



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição

**O efeito do todo-trans ácido retinoico quando administrado como única fonte de
vitamina A no metabolismo de ferro em ratos**

João Gabriel Marques de Brito e Silva

Brasília-DF

Julho, 2013



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição

João Gabriel Marques de Brito e Silva

**O efeito do todo-trans ácido retinoico quando administrado como única fonte de
vitamina A no metabolismo de ferro em ratos**

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda
Orientadora

Brasília-DF
Julho, 2013

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho”.

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Aos meus pais, João Batista e Silvia, e meus irmãos, João Henrique e Jéssica, por darem suporte a minha base moral e caráter, além do desejo de ser melhor sempre.

A Débora, por me fazer crescer mais a cada dia e por acreditar incondicionalmente no meu potencial.

A minha orientadora, professora Sandra Arruda, pela oportunidade, paciência, apoio e exemplo de dedicação e profissionalismo.

À professora Egle Siqueira, pela oportunidade de compartilhar de seu conhecimento e experiência, auxiliando consideravelmente no meu crescimento.

A Adriana, Juliana e Marcela, amigas e companheiras de bancada, pelo acolhimento, convivência e enorme contribuição nos experimentos e análises.

Aos demais amigos do laboratório de Bioquímica Nutricional, Azadeh, Douglas, Fernanda, Leandro, Lívia, Lorena e Luciano, pelo compartilhamento de bons momentos e experiências que sempre serão lembradas.

A todos os outros professores, alunos e funcionários do Instituto de Biologia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	vi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. Metodologia.....	4
3.1. Animais e tratamento.....	4
3.2. Concentração de retinol hepático.....	4
3.3. Concentração de ferro tecidual.....	5
3.4. Níveis de transcritos de Rara, Rxrb, Fpn1, Dmt1, Hamp e Epo.....	5
3.4.1. Extração de RNA.....	5
3.4.2. Síntese de DNA complementar.....	7
3.4.3. Amplificação e análise dos genes por qRT-PCR.....	7
3.5. Concentração sérica de IL-1 β e IL-6.....	8
3.6. Análise estatística.....	9
4. Resultados e Discussão.....	10
4.1. Consumo e ganho de peso.....	10
4.2. Retinol hepático.....	12
4.3. Metabolismo de ferro.....	13
5. Conclusão.....	22
6. Referências.....	23

Resumo

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel essencial para diversos processos fisiológicos, sendo o *todo-trans* e o *9-cis* ácido retinoico suas formas mais ativas. A deficiência desta vitamina tem sido relacionada à anemia e ao acúmulo de ferro nos tecidos, além de modular genes envolvidos no metabolismo de ferro. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do *todo-trans* ácido retinoico, como única forma de vitamina A na dieta, no metabolismo de ferro em ratos. Dezoito ratos Wistar machos foram tratados com três dietas: AIN-93G controle (CT); AIN-93G isenta de vitamina A (-VA); e AIN-93G isenta de vitamina + 12 mg de *todo-trans* ácido retinoico/kg de dieta (atRA). Após 59 dias, os ratos foram sacrificados; fígado, baço, coração e intestino foram removidos e armazenados a -70 °C para análises. A concentração de retinol hepático foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência e a concentração de ferro nos tecidos por espectrometria de emissão atômica. Os níveis de mRNA para *Rara*, *Rxb*, *Fpn1*, *Dmt1*, *Hamp* e *Epo* foram determinados por qRT-PCR. IL-1 β e IL-6 séricas foram quantificadas por ensaio imunoenzimático. O teste t-student para análises independentes foi utilizado para a comparação entre os grupos ($p < 0,05$). Houve menor ganho de peso nos grupos -VA e atRA, apesar do mesmo consumo de dieta, sugerindo que alterações sensoriais não são a principal causa nesse contexto. Não foi detectado retinol hepático nos animais -VA e atRA. O grupo -VA apresentou aumento em IL-1 β e IL-6 e menor expressão de *Epo* e *Rara*, sugerindo um estado de eritropoiese ineficaz que explicaria o acúmulo de ferro no baço com a secreção de GDF-15 ou TWSG-1; a menor expressão de *Hamp* no grupo -VA também seria decorrente da eritropoiese ineficaz, já no grupo atRA seria uma resposta ao tratamento. O *todo-trans* ácido retinoico foi capaz de aumentar a expressão de *Rara*, manter a de *Epo* e reduzir a concentração de ferro esplênico. Sugere-se que o maior teor de ferro no fígado dos animais atRA seja devido à captação do ferro exportado pelo intestino. A menor concentração de ferro no intestino dos animais atRA, apesar da redução em *Fpn1*, pode ser devido à isoforma *Fpn1b*. Conclui-se que o *todo-trans* ácido retinoico influencia processos de homeostase e utilização do ferro pela regulação de genes envolvidos no metabolismo de ferro.

Palavras-chave: *todo-trans* ácido retinoico; ferro; deficiência de vitamina A; ratos.

1. Introdução

A vitamina A é um composto lipossolúvel, primeiramente identificado há cerca de 100 anos (D'Ambrosio et al., 2011), essencial a diversos processos fisiológicos no organismo, incluindo reprodução, crescimento, imunidade, visão e manutenção de diversos tecidos corporais (Semba, 2012; Al Tanoury et al., 2013). Devido ao fato de não ser endogenamente produzida pelos mamíferos, é necessário que a vitamina A seja obtida através da dieta, podendo ocorrer de duas formas distintas: pela ingestão da vitamina A pré-formada de fontes animais, os ésteres de retinil (Frey e Vogel, 2011); ou pelos carotenoides pró-vitamina A, encontrados em fontes vegetais, os quais são hidrolisados e convertidos em retinol no organismo (von Lintig, 2012).

Todos os compostos estrutural ou funcionalmente relacionados à vitamina A, como seus metabólitos e precursores, são conjuntamente classificados como retinoides (Frey e Vogel, 2011). Entre esses, os principais são o retinil palmitato, forma de armazenamento da vitamina A; o todo-trans retinol, molécula convertida para as formas metabolicamente ativas da vitamina A; e o retinal, cuja função está diretamente relacionada à visão (Theodosiou et al., 2010). Além desses, a vitamina A também pode se apresentar na forma de ácido retinoico, o qual pode ser encontrado em três formas isoméricas distintas: todo-trans ácido retinoico, 9-cis ácido retinoico e 13-cis ácido retinoico (Theodosiou et al., 2010; Frey e Vogel, 2011).

O ácido retinoico é considerado a forma biologicamente ativa mais importante da vitamina A, mais especificamente os isômeros todo-trans e 9-cis (Kam et al., 2012). Entre suas principais funções estão a regulação de processos importantes como a diferenciação e o crescimento celular, além do controle do ciclo celular e modulação da apoptose (Ziouzenkova e Plutzky, 2008; Theodosiou et al., 2010). Por outro lado, sugere-se que a forma 13-cis ácido retinoico também possui funcionalidade metabólica (Blaner, 2001), e que as formas todo-trans retinol e todo-trans retinal poderiam ser capazes de modular a expressão gênica (Amann et al., 2011).

O todo-trans ácido retinoico é uma molécula capaz de regular a expressão de inúmeros genes envolvidos na diferenciação e proliferação celular, além de diversos processos homeostáticos (Al Tanoury et al., 2013). O mecanismo de modulação da expressão de genes envolve a translocação do todo-trans ácido retinoico para o núcleo

pela proteína celular ligante de ácido retinoico (CRABP), onde se liga ao receptor de ácido retinoico (RAR), um importante fator de transcrição (Kam et al., 2012). A interação entre ligante (todo-trans ácido retinoico) e receptor (RAR) induz uma alteração conformacional no próprio receptor, promovendo a formação de um heterodímero entre o RAR e o receptor de retinoide X (RXR) (Al Tanoury et al., 2013) – que é capaz de promover ou inibir a expressão gênica através da ligação a sequências conhecidas como elementos responsivos ao ácido retinoico (RARE), encontradas na região promotora dos genes alvo (Kam et al., 2012). Estima-se que mais de 500 genes são controlados, em diversos níveis, pela ação – direta ou indireta – do ácido retinoico (Bomhoff e Blomhoff, 2006; Frey e Vogel, 2011). Existem três subtipos conhecidos de RAR e RXR: α , β e γ (Kam et al., 2012).

