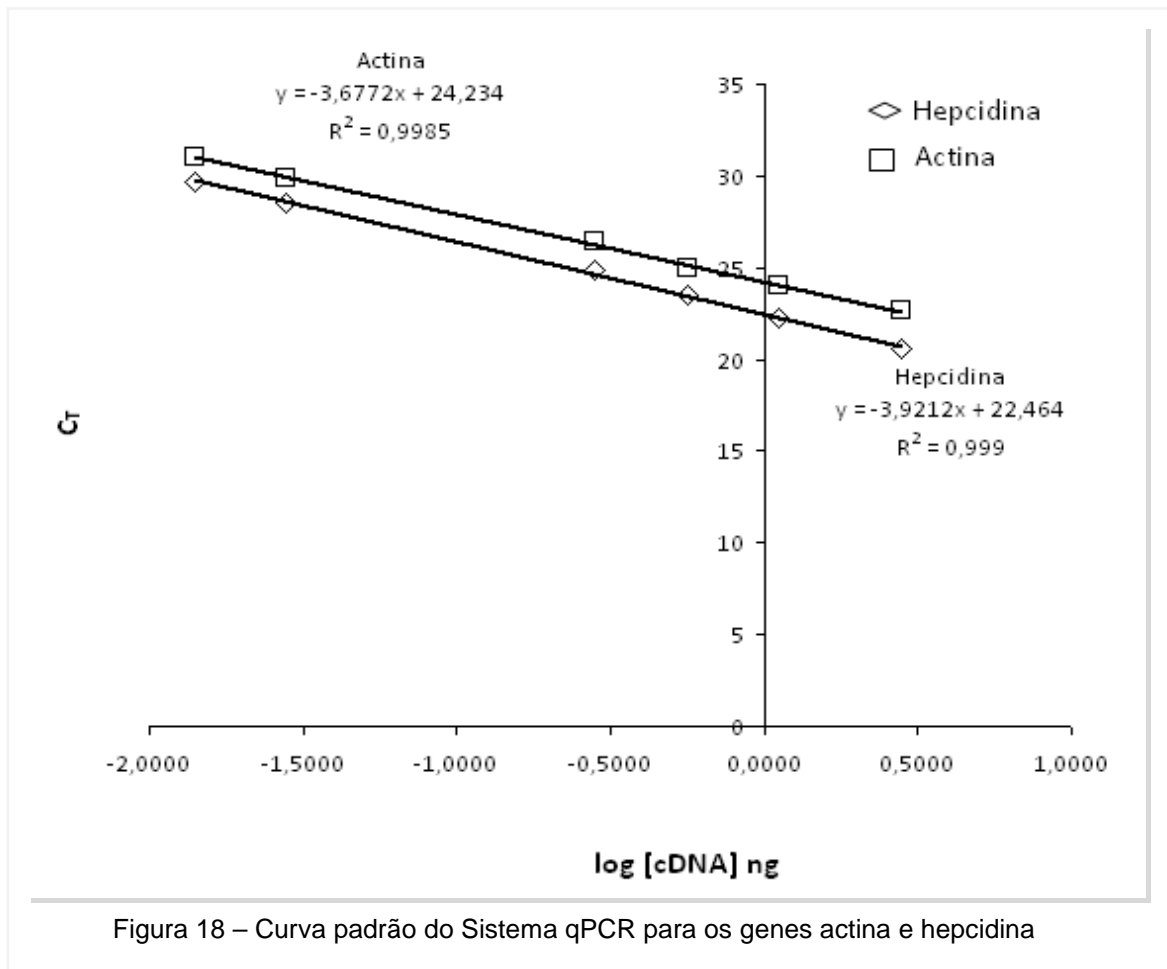
$$R_n = R_0 \cdot (1 + E)^n$$

n ou R_n - equivale ao ciclo onde termina o crescimento exponencial.

R_0 - equivale ao ciclo no qual se inicia a fase exponencial

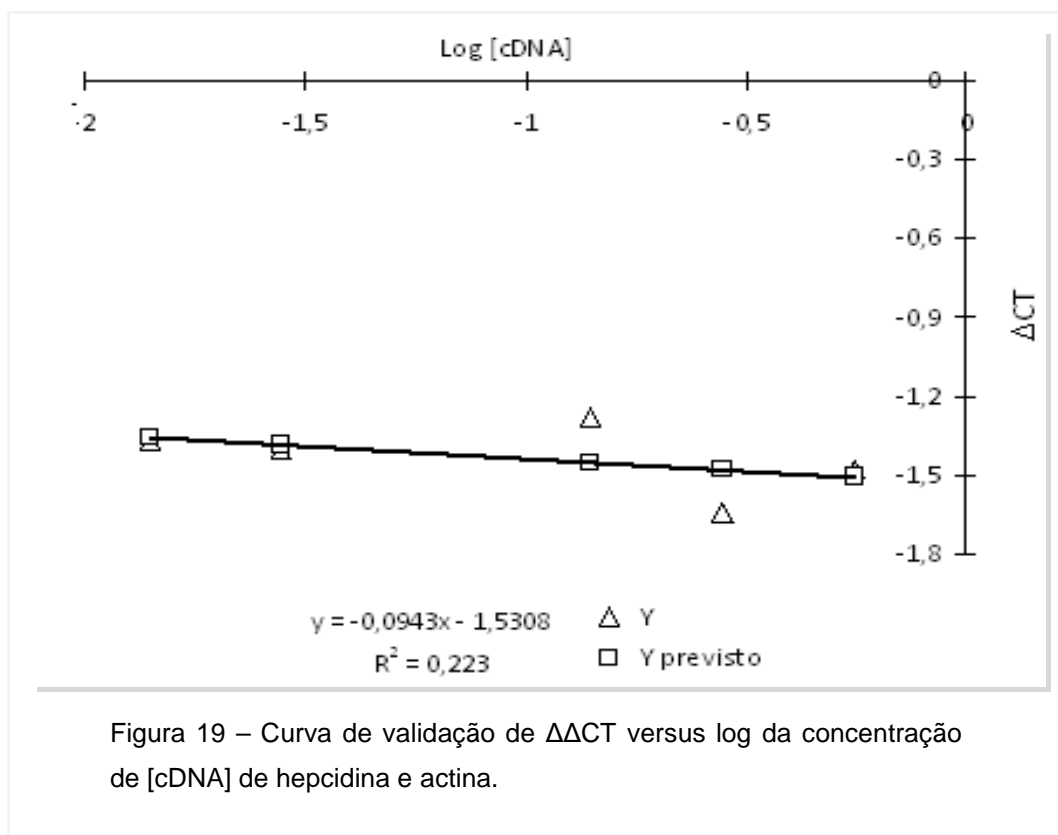
E - eficiência da reação ($0 \leq E \leq 1$)

A partir dos dados obtidos anteriormente foi determinada a diluição do cDNA de 1:500 para trabalhar as análises de qRT-PCR onde a eficiência obtida foi de 99%. A figura a seguir (Figura 18) mostra a curva de linearidade da amplificação da qPCR na faixa de diluições trabalhadas.



4.8.2 VALIDAÇÃO DO EXPERIMENTO: VERIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA REAÇÃO DE qPCR SOBRE A EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS

A partir dos dados de C_T obtidos para os genes de interesse e constitutivo foi determinado o ΔC_T ($C_{T_{\text{interesse}}} - C_{T_{\text{referência}}}$) para cada ponto da curva de calibração descrito anteriormente e construída uma curva padrão utilizando $\Delta C_T \times \log$ [transcrito mRNA]. Valores $<0,1$ para o coeficiente angular da curva foram considerados dentro do padrão (Scheffe *et al.*, 2006; Bustin e Nolan, 2004). A figura a seguir (Figura 19) mostra a eficiência da amplificação da qPCR do sistema como um todo.



4.9 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE mRNA DE HEPCIDINA (Hamp) E FERROPORTINA (Fpn) POR qPCR

Os genes de interesse, hepcidina e ferroportina, e o gene constitutivo β -actina foram amplificados utilizando-se o sistema de reação em cadeia de polimerase 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 seqüências de oligonucleotídeos descritas anteriormente na Tabela 5. Todas as reações foram feitas em triplicata, inclusive o controle negativo para cada transcrito.

Tabela 6 – Sistema reacional 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	2,0	-
Volume final (água deionizada)*	10 (2,6)*	-

Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação a 95 °C / 20 s; hibridação 60°C / 3s e alongação a 80°C / 20s, por 40 ciclos. Após a amplificação, foi obtida a curva de dissociação do transcrito amplificado, para verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos e/ou outros produtos não específicos.

Os valores de C_T foram obtidos utilizando-se um limiar de amplificação T (*threshold*) de 0,3 (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 0,3. Os valores de C_T obtidos para β -actina foram subtraídos dos valores obtidos para hepcidina e para ferroportina para determinação do $\Delta\Delta C_T$. Utilizou-se a razão dos $\Delta\Delta C_T$ em relação ao logaritmo da concentração de cDNA como parâmetro de comparação dos níveis de transcritos, conforme Peinnequin e colaboradores (2004), Bustin e Nolan (2004) e Schefe e colaboradores (2006).

4.10 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

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

4.11 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 H_2SO_4 (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As amostras foram então digeridas em forno microondas (Provecto Analítica, DGT 100 Plus, São Paulo, SP, Brasil), de acordo com a metodologia descrita por Baranowska, Czernicki e Aleksandrowicz, em 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 HNO_3 0,1 mols/ 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 solução 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).

4.12 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 em 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 10000xg (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. A dosagem do retinol hepático foi realizada em nosso laboratório como parte integrante de uma dissertação de Mestrado que ainda está em andamento.

Para quantificação foi construída uma curva padrão utilizando o *todo-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 $A_{325\text{nm}}^{1\%} = 5248$. 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 ($y = 3,8547 \cdot 10^{-9}x + 0,001188$; $R^2 = 0,9998$).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise da distribuição das variáveis 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 significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os grupos Controle (CT) e Deficiente em vitamina A (-VA) apresentaram um aumento significativo no ganho de peso durante os 45 dias de tratamento. A deficiência de vitamina A não alterou o ganho de peso e o consumo de dieta dos animais por um período de 45 dias (Tabela 7). Aos 15 dias de depleção, os animais apresentaram uma redução da concentração de retinol hepático (57%) em relação ao grupo Controle ($p=0,0007$). Aos 30 dias de depleção não foi mais possível quantificar a concentração de retinol no fígado dos animais pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Tabela 7). No tempo inicial (T_0), os níveis de hemoglobina foram significativamente menores em relação aos demais períodos de tratamento, em ambos os grupos CT e -VA.

Houve um aumento significativo na concentração de hemoglobina dos ratos, após quinze dias de tratamento para ambos os grupos ($p=0,002$), mantendo-se constante durante os 45 dias de tratamento, em ambos os grupos CT e -VA (Tabela 7).

Tabela 7 – Ganho de peso, ingestão total de dieta e retinol hepático e hemoglobina de animais Controle (CT) e Deficientes em vitamina A (-VA) nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias de tratamento (em função do grupo controle).

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

LD (limite de detecção)=0,0011 $\mu\text{g/g}$.