Mais recentemente foi demonstrado que a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ferro, como *Hamp* e *Hfe2*, que são responsáveis por codificar respectivamente as proteínas hepcidina e hemojuvelina – importantes na regulação sistêmica do ferro –, pode ser modificada quando há deficiência de vitamina A (Arruda et al., 2009; Tsuchiya et al., 2009; Citelli et al., 2012). Nesses casos, assume-se a possibilidade dessa regulação ser em nível transcricional, o que poderia sugerir o envolvimento da forma de vitamina A capaz de regular a expressão gênica (o ácido retinoico), assim como as proteínas e receptores nucleares – como o $RAR\alpha$ e $RXR\beta$, por exemplo – envolvidos na via de sinalização desencadeada pelo próprio ácido retinoico. Existe, portanto, a possibilidade de que os genes envolvidos na regulação do ferro possuam sequências RARE (Balmer e Blomhoff, 2002; Tsuchiya et al., 2009).

Considerando que a deficiência de vitamina A tem sido associada à anemia e ao acúmulo tecidual de ferro (Mejía et al., 1979; Semba e Bloem, 2002; Arruda et al., 2009; Mehdad et al., 2010; Jiang et al., 2012), e que existe uma intrínseca relação entre os metabolismos de ferro e vitamina A (Schroeder et al., 2007), o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do todo-trans ácido retinoico, como única fonte de vitamina A, sobre o metabolismo de ferro em ratos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do todo-trans ácido retinoico, como única fonte de vitamina A, no metabolismo de ferro em ratos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do todo-trans ácido retinoico sobre a concentração tecidual de ferro;

Avaliar o efeito do todo-trans ácido retinoico sobre a expressão dos genes Rara, Rxrb, Fpn1, Dmt1, Hamp e Epo, envolvidos no metabolismo de ferro e vitamina A.

3. Metodologia

3.1. Animais e tratamento

Dezoito ratos Wistar, machos, com 21 dias de idade, foram alojados em gaiolas individuais, em biotério, com ciclos de luz/escurecimento de 12/12 h e temperatura de 22 ± 2 °C. Os animais foram aclimatados por sete dias com a dieta AIN-93G (Reeves et al., 1993). A dieta era oferecida no período de 16 às 8h, sendo livre o acesso a água. O consumo da dieta foi registrado diariamente e a avaliação deste foi realizada através da diferença entre o peso da dieta ofertada e o peso da sobra. Os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento ponderal. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBDoc n° 52606/2011.

Após o período de aclimação com dieta AIN-93G, os animais foram alocados em três diferentes grupos (6 ratos/grupo) e tratados durante 59 dias com uma das seguintes dietas: dieta controle AIN-93G (grupo CT), dieta AIN-93G isenta de vitamina A (grupo -VA) ou dieta AIN-93G isenta de vitamina A + 12 mg de todo-trans ácido retinoico/kg de dieta (grupo atRA). Posteriormente ao tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano 3% e tiveram o sangue retirado por punção cardíaca, tendo os seguintes órgãos removidos para análise: fígado, baço e intestino. Os órgãos foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) a 4 °C, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C.

3.2. Concentração de retinol hepático

O retinol foi extraído do fígado dos animais pelo método descrito por Tanumihardjo e Penniston (2002), adaptado para retinol hepático, e determinado usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Uma amostra de 0,1 g de fígado foi homogeneizada em solução de etanol + BHT (butil-hidroxitolueno) 1% (5 x volume inicial); KOH (hidróxido de potássio) 50% (0,8 x volume) foi adicionado à suspensão e a mesma foi agitada em vortex por 15 segundos e incubada em banho-maria a 48 °C por 60 minutos. Durante o período de incubação a amostra foi agitada em vortex a cada 15 minutos (15', 30', 45') por 15 segundos. Após a saponificação, hexano (2 x volume) foi adicionado à suspensão, e a mesma foi agitada por 30

segundos e centrifugada por 1 minuto para separação de fases; esse procedimento foi realizado três vezes. A fase superior foi coletada em tubo de ensaio e evaporada com nitrogênio gasoso. O extrato seco de retinol foi ressuscitado em 1 mL de etanol, filtrado com membrana de nylon (Whatman, Maidstone, Inglaterra) e 50 µL foram injetados em sistema HPLC (coluna Shim-pack C18 CLC-ODS 25 cm; Shimadzu, Kyoto, Japão). Uma mistura de metanol/água (95:5) foi utilizada como fase móvel, em fluxo de 1,0 mL/minuto, e o retinol foi detectado a 325 nm. As amostras de cada fígado foram analisadas em duplicata.

3.3. Concentração de ferro tecidual

As concentrações de ferro no fígado, baço, coração, intestino e na ração foram determinadas através do método de Baranowska et al. (1995), adaptado. Amostras de 0,3 g, 0,1 g, 0,1 g, 0,4 g e 0,5 g de fígado, baço, coração, intestino e ração, respectivamente, foram digeridas com 5 mL de HNO₃ e 2,5 mL de H₂SO₄ em sistema biodigestor micro-ondas Provecto Analítica (DGT 100 Plus; Provecto Analítica, Jundiaí, São Paulo, Brasil). Após a digestão, as amostras foram ressuscitadas em HNO₃ 0,1 mol/L para um volume final de 25 mL. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por espectrometria de emissão atômica (ICP-AES; Spectro, Kleve, Alemanha), linha 238 nm, utilizando curva de calibração com Fe (Titrisol-Merck) no intervalo de 0 a 10 ppm.

3.4. Níveis de transcritos de Rara, Rxrb, Fpn1, Dmt1, Hamp e Epo

3.4.1. Extração de RNA

Para a extração do RNA pesou-se 0,1 g de tecido em um eppendorf. O tecido foi homogeneizado em 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) utilizando-se um homogeneizador elétrico (Ultra-Turrax T8, IKA, Werke, Alemanha). A amostra foi centrifugada a 14432 g, durante 15 minutos, a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5418R, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante contendo o RNA foi retirado, transferido para um novo eppendorf e adicionado de 0,2 mL de clorofórmio (J. T. Baker, México) para cada 1 mL de Trizol. O eppendorf foi agitado por 15 segundos, incubado por três minutos e, depois, centrifugado por 15 minutos a 14432 g e 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf, onde se adicionou 0,5 mL de

álcool isopropílico (Sigma, Estados Unidos) para cada 1 mL de Trizol. Posteriormente, a amostra foi agitada manualmente, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 14432 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado uma vez com 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Trizol. A amostra foi então agitada em vortex e centrifugada a 14432 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37 °C. O pellet seco de RNA foi então ressuscitado em 50 µL de água deionizada livre de RNA (MilliQ Plus, Millipore, São Paulo, Brasil) e a amostra incubada por 10 minutos a 55-60 °C, posteriormente estocada a -70 °C.

Para verificar a integridade do RNA extraído, ~300 ng de RNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen, Espanha) em tampão de corrida TAE 1x (Tris: Vetec, Rio de Janeiro, Brasil; EDTA: Sigma, Estados Unidos; ácido acético: Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e corado com 0,2 µg/mL de brometo de etídeo.

A avaliação da pureza do RNA foi realizada a partir da determinação das absorvâncias a 230, 260 e 280_{nm} em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV-Visible, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). Em relação à contaminação por proteínas, foi realizada a razão entre as absorvâncias 260/280_{nm}; enquanto que a avaliação para contaminação por compostos aromáticos (como o fenol) – utilizados na purificação de RNA – foi realizada pela razão entre as absorvâncias 260/230_{nm}. O valor de referência para as razões de pureza de RNA esperado era de 1,9 a 2,0. A concentração de RNA foi determinada pela fórmula: $[RNA] = 40 \times A_{260} \times D$, onde **[RNA]**: concentração de RNA total, em mg/mL; **A₂₆₀**: leitura espectrofotométrica da absorvância no comprimento de onda 260nm; e **D**: diluição usada, em número de vezes diluídas.

Posteriormente, o RNA total foi lavado com 30 µL de acetato de sódio anidro 3 mol/L (Sigma, Estados Unidos) pH 5,2 – 0,1 vezes o volume da solução final – e etanol 100% (Sigma, Estados Unidos) gelado – 2,5 vezes o volume. A solução foi deixada durante a noite a -20 °C. As amostras foram então centrifugadas a 14432 g por 30 minutos, a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 75% (Sigma, Estados Unidos) gelado. Os eppendorfs foram novamente centrifugados a 14432 g por 5 minutos e 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas para secar em temperatura ambiente. Após serem secas, as amostras foram

dissolvidas em 20 μ L de água deionizada. A pureza das amostras foi novamente verificada por espectrofotometria, como anteriormente citado.

3.4.2. Síntese de DNA complementar

O RNA lavado com acetato e etanol foi utilizado como base para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o protocolo do Kit Improm II Reverse Transcription System (Promega, Madison, Estados Unidos). A 2,5 μ L de RNA foram adicionados 1,25 μ L de oligos dT e a mistura foi submetida a desnaturação a 70 °C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1,25 μ L da enzima Improm-IITM transcriptase reversa. A amostra foi incubada a 42 °C por 50 minutos e a reação foi interrompida por nova incubação a 70 °C por 15 minutos. Ao término desses procedimentos a amostra foi estocada a -20 °C. Para cada amostra de RNA foi realizada também a síntese de cDNA sem a utilização da enzima transcriptase reversa, para ser utilizado posteriormente para verificar contaminação por RNA genômico.

3.4.3. Amplificação e análise dos genes por qRT-PCR

Primeiramente, para determinar a eficiência da do procedimento de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), construiu-se curvas de diluição utilizando amostras de cDNA em diferentes concentrações (1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500) para os genes de interesse e o gene constitutivo (*Actb*). A eficiência foi finalmente determinada por métodos descritos anteriormente (Arruda et al., 2013). Assim, foi possível determinar a melhor diluição de cDNA para se realizar as reações de amplificação, de acordo com os ciclos de amplificação (*Ct*) apresentados para cada um dos genes. Para quantificação da expressão, os genes foram amplificados via qRT-PCR (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura), utilizando-se as sequências de nucleotídeos para os *primers* apresentados na tabela 1 e com as condições descritas a seguir. A expressão de todos os genes foi normalizada pela expressão de *Actb*. A especificidade da amplificação dos genes foi confirmada pela verificação da curva de dissociação. Todas as reações foram realizadas em triplicatas, inclusive os controles negativos para os genes de interesse em cada uma das reações de amplificação (Applied Biosystems, 2004).

Durante a reação de amplificação, foram utilizados os seguintes parâmetros: desnaturação a 95 °C/20 segundos, hibridação a 60 °C/3 segundos e alongação a 60 °C/20 segundos, por 40 ciclos. A curva de dissociação da amostra amplificada foi verificada para avaliação da especificidade da amplificação. De acordo com os resultados obtidos com a eficiência da curva-padrão e os Ct dos genes analisados, foi possível determinar a expressão relativa dos genes de interesse.

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados na reação de qRT-PCR.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Amplicon (pb)	GenBank
Rara	ACCATTGCCGACCAGATTACCC (sense) AAGGCATTGTGTCTTGCTCAGGT (anti-sense)	101	NM_031528
Rxrb	CTTCCCAGTCATCAGTTCTTCC (sense) GGTGGCTTCACATCTTCAGG (anti-sense)	150	NM_206849
Fpn1	TTCCGCACTTTTCGAGATGG (sense) TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT (anti-sense)	106	NM_133315
Dmt1	CTGATTTACAGTCTGGAGCAG (sense) CACTTCAGCAAGGTGCAA (anti-sense)	101	NM_013173
Hamp	TGATGCTGAAGCGAAGGA (sense) TGTGTTGAGAGGTCAGGAC (anti-sense)	135	NM_053469
Epo	TACGTAGCCTCACTTCACTGCTT (sense) GCAGAAAGTATCCGCTGTGAGTGTTT (anti-sense)	88	NM_017001
Actb	GTCGTACCACTGGCATTGTG (sense) CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA (anti-sense)	181	NM_031144

3.5. Concentração sérica de IL-1 β e IL-6

A concentração sérica das interleucinas foi determinada pela utilização de kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Bender Medsystems, Áustria). Microplacas previamente sensibilizadas com anticorpo específico para rato foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (PBST, PBS 1x + Tween 20 0,05%). Depois, adicionaram-se 100 μ L de soro e 50

μL de biotina-conjugada para incubação em centrífuga de microplacas a 100 g, por 2 horas (Centrífuga Megafuge 16R, Thermo Scientific, Estados Unidos). As microplacas foram posteriormente lavadas seis vezes com PBST, adicionadas de 100 μL de estreptavidina conjugada a HRP e incubadas em centrífuga de microplacas a 100 g, por 1 hora. As microplacas foram mais uma vez lavadas com PBST e adicionadas de 100 μL de solução de substrato de tetrametilbenzidina (TMB) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 100 μL de solução de parada (H_2SO_4 1 mol/L) para interromper a reação. As absorbâncias das amostras foram determinadas em 450 nm utilizando-se uma leitora de microplacas (Sunrise Tecan, Suíça). Para determinação da concentração de cada citocina, construiu-se uma curva-padrão de seis pontos, nas concentrações de 0 a 500 pg/mL para interleucina (IL)-1 β ($y = 0,0004 x + 0,0303$; $r^2 = 0,98537$) e nas concentrações de 0 a 1000 pg/mL para IL-6 ($y = 0,0009 x + 0,0403$; $r^2 = 0,9921$).

3.6. Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A normalidade dos resultados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as comparações entre os grupos realizou-se o teste t-Student para variáveis independentes, utilizando o programa SPSS (versão 18.0, SPSS Incorporation, Estados Unidos). O valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo na comparação das variáveis analisadas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Consumo e ganho de peso

Estágios avançados de deficiência de vitamina A parecem promover respostas alteradas no paladar e na escolha de alimentos em ratos (Bernard et al., 1961). Estudos anteriores demonstraram que a deficiência de vitamina A em ratos promoveu a queratinização das papilas gustativas da língua, levando a alterações no paladar que possivelmente seriam responsáveis pelo prejuízo na capacidade de escolha alimentar, pela redução no consumo de dieta e, conseqüentemente, pelo menor ganho ou perda de peso (Bernard e Halpern, 1968). Por outro lado, Anzano et al. (1979) sugerem que a deficiência de vitamina A em ratos seria responsável, primeiramente, por causar uma “ineficiência metabólica” que afetaria negativamente a utilização de substratos no metabolismo, induzindo a perda de peso antes que alterações no paladar pudessem afetar o consumo e, conseqüentemente, o ganho de peso dos ratos; porém, esses autores não descartam que as alterações gustativas também possam ter um papel, mesmo que secundário, no consumo e peso dos ratos.

Tabela 2. Ganho de peso, consumo de dieta e ferro e concentração de retinol hepático em ratos tratados com dietas CT, -VA e atRA após 59 dias de tratamento.

Grupo	Ganho de peso (g)	Consumo de dieta (g)	Consumo de ferro (mg)	Retinol hepático (µg/g tecido)
CT	274,9 ± 9,8	1110,3 ± 51,7	49,8 ± 2,3	60,3 ± 9,5
-VA	226,9 ± 41,2*	1053,3 ± 80,8	40,9 ± 3,1*	< LD*
atRA	232,8 ± 39,2*	1070,9 ± 82,2	36,9 ± 2,8*	< LD*

CT: dieta controle; -VA: dieta isenta de vitamina A; atRA: dieta isenta de vitamina A adicionada de todo-trans ácido retinoico. *Comparação dos grupos -VA e atRA em relação ao grupo CT ($p < 0,05$).

No presente estudo os grupos -VA e atRA apresentaram menor ganho de peso e consumo de ferro quando comparados ao grupo CT ($p = 0,029$; $0,000$ e $p = 0,020$; $0,000$, respectivamente; tabela 1), não tendo sido observada diferença no consumo de dieta dos grupos -VA e atRA ($p = 0,176$ e $p = 0,333$) em relação ao grupo CT. Esses resultados reforçam a ideia de que as alterações sensoriais no paladar de ratos

deficientes em vitamina A, as quais poderiam afetar negativamente o consumo alimentar e o ganho de peso, teriam apenas um papel secundário sobre esses processos (Anzano et al., 1979) – não representando, portanto, a principal causa da redução no ganho de peso observada no grupo -VA. Apesar desse fato, a administração do todo-trans ácido retinoico (grupo atRA) não foi capaz de promover um ganho de peso semelhante ao obtido para o grupo CT, que recebeu éster de retinil como fonte de vitamina A (tabela 1). Esses dados sugerem que outra(s) forma(s) de retinoides sejam importante(s) para a manutenção do processo de ganho de peso, já que a conversão de ácido retinoico a retinol ou retinal é fisiologicamente inviável em mamíferos, devido à irreversibilidade da reação (Napoli, 2012). Ainda, é possível que outros isômeros de ácido retinoico também tenham participação no crescimento dos ratos, considerando que as formas 9-cis e 13-cis também possuem outras importantes funções fisiológicas (Blaner, 2001; Kane, 2012).