Letras diferentes indicam comparação intragrupo, e letras diferentes entre parênteses comparação intragrupo VA, ambas durante os 45 dias de tratamento ($p \leq 0,05$).

* Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p \leq 0,05$).

CT: Controle; VA: Deficiente em vitamina A. T_0 : tempo inicial.

Os dados correspondem à média e ao desvio padrão, $n=6$ animais por grupo.

No fígado, a concentração de ferro aumentou significativamente aos 30 dias, tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Deficiente em vitamina A em relação ao 15º dia de tratamento ($p=0,04$ e $p<0,001$; 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 durante o período de tratamento (Figura 20A).

A Figura 20C apresenta os níveis intestinais de ferro dos ratos tratados com dieta Controle e Deficiente nos quatro períodos de tratamento. Na figura pode se observar que o grupo Controle apresenta uma oscilação no conteúdo de ferro intestinal durante o período de tratamento. No início do tratamento, aos 15 dias, houve um aumento significativo na concentração de ferro intestinal em relação ao período inicial ($p<0,001$). Entretanto, aos 30 dias ocorreu uma redução significativa em relação ao 15º dia de tratamento ($p=0,0071$), permanecendo, ainda, maior do que no T_0 ($p=0,0308$), e no 45º dia, retornando ao valor encontrado com 15 dias de tratamento.

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 20B).

Nos animais do grupo-VA, os teores de ferro nos enterócitos se mantiveram constantes durante os primeiros 30 dias de tratamento, tornando-se significativamente maiores 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, aos 15 e 30 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 20C).

Semelhantemente ao observado no intestino, no baço dos animais do grupo Controle pode ser observada uma oscilação na concentração de ferro. Com 15 dias de tratamento, os animais apresentaram um aumento significativo em relação ao T_0 ($p=0,0029$), sofrendo uma redução significativa após os 30 dias em relação a 15 dias

de tratamento ($p=0,0108$). Aos 45 dias de tratamento houve um aumento significativo em relação aos 30 dias ($p\leq 0,0001$). No baço dos animais-VA é observado um aumento gradativo no teor de ferro.

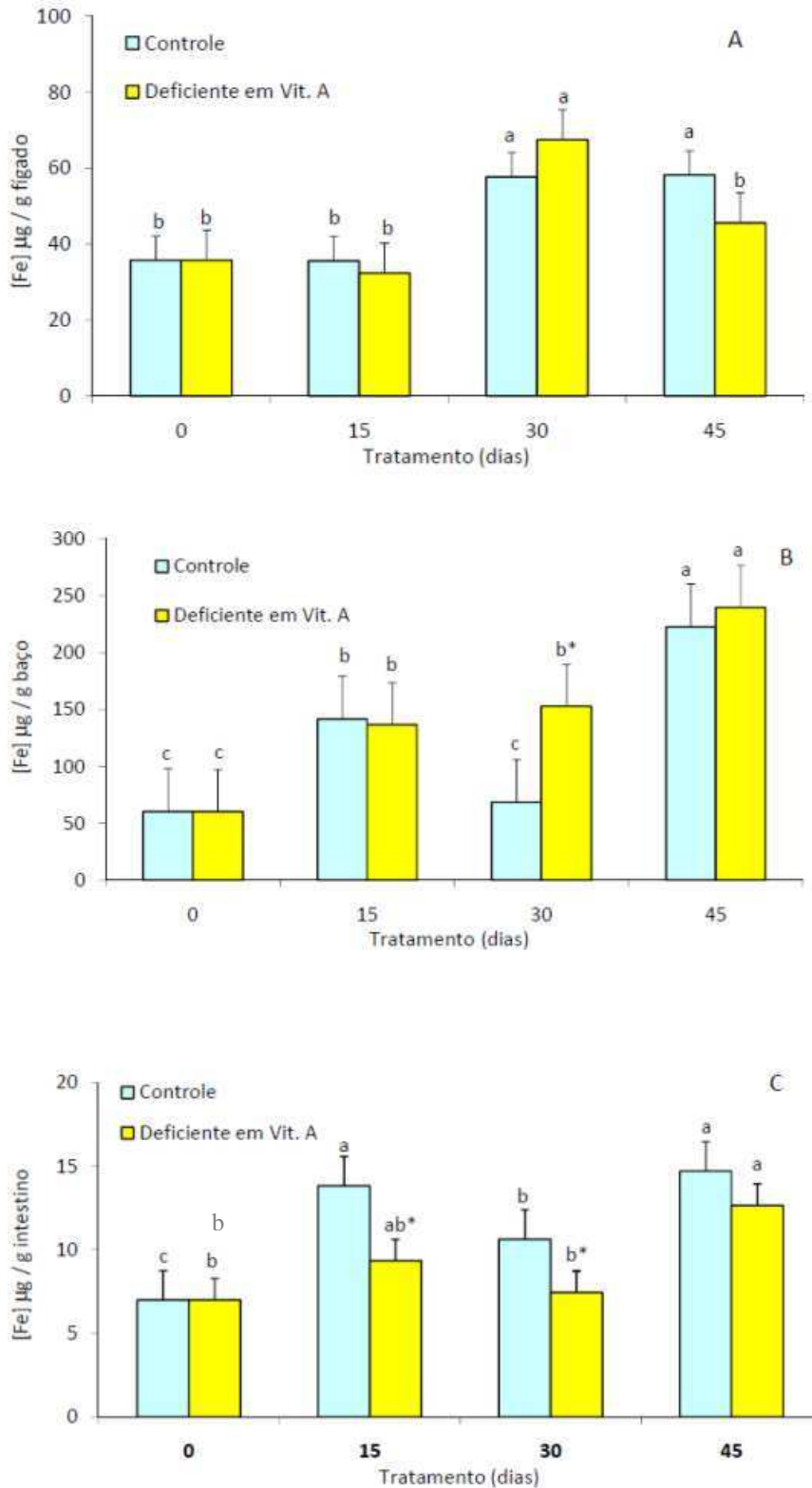


Figura 20 – Concentração de Ferro no fígado (A), baço (B) e intestino(C) para os grupos Controle (CT), Deficiente em Vitamina A (-VA) e Período inicial (T_0). Média \pm desvio padrão, $n=6$. Letras diferentes indicam comparação intragrupo ($p < 0,05$). * Comparação entre grupos, no mesmo período de tratamento ($p \leq 0,05$).

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 20B).

A Figura 21 apresenta a razão entre os níveis de mRNA de Hepsidina (Hamp) e da Actina (Actb) dos ratos tratados com dieta Controle e Deficiente em vitamina A, nos quatro tempos de tratamento (T_0 , T_{15} , T_{30} e T_{45}), conforme metodologia descrita por Peinnequien e colaboradores em 2004. Na figura, pode se observar que tanto o grupo Controle quanto o Deficiente em vitamina A apresentaram oscilação nos níveis de transcritos hepcidina (Hamp) durante o período de tratamento nos pontos T_{30} e T_{45} . Houve uma redução nos níveis de transcritos de hepcidina (Hamp) em T_{30} , em relação ao T_0 , T_{15} , nos dois grupos, Controle e -VA ($p<0,001$, e $p=0,008$, respectivamente), sendo que esta redução foi mais significativa no grupo Controle, tornando este nível inferior ao encontrado no grupo-VA ($p=0,029$). Em T_{45} , os níveis de transcritos de hepcidina voltam a aumentar em ambos os grupos, não tendo sido observada diferença significativa entre os dois grupos neste tempo de tratamento (Figura 21).

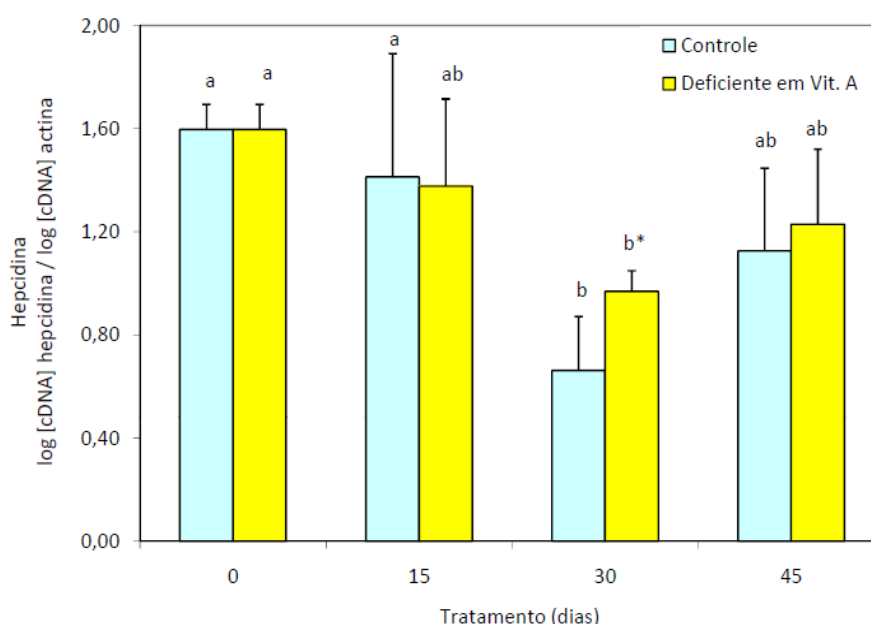


Figura 21 – Análise dos valores de hepcidina no fígado por PCR em tempo real (PCR-RT) para os grupos Controle (CT), Deficiente em Vitamina A (-VA), durante os períodos inicial (T_0) e de tratamento (T_{15}), (T_{30}) e (T_{45}). A análise quantitativa dos transcritos dos mRNA foi derivada de uma curva padrão construída através dos valores de concentrações conhecidas de PCR. Os dados de transcritos do gene de interesse foram normalizados pela relação com os níveis de transcritos do gene constitutivo actina. Média \pm desvio padrão, $n=6$. Letras diferentes indicam comparação intragrupo ($p < 0,05$). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento ($*p < 0,05$).

Com 45 dias de tratamento ambos os grupos apresentaram um nível intermediário de expressão entre T_0 e T_{30} , já que os valores apresentados em T_{45} são estatisticamente semelhantes aos valores de T_0 e/ou T_{15} e T_{30} (Figura 21).

A Figura 22 apresenta os níveis de transcritos de ferroportina (Fpn) em relação aos níveis do gene constitutivo actina (Actb) dos ratos tratados com dieta Controle e Deficiente em vitamina A nos quatro tempos de tratamento (T_0 , T_{15} , T_{30} e T_{45}), conforme metodologia descrita por Peinnequien e colaboradores em 2004. Na figura pode ser observado que, tanto o grupo Controle, quanto o Deficiente em vitamina A não apresentaram nos níveis de transcritos de ferroportina (Fpn) hepática durante todo o período de tratamento, não havendo diferença significativa nos valores dos transcritos desse gene entre os dois grupos.