No entanto, alguns trabalhos observaram que a administração de ácido retinoico em ratos deficientes em vitamina A foi capaz de recuperar o retardo no crescimento induzido por essa deficiência (Moore e Holmes, 1971; Anzano et al., 1979), mesmo em doses inferiores às utilizadas no presente estudo (5 vs. 12 mg/kg de dieta e 2/5/10 vs. 12 mg/kg de dieta, respectivamente). Os resultados aqui obtidos não refletem esse potencial efeito do ácido retinoico; porém, vale ressaltar que nos estudos anteriormente citados (Moore e Holmes, 1971; Anzano et al., 1979) os ratos foram inicialmente tratados com uma dieta isenta de vitamina A e somente após a indução da deficiência de vitamina A o ácido retinoico foi administrado aos animais – recuperando, assim, o crescimento que parecia desacelerar após o período inicial de tratamento sem qualquer fonte de vitamina A.

O efeito do ácido retinoico sobre o crescimento de animais parece depender da dose e tempo de tratamento. A administração crônica (≥ 3 meses) de ácido retinoico dietético parece exercer efeito limitado na manutenção do crescimento, uma vez que ratos suplementados tendem a perder peso mesmo quando a suplementação é mantida por um tempo prolongado (Bernard e Halpern, 1968), o que poderia ser decorrente da necessidade de outras formas de vitamina A para dar suporte ao crescimento e desenvolvimento normais. A retirada e a reintrodução periódica de ácido retinoico na dieta parecem demonstrar melhor a capacidade que essa forma de

vitamina A possui em modular o crescimento dos ratos (Moore e Holmes, 1971; Anzano et al., 1979). Assim, a análise pontual ao final do tratamento pode ser insuficiente para determinar o papel do todo-trans ácido retinoico no ganho de peso.

4.2. Retinol hepático

A vitamina A é um micronutriente obtido essencialmente da dieta e armazenado no fígado na forma de ésteres de retinil. A deficiência dessa vitamina é induzida quando a ingestão dietética é deficiente e, portanto, sua concentração no organismo encontra-se reduzida (Zimmerman et al., 2006; Cifelli e Ross, 2007). No presente estudo, após 59 dias de tratamento, o grupo -VA apresentou nível de retinol hepático abaixo do limite de detecção do método HPLC, enquanto os animais do grupo CT apresentaram um valor médio de $60,3 \pm 9,5$ µg/g de fígado (tabela 2).

O grupo -VA não apresentou estoque de retinol no fígado porque sua dieta foi completamente deficiente em qualquer fonte de vitamina A, sendo o retinol armazenado durante os períodos de amamentação e aclimatação utilizado para a manutenção das funções fisiológicas inerentes à vitamina A. Em função da vitamina A possuir outras funções fisiológicas diferentes daquelas realizadas exclusivamente pelo ácido retinoico, como por exemplo a função da visão – mediada pelo retinal –, o grupo atRA também não conseguiu preservar o estoque de retinol no fígado nos períodos anteriormente citados, uma vez que as demais funções independentes do ácido retinoico precisavam ser mantidas. Um estudo realizado por Arruda et al. (2004) evidenciou que, após 30 dias de tratamento com dieta deficiente em vitamina A, os estoques de retinol hepático dos ratos encontravam-se esgotados. Dessa forma, sugere-se que a deficiência de vitamina A no presente estudo tenha sido estabelecida aproximadamente após esse mesmo período de tratamento.

O grupo atRA também apresentou concentração de retinol hepático abaixo do limite de detecção (LD) do método utilizado (tabela 2), sugerindo que a administração do todo-trans ácido retinoico na dieta como única fonte de vitamina A não foi capaz de manter o estoque de retinol no fígado deste grupo como observado no grupo CT, o que pode ser explicado pelo fato da reação de oxidação do retinal a ácido retinoico, catalisada pela enzima retinal oxidase, ser irreversível (Napoli, 1993). Embora o todo-trans ácido retinoico seja considerado uma das formas mais ativas da vitamina A (Kam

et al., 2012) – e portanto capaz de realizar grande parte de suas funções no organismo –, a administração do mesmo não foi capaz de preservar o estoque de retinol que provavelmente foi acumulado no fígado dos animais atRA durante a amamentação e o período de aclimatação do estudo.

O ácido retinoico é capaz de auto-regular suas concentrações endógenas (Kam et al., 2012). Ratos que receberam doses orais entre 100 e 200 µg/dia de todo-trans ácido retinoico, durante 2 (Yamamoto et al., 2000) ou 50 dias (Wang et al., 2002), apresentaram aumento na expressão da enzima citocromo P450 26A1 (CYP26), responsável pela degradação do ácido retinoico, mecanismo importante para manter as concentrações de ácido retinoico em homeostase. Nas células, as proteínas celulares ligantes de ácido retinoico (CRABPs), CRABP-I e CRABP-II, encontram-se em concentrações muito superiores aos seus ligantes (ácido retinoico e seus metabólitos) e apresentam, ainda, alta afinidade pelos mesmos, especialmente pelo todo-trans ácido retinoico (Napoli, 1996). A CRBP-I, em particular, possui papel fundamental na transferência do ácido retinoico à CYP26 para degradação (Boylan e Gudas, 1992), evitando que o excesso de ácido retinoico tenha efeitos tóxicos no organismo. Nesse sentido, a ausência de estoques de retinol no fígado dos ratos atRA é corroborada, uma vez que o ácido retinoico excedente dentro da célula imediatamente se ligaria à CRBP-I e estaria prontamente disponível para servir como substrato para a CYP26, sendo assim degradado.

4.3. Metabolismo de ferro

Em relação às concentrações teciduais de ferro (tabela 3), a deficiência de vitamina A (grupo -VA) promoveu aumento enquanto a administração de todo-trans ácido retinoico (grupo atRA) promoveu decréscimo no conteúdo esplênico de ferro, ambos comparados ao grupo CT ($p = 0,005$ e $p = 0,033$, respectivamente). Por outro lado, no fígado, o grupo atRA apresentou maior conteúdo de ferro quando comparado ao grupo CT ($p = 0,046$), não havendo diferença estatística entre os grupos -VA e CT ($p = 0,217$) para esse órgão. A deficiência de vitamina A (grupo -VA) assim como a administração do todo-trans ácido retinoico (grupo atRA) não alteraram a concentração de ferro no coração dos animais quando comparados ao grupo CT ($p = 0,310$; $p = 0,228$, respectivamente). No grupo atRA foi observada uma redução na

concentração de ferro intestinal em relação ao grupo CT ($p = 0,002$), enquanto no grupo -VA não foi observada diferença quando comparado ao grupo CT ($p = 0,406$).

Embora os resultados descritos na literatura quanto ao efeito da deficiência de vitamina A sobre as alterações de parâmetros hematológicos, como os níveis de hemoglobina e hematócrito, não sejam consenso, há razoável concordância quanto ao acúmulo de ferro nos tecidos (baço, medula óssea, coração e fígado) de ratos deficientes em vitamina A (Mejía et al., 1979; Staab et al., 1984; Sijtsma et al., 1993; Arruda et al., 2009; Mehdad et al., 2010; Citelli et al., 2012).

No que concerne às concentrações de ferro no baço, um possível efeito da deficiência de vitamina A estaria relacionado ao prejuízo na eritropoiese (Roodenburg et al., 1994). Roodenburg et al. (1996) observaram que a suplementação com vitamina A em ratos deficientes nesse nutriente reduziu a concentração de ferro no baço; sugerindo uma maior disponibilidade de ferro para as funções de eritropoiese (Roodenburg et al., 1994). Uma relação positiva também já foi observada entre as concentrações de retinol sérico e hemoglobina (Mejía et al., 1977; Mejía e Chew, 1988; Bloem et al., 1990) e hematócrito (Mejía e Chew, 1988; Bloem et al., 1989; Bloem et al., 1990;) em humanos e em ratos (Roodenburg et al., 1994). Além disso, a redução nas concentrações de hemoglobina, hematócrito e hemácias também pode ocorrer na presença de deficiência de vitamina A, sendo esses parâmetros corrigidos com a suplementação dessa vitamina (Hodges et al., 1980).