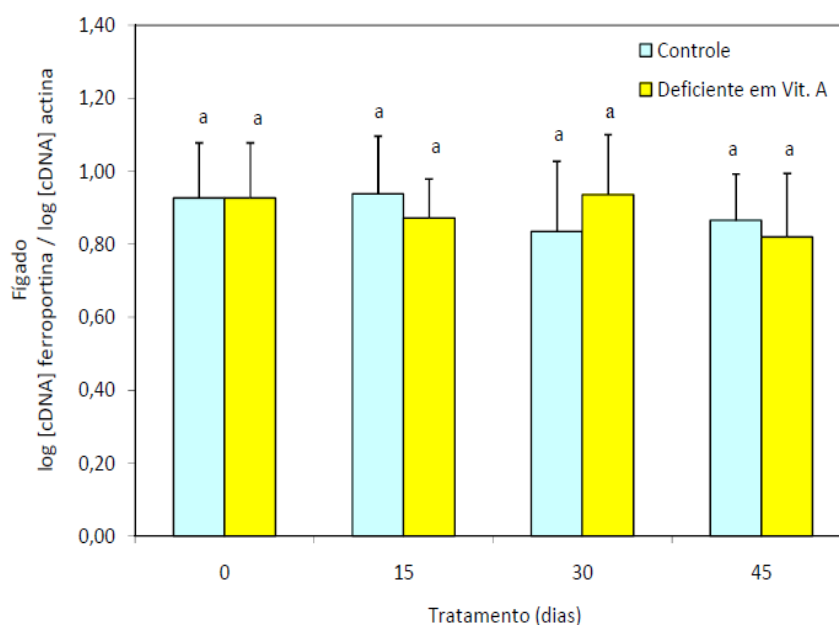


Figura 22 – Análise dos valores de ferroportina no fígado por PCR em tempo real (PCR-RT) para os grupos Controle (CT), Deficiente em Vitamina A (-VA), durante os períodos inicial (T_0) e de tratamento (T_{15} , T_{30}) e (T_{45}). A análise quantitativa dos transcritos dos mRNA foi derivada de uma curva padrão construída através dos valores de concentrações conhecidas de PCR. Os dados de transcritos do gene de interesse foram normalizados pela relação com os níveis de transcritos do gene constitutivo actina. Média \pm desvio padrão, $n=6$. Letras diferentes indicam comparação intragrupo ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado uma estreita correlação entre os *status* de ferro e de vitamina A no organismo (Jimenez *et al.*, 2010; Arruda, Siqueira e Valência, 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. Dessa forma, a depleção da reserva hepática estabelece a deficiência de vitamina A sistêmica (Kabat *et al.*, 2009).

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).

Os efeitos da deficiência de vitamina A são observados após a depleção dos estoques corporais e da conseqüente diminuição dos níveis de retinol plasmático (Arruda, Siqueira e Valência, 2009). Estudos realizados em ratos evidenciam uma redução de retinol sérico de 57% (T₁₅) e valor indetectável no T₃₀ em animais deficientes de vitamina A (Ghenimi *et al.*, 2009). Corroborando com dados da literatura, no presente estudo, ratos Wistar recém desmamados (21 dias de vida), submetidos a uma dieta Deficiente em vitamina A, apresentaram, após os primeiros 15 dias de tratamento depleção parcial de vitamina A das reservas hepáticas (redução de cerca de 50%) e a depleção total destas reservas deu-se aos 30 dias de tratamento (Tabela 7).

Sendo os alimentos a única fonte de vitamina A nos mamíferos, uma baixa biodisponibilidade de vitamina A na dieta pode alterar o seu *status* no organismo (Zimmerman *et al.*, 2006; Walczyk *et al.*, 2003; Ameny *et al.*, 2002; Yeum e Russell, 2002). No presente estudo, a tendência de redução na concentração de retinol hepático observada no grupo Controle, durante a primeira quinzena de tratamento, pode ser explicada por uma adaptação fisiológica, uma vez que os animais passaram de uma alimentação predominantemente rica em vitamina A, na forma de retinil (leite materno), para uma dieta sólida com éster de retinil, provavelmente com

menor biodisponibilidade. Nos 30 dias subseqüentes, nos animais com a dieta Controle a concentração de retinol hepático atingiu os valores iniciais, sugerindo uma adaptação dos animais às novas condições da disponibilidade dieta sólida oferecida.

Os valores de concentração da hemoglobina variaram de acordo com um perfil fisiológico de desenvolvimento. Os animais do período inicial (T_0) apresentaram os menores níveis que, a partir do 15º dia, se normalizaram mantendo-se constantes ao longo do experimento (Tabela 7). Os menores valores observados em T_0 podem ser explicados pelo fato de os animais terem se alimentado previamente apenas de leite materno. Sabe-se que como o leite materno possui a maior parte do ferro ligado à lactoferrina a biodisponibilidade deste mineral diminui (Dunn, Rahmanto e Richardson, 2006). Em outras palavras, durante o período de amamentação o surgimento de uma leve deficiência de ferro é considerado não patológico.

Após a introdução da alimentação sólida, com teores de ferro mais elevados, 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 ao longo do experimento (Tabela 7).

Nesse estudo, a ferritina sérica se manteve constante durante quase todo o período de tratamento em ambos os grupos CT e -VA. Somente aos 15 dias de tratamento o grupo Deficiente em vitamina A apresentou menor concentração em relação ao grupo Controle ($p=0,034$). Esse fato não alterou os valores de hemoglobina sérica durante o período de tratamento, em ambos os grupos (Oliveira, 2009).

Nossos resultados mostram que, apesar da deficiência da vitamina A na dieta, a total depleção das reservas hepáticas dessa vitamina só foi observada aos 30 dias de tratamento. Assim, os efeitos da deficiência de vitamina A 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, entre outros fatores (Lechtig *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 2006).

Em estudos complementares realizados com os animais dessa pesquisa, Moreira (2009) e Chaves, Siqueira e Arruda (2010) sugerem que, no grupo Controle, a oscilação na concentração de ferro observada no intestino na primeira quinzena de tratamento (T₁₅) é causada, dentre outras razões, por uma maior disponibilidade desse ferro na dieta AIN-93G (Costa *et al.*, 2009; Reeves, Nielsen e Fahey, 1993) em relação ao leite materno. Ao longo do período de tratamento, a variação observada na concentração de ferro no intestino e no baço pode ser decorrente das adaptações fisiológicas necessárias à manutenção da homeostase do ferro no organismo, tanto exógeno quanto endógeno (Oates, 2007).

No presente estudo, o aumento do ferro no intestino 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 (aos 30 dias, houve redução no intestino e aumento no baço), observada no grupo Controle, poderia ser explicada, então, por duas razões: 1) aumento da biodisponibilidade do ferro dietético em relação ao leite materno na primeira quinzena; e 2) alterações na concentração de ferro sérico, decorrentes do aumento da demanda (crescimento e manutenção das atividades vitais).

A vitamina A parece estar envolvida na regulação da expressão de vários genes, como reportado na literatura (McClintick *et al.*, 2006). Quando os efeitos da deficiência de vitamina A são associados ao *status* de ferro em mamíferos, alguns estudos mostram alterações na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo desse mineral em alguns tecidos (Zimmerman *et al.*, 2006; Ameny *et al.*, 2002; Yeum e Russel, 2002; Thurnham, 1993). Assim, no presente estudo, as alterações encontradas nos níveis de ferro no baço dos animais Deficientes em vitamina A em relação ao Controle podem ter sido resultantes da variação nos níveis de hepcidina, mediado pelo ácido retinoico, na expressão das duas proteínas transportadoras de ferro: DMT1 (importador de ferro no lúmen intestinal); e ferroportina (exportador de ferro nos enterócitos e nos macrófagos), Figuras 23, 24 e 25, respectivamente.

No fígado dos animais do grupo Controle, não foi observado aumento na concentração de ferro na primeira quinzena (T₁₅), mas sim na segunda quinzena de

tratamento (T_{30}), o que ocorreu de maneira semelhante ao grupo Deficiente em vitamina A. Esse aumento na concentração de ferro hepático pode estar relacionado ao aumento da captação desse mineral pelo fígado, principal órgão de estoque de ferro; pela diminuição da liberação do ferro hepático; ou até mesmo por ambos (Figura 20 A).

O acúmulo de ferro observado no baço dos animais deficientes em vitamina A aos 30 dias de tratamento (Figura 20B) pode ser devido à redução nos níveis dos transcritos de ferroportina (Fpn) ocorrido nesse período, conforme análise realizada paralelamente em nosso laboratório (Figura 23) por Chaves, Siqueira e Arruda (2010). Nesse mesmo estudo, os autores também observaram uma redução nos níveis de transcritos de Dmt1 no baço dos animais deficientes aos 30 dias de depleção de vitamina A (Figura 24). Porém, vale ressaltar que a entrada de ferro nos macrófagos ocorre principalmente via fagocitose de hemácias senescentes. Assim, a função primordial do DMT1 seria a liberação do ferro contido no endossoma (Ganz e Nemeth, 2011a; Beard e Han, 2009).

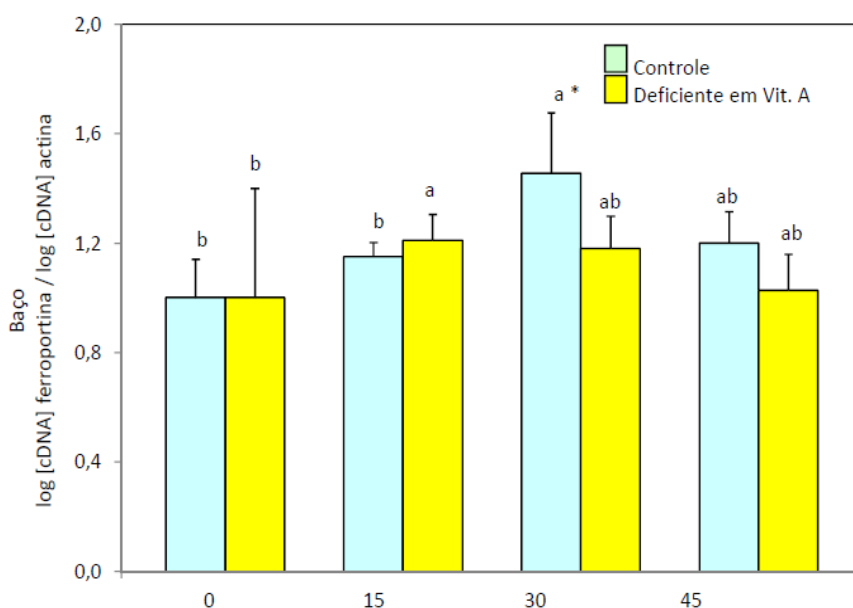


Figura 23 – Análise dos valores de ferroportina no baço por PCR em tempo real (PCR-RT) para os grupos Controle (CT), Deficiente em Vitamina A (-VA), durante os períodos inicial (T_0) e de tratamento (T_{15}), (T_{30}) e (T_{45}). A análise quantitativa dos transcritos dos mRNA foi derivada de uma curva padrão construída através dos valores de concentrações conhecidas de PCR. Os dados de transcritos do gene de interesse foram normalizados pela relação com os níveis de transcritos do gene constitutivo actina. Média \pm desvio padrão, $n=6$. Letras diferentes indicam comparação intragrupo ($p < 0,05$). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento ($*p < 0,05$) (Chaves, Siqueira e Arruda, 2010).

No intestino, no T₁₅ e T₃₀, os animais Deficientes em vitamina A apresentaram menores níveis de ferro (Figura 20C), embora os níveis de transcritos de ferroportina (Fpn) encontrados por Moreira (2009) tenham sido inferiores quando comparados aos animais do grupo Controle ($p=0,023$ e $p=0,015$, respectivamente) (Figura 25). Os níveis de transcritos de Dmt1 no intestino mantiveram-se constantes, em ambos os grupos, durante o período de tratamento (Figura 26).

Aos 15 dias de tratamento, os animais do grupo-VA ainda apresentavam retinol hepático nos tecidos (Tabela 7). Dessa forma, podemos suspeitar que em fases iniciais de deficiência da vitamina A dietética parece haver, no lúmen intestinal, diminuição da absorção do ferro inorgânico.

Com relação ao T₃₀, podemos inferir que a regulação do mRNA do Dmt1 pode ter sofrido uma estabilização ou regulação em detrimento dos níveis de ferro intracelular via IRP/IRE.

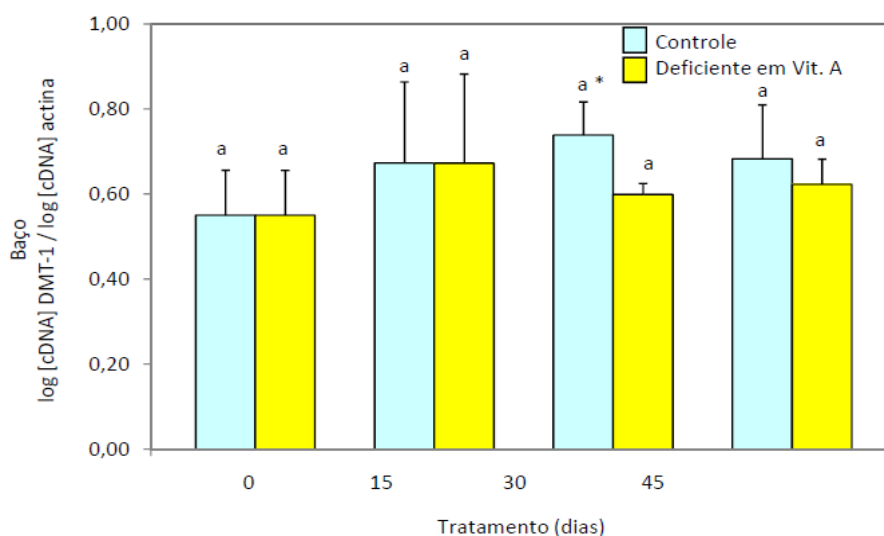


Figura 24 – Análise dos valores de DMT1 no baço por PCR em tempo real (PCR-RT) para os grupos Controle (CT), Deficiente em Vitamina A (-VA), durante os períodos inicial (T₀) e de tratamento (T₁₅), (T₃₀) e (T₄₅). A análise quantitativa dos transcritos dos mRNA foi derivada de uma curva padrão construída através dos valores de concentrações conhecidas de PCR. Os dados de transcritos do gene de interesse foram normalizados pela relação com os níveis de transcritos do gene constitutivo actina. Média \pm desvio padrão, $n=6$. Letras diferentes indicam comparação intragrupo ($p < 0,05$). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento ($*p < 0,05$) (Chaves, Siqueira e Arruda, 2010).

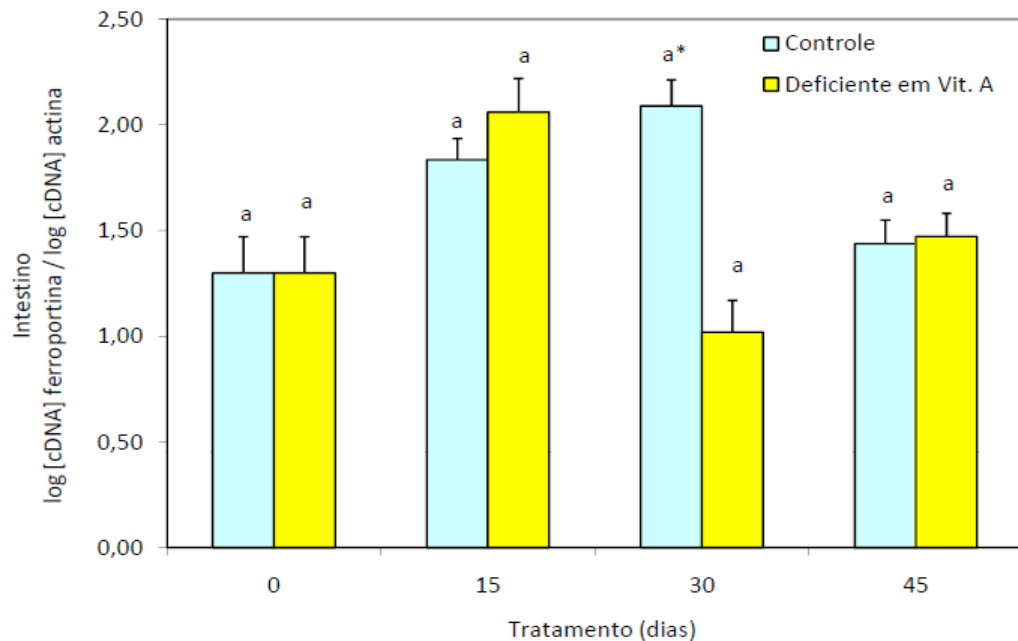


Figura 25 – Análise dos valores de ferroportina no intestino por PCR em tempo real (PCR-RT) para os grupos Controle (CT), Deficiente em Vitamina A (-VA), durante os períodos inicial (T_0) e de tratamento (T_{15} , T_{30}) e (T_{45}). A análise quantitativa dos transcritos dos mRNA foi derivada de uma curva padrão construída através dos valores de concentrações conhecidas de PCR. Os dados de transcritos do gene de interesse foram normalizados pela relação com os níveis de transcritos do gene constitutivo actina. Média \pm desvio padrão, $n=6$. Letras diferentes indicam comparação intragrupo ($p < 0,05$). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento ($*p < 0,05$) (Moreira, 2009).

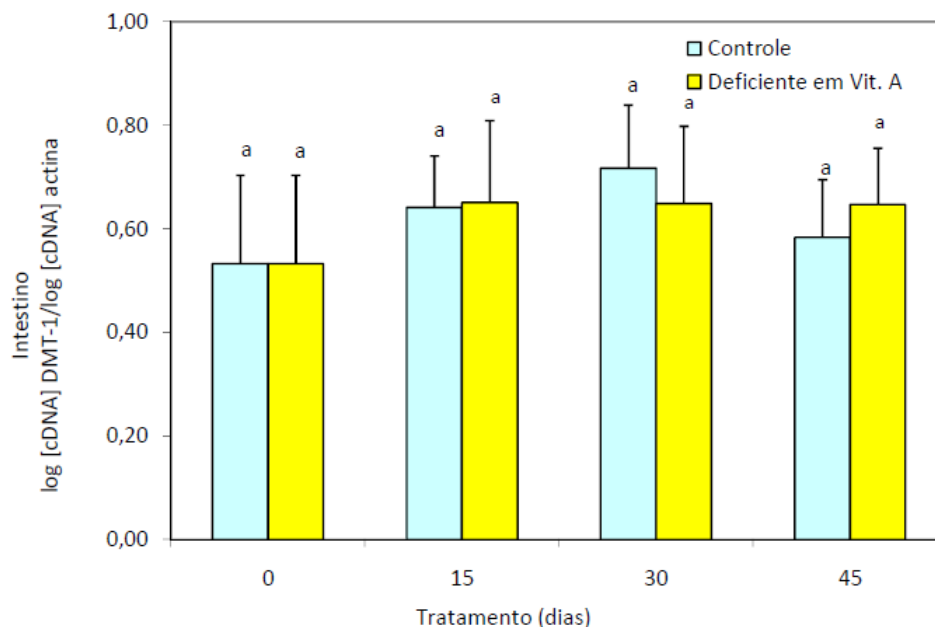


Figura 26 – Análise dos valores de DMT1 no intestino por PCR em tempo real (PCR-RT) para os grupos Controle (CT), Deficiente em Vitamina A (-VA), durante os períodos basais (T_0) e de tratamento (T_{15} , T_{30}) e (T_{45}). A análise quantitativa dos transcritos dos mRNA foi derivada de uma curva padrão construída através dos valores de concentrações conhecidas de PCR. Os dados de transcritos do gene de interesse foram normalizados pela relação com os níveis de transcritos do gene constitutivo actina. Média \pm desvio padrão, $n=6$. Letras diferentes indicam comparação intragrupo ($p < 0,05$). Asterisco: comparação entre os grupos, no mesmo período de tratamento ($*p < 0,05$) (Moreira, 2009).

A relação entre a vitamina A e os níveis de transcritos de mRNA de hepcidina (Hamp), em ratos, foi recentemente identificada em nosso laboratório (Arruda, Siqueira e Valência., 2009). Esse estudo mostrou que ratos tratados com dieta Deficiente em vitamina A por 57 dias apresentavam aumento dos níveis de transcritos de hepcidina (Hamp) e aumento significativo no teor de ferro no baço, em relação ao grupo Controle. 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 DMT1. Os dados apresentados em nosso estudo (Figura 21) podem ser justificados por essa afirmativa, já que os níveis de ferro no intestino dos ratos Deficientes em vitamina A foram inferiores aos níveis encontrados nos animais do grupo Controle até 30 dias de tratamento, quando, então, os níveis de transcritos de ferroportina diminuíram, resultando em um significativo aumento nos níveis de ferro intestinal entre o período de 30 a 45 dias de tratamento..

Essa regulação pós-traducional feita pela hepcidina sobre a ferroportina somar-se-ia ainda ao esquema proposto por Oates (2007) e Hentze e colaboradores (2010), pelo qual a hepcidina estaria envolvida também na diminuição da absorção de ferro, via DMT1 (Figuras 26 e 27, respectivamente).

Em sua revisão, Oates (2007) acrescenta ao modelo de Nemeth e colaboradores (2004) uma interação entre ferroportina e DMT1, mediada pela hepcidina. Nesse modelo, o autor sugere que tanto o DMT1 quanto a ferroportina apical são constitutivamente internalizados em um processo cíclico proporcionando o seu retorno constante à membrana apical. Entretanto, na presença de hepcidina, a ferroportina da membrana basolateral, ligada à hepcidina, é internalizada, sendo encaminhada ao mesmo compartimento em que se encontram a ferroportina apical e o DMT1. 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 DMT1 à membrana, uma vez que o seu retorno à membrana apical só é possível quando esse está associado à ferroportina. Assim, o DMT1 permanece internalizado, resultando na redução do potencial absorptivo da célula (Figura 27 e Figura 28).