Tabela 3. Concentração de ferro no baço, fígado, coração e intestino de ratos tratados com dietas CT, -VA e atRA, após 59 dias de tratamento.

Grupo	Baço ($\mu\text{g/g}$)	Fígado ($\mu\text{g/g}$)	Coração ($\mu\text{g/g}$)	Intestino ($\mu\text{g/g}$)
CT	$308,8 \pm 67,9$	$63,8 \pm 21,2$	$59,8 \pm 15,4$	$7,9 \pm 1,2$
-VA	$460,4 \pm 56,0^*$	$80,1 \pm 21,6$	$52,5 \pm 6,4$	$8,6 \pm 1,7$
atRA	$230,9 \pm 41,9^*$	$85,4 \pm 9,6^*$	$51,1 \pm 3,9$	$5,6 \pm 0,8^*$

CT: dieta controle; -VA: dieta isenta de vitamina A; atRA: dieta isenta de vitamina A adicionada de todo-trans ácido retinoico. *Comparação dos grupos -VA e atRA em relação ao grupo CT ($p < 0,05$).

No presente estudo, o primeiro fator que poderia estar contribuindo para o acúmulo de ferro no baço observado no grupo -VA seria a combinação entre o

aumento nos marcadores séricos de inflamação (figura 1), induzido pela deficiência de vitamina A (Cantorna et al., 1995), e a redução na expressão de mRNA de eritropoietina (Epo) (figura 2) observados nesses animais. A deficiência de vitamina A é capaz de favorecer um estado pró-inflamatório (Iwata et al., 2003), enquanto o todo-trans ácido retinoico parece atenuar a atividade pró-inflamatória exacerbada (Nozaki et al., 2006; van Neerven et al., 2008; Kirchmeyer et al., 2009). O aumento na atividade pró-inflamatória, por sua vez, pode reduzir a expressão ou secreção de Epo (Faquin et al., 1992; Jelkman et al., 1992; Trey e Kushner, 1995; Weiss e Goodnough, 2005) e também alterar a suscetibilidade de resposta de progenitores eritroides a esse hormônio (Weiss, 2009). De forma semelhante, a Epo também é regulada em nível transcricional pela ação do todo-trans ácido retinoico (Balmer e Blomhoff, 2002; Semba e Bloem, 2002; Makita et al., 2005).

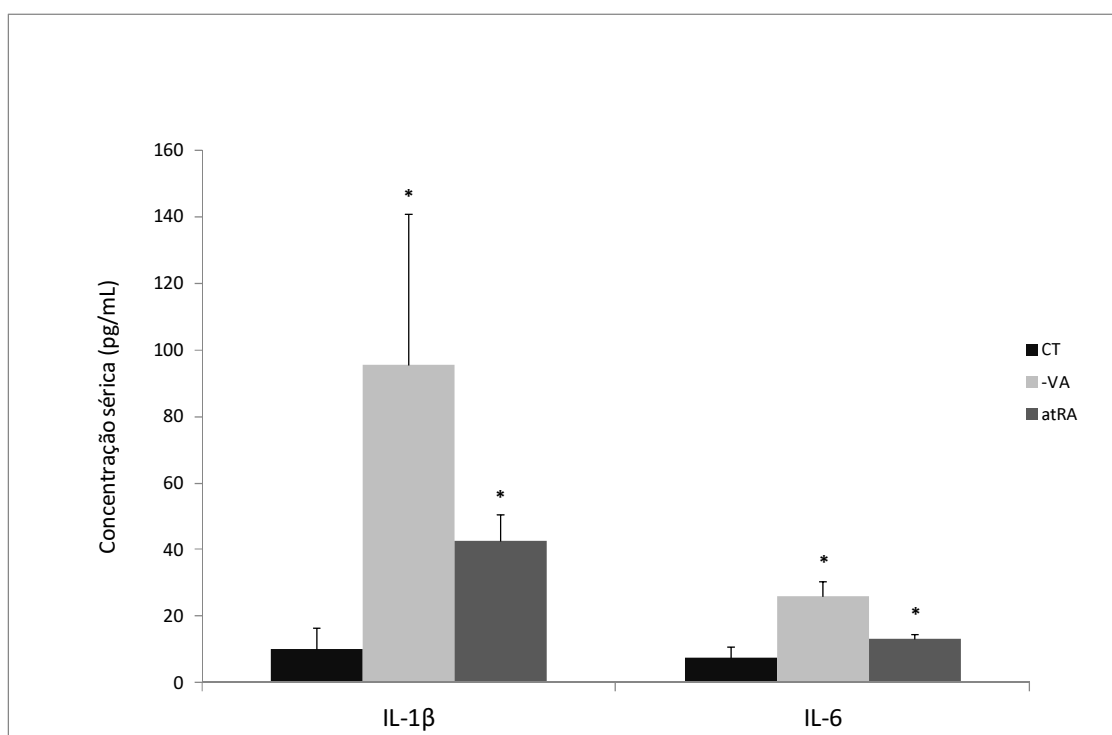


Figura 1. Concentração sérica de IL-1β e IL-6 de ratos tratados com dietas CT, -VA e atRA após 59 dias de tratamento (* $p < 0,05$, -VA e atRA vs. CT).

Tais evidências vão de acordo com os resultados aqui obtidos: concentrações séricas consideravelmente aumentadas para IL-1β e IL-6 ($p = 0,002$ e $p = 0,000$, respectivamente; figura 1) e, ao mesmo tempo, redução nas expressões de Epo no rim

($p = 0,000$; figura 2) e Rara no fígado ($p = 0,016$; figura 3) dos animais deficientes em vitamina A quando comparados ao grupo CT. Os níveis insuficientes de vitamina A, e consequentemente de ácido retinoico, dos animais deficientes em vitamina A (-VA) reduziram a expressão de Epo e Rara, uma vez que ambos os genes são controlados em nível transcricional pelo todo-trans ácido retinoico (Balmer e Blomhoff, 2002). Por outro lado, observa-se que a administração do todo-trans ácido retinoico pode atenuar o quadro apresentado pela deficiência de vitamina A: houve redução nos níveis séricos de IL-1 β e IL-6 quando comparados ao grupo -VA ($p = 0,062$ e $p = 0,001$, respectivamente; figura 1), apesar de ainda serem estatisticamente maiores que os apresentados pelo grupo CT ($p = 0,001$ e $p = 0,019$, respectivamente; figura 1) – o que pode ser parcialmente explicado pelo fato de que a modulação do sistema imune pela vitamina A não é dependente apenas do todo-trans ácido retinoico (Reifen, 2002); além disso, no grupo atRA a expressão relativa de Epo renal foi igual à do grupo CT ($p = 0,812$), enquanto que os níveis de mRNA de Rara foram maiores que no grupo CT ($p = 0,001$). Dessa forma, verificou-se que o estado pró-inflamatório e a redução na expressão de Epo induzidos pela deficiência de vitamina A são controlados, ao menos em parte, pela ação do todo-trans ácido retinoico nesses animais.

Em relação à expressão de *Rxrb*, não foram constatadas alterações nos grupos -VA e atRA quando comparados ao grupo CT ($p = 0,887$ e $p = 0,609$, respectivamente; figura 3). Isso pode ser explicado pelo fato de que sua atividade – e talvez sua expressão – não seja regulada pelo todo-trans ácido retinoico, mas sim principalmente pelo isômero 9-cis ácido retinoico (Amann et al., 2011; Al Tanoury et al., 2013). Ainda, o RXR- β é um fator de transcrição não específico para o ácido retinoico, sendo capaz de se ligar a muitas outras moléculas e formar heterodímeros com diversos receptores nucleares para regular a expressão gênica (Amann et al., 2011; Al Tanoury et al., 2013). Ainda não há evidências minimamente concretas que qualquer uma das formas de ácido retinoico seja capaz de regular positivamente a expressão gênica das diferentes isoformas de RXR (Balmer e Blomhoff, 2002).

Nesse contexto, os animais do grupo -VA, devido à deficiência de Epo, entrariam num estado de *eritropoiese ineficaz* que se assemelharia ao que ocorre, por exemplo, na β -talassemia. Na eritropoiese ineficaz, as células precursoras de eritrócitos passam por uma maturação incompleta (Tanno et al., 2010), processo este

que é intrinsecamente dependente de Epo em diversas etapas (Ingley et al., 2004; Elliott et al., 2012). Posteriormente, as células precursoras de eritrócitos, uma vez que não foram completamente maturadas, seriam encaminhadas para degradação no baço – local onde ocorre a reciclagem do ferro – e, além disso, secretariam dois supostos reguladores da eritropoiese: o GDF-15 (*growth differentiation factor 15*) e o TWSG-1 (*twisted gastrulation homolog 1*). Assim, o possível excesso de eritroides mal formados decorrente da deficiência de vitamina A (-VA), no presente trabalho, estariam se acumulando no baço para degradação e reciclagem do ferro, explicando o acúmulo esplênico deste micronutriente. Por outro lado, a adição do todo-trans ácido retinoico na dieta foi suficiente para manter a expressão adequada de Epo em função desse gene apresentar elemento RARE e ser ativado pelo todo-trans ácido retinoico, associado também ao menor estado pró-inflamatório, evitando a eritropoiese ineficaz e, portanto, o acúmulo de ferro no baço dos animais atRA (tabela 3).

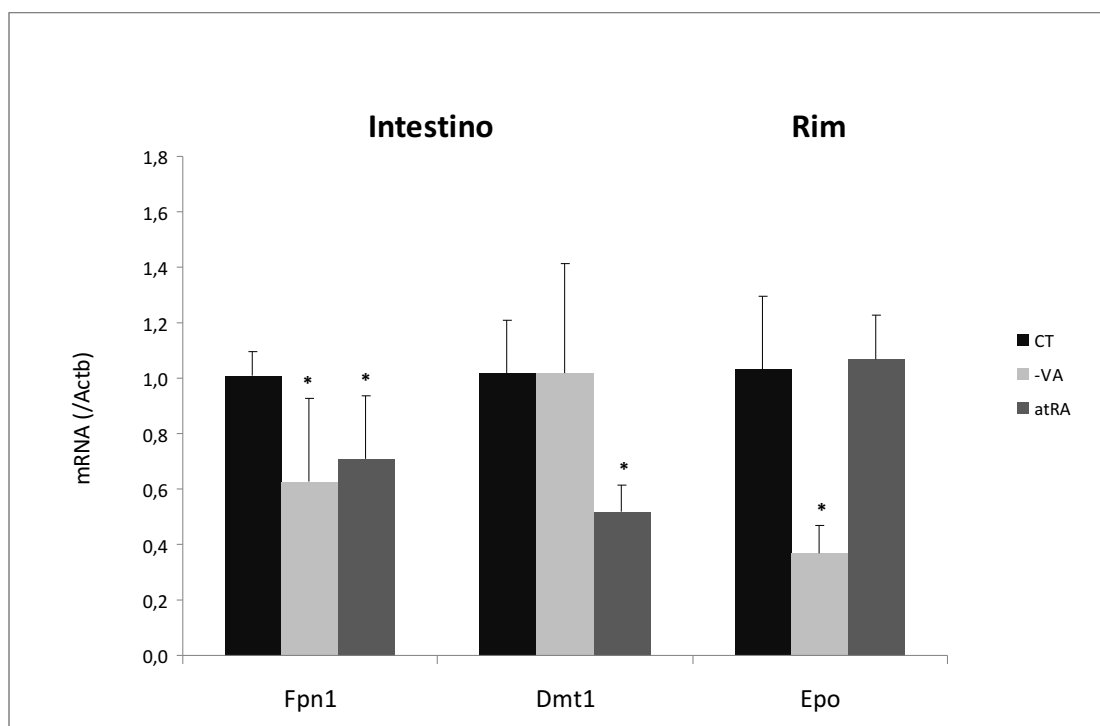


Figura 2. Níveis de mRNA para ferroportina (Fpn1) e transportador de metal divalente 1 (Dmt1) no intestino e eritropoietina (Epo) no rim de ratos tratados com dietas CT, -VA e atRA, após 59 dias de tratamento (* $p < 0,05$, -VA e atRA vs. CT).

Adicionalmente, tanto o GDF-15 (Gardenghi et al., 2010; Tanno et al., 2010) como o TWSG-1 (Tanno et al., 2009; Tanno et al., 2010), fatores secretados por

eritrócitos imaturos, parecem atuar como inibidores da expressão de hepcidina (Hamp). No presente estudo, tanto o grupo deficiente em vitamina A (-VA) quanto o grupo tratado com todo-trans ácido retinoico (atRA) apresentaram menores níveis de mRNA de Hamp no fígado ($p = 0,011$ e $p = 0,004$, respectivamente; figura 3) quando comparados ao grupo CT. A hepcidina é um peptídeo anti-microbiano produzido principalmente no fígado, considerado o principal responsável pela regulação sistêmica da homeostase do ferro, fundamentalmente por se ligar e promover a degradação da ferroportina (Fpn1) – o único exportador celular de ferro conhecido até o momento (Evstatiev e Gasche, 2012). Assim, esses resultados sugerem que a redução na expressão de Hamp não deveria favorecer o acúmulo de ferro no baço, uma vez que níveis reduzidos deste peptídeo a maior exportação de ferro tecidual (Hentze et al., 2010). No entanto, sugere-se que o gene Hamp estaria inibido em função da secreção aumentada dos fatores GDF-15 ou TSWG-1 por eritroides mal formados, devido à eritropoiese ineficaz (Gardenghi et al., 2010), e que essa sinalização parece sobrepor o efeito estimulante do acúmulo de ferro e da inflamação (Anderson et al., 2009) sobre a expressão do peptídeo hepcidina.

A menor expressão de Hamp no grupo atRA apresentou-se de acordo com o não acúmulo de ferro no baço desses animais. Além disso, foi demonstrado que a perda de função na sinalização RAR-RXR pelo todo-trans ácido retinoico aumenta a expressão de hemojuvelina – importante proteína que regula positivamente a expressão de Hamp –, enquanto que a administração do todo-trans retinoico, *in vitro*, reduziu a expressão hepática de hemojuvelina e Hamp (Tsuchiya et al., 2009).

Além da possibilidade de eritropoiese ineficaz, o acúmulo de ferro no baço dos animais -VA pode ser explicado pelo fato da deficiência de vitamina A promover o aumento da expressão dos genes de receptor de transferrina (TfR) e proteína reguladora de ferro (IRP)-2 (Jiang et al., 2012). A IRP é a principal proteína de regulação da homeostase intracelular do ferro (Evstatiev e Gasche, 2012). Quando os níveis de ferro estão dentro da normalidade, a IRP encontra-se na forma da enzima aconitase, composta de quatro centros ferro-enxofre, não modulando diretamente os níveis intracelulares de ferro; por outro lado, quando a concentração intracelular deste micronutriente é reduzida, esta proteína passa a conter um centro ferro-enxofre a menos em sua composição, adquirindo função de IRP. Nesta forma, a IRP passa a

regular a concentração intracelular de ferro ao promover a transcrição de genes para proteínas relacionados à captação de ferro (TfR) e inibir a transcrição de genes envolvidos com o estoque (ferritina) e a liberação (Fpn1) deste mineral. Ratos deficientes em vitamina A tendem a apresentar atividade ligante de RNA da IRP superior à de ratos controles, apesar da diferença encontrada não ser estatisticamente significativa (Schroeder et al., 2007); essa consequência poderia favorecer o aumento na expressão de TfR e diminuição na expressão de Fpn1, possivelmente contribuindo para o aumento da captação e diminuição da exportação de ferro na deficiência de vitamina A, conseqüentemente promovendo maior concentração de ferro em determinados órgãos, como o baço.