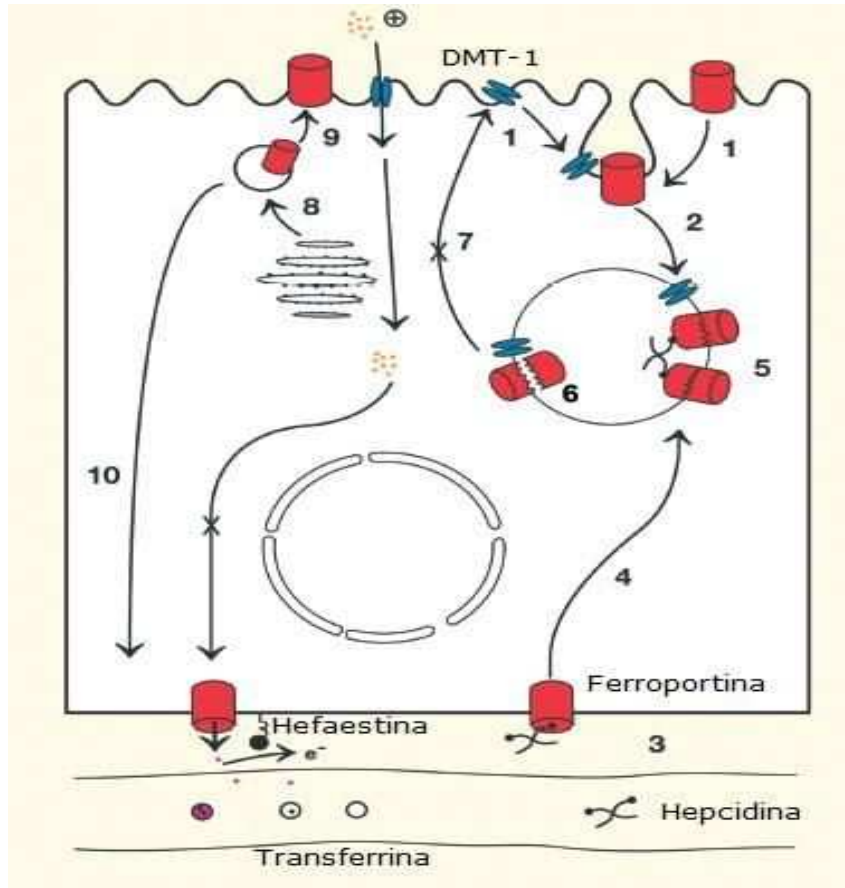


Figura 27 – Mecanismo proposto para a diminuição de absorção de Ferro induzida pela hepcidina no enterócito. Em circunstâncias normais, ferroportina e DMT1 encontram-se na membrana apical e, constitutivamente, sofrem endocitose (1). O endossoma primário se funde ao endossoma tardio (2). A hepcidina ativa 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 DMT1 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 apicais (9) ou basolateral (10). Adaptado de Oates, 2007.

Observando-se a Figura 21, verifica-se que os animais de ambos os grupos apresentaram, aos 30 dias de tratamento, diminuição dos níveis de transcritos de hepcidina (Hamp) em relação ao T0, sendo que a redução foi mais significativa no grupo Controle. Em contrapartida, aos 45 dias de tratamento, houve reversão desses valores, mostrando uma tendência de elevação nesses níveis, atingindo os valores encontrados em T0 e/ou T15 em ambos os grupos.

Neste estudo, o grupo Deficiente em vitamina A apresentou valores maiores de transcritos de Hamp em relação ao grupo Controle aos 30 dias de tratamento. Confrontando-se esses resultados com os modelos propostos pelos autores

supracitados (Hentze *et al.*, 2010 e Oates, 2007), bem como por Arruda e colaboradores (2009), verificamos que os dados encontrados corroboraram com os achados da literatura que correlacionam a deficiência da vitamina A com maior retenção de ferro nos tecidos (Figura 20A, Figura 27 e Figura 28) (Arruda, Siqueira e Valência., 2009; Constante *et al.*, 2006; Dunn, Rahmanto e Richardson, 2006; Arruda, Siqueira e Souza, 2004; Frazer *et al.*, 2003).

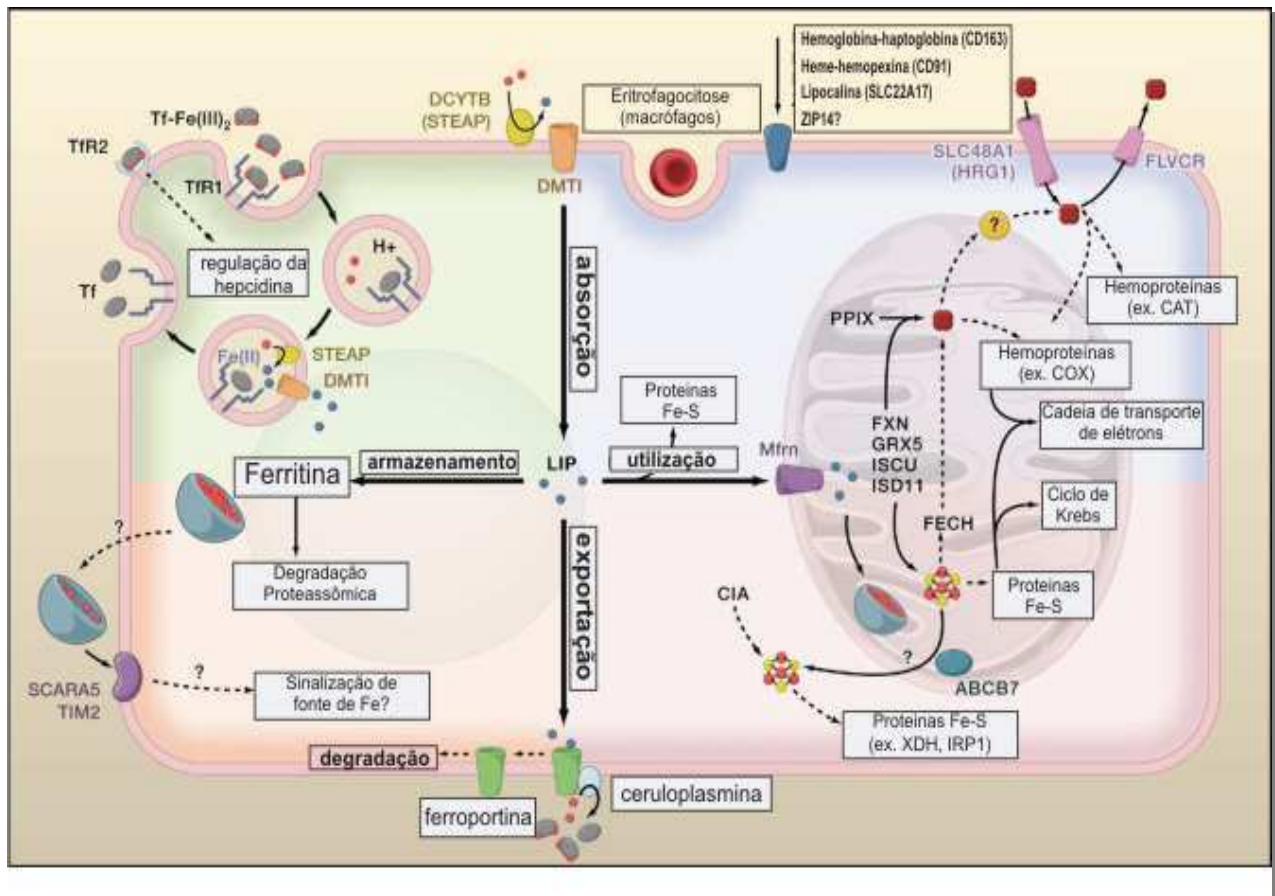


Figura 28 – Modelo de regulação do metabolismo celular do ferro. A maioria das células recebe ferro pelo TfR 1 (receptor de transferrina 1), que sofre endocitose quando o RTf1 se liga à Tf (transferrina) diférrica. No endossoma, o ferro é liberado da transferrina e reduzido pela enzima STEAP3, sendo então liberado no citossol pelo DMT1 contido na membrana do endossoma. A Tf e o RTf retornam para o citossol e membrana celular, respectivamente, para participarem de outros ciclos. O DMT1 também se encontra na membrana apical dos enterócitos com a função de absorver o ferro inorgânico da dieta. Ferro esse que já foi reduzido pela Dcyt B (citocromo B duodenase). Outra maneira do ferro ser capturado se dá pelo ferro proveniente do grupo heme das células vermelhas. O ferro que circula no citossol após a entrada na célula forma o LIP (*labile pool iron* ou *pool* de ferro livre) que pode ser usado pela mitocôndria e reações celulares. O ferro que não é utilizado pela célula é então armazenado na ferritina ou exportado pela ferroportina basal. A ferritina parece ter receptores de membrana basolateral específicos. Adaptado de Hentze *et al.*, 2010.

O ácido retinoico é o responsável pela ação hormonal atribuída à vitamina A, e por esse motivo torna-se responsável pela expressão de vários genes, dentre eles pode haver correlação com as proteínas envolvidas no metabolismo do ferro ou na regulação da expressão da hepcidina no fígado, como já descrito anteriormente

(Ganz, 2011c; Mitro *et al.*, 2007; Ross e Zolfaghari, 2004; Vogel *et al.*, 2002). Os níveis de hepcidina sérica respondem a vários processos, dentre eles, a inflamação (Domenico e Kaplan, 2009; Vecchi *et al.*, 2009; Ganz *et al.*, 2009; Roe *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2005; Maqsood *et al.*, 2004; Nemeth *et al.*, 2003). Na Tabela 7, os animais do grupo Deficiente em vitamina A apresentaram, a partir do T₃₀, valores não detectáveis de retinol hepático, o que pode ter propiciado o surgimento de um processo inflamatório. Na inflamação, há um aumento na síntese de IL-6, que por sua vez, através de uma cadeia de interações moleculares, atua na região promotora do Hamp, estimulando a transcrição da hepcidina e, conseqüentemente, o acúmulo de ferro nos tecidos, conforme esquema proposto por Hentze e colaboradores em 2010 (Figura 29) e por Ganz e Nemeth em 2012 (Figura 31) (Ganz e Nemeth, 2011a; Domenico e Kaplan, 2009; Tsuchiya *et al.*, 2009; Hershko, 2006).

Na inflamação, a hipoferremia acontece pela diminuição da liberação do ferro pelos macrófagos já que esse é um mecanismo de defesa orgânico contra patógenos ferro-dependentes (Muñoz, García-Erce e Remacha, 2010b; Vecchi *et al.*, 2009; Chaston *et al.*, 2008; Nemeth *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostram outra via de regulação da transcrição do Hamp mediada pelo complexo BMP/SMAD (proteína morfogenética óssea/ proteína homóloga decapentaplégica). A ativação da BMP necessita da hemojuvelina como correceptor levando à fosforilação da SMAD4 que, em resposta, liga-se diretamente à região promotora da hepcidina, estimulando sua transcrição (Figura 7) (Figura 31) (Ganz e Nemeth, 2012; Ganz e Nemeth, 2011a; Ramos *et al.*, 2011; Hentze *et al.*, 2010).