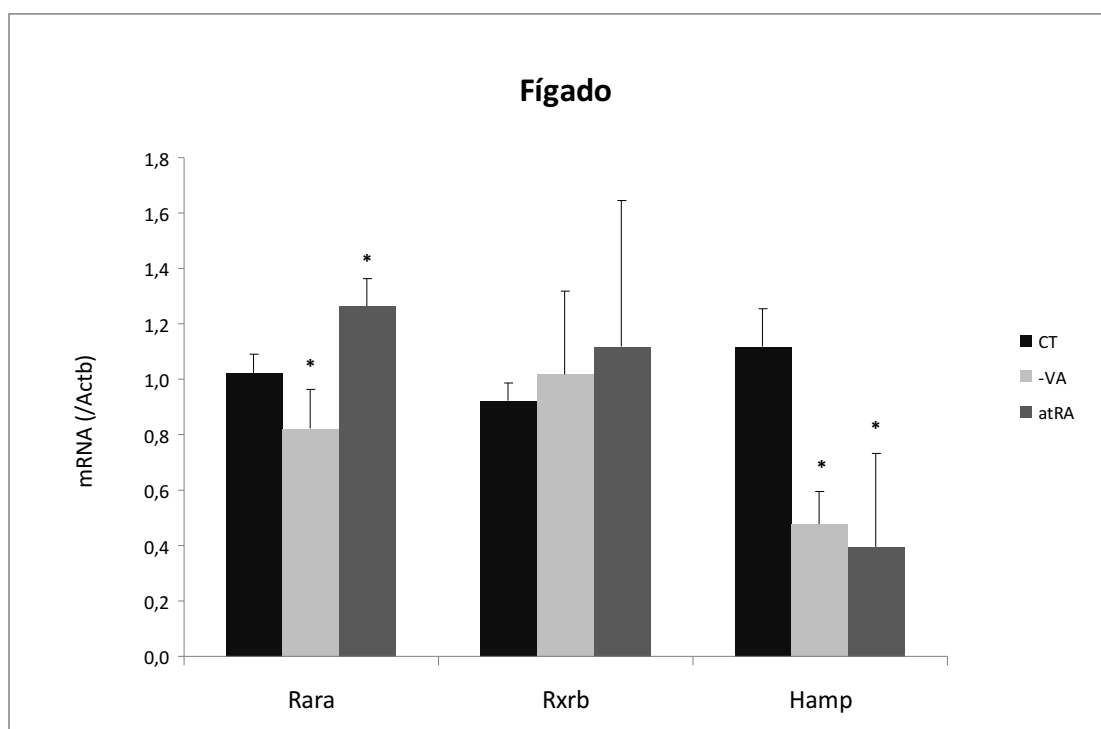


Figura 3. Níveis de mRNA para receptor de ácido retinoico alfa (Rara), receptor de retinoide X beta (Rxrb) e hepcidina (Hamp) no fígado de ratos tratados com dietas CT, -VA e atRA, após 59 dias de tratamento (* $p < 0,05$, -VA e atRA vs. CT).

A redução no conteúdo de ferro no baço dos animais tratados com todo-trans ácido retinoico, por outro lado, sugere que essa forma de vitamina A possui efeito modulador direto no metabolismo de ferro. De fato, esse retinoide parece ser capaz de reduzir o acúmulo de ferro induzido pela deficiência de vitamina A possivelmente por diminuir os níveis de TfR e por diminuir a atividade ligante de RNA da IRP (Schroeder et

al., 2007), regulando positivamente também a expressão de Fpn1. Citelli et al. (2012) observaram, *in vitro*, que a vitamina A, também na forma de todo-trans ácido retinoico, é capaz de induzir a expressão de Fpn1, fator que possibilitaria a redução nas concentrações de ferro nos tecidos dependentes dessa regulação, como o baço (Chaston et al., 2008). Também já foi observado *in vitro* que há redução nos níveis de mRNA e proteína para TfR e Hamp com a administração do todo-trans ácido retinoico, sendo essas alterações tempo e dose dependentes (Tsuchiya et al., 2009). Nesse sentido, enquanto a deficiência de vitamina A (grupo -VA) direcionaria o acúmulo de ferro para o baço, possivelmente através da regulação de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, a administração de todo-trans ácido retinoico (grupo atRA) exerceria um efeito contrário.

Contrariamente ao observado no baço, a deficiência de vitamina A (-VA) induzida durante 59 dias de tratamento não alterou a concentração de ferro no fígado (tabela 3), enquanto a administração de todo-trans ácido retinoico como única fonte de vitamina A (atRA) promoveu aumento no conteúdo de ferro neste órgão, ambos em relação ao grupo CT. Esses resultados sugerem que a resposta ao todo-trans ácido retinoico seja dose e tecido dependentes, ou que a regulação de Fpn1 no fígado possa ser independente dos níveis de hepcidina (Strube et al., 2002; Constante et al., 2006; Chaston et al., 2008). Além disso, o acúmulo de ferro hepático observado nos animais atRA, apesar do menor consumo total de ferro dietético em relação ao grupo CT, sugere que o ferro que foi ativamente exportado pelo baço e pelo intestino estivesse sendo captado pelo fígado, órgão responsável pelo estoque de ferro no organismo.

No intestino, a concentração de ferro não foi alterada no grupo -VA ($p = 0,217$), enquanto o grupo atRA apresentou redução ($p = 0,002$), quando comparados ao grupo CT. Citelli et al. (2012) verificaram que a administração do todo-trans ácido retinoico *in vitro* induziu o aumento nos níveis de mRNA de Fpn1 em células intestinais. Tais achados poderiam corroborar os resultados encontrados no presente estudo, onde o maior efluxo de ferro dos enterócitos dos animais do grupo atRA, possivelmente ocasionado pelo aumento nos níveis de Fpn1, proporcionaria menor concentração de ferro neste órgão. Entretanto, os dados aqui apresentados apontam para menor expressão de Fpn1 no intestino dos animais atRA ($p = 0,020$) e dos animais -VA ($p = 0,043$), em relação ao grupo CT (figura 2).

A deficiência de vitamina A pode resultar em maior atividade (Schroeder et al., 2007) e expressão (Jiang et al., 2012) de IRP no fígado. Levando em consideração que o sistema IRE (elemento responsivo ao ferro)-IRP é o principal mecanismo de regulação da homeostase intracelular do ferro – e que sua atividade reduz a tradução de Fpn1 (Evstatiev e Gasche, 2012) e possibilita a posterior degradação do mRNA desta proteína –, a menor expressão de Fpn1 no grupo -VA poderia ser explicado pela maior atividade/expressão de IRP nas células intestinais. Embora o grupo atRA tenha também apresentado expressão reduzida de mRNA de Fpn1, a literatura demonstra que outra isoforma de ferroportina, Fpn1b, não é regulada pelo sistema IRE-IRP (Zhang et al., 2009). Assim, os animais tratados com todo-trans ácido retinoico podem ter apresentando maior efluxo de ferro das células intestinais devido ao maior nível de proteína de Fpn1b, apesar da possibilidade de redução nos níveis de proteína para Fpn1 – o que não necessariamente ocorreu, tendo em vista que, *in vitro*, células hepáticas tratadas com todo-trans ácido retinoico podem apresentar redução na expressão de mRNA de Fpn1 sem necessariamente haver alteração nos níveis de proteína (Tsuchiya et al., 2009). Além disso, a baixa expressão de mRNA de Hamp no grupo atRA, quando comparado ao grupo CT (figura 3), indica a possibilidade de haver pouca degradação de Fpn1 no enterócitos desses animais, uma vez que a Hamp controla o efluxo celular de ferro ao se ligar e induzir a internalização e degradação da Fpn1 (Nemeth et al., 2004; De Domenico et al., 2007). Este fato também poderia levar à preservação dos níveis de proteína para Fpn1, apesar da redução observada nos níveis de mRNA para a mesma (figura 2).

Por outro lado, a menor concentração de ferro encontrada no intestino dos animais atRA também pode ter ocorrido devido à menor expressão do mRNA de Dmt1 nesse tecido (figura 2). Considerando que a homeostase intracelular do ferro é controlada pelo sistema IRE-IRP, e que a administração de todo-trans ácido retinoico parece diminuir a expressão ou atividade da IRP (Schroeder et al., 2007; Jiang et al., 2012), é possível que o menor conteúdo de ferro intestinal observado nos animais atRA seja decorrente da menor atividade do sistema IRE-IRP, e conseqüente menor ligação da IRP à região 3' não traduzida do mRNA de Dmt1 (Hentze et al., 2010), o que reduziria a tradução desta proteína e, assim, a captação de ferro pelos enterócitos.

5. Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem, junto à literatura, que a deficiência de vitamina A diminui a disponibilidade de ferro para suas funções, uma vez que este último apresenta tendência a se acumular em órgãos diretamente ligados ao seu metabolismo. Por outro lado, a administração do todo-trans ácido retinoico é capaz de aumentar a disponibilidade sistêmica de ferro. O todo-trans ácido retinoico, como única fonte de vitamina A na dieta, em ratos, parece possuir papel importante em diversos aspectos do metabolismo de ferro, incluindo absorção, liberação e disponibilidade, além de influenciar processos de homeostase, regulação e utilização deste micronutriente, principalmente através da modulação da expressão de genes envolvidos nesse metabolismo. Todavia, alguns aspectos da regulação do metabolismo de ferro pela vitamina A ainda parecem não ser diretamente modulados apenas pela ação do todo-trans ácido retinoico.

6. Referências

Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and non-genomic effects. 2013 Feb 24. [Epub ahead of print].

Amann PM, Eichmüller SB, Schmidt J, Bazhin AV. Regulation of gene expression by retinoids. *Curr Med Chem*. 2011;18:1405-12.

Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25:129-35.

Anzano MA, Lamb AJ, Olson JA. Growth, appetite, sequence of pathological signs and survival following the induction of rapid, synchronous vitamin A deficiency in the rat. *J Nutr*. 1979;109:1419-31.

Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. 2004.

Arruda SF, Siqueira EMA, Souza EM. Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and purslane (*Portulaca oleracea*) leaves reduce oxidative stress in vitamin A-deficient rats. *Ann Nutr Metab*. 2004;48:288-95.

Arruda SF, Siqueira EMA, Valencia FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition*. 2009;25:472-8.

Arruda LF, Arruda SF, Campo NA, Valencia FF, Siqueira EMA. Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61058.

Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*. 2002;43:1773-808.

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. *Sci Total Environ*. 1995;159:155-62.

Bernard RA, Halpern BP, Kare MR. Effect of vitamin A deficiency on taste. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1961;108:784-6.

Bernard RA, Halpern BP. Taste changes in vitamin A deficiency. *J Gen Physiol*. 1968;52:444-64.

Blaner. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:S129-35.

Bloem MW, Wedel M, Egger RJ, Speek AJ, Schrijver J, Saowakontha S, Schreurs WHP. Iron metabolism and vitamin A deficiency in children in Northeast Thailand. *Am j Clin Nutr*. 1989;50:332-8.

Bloem MW, Wedel M, van Agtmaal EJ, Speek AJ, Saowakontha S, Schreurs WHP. Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1990;51:76-9.

Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol*. 2006;66:606-30.

Boylan JF, Gudas LJ. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem*. 1992;267:21486-91.

Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. *Eur J Immunol*. 1995;25:1673-9.

Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srani SK, et al. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut*. 2008;57:374-82.

Cifelli CJ, Ross AC. Chronic vitamin A status and acute repletion with retinyl palmitate are determinants of the distribution and catabolism of all-trans-retinoic acid in rats. *J Nutr*. 2007;137:63-70.

Citelli M, Bittencourt LL, Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res*. 2012;149:64-70.

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. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:G229-37.

D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*. 2011;3:63-103.

De Domenico I, Ward DM, Langelier C, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell*. 2007;18:2569-78.

Elliott S, Sinclair AM. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics*. 2012;6:163-89.

Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut*. 2012;61:933-52.

Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood*. 1992;79:1987-94.

Frey SK, Vogel S. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients*. 2011;3:27-39.

Gardenghi S, Grady RW, Rivella S. Anemia, ineffective erythropoiesis, and hepcidin: interacting factors in abnormal iron metabolism leading to iron overload in β -thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24:1089-107.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142:24-38.

Hodges RE, Rucker RB, Gardner RH. Vitamin A deficiency and abnormal metabolism of iron. *Ann NY Acad Sci*. 1980;355:58-61.

Ingle E, Tilbrook PA, Klinken SP. New insights into the regulation of erythroid cells. *IUBMB Life*. 2004;56:177-84

Iwata M, Eshima Y, Kagechika H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol*. 2003;15:1017-25.

Jelkmann W, Pagel H, Wolff M, Fandrey J. Monokines inhibiting erythropoietin production in human hepatoma cultures and in isolated perfused rat kidneys. *Life Sci*. 1992;50:301-8.

Jiang S, Wnag C, Lan L, Zhao D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition*. 2012;28:281-7.

Kam RKT, Deng Y, Chen Y, Zhao H. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell Biosci*. 2012;2:11.

Kane MA. Analysis, occurrence, and function of 9-cis retinoic acid. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821:10-20.

Kirchmeyer M, Koufany M, Sebillaud S, Netter P, Jouzeau JY, Bianchi A. All-trans retinoic acid suppresses interleukin-6 expression in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts by inhibition of ERK1/2 pathway independently of RAR activation. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(6):R141.

Makita T, Duncan SA, Sucov HM. Retinoic acid, hypoxia, and GATA factors cooperatively control the onset of fetal liver erythropoietin expression and erythropoietic differentiation. *Dev Biol*. 2005;280:59-72.

Mehdad A, Siqueira EMA, Arruda SF. Effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability. *Ann Nutr Metab*. 2010;57:35-9.

Mejía LA, Hodges RE, Arroyave G, Viteri F, Torún B. Vitamin A deficiency and anemia in Central American children. *Am J Clin Nutr*. 1977;30:1175-84.

Mejía LA, Hodges RE, Rucker RB. Role of vitamin A in the absorption, retention and distribution of iron in the rat. *J Nutr*. 1979;109:129-37.

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

Moore T, Holmes PD. The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Lab Anim*. 1971;5:239-50.

Napoli JL. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J Nutr*. 1993;123:362-6.

Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J*. 1996;10:993-1001.

Napoli JL. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821:152-67.

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090-3.

Nozaki Y, Yamagata T, Sugiyama M, Ikoma S, Kinoshita K, Funachi M. Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clin Immunol*. 2006;119:272-9.

Reifen R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. *Proc Nutr Soc*. 2002;61:397-400.

Roodenburg AJC, West CE, Yu S, Beynen AC. Comparison between time-dependent changes in iron metabolism of rats as induced by marginal deficiency of either vitamin A or iron. *Br j Nutr.* 1994;71:687-99.

Roodenburg AJC, West CE, Hovenier R, Beynen AC. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br J Nutr.* 1996;75:623-36.

Schroeder SE, Reddy MB, Schalinske KL. Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory proteins. *J Nutr.* 2007;137:2686-90.

Semba RD. On the 'discovery' of vitamin A. *Ann Nutr Metab.* 2012;61:192-8.

Semba RD, Bloem MW. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56:271-81.

Sijtsma KW, van den Berg GJ, Lemmens AG, West CE, Beynen AC. Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A. *Br J Nutr.* 1993;70:777-85.

Staab DB, Hodges RE, Metcalf WK, JL Smith. Relationship between vitamin A and iron in the liver. *J Nutr.* 1984;114:840-4.

Strube YN, Beard JL, Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *J Nutr.* 2002;132:3607-15

Tanno T, Porayette P, Sripichai O, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood.* 2009;114:181-6.

Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol.* 2010;17:184-90.

Tanumihardjo SA, Penniston KL. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J Lipid Res.* 2002;43:350-5

Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:1423-45.

Trey JE, Kushner I. The acute phase response and the hematopoietic system: the role of cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995;21:1-18.

Tsuchiya H, Akechi Y, Ikeda R, Nishio R, Sakabe T, Terabayahi K, et al. Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver. *Gastroenterology*. 2009;136:341-50.

van Neerven S, Kampmann E, Mey J. RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol*. 2008;85:433-51.

von Lintig J. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(suppl):1234S-44S.

Wang Y, Zolfaghari R, Ross AC. Cloning of rat cytochrome P450RAI (CYP26) cDNA and regulation of its gene expression by all-trans-retinoic acid in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2002;401:235-43.

Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1011-23.

Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:682-93.

Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC. Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *FASEB J*. 2000;14:2119-27.

Zhang D, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab*. 2009;9:461-73.

Zimmermann MB, Biebinger R, Rohner F, Dib A, Zeder C, Hurrell RF, Chaouki N. Vitamin a supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:580-6.

Ziouzenkova O, Plutzky J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: new insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett*. 2008;582:32-8.