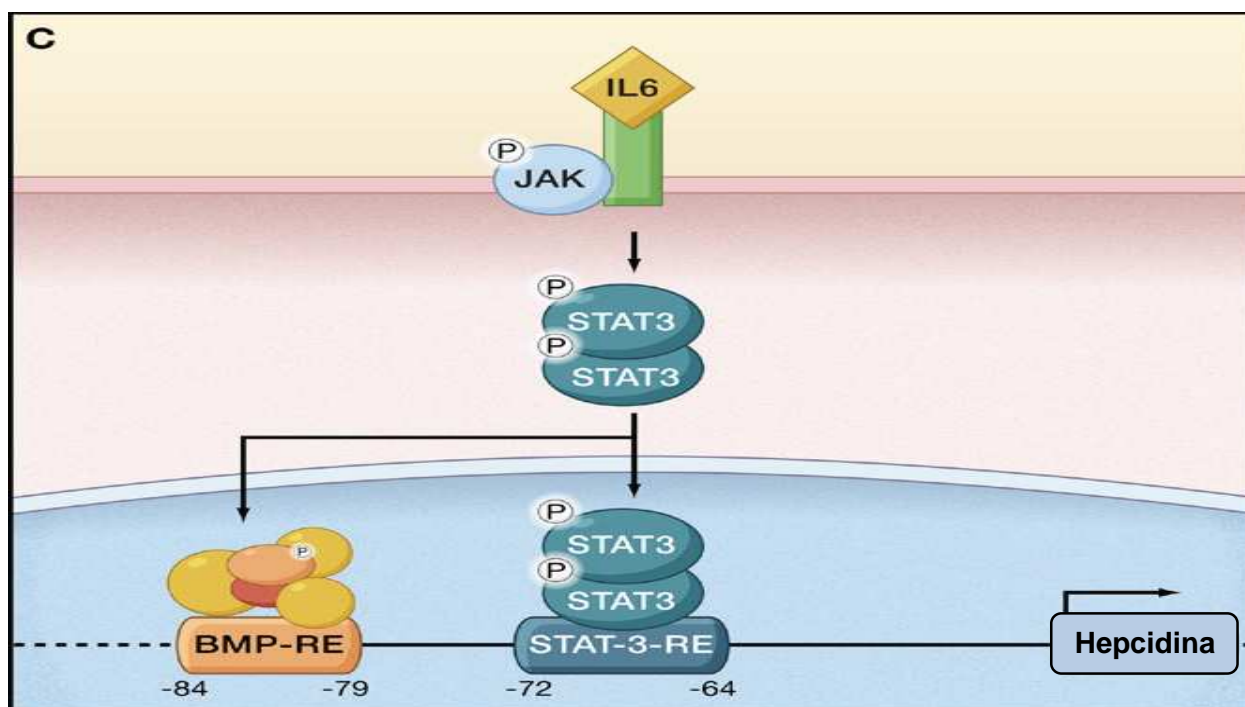


Figura 29 – Modelo de regulação da expressão de hepcidina pela inflamação. Adaptado de Hentze *et al.*, 2010

Neste estudo, observou-se uma maior variação no teor de ferro no baço e no intestino dos animais aos 45 dias de tratamento em ambos os grupos em relação a todo período de tratamento (Figura 20B e 20C). Pode-se explicar esse comportamento pela expressão de hepcidina (Figura 21) que, inicialmente, ao internalizar a ferroportina basolateral, reduziria a exportação de ferro do baço e do intestino, acarretando o aumento desse mineral. Entretanto, à medida que a ferroportina basolateral é internalizada, o DMT1 permanece impedido de retornar à membrana apical, resultando também na redução da absorção do ferro intestinal (Figura 27). No baço, apenas a exportação estaria comprometida, posto que a entrada de ferro nos macrófagos ocorre principalmente via fagocitose de hemácias senescentes. Nos ratos Deficientes em vitamina A, a evolução do acúmulo de ferro no baço em relação ao intestino nos pontos T₃₀ e T₄₅ (Figuras 20B e 20C, respectivamente) ocorrem juntamente com o esgotamento do estoque de vitamina A (Tabela 7). Durante esse período (entre 30 e 45 dias de tratamento), os níveis apresentados de transcritos de Hamp (Figura 21) mostram que os dados analisados em conjunto são corroborados pelo modelo proposto por Oates (2007) (Figura 27). Esse modelo estabelece que níveis elevados de hepcidina diminuem a captação e exportação de ferro dos tecidos, favorecendo o acúmulo desse mineral.

No presente estudo, a concentração indetectável de vitamina A que se estabelece aos 30 dias de tratamento acompanha uma menor redução nos níveis de transcritos de hepcidina do grupo Deficiente em vitamina A quando comparado com o grupo Controle (Figura 21). Essa redução pode ser devida ao menor efeito inibidor da vitamina A sobre a hepcidina: estudos mostram que a regulação dos transcritos de hepcidina (Hamp) se dá por via inflamatória (IL-6) ou por ação do ácido retinóico via hemojuvelina (Figura 29) (Tsuchiya *et al.*, 2009). Os níveis maiores de hepcidina no T₃₀ nos ratos Deficientes em vitamina A poderiam explicar o aumento na concentração de ferro no baço desses animais em relação ao grupo Controle (Figura 20 A, B e C, respectivamente). Esses dados são corroborados com os descritos na literatura, que mostram que maiores concentrações de transcritos de hepcidina (Hamp) estão associados a maior acúmulo de ferro no baço, entre outros órgãos (Ganz e Nemeth, 2012; Hentze *et al.*, 2010; Arruda, Siqueira e Valência., 2009; Oates, 2007; Arruda, Siqueira e Souza, 2004; Nemeth *et al.*, 2004; Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004). Vale ressaltar ainda que os animais do estudo em questão foram submetidos à dieta Deficiente em vitamina A, enquanto que os valores de ferro da dieta mantiveram-se os mesmos durante todo tratamento em ambos os grupos.

Assim, por esse mecanismo, a deficiência de vitamina A não alteraria os níveis de mRNA do Dmt1, mas poderia agir indiretamente sobre a proteína DMT1, via hepcidina, em uma regulação pós-traducional, uma vez que altas concentrações de hepcidina internalizam a ferroportina basolateral, inibindo a exportação de ferro e, posteriormente a captação de ferro pelo DMT1 (Figura 27) (Hentze *et al.*, 2010; Muñoz, García-Erce e Remacha, 2010a; Domenico e Kaplan, 2009; Oates, 2007). Deve-se ressaltar ainda a regulação intracelular mediada pelos elementos responsivos ao ferro, os IREs, presentes na extremidade 3': livres pelas altas concentrações de ferro intracelular, fazem com que haja uma menor estabilidade do mRNA do Dmt1 tornando-o mais susceptível à ação das nucleases (Figura 8) (Templenton e Liu, 2003). No estudo de Collins e colaboradores (2005), observou-se que a privação do ferro levou a um aumento do DMT1 e que os transcritos de Fpn, que codificam a proteína, foram menos expressos. Os autores sugeriram que a menor expressão de ferroportina poderia ser explicada por uma regulação pós-traducional na atividade da proteína.

A Figura 30 mostra os resultados encontrados no grupo-VA aos 30 dias de tratamento em relação ao retinol hepático, aos tecidos e aos genes analisados neste trabalho.

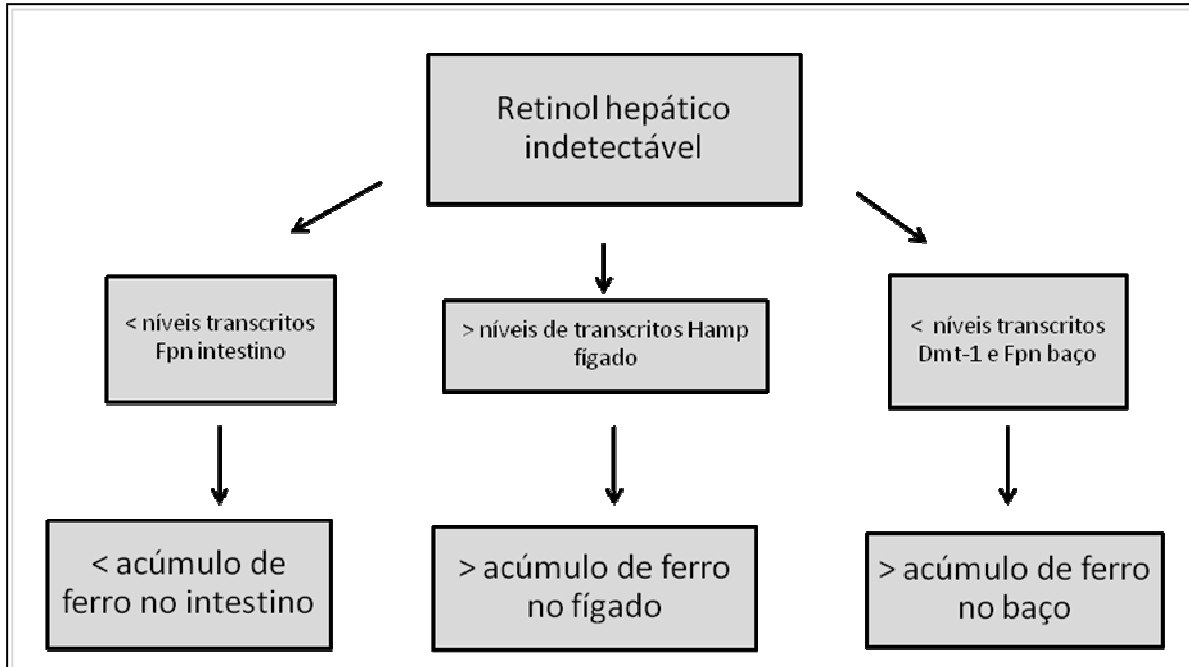


Figura 30 – Resultados encontrados no grupo deficiente em vitamina A aos 30 dias de tratamento.

Sabe-se que a regulação pós-traducional é mais dispendiosa para o organismo do que a regulação transcricional. Entretanto, como o intestino é um órgão absorptivo a mercê de constantes flutuações na oferta de nutrientes da dieta, a regulação pós-traducional seria, pela sua agilidade de resposta, imprescindível (Nelson e Cox, 2000). Devemos lembrar, todavia, que vários estudos mostram a regulação transcricional dos genes envolvidos no metabolismo do ferro em diversos órgãos (Ganz, 2011c; Domenico e Kaplan, 2009; Arruda, Siqueira e Valência, 2009), dados aos quais nossos resultados vêm se somar.

Durante o período de tratamento, o acúmulo de ferro no intestino atingiu os valores máximos, em ambos os grupos, aos 45 dias, atingindo valores iguais ao T₁₅. Em contrapartida, no T₄₅, os valores de transcritos de Fpn foram iguais aos iniciais (T₀), também em ambos os grupos. Para explicarmos esse fato a luz dos transcritos do mRNA da ferroportina (Fpn) e do Dmt1 é indispensável que levemos em consideração as alternativas das regulações traducionais e pós-traducionais do sistema da homeostase do ferro. Tal necessidade torna-se evidente, pois ao correlacionarmos o acúmulo do ferro no intestino com a expressão do mRNA da

ferroportina (Fpn) e do Dmt1 poderíamos esperar aumento do ferro no intestino dos animais tratados com dieta Deficiente em vitamina A aos 30 dias de tratamento. Ali, sim, detectamos menores níveis de transcritos de ferroportina (Fpn) e níveis constantes de transcritos de Dmt1 (Figura 30).

No fígado dos animais do grupo Deficiente em vitamina A houve, seguido de uma recuperação no T₃₀, um decréscimo nos níveis de ferro no tecido tornando os valores no T₄₅ iguais encontrados no T₀. Simultaneamente, os níveis de transcritos de hepcidina hepática nesses animais aumentaram no T₄₅ atingindo também, os níveis iniciais (T₀). Os níveis de ferro no fígado são resultantes da ação da hepcidina tanto no hepatócito quanto da ação sistêmica, embora alguns estudos sugeriram que a ferroportina hepática não responda à hepcidina (Hentze *et al.*, 2010), de modo que, as quantidades de ferro detectadas no fígado são explicadas portanto, pela ação da hepcidina no intestino e no baço. Aos 30 dias de tratamento, o nível de ferro no intestino dos ratos deficientes atingiu valores mais baixos (Figura 20C) acompanhados de maior acúmulo de ferro no fígado (Figura 20A). Como o fígado é um dos principais órgãos de estoque de ferro (Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004), há flutuações nos níveis intracelulares desse tecido decorrentes do *status* de ferro nos outros tecidos (Arruda, Siqueira e Valência., 2009).

O aumento da concentração de ferro encontrado no T₃₀ em relação aos níveis basais e em T₁₅ (Figura 20A) associado à menor expressão de Hamp no fígado também no T₃₀ (Figura 21) pode ser justificado pelas características supracitadas. Ou seja, a menor expressão de hepcidina acarretaria num aumento da exportação de ferro do baço e do intestino e, conseqüentemente, acúmulo de ferro no fígado, já que os níveis de hepcidina não alterariam a ferroportina no fígado. Quanto ao baço, aos 45 dias de tratamento o acúmulo de ferro foi o maior em ambos os grupos, porém, os valores de transcritos de Fpn e Dmt1 não acompanharam essa elevação sendo semelhantes, em ambos os grupos, aos valores do tempo inicial (T₀). Esse comportamento é facilmente justificado pelo fato de que a hepcidina no baço tem maior ação em nível de exportação do ferro, pela internalização da ferroportina (Oates, 2007). A captação do ferro no baço, por outro lado, dá-se de maneira independente pela ação das células de Kupffer e macrófagos sobre as senescentes da hematopoiese (Beard e Han, 2009). Assim, podemos inferir que no baço o acúmulo deu-se mais pela captação de ferro do que pela expressão de ferroportina

nesse órgão. No intestino, os menores níveis de ferro encontrados aos 30 dias de tratamento em ambos os grupos (Figura 20C) foram acompanhados por menores concentrações de mRNA de hepcidina (Hamp) no fígado (Figura 21). Assim podemos supor que os menores níveis de mRNA de hepcidina (Hamp) foram acompanhados por maiores taxas de exportação de ferro levando assim, a menores concentrações de ferro no enterócito (Figura 30).

Um novo modelo de regulação molecular da expressão dos transcritos Hamp tem sido proposto por Ganz e Nemeth em 2012 (Figura 31), com base nos modelos previamente propostos por Frazer e Anderson, 2003 (Figura 6) e Hentze *et al*, 2010 (Figuras 7 e 29). Os autores mostram as três vias pelas quais a regulação molecular da hepcidina (Hamp) aconteceria. A primeira delas se daria pela presença de transferrina diférrica da circulação em contato com a membrana do hepatócito. Esse contato ativaria os receptores de transferrina 1 e 2 que, juntamente com HFE, levariam a uma cascata de reações via SMAD, culminando com o aumento da expressão de transcritos Hamp. Vale ressaltar que a BMP6 e seus receptores BMPR e HJV têm um importante papel na sinalização via SMAD. A proteína neogenina, proteína da família das netrinas, amplifica o sinal da HJV e, conseqüentemente, o sinal de transcrição do Hamp. Nesse modelo ainda aparece a matriptase-2, proteína liberada na baixa de ferro, que agiria fisicamente com a HJV, clivando-a à hemojuvelina solúvel (sHJV), inibindo assim sua ação como coreceptor da BMP6. Dessa maneira, a matriptase-2, ao contrário da neogenina, parece ter a função de diminuir o sinal de transcrição de hepcidina (Hamp) via HJV. O ácido retinoico também parece interagir com a HJV, modulando a ação dessa proteína como coreceptora de BMP e, conseqüentemente, regulando o sinal de transcrição do Hamp (Figura 31) (Tsuchiya *et.al.*, 2009).

A segunda via de regulação aconteceria por meio da inflamação e aumento da IL-6. Como é sabido, a hipovitaminose A leva à imunossupressão e a uma maior susceptibilidade a infecções (Bozho e Conner, 2004; Kruszewski, 2003; Crichton *et al.*, 2002). Assim, a elevada concentração de IL-6 na circulação amplificaria a sinalização de transcritos de hepcidina (Hamp) via JAK/STAT (Figura 29) (Hentze *et al.*, 2010; Ganz e Nemeth, 2011a; Domenico e Kaplan, 2009).

A terceira via mostra um possível mecanismo de regulação de transcritos de hepcidina (Hamp) via concentração de ferro intracelular. A presença de teores elevados de ferro no hepatócito acionariam sensores intracelulares de ferro e, conseqüentemente, aumentariam o nível de transcritos de Hamp. Os autores relatam que essa via ainda precisa ser mais bem estudada (Figura 31).

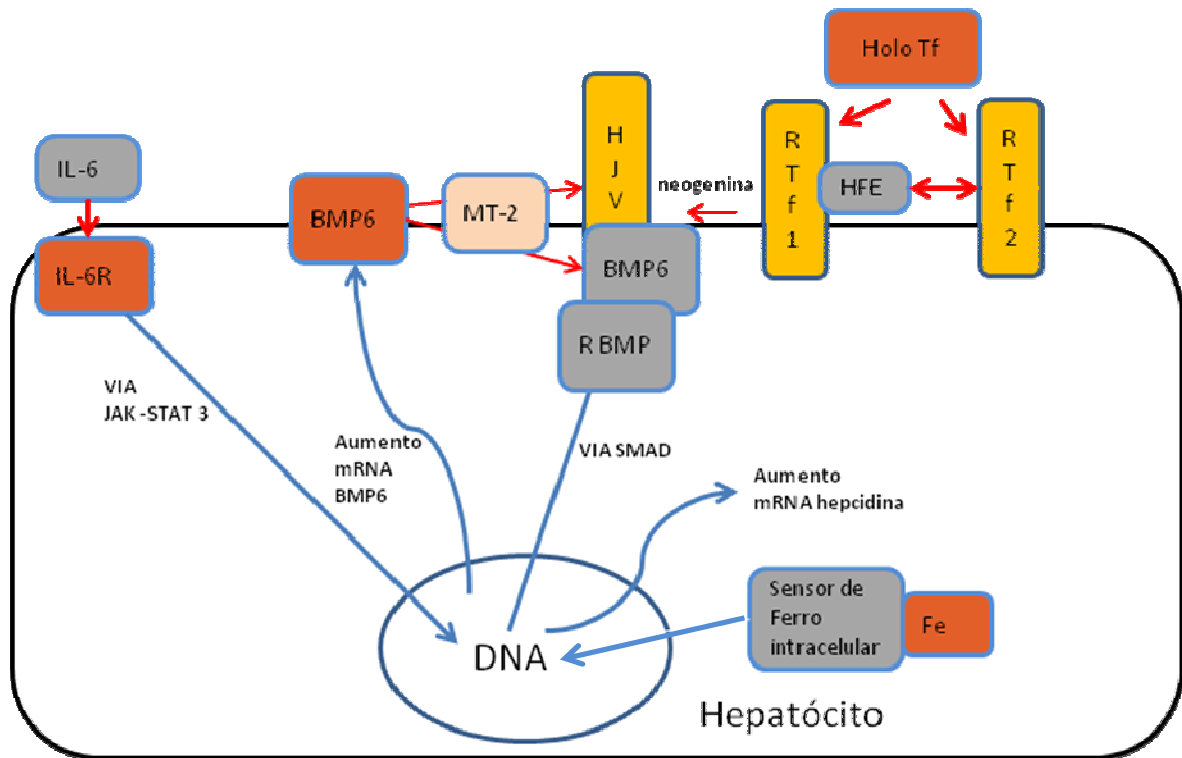


Figura 31 – Regulação molecular da expressão dos transcritos Hamp. Adaptado de Hentze *et al.*, 2010; Ganz e Nemeth, 2012.

Assim, pelo comportamento dos animais Deficientes em vitamina A em relação aos do grupo Controle durante o experimento realizado nesse estudo podemos sugerir que a deficiência de vitamina A agiu na homeostase do ferro ou pela via inflamatória, ou por ação do ácido retinóico na hemojuvelina ou, até mesmo, por ambos. Essas afirmativas são corroboradas pelo modelo de regulação metabólica proposto por Ganz e Nemeth em 2012 (Figura31).

Apesar do período de acompanhamento dos animais ter sido de 45 dias, a total deficiência de vitamina A que ocorreu aos 30 dias de tratamento (Tabela 7) foi suficiente para identificarmos alterações no perfil dos níveis de transcritos de hepcidina, bem como acúmulo de ferro no baço e intestino nos 15 dias subsequentes (Figura 30). Essas alterações descritas aconteceram mesmo com os

níveis de transcritos de ferroportina (Fpn) no fígado e Dmt1 no intestino tendo permanecido constantes durante o tratamento. Embora não tenhamos determinado os níveis de mRNA do Dmt1 no fígado, os resultados apresentados quanto ao acúmulo de ferro nesse tecido (Figura 20A) sugerem que a expressão do mRNA do Dmt1 possa estar aumentada. Tal hipótese será testada na continuação do presente trabalho. Outro fato a ser considerado é o mecanismo de regulação pós-traducional das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro já que a transcrição do DNA em mRNA ocorre no núcleo celular e precisa ser traduzida no ribossomo para então, acontecer a síntese de proteínas que, por diversos mecanismos podem ainda sofrer uma regulação pós-traducional (Anderson, Frazer e Mc Laren, 2009; Atanasiu, Manolescu e Stoian, 2006). Em estudos futuros iremos dosar, por *Western-Blot*, as quantidades das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, bem como os valores dos transcritos de Dmt1, HJV, RAR, RXR, BMP6 e IL-6 no fígado. Dessa forma, poderemos contribuir para a construção de um modelo molecular de hipótese mais completo no que tange ao metabolismo do ferro na deficiência de vitamina A.

7. CONCLUSÃO

Testamos no presente trabalho a influência do déficit de vitamina A na expressão dos genes de algumas das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro (hepcidina, ferroportina e DMT1). A análise dos níveis de mRNA por PCR em tempo real mostrou haver elevação das concentrações do mRNA da hepcidina (hamp) 30 dias após o período de depleção, quando comparado com o grupo Controle. Também identificamos um acúmulo de ferro no fígado dos ratos tratados com dieta Deficiente em vitamina A aos 45 dias retornando aos mesmos valores encontrados em T₀ e T₁₅. Foram observadas alterações significativas nas concentrações de ferro no baço dos animais Deficientes em vitamina A durante o período de tratamento, com maior concentração aos 30 dias após o período de depleção. Diferentemente do observado no baço, os níveis de ferro no intestino aos 15 e aos 30 dias foram menores nos animais Deficientes em vitamina A.

Estes resultados sugerem que o efeito da deficiência de vitamina A sobre o metabolismo de ferro, mediado pela hepcidina, parece percorrer os níveis traducional e/ou pós-traducional, inclusive nos tecidos-alvo.

Como perspectivas futuras, com o objetivo de identificarmos possíveis alterações em mecanismos de regulação traducional e pós-traducional, sugere-se a análise dos transcritos de Dmt1, HJV, Bmp-6, RAR, RXR e IL-6 no fígado, e, em linhas gerais, a análise do nível de atividade das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, sempre em diferentes condições de disponibilidade de vitamina A.

REFERÊNCIAS

- 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. 2009; 139(5): 1022-1030.
- Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. *Iron Absorption and Metabolism*. Current Opinion in Gastroenterology. 2009; 25: 129-135.
- Andrews NC. *Iron Metabolism: iron deficiency and iron overload*. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2000; 01: 75-98.
- Andrews NC. *Forging a field: the golden age of iron biology*. Blood. 2008; 112: 219-230.
- 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. 2002; 16: 175-178.
- Arredondo M, Martínez R, Núñez MT, Ruz M, Olivares M. *Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc*. Biology Research. 2006; 39: 95-102.
- Arruda SF, Siqueira EMA, Valência FF. *Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress by iron tissues overload*. Nutrition. 2009; 25: 472-478.
- 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. 2004; 48(4): 288-95.
- Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. *Hepcidin – central regulator of iron metabolism*. European Journal of Haematology. 2006; 78: 1-10.
- 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. 2009; 139: 434-438.
- Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. 2001.
- 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, 1995; 159(2): 155-162.
- Batista-Filho M, Rissin, A. *A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais*. Cadernos de Saúde Pública. 2003; 19 (1): S181-S191.
- Barros HLC. *Química Inorgânica: Uma Introdução*. Primeira ed. Editora UFMG, Belo Horizonte, 1992.

Beard J, Han O. *Systemic iron status*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790: 584–588; 2009.

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.

Bustin SA, Nolan T. *Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*. *Journal of Biomolecular Techniques*. 15: 155-166, 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.

Chaves GAT, Siqueira EMA, Arruda SF. *Vitamin A Deficiency Effect in the Expression of Spleen ferroportin gene in Rats*. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. v. 1. p. 1-1, 2010.

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.

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.

Costa ML, Freitas KC, Amancio OMS, Paes AT, da Silva SMA, Luz J, de Moraes MB. *Absorção do ferro da fórmula para lactentes e do leite de vaca fortificado: modelo experimental em ratos recém-desmamados*. Jornal de Pediatria. 85(5): set/out, 2009.

Cook CI, Yu BP. *Iron accumulation in aging: modulation by dietary restriction*. Mechanism of Ageing and Development. 102:1–13, 1998.

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

Crichton RR, Wilmet S, Legssyer 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, Bornman 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.

Davey MW, Saeys W, Hof E, Ramon H, Swennen RL, Keulemans J. *Application of Visible and Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (Vis/NIRS) to Determine Carotenoid Contents in Banana (Musa spp.) Fruit Pulp*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57:1742–1751, 2009.

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.

Domenico ID, Kaplan J. *A New Wrinkle in the Fold: Hepcidin Links Inflammation to the Unfolded Protein Response*. Cell Metabolism. 10:245-46, 2009.

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.

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.

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

Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J, Ganz T, Nemeth E. *The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis*. *Blood*: 114, 437–443, 2009.

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 A M. *vitamina A no leite materno: influência do estado nutricional de lactantes e da composição do leite*. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Gao J, Chen J, De Domenico I, Koeller DM, Harding CO, Fleming RE, Koeberl DD, Enns CA. *Hepatocyte-targeted HFE and TFR2 control hepcidin expression in mice*. *Blood*:115, 3374–3381, 2010.

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

Ganz T, Nemeth E. *Hepcidin and Iron Homeostasis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. PMID:22306005, 2012.

Ganz T, Nemeth E. *Hepcidin and disorders of Iron Metabolism*. *Annual Reviews of Medicine*. 62:347-360, 2011a.

Ganz T, Nemeth E. *The Hepcidin-ferroportin System as a Therapeutic Target in Anemias and Iron Overload Disorders*. *Hematology*. 10 (1):538-542, 2011b.

Ganz T. *Hepcidin and Iron regulation, 10 years later*. *Blood*.117 (17):4425-4433, 2011c.

Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. *Immunoassay for human serum hepcidin*. *Blood*:112(10): 4292- 97, 2009.

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

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.

Goswami BC, Ivanoff KD, Barua AB. *Absorption and Conversion of 11,12-3H-Carotene to Vitamin A in Sprague-Dawley Rats of Different Vitamin A Status*. *The Journal of Nutrition*, 133 (1): 148 2003.

Grotto HZW. *Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase*. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30(5): S1516-S1524, 2008.

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, 4a edição. New York, NY, USA, 2007.

Hershko C. *Regulating the master iron regulator hepcidin*. *Blood*, 108 (9): 2890-2891, 2006.

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

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. *Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism*. *Cell*, 142: 24-38, 2010.

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.

Iolascon A, De Falco L, Beaumont C. *Molécula Basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis*. *Haematologica* 94: 395-408, 2009.

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.

Jimenez C, Leets I, Puche R, Anzola, E, Montilla R, Aguilera CPA, Casal G. *A single dose of vitamin A improves haemoglobin concentration, retinol status and phagocytic function of neutrophils in preschool children*. *British Journal of Nutrition*, 103: 798-802, 2010

Kabat GC, Kim M, Adams-Campbell LL, Caan BJ, Chlebowski RT, Neuhaus 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.

Kobori C.N.; Amaya D.B. *Uncultivated Brazilian green leaves are richer sources of carotenoids than are commercially produced leafy vegetables*. *Food and Nutrition Bulletin*, 29(4):320-8, 2008.

- 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.
- Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. *Regulation of Hcpidin transcription by Interleukin-1 and Interleukin-6.* Proceedings of the National Academy of Sciences. 102(6): 1901-1910, 2005.
- Leong WI, Lönnerdal B. *Hcpidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption.* The Journal of Nutrition. 134: 1-4, 2004.
- Limdi JK, Crampton JR. *Hereditary hemocromatosis.* 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.
- Maqsood M, Dancheck B, Gamble MV, Palafox NA, Ricks MO, Briand K, Semba RD. *Vitamin A deficiency and inflammatory markers among preschool children in the Republic of the Marshall Islands.* Journal of Nutrition. 3:21-6, 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.
- Martínez-Navarrete N, Camacho MM, Martínez-Lahuerta J, Martínez-Monzó J, Fito P. *Iron deficiency and iron fortified food – a review.* Food Research International. 35: 225 – 23, 2002.
- 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, 2007 a.
- 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, 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.

Moreira DS. *Deficiência de vitamina A e níveis de transcrito de transportadores de ferro no intestino de ratos*. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana)- Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

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

Ministério da Saúde. *Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS-2006)*. Brasília, DF, Brasil, 2009.

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.

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

Monsen ER. *The ironies of the iron*. American Journal of Clinical Nutrition. 69:831-2, 1999.

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

Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. *Disorders of Iron metabolism. Part : molecular basis of iron homeostasis*. The Journal of Clinical Phatology On line. doi:10.1136/jcp.2010.079046, 2010 a.

Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. *Disorders of Iron metabolism. Part : molecular basis of iron homeostasis*. The Journal of Clinical Phatology On line. doi:10.1136/jcp.2010.086991, 2010 b.

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, pp 343-368, 2000.

Nemeth E, Vallore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein*. Blood. 101(7): 2461-2463; 2003.

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, Sirito 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.

Oliveira L F de. *Status de ferro durante o processo de depleção hepática de vitamina A*. 2010. xvi, 115 f., il. Dissertação (Mestrado em Nutrição)-Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

Oliveira SJ, de Sousa M, Pinto JP. *ER stress and iron homeostasis: A New Frontier for the UPR*. Biochemistry Research International .2011-896474, 2011.

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. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 7806-7810, 2001.

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

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, Blarer 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.

Prentice AM, Doherty CP, Abrams AS, Cox SE, Atkinson SH, Verhoef H, Armitage AE, Drakesmith H. *Hepcidin is the major predictor of erythrocyte iron incorporation in anemic African children*. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2011-11-391219. 2012

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 pathophysiology*. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 13: 73-83, 2000.

Prado MS, Assis AMO, Martins MC, Nazaré MPA, Rezende IFB, Conceição MEP. Hipovitaminose A em crianças de áreas rurais do semi-árido baiano. *Revista de Saúde Pública*, 29 (4): 295-300, 1995.

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.

Ramalho RA, Flores H, Saunders C. *Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública*. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 12(2): 117-123, 2002.

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

Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, Roth MP, Nemeth E, Ganz T. *Evidence for Distinct Pathways of Hepcidin Regulation by Acute and Chronic Iron Loading in Mice*. *Hepatology*. 53(4): 1333- 41, 2011.

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.

Roe MA, Collins R, Dainty JR, Swinkels DW, Fairweather- Tait SJ. *Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 89: 1-4, 2009.

Roodenburg AJC, West CE, Béguin Y, Van Dijk JE, Van Eijk HG, Marx JJ. *Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency*. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 11:223–30,2000.

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.

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.

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.

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

Scheffe JH, Lehman KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. *Quantitative real time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C_T difference" formula*. Journal of Molecular Medicine. 84:901-910, 2006.

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.

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.

Soe-Lin S, Apte SS, Andriopoulos B, Jr Andrews MC, Schranzhofer M, Kahawita T, Garcia-Santos D, Ponka, P. *Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo*. Proceedings of the National Academy of Science. 106: 5960–5965, 2009.

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.

Strube YN; Beard JL; Ross AC. *Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats*. Journal of Nutrition, 132:3607–3615, 2002.

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.

Tanumihardjo 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.
- Trombini P, Paolini V, Peklucchi S, mariani R, Nemeth E, Ganz T, Piperno A. . *Hepcidin response to acute iron intake and chronic iron loading in dysmetabolic iron overload syndrome*. Liver International. 31(7): 994-1000, 2011.
- Tsuchiya H, Akechi Y, Ikeda R, Nishio R, Sakabe T, Terabayashi K, Matsumi Y, Ashla AA, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Suzuki T, Ishibashi N, Yanagida S, Shiota G. *Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver*. Gastroenterology. 136 (1):341-50, 2009.
- 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.
- Vander ADL, Grobbee DE, Roest M, Marx JJM, Voorbij HA, Vander Schouw YT. *Serum Ferritin Is a Risk Factor for Stroke in Postmenopausal Women*. Stroke, 36; 1637-1641, 2005.
- 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.
- Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, Pietrangelo A. *ER Stress Controls Iron Metabolism Through Induction of hepcidin*. Science. 325:877-80, 2009.
- 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, Zervas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. *A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation 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 08/12/2011.

World Health Organization. *Assessing iron status of populations*. World Health Organization, 2a 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, Srani 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.

Zhang Z, Benabbas A, Ye X, Yu A, Champion PM. *Measurements of Heme Relaxation and Ligand Recombination in Strong Magnetic Fields*. The Journal of Physical Chemistry B. 113 (31): 10923–10933, 2009.

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.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 27 de maio de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DA VITAMINA A NA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS HEPCIDINA, DMT1 E IREG; NO STATUS DE FERRO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS", UNBDOC nº 18996/2008, sob responsabilidade da Profa. Sandra Fernandes Arruda, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA