

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE  
RIBEIRÃO PRETO

**FELIPE SALDANHA DE ARAUJO**

**Avaliação fenotípica dos linfócitos T em um modelo animal de  
deficiência de ferro**

**Ribeirão Preto  
2006**

**FELIPE SALDANHA DE ARAUJO**

**Avaliação fenotípica dos linfócitos T em um modelo animal de  
deficiência de ferro**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biociências aplicadas à Farmácia para  
obtenção do título de Mestre em  
Biociências aplicadas à Farmácia  
Área de concentração: Biociências  
aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de  
Souza

**Ribeirão Preto  
2006**

**Felipe Saldanha de Araujo**

**Avaliação fenotípica dos linfócitos T em um modelo animal de deficiência de ferro**

---

Prof(a).Dr(a).

---

Prof(a).Dr(a).

---

Profa.Dra. Ana Maria de Souza  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP  
Orientadora

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em...../...../2006.

*Dedico esta tese:*

*Aos meus pais Celi e Renato (in memoriam), que sempre apoiaram minhas decisões, me oferecendo todas as condições para que eu alcançasse os meus objetivos. A minha esposa Liliane e meus filhos Thaís, Renato e Junior, pela paciência e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo apoio e oportunidade.

À Professora **Ana Maria de Souza**, pela chance que me deu de realizar este trabalho sob sua orientação. Agradeço a confiança, o incentivo e a amizade. Admiro tua capacidade de liderança e acima de tudo, teu profissionalismo.

Às Professoras **Fabiola Attié de Castro** e **Maria Regina Torqueti Tolo**, pelos ensinamentos durante a realização do Programa de Aperfeiçoamento ao ensino.

Ao "amigo-irmão" **Rodrigo Proto de Siqueira**, pelos ensinamentos, amizade e oportunidade de crescer. Obrigado por tudo.

Ao meu padrinho **Alcino**, que nos meus momentos mais difíceis, sempre esteve a meu lado e ajudou a amparar meus filhos.

À **Amélia** e ao **Nilton**, pelo carinho e amizade que sempre tiveram comigo.

**Aos amigos do Laboratório de Hematologia Clínica:**

**Zita Maria de Oliveira Gregório** pelo apoio na realização de experimentos.

**Solange e Natalino Boccardo** pelo apoio na preparação dos materiais usados nos experimentos.

**Alexandre**, pela amizade e informações a respeito da pós-graduação na FCFRP, no início de minha caminhada. Foi muito bom conviver contigo.

**Rita**, pela amizade sincera e colaboração durante a realização deste trabalho.

**Elayne, Flávia e Ieda**, por trazerem mais alegria ao nosso laboratório e pela ótima convivência.

À **Fabiana Rosseto Moraes** pelo apoio na realização da Citometria de Fluxo.

**Aos amigos do LAC da FCFRP-USP**, em especial, Analuiza, Cláudia Perone e José Luís pela amizade, companhia e pelos bate-papos nas horas vagas.

**Aos funcionários da FCFRP-USP**, em especial, Clóvis, Henrique, José Luis e Zé Maria pela grande amizade, acolhimento e pelo futebolzinho as quintas-feiras.

**Aos funcionários do biotério**, em especial Aldo, Cleide e Reinaldo, pelas dicas e conversas divertidas.

**Aos colegas, amigos e amigas da pós-graduação**, Amanda, Carla, Danyelle, Fernando, Juliano, Reginaldo, Renes, Ronaldinho e Zezé, pela convivência.

A meu tio **Orayl**, pelos incentivos e conselhos.

À minha irmã **Ana**, pelo incentivo e torcida.

À **Laurinha**, que tornou esse último ano em Ribeirão muito mais agradável.

À **Professora Cristina Fabião**, pelo incentivo e colaboração na minha vinda para Ribeirão Preto.

**Aos amigos de Ribeirão Preto**, Diou, Edílson, Italiano, Turco, Turquinho e Panepucci, pelo acolhimento e carinho.

**Aos colegas e amigos da UCPEL**, pelos incentivos de sempre.

**Aos demais colegas e amigos, professores e funcionários da FCFRP/USP** pela amizade e aprendizado.

À **CAPES** pela bolsa concedida.

**A todos vocês o meu MUITO OBRIGADO.**

**“O homem que decide parar até que as coisas melhorem verificará mais tarde, que aquele que não parou e colaborou com o tempo, está tão adiante que jamais poderá ser alcançado”.**

**Rui Barbosa**

**Lembrado por meu pai**

## RESUMO

ARAUJO, F.S. **Avaliação fenotípica dos linfócitos T em um modelo animal de deficiência de ferro.** 2006. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

O ferro é um elemento chave em muitos processos metabólicos, como transporte de oxigênio, síntese de hormônios esteróides, respiração celular, transporte de elétrons, síntese de DNA, proliferação e diferenciação celular e regulação gênica. A deficiência de ferro é a desordem nutricional mais comum afetando aproximadamente um terço da população mundial. Pequenos déficits no compartimento funcional de ferro têm sérias conseqüências sobre o sistema imune, principalmente na imunidade mediada por células. A abordagem dos pais ou responsáveis, as exigências éticas e a aderência de crianças da mesma faixa etária e sem outros problemas que afetem o metabolismo do ferro e o sistema imune são as principais dificuldades enfrentadas no desenvolvimento de pesquisas com seres humanos, sendo necessário o estabelecimento de modelos experimentais. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo de indução e recuperação de deficiência de ferro em camundongos, visando a sua utilização em estudos sobre alterações do sistema imune induzidas por esta deficiência. A deficiência de ferro foi induzida por ingestão de uma ração com baixo teor de ferro (5 mg /kg de ração) por 4 e 8 semanas. No término deste período foram determinados: concentração de hemoglobina (colorimétrico), hematócrito (microhematócrito), estoques de ferro hepático (espectrometria de absorção atômica) e fenotipagem (citometria de fluxo) dos linfócitos presentes no sangue periférico e em suspensão de células do baço dos animais dos grupos controle (C) e deficiente em ferro (DF), sendo avaliado a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como a expressão do receptor de transferrina (CD71<sup>+</sup>) nessas subpopulações. Não houve diferenças na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito entre os animais dos grupos DF e C, porém os estoques de ferro estavam significativamente reduzidos nos animais do grupo DF de quatro ( $p < 0,05$ ) e oito ( $p < 0,01$ ) semanas. Não houve diferenças na porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> entre os animais dos grupos DF e C, porém os animais deficientes em ferro apresentaram maior porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> do baço expressando CD71<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ). Este trabalho sugere que a depleção nos estoques de ferro não altera a proporção dos subtipos de linfócitos, porém as células T CD8<sup>+</sup> do baço são mais sensíveis à deficiência de ferro.

Palavras chave: deficiência de ferro, imunidade celular, receptor de transferrina.

## ***ABSTRACT***

ARAÚJO, F.S. **Cells T immunophenotypic analysis in animal modelo of iron deficiency** 2006. 70f. Master Degree Dissertation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Iron have a crucial role in several metabolic pathways, such oxygen transport, steroid hormone synthesis, cellular respiration, electron transport, DNA synthesis, cellular proliferation and differentiation and genic regulation. The iron deficiency is most common disorder nutrition, affecting about 30% world population. Deficits in iron functional compartment have serious delays about immunity systems, especially in the cellular immunity. Because of environmental problems, age, deficiency of nutrients other than iron, prevalence of infection, which may make human studies difficult, we used an animal model. This work aimed established iron deficiency induction and recuperation in mouse, for study about immune systems alteration. Iron deficiency was induced by feeding mice a diet that contained only 5 mg Fe/Kg for 4 and 8 weeks. After this period were determined: hemoglobin (colorimetry), hematocrit (microhematocrit), liver iron stores (atomic absorption spectrophotometer) and we performed a flow cytometry analyses in peripheral blood and spleen lymphocytes in control (C) and iron deficient (ID) mouse. We defined the effects of iron deficiency on T-cell subset and expression of cell-surface transferrin receptor (CD71<sup>+</sup>) in these cells. Hemoglobin concentration and hematocrit of ID mice were not difference those of C mice, but iron stores of ID mice (4 and 8 weeks) were reduced ( $p < 0,05$  and  $p < 0,01$ ; respectively). Although T-cells subsets in peripheral blood and spleen were not altered, iron deficiency significantly increased the number of spleen T CD8<sup>+</sup> cells that express CD 71<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ). Data suggest that depletion of iron storage not alter T-cells subsets and spleen T CD8<sup>+</sup> is the most sensible subset in iron deficiency.

Key words: iron deficiency, cellular immunity, transferrin receptor

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C57BL/6	Linhagem de camundongos, Black C57
Dcytb	Citocromo b duodenal
DMT 1	Transportador de Metal Divalente (do inglês “Divalent Cation Transporter” <sup>1</sup> )
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HFE	Proteína da hemocromatose
Ig	Imunoglobulina
IMP	Via da integrina-mobilferrina (do inglês Integrin-Mobilferrin Pathway)
IREG 1	ferroportina 1 ou MTP 1 – transportador de ferro na membrana basolateral
IRE	Elemento Responsivo ao Ferro (do inglês “Iron Response Element”)
IRP	Proteína Regulatória do Ferro (do inglês “Iron Regulatory Proteins”)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês “major histocompatibility complex”)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão de fosfato salina (do inglês “Phosphate Buffer Saline”)
RNA-m	Acido ribonucléico mensageiro
SFT	Estimulador do Transporte de Ferro (do inglês “Stimulator of Fe transport”)
sTfR	receptor de transferrina solúvel (do inglês “Soluble Transferrin Receptor”)
TCR	Receptor de Células T
TfR	Receptor de transferrina
UNICEF	Fundo das Nações Unidas (do inglês “United Nations Children’s Fund”)

# SUMÁRIO

Agradecimentos	
Resumo	
Abstract	
Lista de abreviaturas e siglas	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1 Metabolismo do ferro	13
1.2 Deficiência de ferro	23
1.3 Sistema imune	27
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1 Material	35
3.1.1 Animais	35
3.1.2 Coleta de material	35
3.2 Métodos	36
3.2.1 Grupo de estudo	36
3.2.2 Avaliação do estoque hepático de ferro	37
3.2.3 Preparo da suspensão de células do baço	37
3.2.4 Citometria de fluxo	38
3.2.5 Análise estatística	39
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
4.1 Período de indução da deficiência de ferro	41
4.2 Indicadores do estado férrico, peso corporal, baço e timo	41

4.3 Porcentagem de células T CD4 e CD 8	44
4.4 Expressão do receptor de transferrina (CD71 <sup>+</sup> ) em células T CD4 e CD8 dos animais dos grupos 8C, 8DF e R1.	46
<b>5. DISCUSSÃO</b>	49
5.1 Indicadores do estado férrico, peso corporal, baço e timo	52
5.2 Porcentagem de células T CD4 e CD 8	53
5.3 Expressão do receptor de transferrina (CD71 <sup>+</sup> ) em células T CD4 e CD8 dos animais dos grupos 8C, 8DF e R1.	55
<b>6. CONCLUSÕES</b>	57
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	59

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Metabolismo do ferro

O ferro é o quarto elemento mais abundante na crosta da terra e todas as formas de vida possuem estratégias peculiares para sua absorção e metabolismo, sustentando assim uma ampla variedade de reações biológicas, que inclui a cadeia respiratória mitocondrial, a proliferação celular e as funções de células especializadas relacionadas à síntese de proteínas como mioglobina e hemoglobina (TESTA, 2002). Entretanto, o ferro também é potencialmente tóxico estando envolvido na geração de radicais livres, o que resulta em dano oxidativo para proteínas e ácidos nucleicos e, eventualmente, em morte celular (BARISANE; CONTE, 2002; GANZ; NEMETH, 2006; TESTA, 2002).

O ferro é essencial em todas as células vivas, sendo um elemento chave em muitos processos metabólicos, como componente catalítico em algumas enzimas, transporte de oxigênio, síntese de hormônios esteróides, respiração celular, transporte de elétrons, síntese de DNA, proliferação e diferenciação celular e regulação gênica (CETIN et al, 2004; SRAI; BOMFORD; McARDLE, 2002).

A manutenção da homeostase do ferro é de fundamental importância para o alcance de um balanço ótimo entre a entrada e saída, assim sua absorção é compatível com a quantidade necessária para sustentar as atividades bioquímicas e evitar os efeitos nocivos ocasionados pelo seu excesso. Este equilíbrio é mantido através da regulação coordenada da taxa de entrada, estoque e excreção de ferro, sendo os três processos regulados, via mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, por proteínas que respondem às mudanças na disponibilidade deste metal (LIEU et al, 2001; TESTA, 2002).

O ferro inorgânico da dieta é absorvido no trato gastrointestinal, especificamente no duodeno e jejuno proximal. Nas células intestinais, o ferro é incorporado aos

estoques ou liberado no plasma para se ligar a transferrina e ser distribuído (Figura 1) (BUTENSKY et al, 2004).

Na fisiologia humana, o ferro não é um elemento traço, um adulto sadio possui em torno de 4 a 5 g de ferro corporal. Dois terços deste metal é encontrado no tecido eritróide, como hemoglobina (ZHANG; SHEFTEL; PONKA, 2006).

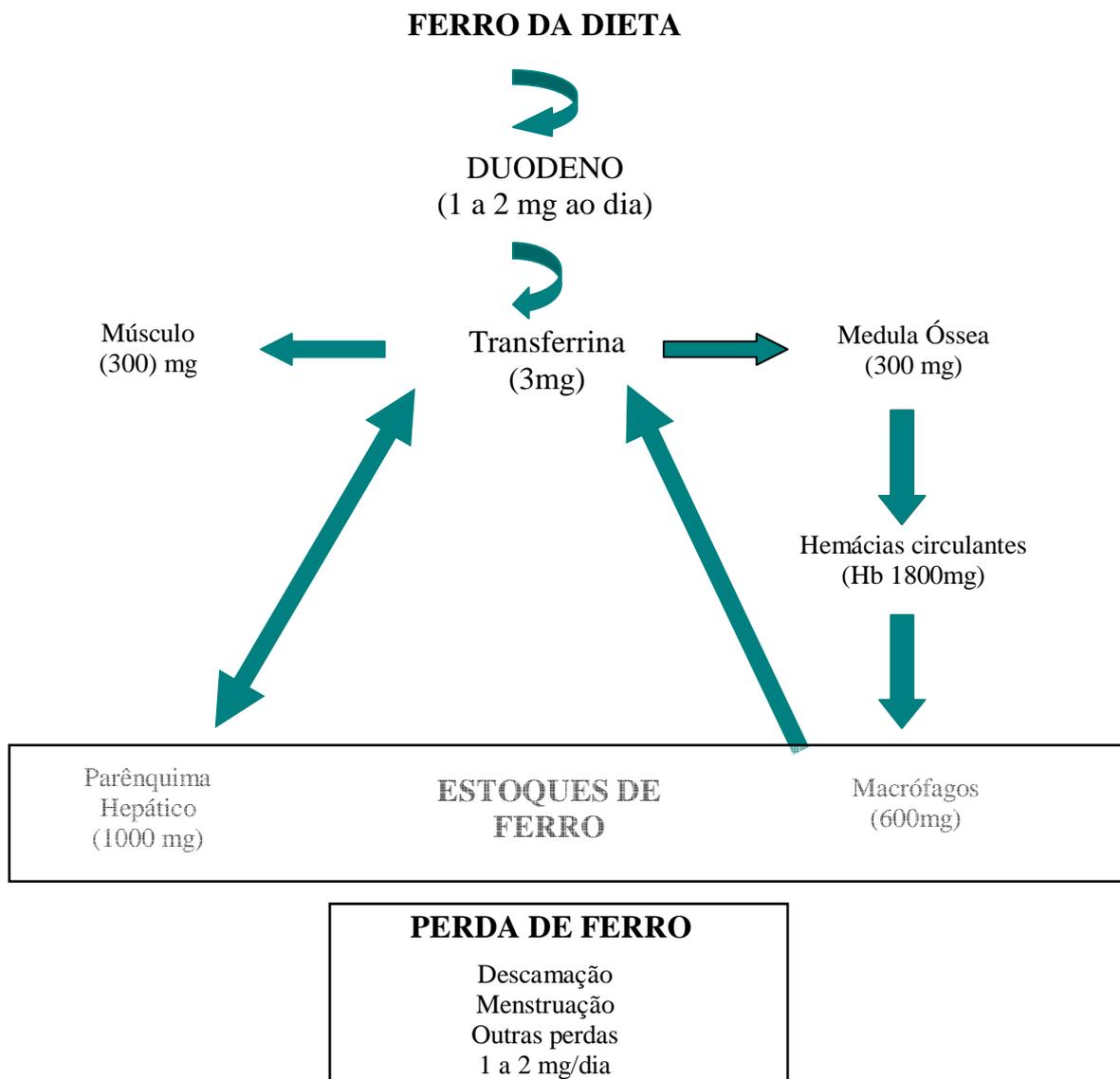


Figura 1. Distribuição do ferro no organismo (adaptado de ANDREWS, 1999).

Os fatores que afetam a absorção de ferro podem ser divididos em: intraluminal, de mucosa e corporal (CONRAD; UMBREIT, 2002). Homens adultos absorvem aproximadamente 1mg de ferro por dia de uma dieta contendo 10 a 20 mg do metal. As mulheres se alimentam menos que os homens e devem absorver diariamente 2 mg durante a vida reprodutiva para não se tornarem ferro deficientes (LIEU et al, 2001; SRAI; BOMFORD; McARDLE, 2002).

O mecanismo molecular de absorção do ferro vem sendo muito estudado. O ferro da alimentação está presente na forma de ferro ligado ao heme e ferro não ligado ao heme. O primeiro é absorvido por um mecanismo ainda não identificado que parece envolver um transportador específico que o libera do heme dentro do enterócito. O segundo vem da alimentação em grande parte na forma férrica, porém o ferro ferroso é o mais eficientemente absorvido pelas células intestinais e este processo depende de muitos fatores, incluindo a presença de ácido gástrico, ácido ascórbico e inibidores como o ácido fítico e polifenóis (CRICHTON et al, 2002; GASCHE et al, 2004; MORGAN; OATES, 2002; ROY; ENNS, 2000).

O ferro férrico é precipitado em soluções com pH maior que 3 e deve ser solubilizado e quelado no estômago ficando disponível para absorção no meio menos ácido do intestino delgado proximal (BENITO; MILLER, 1998; SRAI; BOMFORD; McARDLE, 2002). Algumas substâncias da alimentação como fitatos, fosfatos, carbonatos, taninos e oxalatos precipitam o ferro férrico e formam complexos macromoleculares dificultando sua absorção (BENITO; MILLER, 1998; CONRAD; UMBREIT, 2002; THEIL, 1994).

Estudos recentes sobre o mecanismo e a regulação do transporte de ferro no intestino revelam uma série de moléculas chaves, como o transportador de metal

divalente (DMT1), enzimas do citocromo b duodenal (Dcytb), hefestina e ferroportina (MILLARD et al, 2004).

O DMT1 é uma proteína identificada na borda em escova do enterócito, no duodeno proximal, responsável pelo transporte de ferro da luz intestinal para o enterócito, sendo este processo dependente do pH (GUNSHIN et al, 1997; MIMS et al, 2005). No eritroblasto, o DMT1 está presente na membrana do endossomo, tendo a função de transportar o ferro liberado do complexo transferrina-receptor para o citoplasma, onde este metal participará da síntese do heme, na mitocôndria (MIMS et al, 2005).

Há cerca de dez anos, foi descrito a atividade de uma redutase férrica em nível das células duodenais (GUNSHIN et al, 1997), entretanto apenas recentemente foi identificada a primeira molécula localizada na borda em escova do enterócito envolvida na redução do ferro férrico. Esta proteína foi chamada citocromo b duodenal (Dcytb) (CRICHTON et al, 2002; GOSWAMI; ROLFS; HEDIGER, 2002; MCKIE et al, 2001; TESTA, 2002), pertence à família das redutases de membrana plasmática citocromo b561 (SRAI; BOMFORD; McARDLE, 2002) e está hiper-expressa em casos de deficiência de ferro, anemia crônica e hipóxia (TESTA, 2002).

A superfície polarizada do epitélio intestinal exhibe, além da membrana apical envolvida na redução do ferro e entrada de alimentos digeridos, uma membrana basolateral envolvida na saída deste metal do enterócito para compartimentos do corpo. O transportador envolvido na saída de ferro através das membranas foi identificado em três estudos sendo denominado ferroportina 1 ou IREG ou MTP 1 (Figura 2) (ABBOUD; HAILE, 2000; DONOVAN et al, 2000; McKIE et al, 2000).

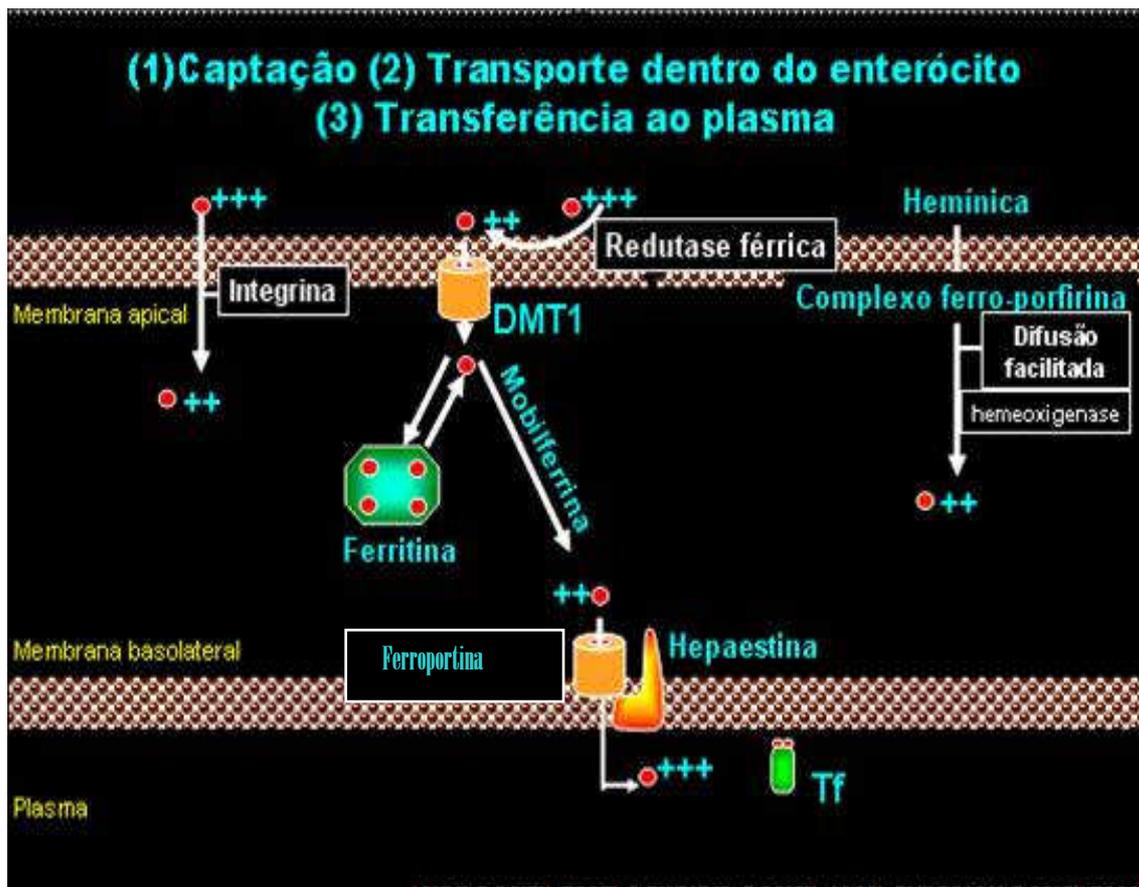


Figura 2. Absorção de ferro no enterócito.

O compartimento apical dos enterócitos duodenais também possui outras proteínas transportadoras de ferro, como o estimulador do transporte de ferro (SFT, stimulator of Fe transport), que é específico para o transporte de ferro férrico e ferroso, não transportando outros metais, e capaz de estimular o transporte de ferro ligado ou não a transferrina (BARISANI; CONTE, 2002; TESTA, 2002).

As vias identificadas para a entrada de ferro não ligado a transferrina nos enterócitos são: a via da integrina-mobilferrina (IMP, integrin-mobilferrin pathway) e a do transportador de metal divalente (DMT-1, Nramp-2) (ANDREWS, 1999; CONRAD; MORGAN; OATES, 2002; UMBREIT, 2002).

A via IMP transporta exclusivamente ferro férrico e não transporta outros metais de importância nutricional. A mobilferrina e a  $\beta$  3 integrina são duas proteínas associadas a esta via. Elas se associam no citosol e se ligam a flavina monooxigenase, formando um complexo macromolecular de 510 kDa, nomeado paraferitina, que apresenta atividade ferredutase. Dados recentes sugerem que DMT-1 também é um componente deste complexo. Este complexo parece promover a entrada de ferro reduzido para a mitocôndria para participar da síntese de proteínas que contêm este metal, como a hemoglobina (CONRAD; UMBREIT, 2002; LIEU et al, 2001).

O mecanismo pelo qual células da cripta duodenal detectam os estoques de ferro do corpo permanece desconhecido (MILLARD et al, 2004; MORGAN; OATES, 2002; TESTA, 2002). Entretanto, recentes estudos sugerem que uma série de moléculas estão envolvidas neste processo, como o produto do gene mutado na forma mais prevalente de hemocromatose hereditária (HFE), receptor de transferrina 2 (sTfR 2) e a hepcidina. Todas estas moléculas estão expressas no fígado e mutações em seus genes podem resultar em sobrecarga de ferro (MILLARD et al, 2004). A hepcidina é um peptídeo dissulfeto secretado na circulação que parece ter função mensageira entre os estoques de ferro corporal e a absorção de ferro pelos enterócitos (MILLARD et al, 2004; MORGAN; OATES, 2002; TESTA, 2002).

Em indivíduos saudáveis, a concentração de ferro no soro varia de 3 a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e este está predominantemente ligado à molécula de transferrina, com pequena associação a albumina ou espécies de baixo peso molecular (CRICHTON et al, 2002; EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001).

A transferrina é uma proteína de 80 kDa que liga-se reversivelmente a dois íons de ferro férrico e também a dois ânions carbonato (CRICHTON et al, 2002; EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001). A afinidade da transferrina pelo ferro é dependente do

pH, sendo o ferro liberado da transferrina quando o pH é menor que 6,5 (TESTA, 2002). Foi proposto que o HFE influencia a captação de ferro pela transferrina (HERRMANN et al, 2004).

Além da transferrina, a lactoferrina é capaz de ligar-se ao ferro com alta afinidade, porém sua principal função não está relacionada ao transporte deste metal e sim ao seu seqüestro em compartimentos de tecidos peculiares e também parece estar relacionada com a defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas (TESTA, 2002).

O receptor de transferrina é uma glicoproteína composta por 760 aminoácidos dispostos em dois monômeros ligados por duas pontes dissulfeto, formando uma molécula de 190 kDa, que interage com a transferrina, permitindo a entrada de ferro na célula (BEGUIN, 2003; DEMIR et al, 2004; KUVIBIDILA et al, 2004; RICHARDSON, 2004).

Dois diferentes receptores de transferrina foram descritos, o receptor de transferrina 1 (TfR1) e o receptor de transferrina 2 (TfR2). O TfR1 está expresso em praticamente todos os tecidos, com exceção dos eritrócitos maduros e representa a principal via de entrada de ferro na célula. A transferrina liga-se ao TfR1 na superfície da célula e este complexo penetra na célula por endocitose. A diminuição do pH endossomal causa uma mudança conformacional que resulta na liberação do ferro pela transferrina. O DMT1 transfere o ferro para o citoplasma, enquanto que a apotransferrina e o TfR1 são reciclados de volta à superfície celular (Figura 3). O TfR2 está hiper expresso no fígado e suas funções e propriedades, quando ligado à transferrina, não foram ainda totalmente compreendidas. Em modelo animal, foi demonstrado que sua expressão não é afetada quando há excesso de ferro, entretanto ratos com mutações no gene que codifica este receptor desenvolveram um tipo raro de hemocromatose hereditária, chamada HFE 3 (BARISANI; CONTE, 2002).

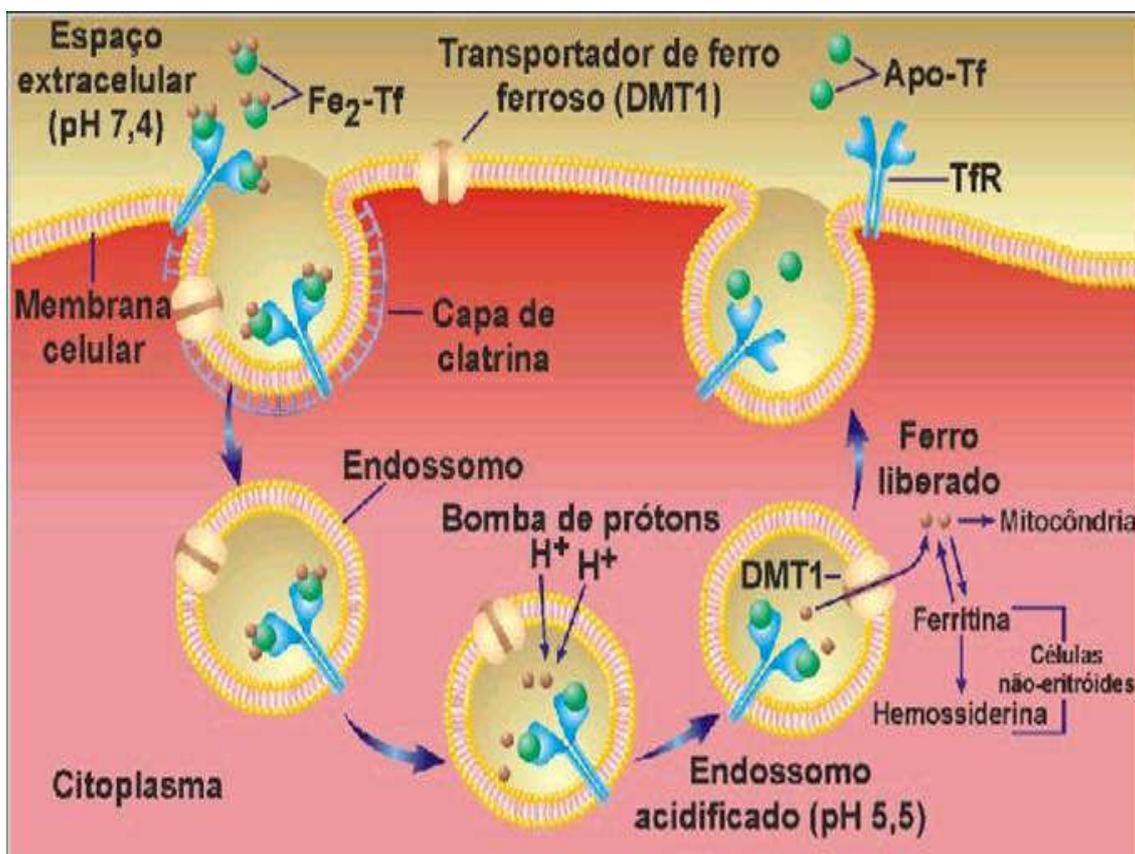


Figura 3. O ciclo da transferrina (ZAGO, 2004).

O TfR é encontrado em uma forma solúvel (sTfR) no soro de animais e humanos e sua concentração correlaciona-se com o conteúdo dos receptores das células. O TfR sérico é a forma truncada do TfR intacto, onde falta os domínios citoplasmáticos e transmembrânicos, sendo identificado como um fragmento monomérico do domínio extracelular, com peso molecular de 85 kDa (COOK; SKIKNE; BAYNES, 1993; SHIH et al., 1990).

Nos últimos anos, os receptores séricos de transferrina foram introduzidos como um meio promissor para diagnosticar deficiência de ferro. Os níveis destes receptores fornecem o indicador mais sensível da depleção do compartimento funcional e são úteis

no diagnóstico diferencial de vários tipos de anemias microcíticas (BAYNES, 1996; COOK; SKIKNE; BAYNES, 1993; FLESLAND et al, 2004).

Como o requerimento de ferro para síntese de hemoglobina é alto, as células eritróides possuem grande densidade de TfR. Espera-se que os níveis de sTfR elevem-se com o aumento da atividade eritropoética. Na deficiência de ferro, o aumento destes níveis é explicado pela maior necessidade de captação de ferro pelos precursores eritróides. Portanto, estes dois fatores regulam a expansão destes receptores e, por conseguinte, seus níveis séricos. O número de TfR tecidual reflete a demanda de ferro celular e aumenta quando o número de células que possui TfR (a maioria em reticulócitos e eritroblastos do tecido eritróide) aumenta ou quando o número de receptores por célula aumenta (R'ZIK; BEGUIN, 2001).

A ferritina é uma proteína com peso molecular de 450 kDa e diâmetro de 12nm, capaz de acomodar até 4500 átomos de ferro, no estado oxidado (LINSENMAYER et al, 2005; MEHLHASE et al, 2005). Esta proteína utiliza mecanismos alternativos para estocar o excesso de ferro e está presente em bactérias, plantas, invertebrados e mamíferos. Sob condições aeróbicas, todas as ferritinas têm a propriedade de interagir com o ferro ferroso e induzir oxidação e agregação deste metal (AROSIO; LEVI, 2002). Em mamíferos, ela é composta por duas cadeias, pesada (H, heavy) e leve (L, light). As cadeias possuem diferentes funções, a unidade H exibe uma atividade ferroxidase e catalisa a primeira etapa no estoque de ferro, isto é, a oxidação do ferro ferroso, enquanto a unidade L parece estar envolvida na formação do núcleo de ferro no interior da ferritina (TESTA, 2002).

Pequenas quantidades de ferritina estão presentes no plasma humano, e esta proteína de circulação é um produto da síntese da ferritina intracelular (CAZZOLA, 2005). A ferritina sérica esta diretamente relacionada com a ferritina intracelular,

refletindo o total de ferro corporal (TROST; BERGFELD; CALOGERAS, 2006; YOU; WANG, 2005).

A síntese de ferritina e a expressão de TfR são reguladas por um sistema que opera através da interação de duas proteínas citoplasmáticas, as proteínas reguladoras de ferro (IRP-1 e IRP-2, iron regulatory protein). Estas proteínas possuem seqüências específicas, os elementos responsivos ao ferro (IRE, iron responsive element). Quando há aumento na concentração de ferro no citosol, diminui a afinidade da IRP pelo IRE, e assim, a síntese de ferritina é estimulada. Na deficiência de ferro, a ligação da IRP ao IRE do RNA-m da ferritina, inibe sua tradução enquanto a ligação ao IRE do RNA-m do TfR, inibe a degradação deste RNA, levando ao aumento da expressão do TfR (Figura 4) (AROSIO; LEVI, 2002; TESTA, 2002).

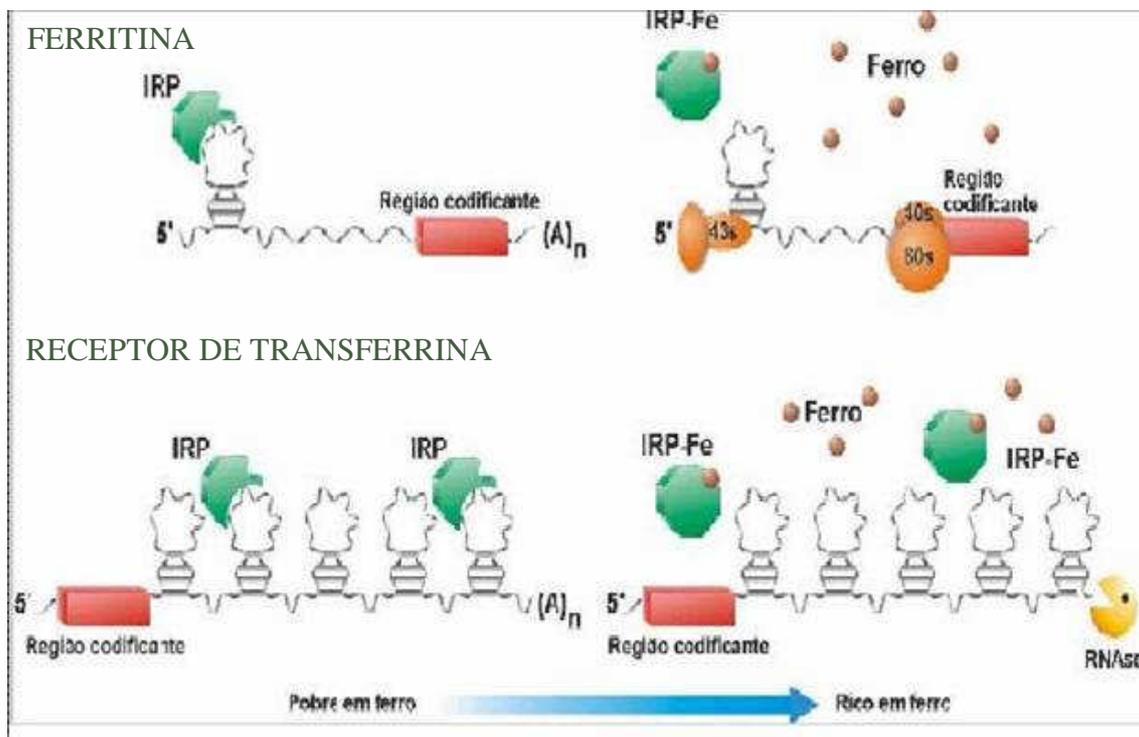


Figura 4. Regulação genética do metabolismo do ferro (adaptado de ZAGO, 2004).

Camundongos jovens, com deficiência constitutiva total de IRP-2 apresentam hematopoese restrita e microcitose, com distribuição de ferro anormal no duodeno, fígado e baço (GALY et al, 2005; COOPERMAN et al, 2005).

## **1.2 Deficiência de Ferro**

Nos últimos anos, as deficiências de micronutrientes tornaram-se um importante problema de saúde pública, comparado às deficiências de macronutrientes (FERRAZ et al, 2005). Uma recente reportagem no Consenso de Copenhagem, sobre prioridades econômicas, entre uma série de propostas, apontou o suprimento populacional de micronutrientes como a segunda principal ordem de necessidade, após o controle da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (DARNTON-HILL, 2005). Essas deficiências têm chamado a atenção das autoridades de saúde e de profissionais do ramo, do mundo todo. Os estudos nacionais e internacionais sobre deficiência de micronutrientes destacam a ocorrência da deficiência de ferro, especialmente em crianças (FERRAZ et al, 2005).

A deficiência de ferro é definida como uma redução de ferro corporal, em alguns tecidos, enquanto os estoques de ferro já estão completamente esgotados. Em estudos epidemiológicos é comum a prática de determinar a prevalência da deficiência de ferro e da anemia por deficiência de ferro (COOK, 2005). Esta deficiência ocorre quando a ingestão do metal não consegue suprir as necessidades corporais. Isto é caracterizado por avaliações bioquímicas anormais, e mais adiante pelo aparecimento de sintomas e sinais físicos da anemia (MÉIER et al, 2003).

Um importante termo que não é sinônimo da deficiência de ferro é a eritropoese deficiente em ferro, que se refere às evidências laboratoriais de falta de ferro plasmático

disponível para a síntese de hemoglobina nos precursores eritróides na medula óssea, com redução na saturação de transferrina e sinais de deficiência de ferro nos eritrócitos circulantes. Embora a eritropoese deficiente em ferro seja a principal manifestação da anemia por deficiência de ferro, ela também pode estar presente em uma grande variedade de desordens clínicas, principalmente associadas à inflamação e ao câncer. Diferentemente da anemia por deficiência de ferro, no qual os estoques de ferro estão totalmente esgotados, a eritropoese deficiente em ferro pode ocorrer com os estoques de ferro normais ou aumentados resultando em fraca liberação de ferro para o plasma a partir do compartimento de reserva (COOK, 2005).

O ferro é o nutriente mais comum na dieta humana. A deficiência de ferro afeta vários processos celulares como mielinização, transporte de oxigênio, transporte de elétrons, fosforilação oxidativa, metabolismo de neurotransmissores, função imune e síntese de DNA (ESEH; ZIMMERBENG, 2005; SRAI et al, 2002; THEIL, 1994). A diminuição no transporte de oxigênio resulta em fadiga, dispnéia, cefaléia, palpitações, taquicardia e dilatação cardíaca (BUTENSKY et al, 2004).

Os humanos conservam o ferro mais eficientemente que outros animais. Um homem adulto perde somente 1mg do metal por dia, enquanto mulheres durante a vida reprodutiva perdem uma quantidade duas vezes maior devido à menstruação e o parto (CONRAD; UMBREIT, 2002; SRAI; BOMFORD; MCARDLE, 2002). A menstruação excessiva e perdas de sangue associadas às doenças gastrintestinais são importantes causas de desenvolvimento de deficiência de ferro. Neste último caso, o ferro perdido não é reabsorvido, resultando em um balanço negativo, o que favorece o desenvolvimento da anemia (GASCHE et al, 2004).

A deficiência de ferro é a desordem nutricional mais comum no mundo (GASCHE et al, 2004; VIEIRA; GALVÃO; FERNANDES, 2000; ZIMMERMANN;

CHAOUKI; HURRELL, 2005) afetando dois em cada três indivíduos, ou seja, mais de 3,5 bilhões de pessoas. A anemia por deficiência de ferro afeta 43% das crianças sendo comum na Ásia e na África (SCHOFIELD; ASHWORTH, 1996; ZIMERMANN; CHAOUKI; HURRELL, 2005), mas esta prevalência também abrange a população de países desenvolvidos. No Japão, por exemplo, 15% dos doadores de sangue são rejeitados por terem esta deficiência e estima-se que 25% das adolescentes possuam carência deste metal. Nos Estados Unidos da América, aproximadamente 75% das mulheres em idade escolar e 90% das grávidas ingerem alimentos com baixo teor de ferro. Aproximadamente 50% das crianças nos países em desenvolvimento possuem esta doença. Na infância, esta síndrome traz conseqüências adversas como diminuição no desenvolvimento físico e comprometimento do desenvolvimento cognitivo (BALTUSSEN; KNAI; SHARAN, 2004; BEARD; CONNOR; JONES, 1993; COOK, 1999, ZIMERMANN; CHAOUKI; HURRELL, 2005).

Uma criança recém nascida possui aproximadamente 250 mg de ferro corporal oriundos do estoque materno, via placenta (CONRAD; UMBREIT, 2002). O balanço de ferro em crianças é mantido por um ajuste entre a quantidade de ferro absorvido, necessária ao crescimento e expansão da massa de eritrócitos, e as perdas pela descamação da pele e do epitélio dos tratos gastrintestinal e geniturinário (ZIMERMANN; CHAOUKI; HURRELL, 2005).

A prevalência da deficiência de ferro varia com a idade, gênero e estágio da vida. Embora a deficiência de ferro seja observada em grande quantidade na população, alguns grupos são de alto risco para esta desordem, como os adolescentes, crianças jovens, grávidas e mulheres após o parto (BALTUSSEN; KNAI; SHARAN, 2004; MEIER et al, 2003; QUEIROZ; TORRES, 2000). Adolescentes, em particular os do sexo feminino, são de alto risco para o desenvolvimento de desordens nutricionais,

incluindo a deficiência de ferro, ocasionadas pela demanda necessária ao crescimento. Além disso, ocorre a menarca e a subsequente menstruação regular, o que pode dificultar a manutenção positiva no balanço férrico (DEEGAN; BATES; McCARGAR, 2005).

A deficiência de ferro tem importante impacto no bem estar dos indivíduos, como também na produção da sociedade. Na gravidez, há aumento do risco para as mães e para os bebês, incluindo baixo peso ao nascer e aumento da mortalidade materna e infantil (GARN et al, 1981; LAZOFF et al, 2000; SCHOLL et al, 1992). Esta síndrome resulta em menor produtividade no trabalho, menor desenvolvimento das crianças e, a anemia moderada pode aumentar a susceptibilidade a doenças infecciosas (COOK, 1999; STOLZFUS, 2001).

Os danos no desenvolvimento mental e motor das crianças têm efeitos no comportamento e mais tarde no desempenho acadêmico durante a fase escolar (LAZOFF, 2000). O menor aproveitamento educacional implica em impacto negativo na fase adulta. A capacidade física de trabalho estará comprometida em todas as idades (HAAS; BROWNLIE, 2001; LAZOFF et al, 2000). Há conseqüências econômicas significantes para o indivíduo, para a família e para o país, particularmente quando as pessoas dependem de tarefa manual (LAZOFF et al, 2000).

A OMS e o UNICEF recomendam a intervenção para prevenir e controlar a deficiência de ferro, seguindo normas multidisciplinares como, aumento no consumo de ferro, controle da infecção e melhoramento do estado nutricional. Há clara evidência da importância da intervenção nutricional para reduzir a morbidade e a mortalidade e o impacto econômico da deficiência de ferro (BALTUSSEN; KNAI; SHARAN, 2004).

O número de estratégias para combater a deficiência de ferro tem aumentado, incluindo modificação alimentar, fortificação alimentar e suplementação oral e

parenteral de ferro. Entre estas estratégias, a suplementação oral de ferro por 2 a 4 meses é considerada a mais efetiva. Apesar disso, a não adesão ao tratamento é o maior problema desta estratégia devido a efeitos gastrintestinais e a dificuldade de sustentar a motivação de consumir o suplemento de ferro por longo período (SIDDIQUI; RAHMAN; JADEEL, 2004).

A deficiência de ferro e a anemia ocorrem por um balanço negativo de ferro no organismo, apesar da aparente simplicidade deste mecanismo, poucos avanços foram feitos com objetivo de reduzir a prevalência da anemia por deficiência de ferro, provavelmente pelo fato do balanço negativo ser resultado final de uma série de fatores culturais e bio - socioeconômicos, na infância. Dados regionais mostram um aumento substancial na prevalência de anemia no Brasil, observados entre homens e mulheres de todas as idades, grupos e níveis socioeconômicos da população (ALMEIDA et al, 2004).

### **1.3 Deficiência de Ferro e Sistema Imune**

A má nutrição primária causada por ingestão inadequada de micronutrientes pode provocar deficiência no sistema imune e infecções em crianças. É necessário o desenvolvimento de um sistema imune normal, principalmente em períodos críticos de gestação, maturação neonatal e durante a fase de desmame. Infecções seguidas, freqüentemente se tornam crônicas em crianças desnutridas. A interação de baixa nutrição e infecções promove uma fraca resposta imune conduzindo a alterações nas populações de células imunes e provocando aumento nos mediadores inflamatórios. Deficiências de micronutrientes afetam a resposta imune adaptativa, celular e inata (CUNNINGHAM-RUNDLES; McNEELEY; MOON, 2005).

O ferro tem uma relevância particular na função neural e imune. Estudos em animais revelam que ratos com baixo suprimento de ferro, desenvolvem alterações de funções cerebrais irreversíveis. Em animais adultos e humanos, a deficiência de ferro afeta a resposta imune de várias maneiras. Os macrófagos exibem atividade bactericida reduzida e os neutrófilos redução na atividade da enzima mieloperoxidase. Esta enzima produz vários intermediários reativos do oxigênio responsáveis pela morte intracelular de patógenos (ARREDONDO; NUÑES, 2005; EKIZ et al, 2005).

O ferro, além de ser essencial para a eritropoese, é também um componente ativo de muitas enzimas relevantes para o crescimento e função de outros compartimentos celulares, como as células imunes. O ferro está envolvido em mecanismos imunes efetores de neutrófilos e macrófagos pela formação de radicais tóxicos de hidroxila. A restrição de ferro parece afetar a proliferação e diferenciação de linfócitos B e Th1, enquanto que o excesso de ferro pode levar a disfunção de células NK (*natural killer*), diminuição da citotoxicidade de neutrófilos e mudança na proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> em relação aos linfócitos CD8<sup>+</sup> (GASCHE et al, 2004).

O ferro é vital a todas as células, particularmente para a ativação metabólica e proliferação celular, tendo importância fundamental para os timócitos, na ativação de células T (BOWLUS, 2003). A deficiência de ferro resulta em diminuição do número de linfócitos T, na blastogênese destas células e mitogênese em resposta a mitógenos (ARREDONDO; NUÑES, 2005; EKIZ, 2005; SAWITSKY; KARTER; SAWITSKY A., 1976; SOYANO; CANDELLET; LAYRISSE, 1982).

O complexo receptor de células T-CD3 tem um papel central na resposta imune mediada pelas células T, estando envolvido no reconhecimento de antígenos e subsequente transdução e ativação de linfócitos imunocompetentes. Por esta razão, as moléculas CD3 e o receptor de células T (TCR), que estão na superfície estrutural dos

linfócitos, têm sido extensivamente estudados (YANG; PARKHOUSE; WILEMAN, 2005).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são subtipos de linfócitos T bem caracterizados. Estas células atuam na maturação dos linfócitos T (TROBRIDGE; FORBUSH; LEVIN, 2001), além de estabilizar a interação do TCR com o complexo peptídeo-MHC II e agem na sinalização intracelular das células T (LYNCH et al, 2006).

O antígeno de superfície CD8 está envolvido na transdução de sinal e no processo de adesão de um subtipo de células T, além de atuar no desenvolvimento destas células, expressando TCR restrito a MHC de classe I (KERN et al, 1999).

Alguns autores têm demonstrado alterações nas subpopulações linfocitárias na deficiência de ferro. Segundo Santos e Falcão (1990), adultos com deficiência de ferro têm significativa redução no número de células T *helper* (CD4<sup>+</sup>) em sangue periférico, e alcançam valores normais após a reposição de ferro. Evidências *in vitro* indicam que células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) e as células CD4<sup>+</sup> são os linfócitos mais sensíveis à carência de ferro (KEMP, 1993). Entretanto, Ekiz e colaboradores (2005), em um estudo realizado com crianças de 0,5 a 2 anos com anemia por deficiência de ferro, apontaram que não houve alteração na distribuição dos subgrupos de linfócitos T, aumentando a polêmica sobre o tema.

A deficiência de ferro diminui as funções de macrófagos, neutrófilos e linfócitos e conseqüentemente aumenta a susceptibilidade a infecções. Essa deficiência suprime a resposta imune de modo a aumentar o risco de morbidade em infecções bacterianas, virais e parasitárias. A melhoria no estado de ferro, com ingesta adequada restabelece a imunocompetência (BODNAR; COGSWELL; McDONALD, 2005).

Embora o ferro seja necessário para uma resposta imune efetiva, se o ferro disponível estiver em maior quantidade que a requerida pelo hospedeiro, os

microorganismos invasores podem usar o ferro para crescimento, exacerbando a infecção (BODNAR; COGSWELL; McDONALD, 2005).

A suplementação de ferro pode adversamente afetar indivíduos em fase aguda da infecção, injúria ou estresse. O mesmo ocorre em indivíduos portadores de genes predispostos a sobrecarga de ferro (CUNNINGHAM-RUNDLES; McNEELEY; MOON, 2005).

Acredita-se que a proliferação das células T depende da interação entre o ferro ligado a transferrina com o receptor de transferrina, na superfície celular (CHAUDHRI et al, 1986). Em humanos, o receptor de transferrina pode ser encontrado em duas formas: presente na superfície celular, que pode ser detectado por citometria de fluxo, usando um anticorpo monoclonal contra CD71; e circulante no soro, que pode ser determinado por imunoenaios.

Dois estudos relacionam a expressão e o número de TfR (CD71<sup>+</sup>) em linfócitos de indivíduos com deficiência de ferro. Pattanapanyasat (1990) constatou que, em portadores de anemia por deficiência de ferro branda, o número de TfR (CD71<sup>+</sup>) em linfócitos do sangue periférico estava normal, enquanto o estudo de Kinik, Tuncer e Altay (1999) indicou que, em uma severa deficiência de ferro, o número de TfR (CD71<sup>+</sup>) em linfócitos do sangue periférico apresentava-se significativamente baixo.

De acordo com Kinik, Tuncer e Altay (1999), na anemia por deficiência de ferro, enquanto as células eritróides apresentam um aumento na expressão e no número de TfR (CD71<sup>+</sup>), os linfócitos do sangue periférico apresentam uma diminuição na expressão e no número de TfR (CD71<sup>+</sup>) e esta redução pode, em parte, explicar a deterioração da imunidade celular relatada em portadores de anemia por deficiência de ferro.

A quantificação de células não eritróides que expressam o marcador CD71<sup>+</sup> em sangue periférico antes e após o tratamento da deficiência de ferro pode fornecer informações valiosas sobre os efeitos *in vivo* desta deficiência (KINIK; TUNCER; ALTAY, 1999).

Nos últimos anos, surgiram na literatura alguns estudos com resultados controversos sobre a função imune na deficiência de ferro. As dificuldades em realizar estudos controlados com humanos, especialmente crianças, apontam para a necessidade de utilizar modelos experimentais nestas investigações.

Vários pesquisadores utilizam camundongos como modelo experimental de deficiência de ferro para estudos sobre o metabolismo de ferro e efeitos no sistema imune, como exemplo citamos Nancy Andrews (1997), Barry Blakley (1994a , 1994b, 1994c) e Solo Kuvibidila (2003a, 2003b, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Estabelecer um modelo experimental de indução e recuperação de deficiência de ferro em camundongos;
- Avaliar as sub-populações de linfócitos T, a saber, linfócitos CD4 e CD8, no sangue periférico e em suspensão de células do baço bem como verificar a expressão de receptores de transferrina (CD71) nestas populações visando identificar alterações da função imune provocadas pela deficiência de ferro.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAL**

#### **3.1.1 Animais**

Foram utilizados 60 fêmeas jovens de camundongos da linhagem C57BL/6, com peso inicial variando entre 6 e 12 gramas, provenientes do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, divididos em 2 grupos. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno medindo 50 X 35 X 15 cm. As caixas foram mantidas em salas com temperatura ambiente constante (22 e 24°C), controlada por meio de aparelho de ar condicionado, em ciclo controlado de 12 horas de claro e escuro. Água e comida foram fornecidas durante todo experimento. Os animais tiveram ração disponível 24 horas por dia. Dois tipos de rações foram utilizados. As rações tinham a mesma constituição em relação aos componentes proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, a diferença entre elas era unicamente a quantidade de ferro, na forma de sulfato ferroso. As rações foram preparadas sob encomenda pela RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA (São Paulo, Brasil). Todos os procedimentos com os animais estavam de acordo com as normas éticas da Associação Internacional para Estudos da Dor (Zimmermann, M., 1983). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com animais do Campus da USP - Ribeirão Preto e aprovado em 22/11/2004 (Anexo I).

#### **3.1.2 Coleta de Material**

Os camundongos foram anestesiados com éter etílico por um período de 30 a 60 segundos. Amostras de sangue venoso (100 µL) foram obtidas por punção do plexo retro orbital ou por punção cardíaca. O baço, fígado e o timo foram removidos cirurgicamente e pesados. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Grupo de Estudo

Cinquenta e sete camundongos foram pesados e divididos em 2 grupos: controle (C; n = 19) e deficiente em ferro (DF; n = 38).

O grupo controle recebeu ração contendo 50 mg (0,9 mmol) de ferro/ kg de ração, enquanto o grupo DF recebeu ração com baixo teor de ferro (2,6 mg ou 0,05 mmol de ferro/ kg de ração). Após anestesia, todos os animais foram submetidos à coleta de 100 µL de sangue do plexo retro orbital para a determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina pelos métodos de cianometahemoglobina e microhematócrito, respectivamente. Esse procedimento foi realizado quinzenalmente. Os animais do grupo DF sofreram adicionalmente uma sangria de 200µL para auxiliar na indução da deficiência de ferro.

Foram estipulados períodos de quatro e oito semanas para análise do estado férrico e da imunofenotipagem, uma vez que essas são as fases de crescimento acelerado dos animais.

O grupo DF foi subdividido em quatro subgrupos. Dezoito camundongos (DF) foram examinados, quatro (n=9) e oito semanas (n=9) após o início da ingestão de ração pobre em ferro. Os vinte camundongos restantes iniciaram um protocolo de reposição de ferro (R) passando a receber a ração que contém 50 mg de ferro/ kg de ração. Destes, dez camundongos foram examinados após quatro dias de ingestão desta dieta (R4) e os outros dez após 10 dias (R10). Nos quatro tempos foram coletados 600 µL sangue de cada animal, por punção cardíaca. O baço, fígado e timo foram removidos cirurgicamente e pesados.

### **3.2.2 Avaliação do estoque hepático de ferro:**

Os fígados foram pesados e sofreram processo de digestão de matéria orgânica em presença de  $H_2SO_4$  concentrado e  $H_2O_2$ , sob chama. O digesto foi diluído para volume de 10mL com solução de HCl 2% para posterior determinação do teor de ferro por espectrometria de absorção atômica em Espectro Shimadzu, modelo AA680. Estas análises foram realizadas pelo técnico Valdir Roberto Balbo, no Laboratório de Métodos Analíticos da Faculdade de Filosofia e Letras de Ribeirão Preto-USP, laboratório este sob responsabilidade do Prof. Dr. Jose Fernando de Andrade.

### **3.2.3 Preparo da suspensão de células do baço**

Após a remoção do baço, foi preparada uma suspensão de células utilizando PBS suplementado com soro bovino fetal 10%. As células foram lavadas com este meio e centrifugadas a 400 g, em 4°C, por 10 minutos. O botão de células foi ressuspenso em 2 mL de PBS . O número total de células foi determinado no contador automático HORIBA ABX 45. As amostras foram centrifugadas e o botão de células ressuspenso em PBS. A suspensão celular foi dividida equitativamente em três tubos assim marcados: CD3/CD4/CD71, CD3/CD8/CD71 e isotipos controles. Após, foram adicionados os respectivos anticorpos, e os tubos ficaram incubados no escuro e em temperatura ambiente, por 30 minutos. Foram adicionados 2 mL de cloreto de amônio 0,83% em cada tubo para lisar os eritrócitos. As células foram novamente lavadas, inicialmente com PBS – Azida 0,01% acrescido de 2% SBF e a segunda lavagem com PBS. Após ser desprezado o sobrenadante, o botão celular foi ressuspenso em 2 mL de PBS-formaldeído 1% para realização da citometria de fluxo.

### 3.2.4 Citometria de fluxo

Foram analisados os linfócitos presentes no sangue periférico e na suspensão de células do baço dos animais dos grupos controle e DF. Foi realizada tripla marcação para estudo das subpopulações de linfócitos T e da expressão do CD71 nestas populações.

A viabilidade celular foi testada no citômetro FACScanto (Becton, Dickinson and Company; San Jose, CA, USA), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, com 100 µL da solução de células/PBS, 300 µL de PBS puro e 50 µL de iodeto de propídio.

Os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD71 (BD Biosciences Pharmingen, USA) estavam marcados com os seguintes fluorocromos: FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) para CD3, PE (*Phycoerythrin*) para CD71 e PerCP (*Peridinin chlorophyll protein*, também nomeado *TriColour*, *Cychrome*, PE-Cy5) para CD4 e CD8.

Três tubos-testes de poliestireno (Becton, Dickinson and Company; San Jose, CA, USA) específicos para análise no citômetro de fluxo foram identificados com o número da amostra e com as determinações imunofenotípicas para cada amostra analisada. As determinações imunofenotípicas incluíram:

\* CD3-FITC /CD4-PerCP /CD71-PE

\* CD3-FITC /CD8-PerCP /CD71-PE

O terceiro tubo foi utilizado para isotipos controles (BD Biosciences Pharmingen) dos tipos IgG1 (FITC), IgG1 (PE) e IgG2 (PerCP). As contagens médias de leucócitos em amostras de sangue periférico e baço foram  $4.10^5$  e  $2.10^7$  células, respectivamente. Portanto, nos tubos identificados com amostras de sangue periférico,

foram colocados 2  $\mu\text{L}$  de cada anticorpo ou isotipos controles com aproximadamente  $1.10^5$  células. Nos tubos identificados com amostras do baço, foram incubados 2  $\mu\text{L}$  de cada anticorpo ou isotipos controles com aproximadamente  $6.10^6$  células.

Os resultados foram fornecidos na forma de *dot-plot*, no qual foi verificado o percentual da população celular com reação positiva para as células CD3, CD4, CD8, CD4/CD71 e CD8/CD71.

### **3.2.5 Análise Estatística:**

Utilizaram-se técnicas não paramétricas para a análise das variáveis do estudo. A comparação dos grupos 4C e 4 DF foi realizada pelo teste Mann-Whitney, enquanto que a comparação entre os grupos DF, C, R1 e R2 foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunns para comparação entre estes grupos.

Os dados foram processados utilizando-se o programa GraphPad InStat®, versão 3.01, 1998 (GraphPad Software Inc.).

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Período de indução da deficiência de ferro

A cada duas semanas, os todos os animais foram submetidos a coletas de sangue para determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina. Estes dados não estão demonstrados, pois estas avaliações serviram apenas para acompanhar o estado de saúde dos animais. O teor de ferro na ração deficiente em ferro foi determinado através de análise por espectrometria de absorção atômica, em triplicata, e foi igual a 2,6 mg ou 0,05 mmol de ferro/ kg de ração.

#### 4.2 Indicadores do estado férrico, peso corporal, baço e timo.

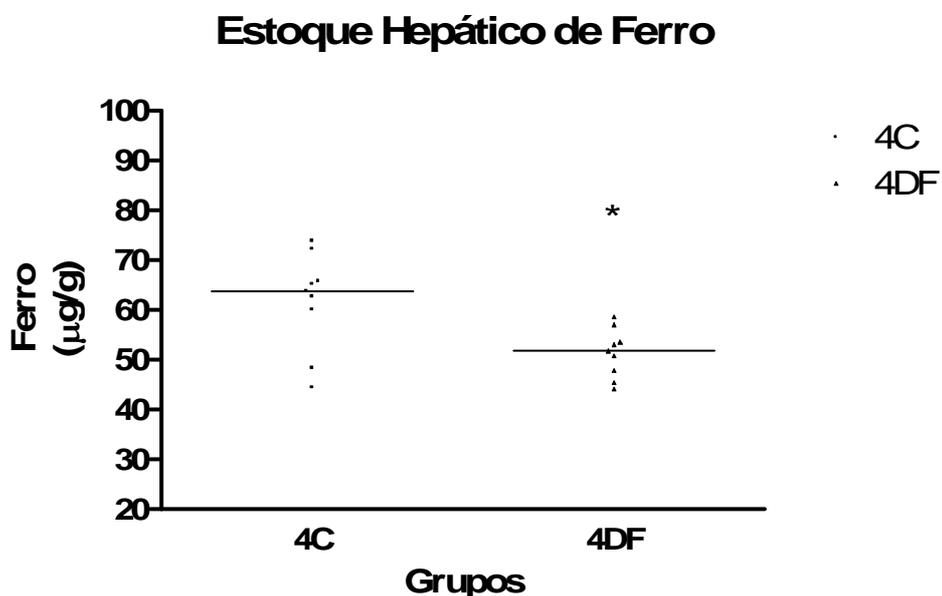
Os valores do hematócrito, concentração de hemoglobina e peso corporal dos animais do grupo deficiente em ferro quatro semanas (4DF) não diferiram dos valores obtidos para os animais do grupo controle de quatro semanas (4C). Os estoques hepáticos de ferro dos animais do grupo 4DF foram significativamente menores quando comparados aos dos animais do grupo 4C (Figura 1;  $p < 0,05$ ).

Os animais de ambos os grupos, 4C e 4 DF, tiveram o mesmo peso relativo dos baços e timos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Indicadores do estado férrico, peso corporal e de vários órgãos do grupo controle de quatro semanas (4C) e de deficiente em ferro quatro semanas (4DF).

	4C	4DF
Hemoglobina (g/dL)	12,8	12,5
Hematócrito (%)	43	43
Estoque de Ferro ( $\mu\text{g/g}$ )	63,79 <sup>a</sup>	51,77 <sup>b</sup>
Peso Corporal (g)	16	16
Baço (mg/g peso corporal)	4,41	4,16
Timo (mg/g peso corporal)	3,59	3,79

<sup>a,b</sup> Mediana dos valores, que foram significativamente diferentes ( $a > b$ ).



**Figura 1.** Estoque hepático de ferro dos animais dos grupos 4C e 4 DF (\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney).

Os animais do grupo deficiente em ferro oito semanas (8DF) tiveram valores de hematócrito e concentração de hemoglobina menores que os animais do grupo controle de oito semanas (8C), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 2).

Os animais do grupo de dez dias de reposição (R2) apresentaram valores de hematócrito significativamente maiores que os animais dos grupos 8DF ( $p < 0,01$ ), 8C ( $p < 0,05$ ) e de 4 dias de reposição (R1) ( $p < 0,01$ ). A concentração de hemoglobina dos animais do grupo R2 também foi estatisticamente maior que a dos animais do grupo R1 ( $p < 0,01$ ), 8C ( $p < 0,01$ ) e 8DF ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

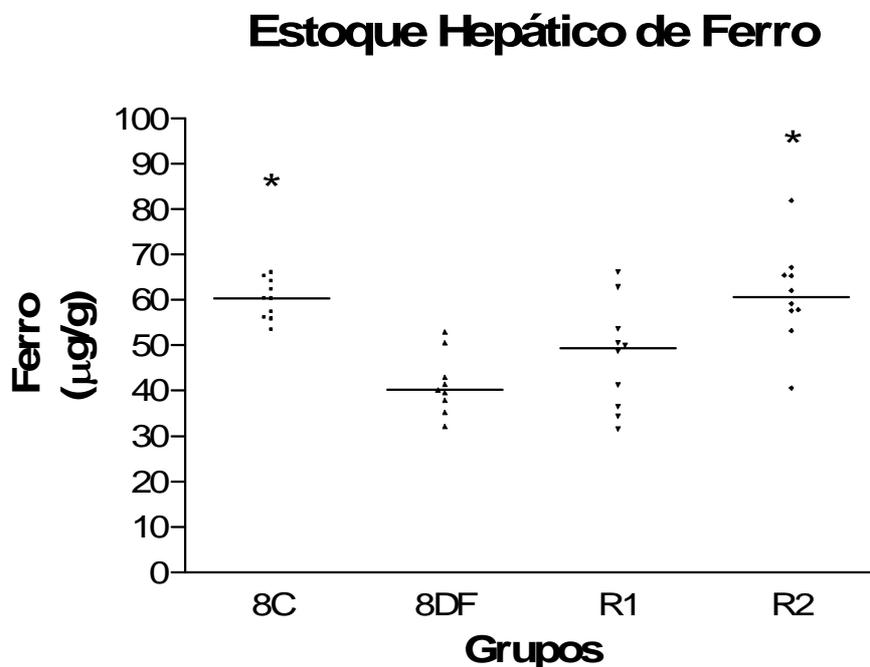
Os estoques hepáticos de ferro dos animais do grupo 8DF foram significativamente menores que os dos animais do grupo 8C ( $p < 0,01$ ). A reposição de ferro por 10 dias corrigiu a deficiência de ferro (Tabela 2, Figura 2).

O peso corporal dos animais dos grupos 8DF e R1 foi estatisticamente menor que o dos animais do grupo R2 ( $p < 0,05$ ). O baço dos animais do grupo R1 foi estatisticamente maior que dos animais dos grupos 8DF ( $P < 0,01$ ) e 8C ( $P < 0,05$ ). O timo dos animais do grupo DF foi menor que dos animais dos grupos 8C, R1 e R2, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 2).

**Tabela 2.** Indicadores do estado férrico, peso corporal e de vários órgãos do grupo controle de oito semanas (8C), deficiente em ferro oito semanas (8DF), deficiente em ferro com reposição de 4 dias (R1) e 10 dias (R2).

	8C	8DF	R1	R2
Hemoglobina (g/dL)	12,35 <sup>b</sup>	12,3 <sup>b</sup>	12,45 <sup>b</sup>	13,4 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	40,5 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	41 <sup>b</sup>	45 <sup>a</sup>
Peso Corporal (g)	18	18 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	19 <sup>a</sup>
Estoque de Ferro ( $\mu\text{g/g}$ )	60,26 <sup>a</sup>	40,22 <sup>b</sup>	49,37	60,64 <sup>a</sup>
Baço (mg/g peso corporal)	3,72 <sup>b</sup>	3,54 <sup>b</sup>	5,75 <sup>a</sup>	4,07
Timo (mg/g peso corporal)	2,96	2,29	3,27	3,08

<sup>a,b</sup> Mediana dos valores, que foram significativamente diferentes ( $a > b$ ).



**Figura 2.** Estoque hepático de ferro dos animais que receberam por oito semanas a ração controle (8C) e deficiente em ferro (8DF) e que foram suplementados com a ração rica em ferro por 4 (R1) e 10 (R2) dias após estarem com deficiência de ferro (\*  $p < 0,01$ , kruskal-wallis).

### 4.3 Porcentagem de células T CD4 e CD8

A análise fenotípica, por citometria de fluxo, de linfócitos do sangue periférico e da suspensão de células do baço, revelou que os animais dos grupos 4DF e 4C não tiveram diferenças significantes quanto a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Tabela 3).

**Tabela 3.** Porcentagem de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em animais dos grupos 4C e 4DF.

	Sangue Periférico			Baço		
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
4C	56	42	1,33	57	37	1,58
4DF	59	38	1,60	60	38	1,58

Resultados expressos em mediana.

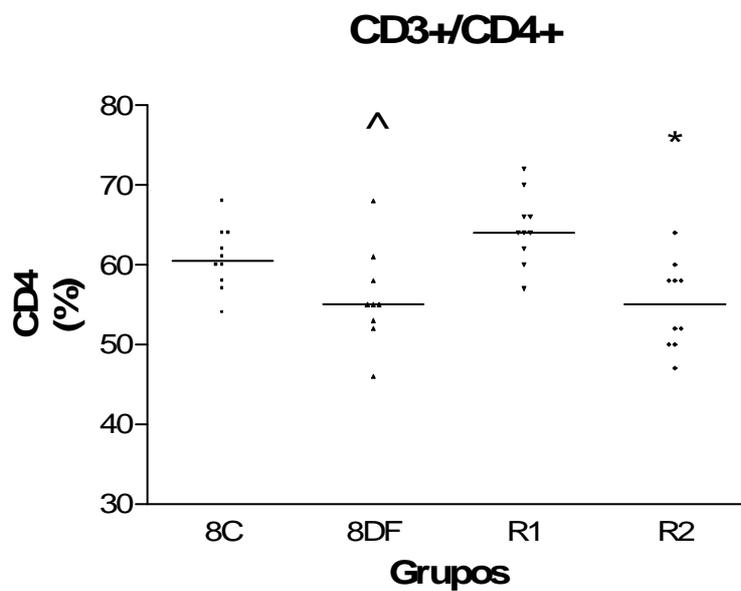
A análise fenotípica, por citometria de fluxo, da suspensão de células do baço dos animais dos grupos 8C, 8DF, R1 e R2 revelou que não houve diferença estatisticamente significativa quanto a porcentagem de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, porém estes grupos tiveram diferenças significantes quando as subpopulações de linfócitos foram analisadas nas amostras de sangue periférico (Tabela 4).

Os animais do grupo R1 tiveram porcentagem de células CD4<sup>+</sup> estatisticamente maior que os animais dos grupos DF ( $p < 0,01$ ) e R2 ( $p < 0,05$ ) (Figura 3) enquanto que a porcentagem de células CD8<sup>+</sup> foi significativamente menor que a dos animais dos grupos 8C ( $p < 0,05$ ), 8DF e R2 ( $p < 0,01$ ) (Figura 4).

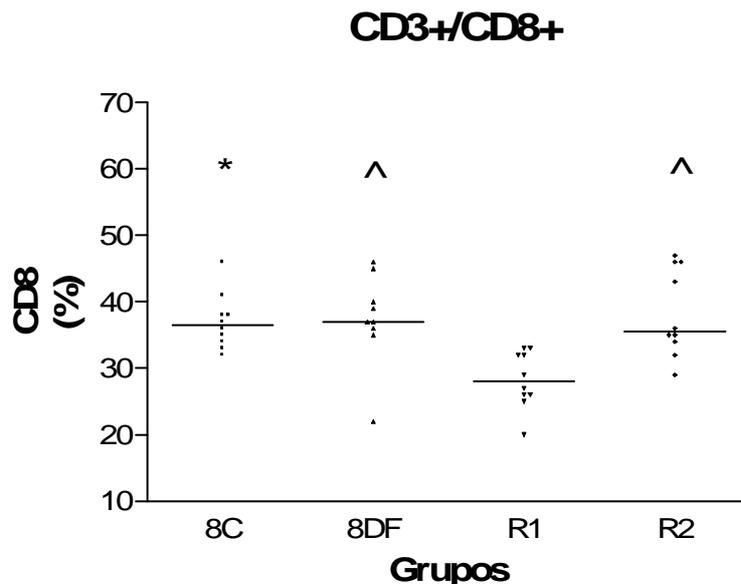
**Tabela 4.** Porcentagem de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em animais dos grupos 8C, 8DF, R1 e R2.

	Sangue Periférico			Baço		
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
8C	60,5	36,5 <sup>a</sup>	1,64 <sup>b</sup>	55	40,5	1,34
8DF	55 <sup>b</sup>	37 <sup>a</sup>	1,52	55	40	1,35
R1	64 <sup>a</sup>	28 <sup>b</sup>	2,28 <sup>a</sup>	57,5	38,5	1,47
R2	55 <sup>b</sup>	35,5 <sup>a</sup>	1,54 <sup>b</sup>	55	39,5	1,39

<sup>a,b</sup> Mediana dos valores, que foram significativamente diferentes (a>b).



**Figura 3.** Porcentagem de células CD4<sup>+</sup> do sangue periférico dos animais dos grupos 8C, 8DF, R1 e R2 (\* p< 0,05, ^ p< 0,01; kruskal-wallis).



**Figura 4.** Porcentagem de células CD8<sup>+</sup> do sangue periférico dos animais dos grupos 8C, 8DF, R1 e R2 (\* p< 0,05, ^ p< 0,01; kruskal-wallis).

#### 4.4 Expressão do receptor de transferrina (CD71<sup>+</sup>) em células T CD4 e CD8 dos animais dos grupos 8C, 8DF e R1.

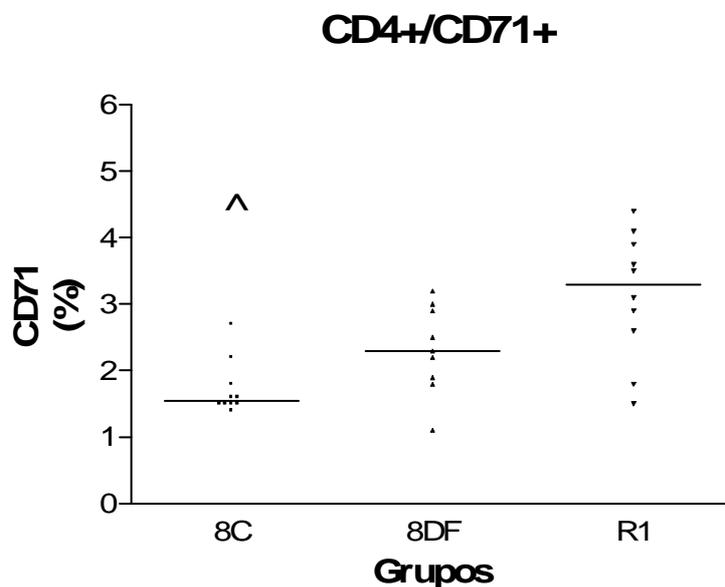
A análise fenotípica, por citometria de fluxo, das células do baço, mostrou que os animais do grupo R1 apresentaram maior porcentagem de células CD4 que expressam CD 71 quando comparados aos animais do grupo C, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Figura 5; p< 0,01), porém quando feita a análise na população CD8<sup>+</sup>, ficou evidente que a deficiência de ferro aumentou a porcentagem de células CD8 que expressam CD 71 em relação aos animais que receberam a ração controle (p< 0,001). A reposição de ferro por 4 dias diminuiu mas não corrigiu essa porcentagem (Figura 6; p< 0,01).

Quando analisadas as amostras de sangue periférico, os animais deficientes em ferro apresentaram maior porcentagem de células CD4 e CD8<sup>+</sup> que expressam CD 71 quando comparados aos animais que receberam a ração controle, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 5).

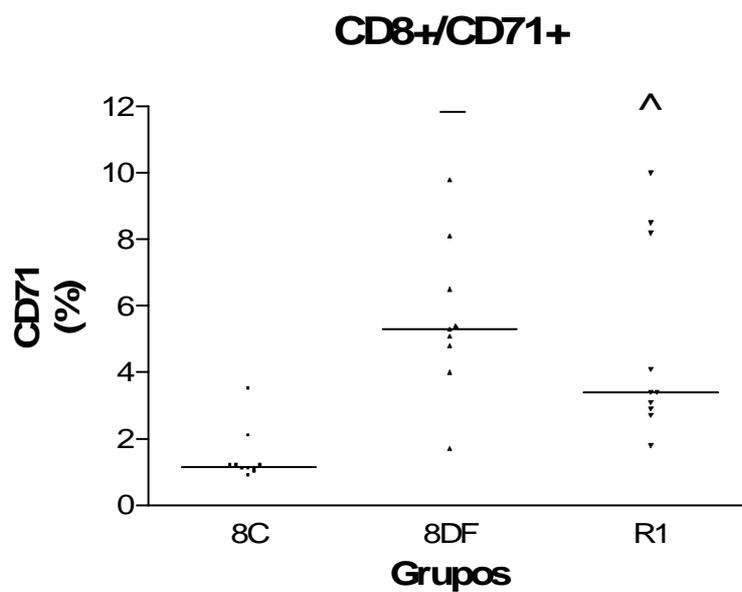
**Tabela 5.** Porcentagem de células CD4 e CD8 que expressam CD 71 nas amostras de sangue periférico e baço dos animais dos grupos 8C, 8DF e R1.

	Sangue periférico		Baço	
	CD4 <sup>+</sup> /CD71 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> /CD71 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD71 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> /CD71 <sup>+</sup>
8C	4,75	7,25	1,55 <sup>b</sup>	1,15 <sup>b</sup>
8DF	7,50	12,20	2,23 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>
R1	2,05	7,1	3,30	3,40 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Mediana dos valores, que foram significativamente diferentes (a>b).



**Figura 5.** Porcentagem de células CD4 que expressam CD 71 nas amostras de baço dos animais dos grupos 8C, 8DF e R1 (^ p< 0,01; kruskal-wallis).



**Figura 6.** Porcentagem de células CD8 que expressam CD 71 nas amostras de baço dos animais dos grupos 8C, 8DF e R1 (^  $p < 0,01$ , -  $p < 0,001$ ; kruskal-wallis).

## **5. DISCUSSÃO**

Desnutrição e infecção são dois dos maiores obstáculos à saúde, desenvolvimento e sobrevivência mundial e, a pobreza e a ignorância são os fatores contribuintes de maior significância (CHANDRA, 1991, 1996, 2002).

A deficiência de ferro é a desordem nutricional mais comum no mundo e esta associada com alterações em muitas funções imunológicas, principalmente na imunidade celular (BOWLUS, 2003). Há vários mecanismos relacionados aos efeitos da deficiência de ferro no sistema imune. Em animais adultos e humanos, com sistema imune intacto, a imunidade não específica pode ser afetada pela deficiência de ferro de várias maneiras. A atividade bactericida de macrófagos está diminuída e os neutrófilos apresentam atividade reduzida da enzima mieloperoxidase (EKIZ et al, 2005). Há diminuição na blastogênese e no número de linfócitos T em resposta a diferentes mitógenos (BEARD, 2001), o que pode comprometer a imunidade mediada por células. Por outro lado, há relatos de proliferação normal de linfócitos em resposta a mitógenos (CANONE-HERGAUX, 1999). Os dados conflitantes justificam mais pesquisas nesta área.

Poucas informações estão disponíveis sobre os efeitos provocados no sistema imune por diferentes níveis de deficiência de ferro e se essas alterações podem estar presentes antes da diminuição da concentração de hemoglobina (OPPENHEIMER, 2001).

A realização de pesquisas com humanos é prejudicada pela baixa adesão e pela dificuldade de formar grupos com idades pareadas, especialmente em crianças, pois elas são recrutadas em escolas e/ou creches, onde a ocorrência de patologias que afetam o sistema imune é comum e elas são facilmente disseminadas para todo o grupo. Estas observações nos levaram a estabelecer um modelo experimental de indução de deficiência de ferro. Os modelos animais ainda apresentam uma grande vantagem em

comparação com os estudos em humanos, que é a possibilidade de estudar os linfócitos de diferentes órgãos, como baço, timo e linfonodos.

Dentre as dificuldades enfrentadas para o desenvolvimento do trabalho, podemos destacar o período de indução da deficiência de ferro.

O nosso objetivo inicial era estabelecer o período necessário para indução através de um estudo piloto onde os camundongos seriam acompanhados até que o grupo que recebia a ração deficiente de ferro tivesse redução na concentração de hemoglobina, comparando-se aos animais que recebiam a ração controle. Foram realizados dois estudos pilotos, cujos resultados não foram satisfatórios.

No primeiro estudo, os animais obtidos junto ao biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto tinham peso corporal inicial médio de 17g, o que caracterizava que o período de crescimento acelerado do animal já havia passado o que dificultou a indução da deficiência de ferro. As caixas de polipropileno utilizadas para armazenamento dos animais tinham tampas de alumínio e a água fornecida aos animais era destilada o que pode ter servido como fonte de ferro para os camundongos.

No segundo estudo piloto, foram tomadas todas as precauções sendo eliminado os interferentes que havíamos identificado como impedimentos para a indução da deficiência de ferro. Os animais obtidos junto ao Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto tinham peso inicial médio de 8 g, necessitando de maior quantidade de ferro para o crescimento físico. As tampas utilizadas nas caixas de armazenamento dos animais foram substituídas por tampas de aço inoxidável e a água fornecida aos animais foi deionizada e autoclavada. Mesmo com todos esses cuidados não foi possível verificar a redução da concentração de hemoglobina nos animais, o que nos levou a inferir que poderíamos também ter problema com o teor de ferro na ração fabricada sob encomenda.

Foi feito contato com a Dra Solo Kuvibidila, pesquisadora da *Louisiana State University Health Sciences Center* (New Orleans, USA) que tem vários trabalhos nesta área, que nos sugeriu duas alterações no protocolo. Uma das sugestões foi trabalhar com ração com teor de ferro inferior a 0,09 mmol / kg de ração. Outra sugestão foi realizar uma sangria de cerca de 200 µl nos animais antes de iniciar o fornecimento da ração pobre em ferro, procedimento que foi incorporado ao protocolo do grupo DF.

Novo lote de ração foi solicitado ao fabricante (RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA) e o teor de ferro na ração deficiente, constatado através de análise por espectrometria de absorção atômica, foi de 2,6 mg ou 0,05 mmol de ferro/ kg de ração.

Um novo estudo piloto foi realizado, utilizando o novo lote de ração, e ainda assim não foi possível observar redução da concentração de hemoglobina dos animais que receberam ração pobre em ferro. Então, decidimos alterar nosso protocolo, utilizando o modelo estabelecido por Omara e Blakley, *pesquisadores da University of Saskatchewan* (Saskatoon, CANADA). Submetemos os animais a ingesta de ração em períodos de 4 e 8 semanas, períodos que correspondem ao crescimento acelerado dos camundongos e elegemos o estoque hepático de ferro como parâmetro para avaliar a deficiência de ferro .

### **5.1 Indicadores do estado férrico, peso corporal, baço e timo**

Os animais dos grupos deficientes em ferro apresentaram depleção significativa nos estoques hepáticos de ferro e, como esperado, a concentração de hemoglobina e o valor do hematócrito não foram diferentes dos valores encontrados nos grupos controles. O peso corporal e do baço dos animais que receberam a ração deficiente em ferro também não mostraram diferenças quando comparados aos animais que receberam

a ração controle (Tabela 2). Estes achados foram semelhantes aos encontrados por Omara e Blakley (1994a, 1994b).

Kuvibidila et al (1990, 2001, 2003a) relataram atrofia no timo de animais com severa deficiência de ferro. Em nossos estudos, os animais deficientes em ferro tiveram redução no peso dos timos quando comparados aos animais do grupo controle, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. Como podemos observar na Tabela 2, os animais sofreram uma deficiência de ferro moderada e, portanto a atrofia do timo foi proporcional ao grau desta deficiência. Estes resultados indicam que o modelo experimental foi adequado para nossos objetivos..

## **5.2 Porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>**

Propusemo-nos a trabalhar com as subpopulações de linfócitos T, já que a literatura concernente ao assunto enfatiza alterações em linfócitos CD3<sup>+</sup>. A maioria dos estudos sugere que a deficiência de ferro afeta a imunidade celular e as funções mediadas pelas células T, não comprometendo significativamente a imunidade humoral (AHLUWALIA et al, 2004, BAGCHI; MOHANRAM; REDDY, 1980; FARTHING, 1989).

As análises fenotípicas foram realizadas utilizando sangue total, pois, em camundongos, só é possível a obtenção de pequenos volumes de sangue. Segundo Ahluwalia e colaboradores (2004), os ensaios com sangue total têm como vantagens a simplicidade da preparação e o fato de refletir melhor a situação *in vivo*.

Em nosso estudo, os animais deficientes em ferro não apresentaram diferenças significantes na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando comparados aos animais do grupo controle, tanto na análise do sangue periférico como nas células do baço.

Nossos resultados estão de acordo com Ekiz et al (2005) que verificaram que a deficiência de ferro não afetava o número de linfócitos T e a distribuição dos seus subgrupos, sugerindo que a disfunção reportada nas células T pode ser devida a defeitos funcionais e não quantitativos.

Soyano et al (1982) reportaram que a deficiência de ferro provocava diminuição no número de linfócitos circulantes e na sua blastogênese quando estimulado por mitógenos. De acordo com Savino (2002), a redução no número de linfócitos T parece ser secundária à atrofia do timo. Estudos em camundongos, onde não há risco de outras deficiências nutricionais, confirmam que a deficiência de ferro provoca atrofia do timo (KUVIBIDILA et al, 1990, 2001). Kuvibidila et al (1990) relataram que a deficiência de ferro leva a uma diminuição no número de timócitos, mas que não há alterações nos seus subtipos.

Provavelmente os resultados conflitantes em relação ao número de linfócitos e seus subtipos sejam decorrentes do grau da deficiência de ferro, em nossos estudos houve uma depleção nos estoques de ferro e embora tenha ocorrido atrofia no timo, esta foi sem significância estatística. Acreditamos que a diminuição do timo tenha sido proporcional ao grau moderado de deficiência conseguido em nosso modelo experimental.

Surpreendentemente, na análise fenotípica do sangue periférico, os animais do grupo R1 apresentaram porcentagem significativamente maior de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e menor de células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Esses achados não eram esperados, uma vez que esses animais receberam a ração controle por apenas 4 dias. Esses resultados aliados a um aumento significativo no volume do baço desses animais podem sugerir a ocorrência de, por exemplo, um quadro infeccioso não diagnosticado neste grupo.

### **5.3 Expressão do receptor de transferrina (CD71<sup>+</sup>) em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos animais do grupo 8C, 8DF e R1.**

As células do sistema imune apresentam uma relação entre ativação celular ou estado funcional e expressão do receptor de transferrina (WARD; KUSHNER; KAPLAN, 1982). Vários fatores parecem estar envolvidos na regulação do receptor de transferrina. Inicialmente, foi relatado que a ligação da transferrina ao seu receptor de membrana, emite sinais necessários para a proliferação de uma variedade de células não eritróides (BROCK; MAINOU-FOWLER, 1983; PELOSI; TESTA; LOUACHE, 1986). Isso sugere que o número de receptores de transferrina pode estar relacionado com o grau de proliferação celular (CHITAMBAR; MASSEY; SELIGMAN, 1983; MUSGROVE; RUGG; TAYLOR; HEDLEY, 1984). Posteriormente, foi relatado que os níveis de receptores de transferrina refletem o metabolismo de ferro na célula. Quando há excesso de ferro para o crescimento celular, há diminuição na expressão dos receptores na superfície da célula, porém quando há falta de ferro, ocorre um aumento na síntese dos receptores de transferrina e um rápido declínio nos níveis intracelulares de ferro (BOMFORD et al, 1986; PELOSI-TESTA et al, 1988).

Em nossos estudos, o grupo deficiente em ferro mostrou maior número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando CD71<sup>+</sup>, tanto em sangue periférico quanto em células do baço, quando comparados aos animais do grupo controle, porém este aumento foi significativo apenas nos linfócitos esplênicos T CD8<sup>+</sup>, sugerindo que este subtipo de linfócitos é mais sensível a depleção de ferro.

Nossos resultados corroboram com a hipótese de que o aumento na expressão dos receptores de transferrina nos animais deficientes em ferro pode ser ocasionado pelo grau da deficiência de ferro. Em casos de depleção nos estoques de ferro, possivelmente

ocorra um mecanismo compensatório, em que aumente a expressão dos receptores de transferrina como tentativa de captar mais ferro.

Mais estudos são necessários para elucidar a relação causal entre deficiência de ferro e imunidade celular. Camundongos da linhagem C57BL/6 mostraram-se resistentes à indução de deficiência de ferro. Assim, estudos em outros modelos experimentais e em humanos poderão ajudar a esclarecer os efeitos da deficiência de ferro no sistema imune.

## **6.CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Houve uma redução significativa dos estoques hepáticos de ferro dos camundongos, o que demonstra que é possível estabelecer e manter, em laboratório, um modelo experimental de deficiência de ferro.
- Um período de dez dias de ingestão de ração controle foi suficiente para recuperar os estoques hepáticos de ferro e melhorar os níveis de hemoglobina dos camundongos deficientes.
- A depleção nos estoques de ferro não alterou a porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>.
- As células T CD8<sup>+</sup> são sensíveis à deficiência de ferro.
- Camundongos deficientes em ferro mostraram maior número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando CD71<sup>+</sup>, tanto em sangue periférico quanto em células do baço, o que sugere que na deficiência moderada de ferro ocorre um aumento na síntese dos receptores de transferrina.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBOUD, S.; HAILE, D.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 275, n. 26, p. 19906- 19912, Jun. 2000.

AHLUWALIA, N.; SUN, J.; KRAUSE, D.; MASTRO, A.; HANDTE, G. Immune function is impaired in iron-deficient, homebound, older women. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.79, n. 3, p. 516-521, Mar. 2004.

ALMEIDA, C.A.N.; RICCO, R.G.; DEL CIAMPO, L.; SOUZA, A.M.; PINHO, A.P.; OLIVEIRA, J.E.D. Factors associated with iron deficiency anemia in Brazilian preschool children. *J. Pediatr.*, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 229-34, May-Jun, 2004.

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. *New Engl. J. Med.*, Boston, v. 341, n. 26, p. 1986-995, Dec. 1999.

ANDREWS, N.C. Iron deficiency: lessons from anemic mice. *Yale J. Biol. Med.*, New Haven, v. 70, n. 3, p. 219-226, May-Jun 1997.

ARÓRIO, P; LEVI, S. Ferritin, iron homeostasis and oxidative damage. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 33, n. 4, p. 457-463, Ago. 2002.

ARREDONDO, M.; NUÑEZ, M.T. Iron and cooper metabolism. *Mol. Aspect. Med.*, Oxford, v. 26, n. 4- 5, p. 313-327, Aug-Oct. 2005.

BAGCHI, K.; MOHANRAM, M.; REDDY, V. Humoral immune response in children with iron-deficiency anaemia. *Br. Med. J.*, London, v.280, n. 6226, p.1249-1251, May. 1980.

BALTUSSEN, R.; KNAI, C.; SHARAN, M. Iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four sub regions of the world. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 134, n. 10, p. 2678-2684, Oct. 2004.

BARISANI, D; CONTE, D. Transferrin receptor 1 (TfR1) and putative stimulator of Fe transport (SPT) expression in iron deficiency and overload: an overview. *Blood Cells Mol. Dis.*, La Jolla, v. 29, n. 3, p. 498-505, Nov-Dec. 2002.

BAYNES, R.D. Assessment of iron status. *Clin. Biochem.*, Toronto, v.29, n.3, p. 209-215, Jun. 1996.

BEARD, J.L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 131, n. 2S-2, p. 568S- 579S, Feb. 2001.

BEARD, J.L.; CONNOR, J.R.; JONES, B.C. Iron in the brain. *Nutr. Rev.*, Baltimore, v. 51, n. 6, p.157-170, Jun. 1993.

BEGUIN, Y; CLEMONS, G.K; POOTRAKUL, P; FILLET, G. Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of

serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood*, New York, v. 81, n. 3, p. 1067-1076, Feb. 1993.

BEGUIN, Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 329, n. 1-2, p. 9-22, Mar. 2003.

BENITO, P.; MILLER. Iron absorption and bioavailability: an update review. *Nutr. Res.*, Los Angeles, v. 18, n. 3, p. 581- 603, Mar. 1998.

BODNAR, L.M.; COGSWELL, M.E.; McDONALD, T. Have we forgotten the significance of postpartum iron deficiency? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, St. Louis, v. 193, n. 1, p. 36-44, July. 2005.

BOMFORD, A.; ISAAC, J.; ROBERTS, S.; EDWARDS, A.; YOUNG, S.; WILLIAMS, R. The effect of desferrioxamine on transferrin receptors, the cell cycle and growth rates of human leukaemic cells. *Biochem J.*, London, v. 236, n. 1, p. 243-249, May. 1986.

BOWLUS, C.L. The role of iron in T cell development and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 73-78, Mar, 2003.

BROCK, J.H.; MAINOU-FOWLER, T. The role of iron and transferrin in lymphocyte transformation. *Immunol. Today*, Amsterdam, v. 4, p. 347-351, 1983.

BUTENSKY, E.; KENNEDY, C.M.; LEE, M.M., HARMATZ, P.; MIASKOWSKI, C. Potential mechanisms for altered iron metabolism in human immunodeficiency virus disease. *J. Assoc. Nurses AIDS Care*, Philadelphia, v. 15, n. 16, p. 31-45, Nov-Dec. 2004.

CANONNE-HERGAUX, F.; GRUENHEID, S.; GOVONI, G.; GROS. P. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, Cambridge, v. 111, n. 4, p. 283-289, July-Aug. 1992

CAZZOLA, M. Role of ferritin and ferroportin genes in unexplained hyperferritinaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, London, v. 18, n. 2, p. 251-263, Jun. 2005.

CETIN, T.; YETISER, S.; CEKIN, E.; DURMUS, C.; NEVRUZ, O.; OKTENLI, C. Outer hair cell activity of the cochlea in patients with iron deficiency anemia. *Auris. Nasus Larynx*, Tókió, v. 31, n. 4, p. 389-394, Dec. 2004.

CHANDRA, R.K. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, Uppsala, v. 374, p. 129-132, 1991.

CHANDRA, R.K. Nutrition, immunity Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.93, n. 25, p. 14304-14307, Dec. 1996.

CHANDRA, R.K Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur. J. Clin. Nutr.*, London, v. 56 (Suppl 8), p. S73-76, Aug. 2002.

CHAUDHRI, G.; CLARK, I.A.; HUNT, N. H.; COWDEN, W.B.; CEREDIG, R. Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 137, n. 8, p. 2646-2652, Oct. 1986.

CHITAMBAR, C.R.; MASSEY, E.J.; SELIGMAN, P.A. Regulation of transferrin receptor expression on human leukemic cells during proliferation and induction of differentiation. Effects of gallium and dimethylsulfoxide. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 72, n. 4, p. 1314-1325, Oct. 1983.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.*, La Jolla, v. 29, n. 3, p. 336-355, Nov/ Dec. 2002.

COOK, J.D. Defining optimal body iron. *Proc. Nutr. Soc.*, London, v. 58, n. 2, p. 489-495, Feb. 1999.

COOK, J.D. Diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Best Practice & Research Clin. Haematol.*, London, v. 18, n. 2, p. 319-332, Jun. 2005.

COOK, J.D.; SKIKNE, B.S.; BAYNES, R.D. Serum transferrin receptor. *Annu. Rev. Med.*, Palo Alto, Calif., v.44, n. 1, p.63-74, Feb. 1993.

COOPERMAN, S.S.; MEYRON-HOLTZ, E.G.; OLIVIERRE-WILSON, H., GHOSH, M.C.; MCCONNELL, J.P.; ROUAULT, T.A. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron regulatory protein 2. *Blood*, New York, v. 106, n. 3, p. 1084–1091, Aug. 2005.

CRICHTON, R.R.; WILMET, S.; LEGSSYER, R.; WARD, R.J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. Inorg. Biochem.*, New York, v.91, n. 1, p. 9-18, July. 2002.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; McNEELEY, D.F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St Louis, v. 115, n. 6, p. 1119-1128, June. 2005.

DARNTON-HILL, I.; WEBB, P.; HARVEY, P.W.; HUNT, J.M.; DALMIYA, N.; CHOPRA, M.; BALL, M.J.; BLOEM, M.W.; BENOIS, T.B. Micronutrient deficiencies and gender: social and economic costs. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 81, n. 5, p. 1198S-1205S, May. 2005.

DEEGAN, H.; BATES, H.M.; McCARGAR, L.J. Assessment of iron status in adolescents: dietary, biochemical and lifestyle determinants. *J. Adolesc. Health*, New York, v. 37, n. 1, p. 75, July. 2005.

DEMIR, A.; YARALI, N.; FISGIN, T.; DURU, F.; KARA, A. Serum transferrin receptor levels in beta-thalassemia trait. *J. Trop. Pediatr.*, London, v. 50, n. 6, p. 369-371, Dec. 2004.

DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A.; BARUT, B.; ZAPATA, A.; LAW, T.C.; BRUGNARA, C.; LUZ, S.E.; PINKUS, G.S.; PINKUS, J.L.; KINGSLEY, P.D.; PALIS, J.; FLEMING, M.D.; ANDREWS, N.C.; ZON, L.I. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, London, v. 403, n. 6771, p. 776-781, Feb. 2000.

EKIZ, C.; AGAOGLU, L.; KARAKAS, Z.; GUREL, N.; YALCIN, I. The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. *Hematol J.*, Houndmills, v. 5, n. 7, p. 579-583, 2005.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed. Pharmacother.*, New York, v. 55, n. 6, p. 333-339, July. 2001.

ESEH, R.; ZIMMERBENG, B. Age-dependent effects of gestational and lactational iron deficiency on anxiety behavior in rats. *Behav. Brain Res.*, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 214-221, Nov. 2005.

FARTHING, M.J. Iron and immunity. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, Uppsala, v. 361, p. 44-52, 1989.

FERRAZ, I.S.; DANELUZZI, J.C.; VANUCCHI, H.; JORDÃO-Jr, A.A.; RICCO, R.G.; DEL CIAMPO, L.A.; MARTINELLI-Jr, C.E.; ENGELBERG, A.A.D.; BONILHA, L.R.C.M.; CUSTÓDIO, V.I.C. Prevalence of iron deficiency and its association with vitamin A deficiency in preschool children. *J. Pediatr.*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 169-174, Mar-Apr. 2005.

FLESLAND, O.; ESKELUND, A.K.; FLESLAND, A.B.; FALCH, D.; SOLHEIM, B.G.; SEGATCHIAN, J. Transferrin receptor in serum. A new tool in the diagnosis and prevention of iron deficiency in blood donors. *Transfus. Apher. Sci.*, Pergamon, v.31, n. 1, p. 11-16, Aug. 2004.

GALY, B.; FERRING, D.; MINANA, B.; BELL O; JANSER, H.G.; MUCKENTHALER, M.; SCHÜ-MANN, K.; HENTZE, M.W. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient for iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood*, New York, v. 106, n. 7, p. 2580-2589, Jun. 2005.

GANZ, T.; NEMETH, E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1763, n. 5-6, NO PAGES, May-Jun. 2006.

GARN, S.M.; RIDELLA, S.A; PETZOLD, A.S.; FALKNER, F. Maternal hematologic levels and pregnancy out-comes. *Semin. Perinatol.*, New York, v. 5, n. 2, p.155-162, Apr. 1981.

GASCHE, C.; LOMER, M.C.; LOMER, M.C.; CAVILL, I.; WEISS, G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut*, London, v. 53, n. 8, p. 1190-1197, Aug. 2004.

GOSWAMI, T.; ROLFS, A.; HEDIGER, M.A. Iron transport: emerging role in health and diseases. *Biochem. Cell Biol.*, Ottawa, v. 80, n. 5, p. 679-689, Mar. 2002.

GUNSHIN, H.; MCKENZIE, B.; BERGER, U.V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M.F.; BORON, W.F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J.L.; HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, London, v. 388, p. 482–488, July 1997.

HAAS, J.D.; BROWNLIE IV, T. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 131, n. 2s-2, p. 691S-696S, Feb. 2001.

HERRMANN, T.; MUCKENTHALER, M.; VAN DER HOEVEN, F.; BRENNAN, K.; GEHRKE, S.G.; HUBERT, N.; SERGI, C.; GRONE, H.J.; KAISER, I.; GOSCH, I.; VOLKMANN, M.; RIEDEL, H.D.; HENTZE, M.W.; STEWART, A.F.; STREMMEL, W. Iron overload in adult HFE-deficient mice independent of changes in the steady-state expression of the duodenal iron transporters DMT1 and Ireg1/ferroportin. *J. Mol. Med.*, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 39-48, Jan. 2004.

KEMP, J.D. The role of iron and iron binding proteins in lymphocyte physiology and pathology. *J. Clin. Immunol.*, New York, v. 13, n. 2, p. 81-92, Mar. 1993.

KERN, P.; HUSSEY, R. E.; SPOERL, R.; REINHERZ, E. L.; CHANG, H. C. Expression, purification, and functional analysis of murine ectodomain fragments of CD8aa and CD8ab dimers. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 274, n. 38, p. 27237–27243, Set. 1999.

KINIK, S.T.; TUNCER, A.M.; ALTAY, Ç. Transferrin receptor on peripheral blood lymphocytes in iron deficiency anemia. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v. 104, n. 3, p. 494-498, Mar. 1999.

KUVIBIDILA, S.; DARDENNE, M.; SAVINO, W.; LEPAULT, F. Influence of iron-deficiency anemia on selected thymus functions in mice: thymulin biological activity, T-cell subsets, and thymocyte proliferation. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 51, n. 2, p. 228-32, Feb. 1990.

KUVIBIDILA, S.; GAUTHIER, T.; WARRIER, R.P.; RAYFORD, W. Increased levels of serum transferrin receptor and serum transferrin receptor/log ferritin ratio in men with prostate cancer and the implications for body-iron stores. *J. Lab. Clin. Med.*, St. Louis, v. 144, n. 4, p. 176-182, Oct. 2004.

KUVIBIDILA, S.R.; PORRETTA, C. Iron deficiency and in vitro iron chelation reduce the expression of cluster of differentiation molecule (CD)28 but not CD3 receptors on murine thymocytes and spleen cells. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, v. 90, n. 1, p. 179-189, July. 2003a.

KUVIBIDILA, S.; WARRIER, R.P. Differential effects of iron deficiency and underfeeding on serum levels of interleukin-10, interleukin-12p40, and interferon-gamma in mice. *Cytokine*, San Diego, v.26, n. 2, p. 73-81. Apr. 2004.

KUVIBIDILA, S.; YU, L.; ODE, D.; VELEZ, M.; GARDNER, R.; WARRIER, R.P. Effects of iron deficiency on the secretion of interleukin-10 by mitogen-activated and

non-activated murine spleen cells. *J. Cell. Biochem.*, New York, v. 90, n. 2, p. 278-286, Oct. 2003b.

LAZOFF, B. Perinatal iron deficiency and the developing brain. *Pediatr. Res.*, Basel, v. 48, n. 2, p. 137-139, Aug. 2000.

LAZOFF, B.; JIMENEZ, E.; HAGEN. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics*, Springfield, v. 105, n. 4, p. e51, Apr. 2000.

LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P.A.; YANG, Y. The roles of iron in health and diseases. *Mol. Aspects Med.*, Oxford, v. 22, n. 1-2, p. 457-463, Feb- Apr. 2001.

LINSENMAYER, T.F.; CAI, C.X.; MILLHOLLAND, J.M.; BEAZLEY, K.E.; FITCH, J.M. Nuclear ferritin in corneal epithelial cells: tissue-specific nuclear transport and protection from UV-damage. *Prog. Retin. Eye Res.*, Oxford, v. 24, n. 2, p. 139-159, Mar. 2005.

LOOKER, A.C.; DALLMAN, P.R.; CARROLL, M.D.; GUNTER, E.W.; JOHNSON, C.L. Prevalence of iron deficiency in United States. *JAMA*, Chicago, v. 277, n. 12, p. 973-976, Mar. 1997.

LYNCH, G.W.; TURVI, S.L.L.E.; CARTER, B.; SLOANE, A.J.; CHAN, A.; MULJADI, N.; LI, S.; LOW, L.; ARMATI, P.; RAISON, R.; ZOELLNER, H.; WILLIAMSON, L.; CUNNINGHAM, A.; CHURCH, W.B. Marked differences in the structures and protein associations of lymphocyte and monocyte CD4: Resolution of a novel CD4 isoform. *Immunol Cell Biol*, Adelaide, v. 84, n. 2, p. 154-165, Apr. 2006.

MCKIE, A.T.; BARROW, D.; LATUNDE-DADA, G.O.; ROLFS, A.; SAGER, G.; MUDALY, E.; MUDALY, M.; RICHARDSON, C.; BARLOW, D.; BOMFORD, A.; PETERS, T.J.; RAJA, K.B.; SHIRALI, S.; HEDIGER, M.A.; FARZANEH, F. AND SIMPSON, R.J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, Washington, v. 291, n. 2, p. 1755-1759, Mar. 2001.

MCKIE, A.T.; MARCIANI, P.; ROLFS, A.; BRENNAN, K.; WEHR, K.; BARROW, D.; MIRET, S.; BOMFORD, A.; PETERS, T.J.; FARZANEH, F.; HEDIGER, M.A.; HENTZE, M.W.; SIMPSON, R.J. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell*, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 299-309, Feb. 2000.

MEHLHASE, J.; SANDIG, G.; PANTOPOULOS, K.; GRUNE, T. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 38, n. 2, p. 276-285, Jan. 2005.

MEIER, P.M.; NICKERSON, H.J.; OLSON, K.A.; BERG, R.L.; MEYER, J.A. Prevention of iron deficiency anemia in adolescent and adult pregnancies. *Clin. Med. Res.*, Marshfield, v. 1, n. 1, p. 29-36, Jan. 2003.

MILLARD, K.N.; FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; ANDERSON, G.J. Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the

enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut*, London, v. 53, n. 5, p. 655-660, May. 2004.

MIMS, M.P.; GUAN, Y.; POSPISILOVA, D.; PRIWITZEROVA, M.; INDRAK, K.; PONKA, P.; DIVOKY, V.; PRCHAL, J.T. Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood*, New York, v. 105, n. 3, p. 1337-1342, Feb. 2005.

MORGAN, E.H.; OATES, P.S. Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.*, La Jolla, v. 29, n. 3, p. 384-399, Nov-Dec. 2002.

MUSGROVE, E.; RUGG, C.; TAYLOR, I.; HEDLEY, D. Transferrin receptor expression during exponential and plateau phase growth of human tumor cells in culture. *J. Cell Physiol.*, Philadelphia, v. 118, n.1, p. 6-12, Jan. 1984.

OMARA, F.O.; BLAKLEY, B.R. The IgM and IgG antibody responses in iron-deficient and iron-loaded mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, London, v. 46, n. 1-2, p. 155-161, Oct-Nov. 1994a.

OMARA, F.O.; BLAKLEY, B.R. The effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *Br J Nutr.*, Cambridge, v. 72, n. 6, p. 899-909 Dec. 1994b.

OMARA, F.O.; BLAKLEY, B.R.; HUANG, H.S. Effect of iron status on endotoxin-induced mortality, phagocytosis and interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha production. *Vet. Hum. Toxicol.*, Manhattan, v. 36, n. 5, p. 423-428, Oct. 1994c.

OPPENHEIMER, S.J. Iron and it's relation to immunity and infectious disease. *J Nutr*, Philadelphia, v. 131, n. 2s-2, p.616s-636s, Feb. 2001.

PATTANAPANYASAT, K. Expression of cell-surface transferrin receptor following *in vitro* stimulation of peripheral blood lymphocytes in patients with  $\beta$ -thalassaemia and iron-deficiency anemia. *Eur. J. Haematol.*, Copenhagen, v. 44, n. 3, p. 190-195, Mar. 1990.

PELOSI-TESTA, E.; SAMOGGIA, P.; GIANNELLA, G.; MONTESORO, E.; CARAVITA, T.; SALVO, G.; CAMAGNA, A.; ISACCHI, G.; TESTA, U.; PESCHLE, C. Mechanisms underlying T-lymphocyte activation: mitogen initiates and IL-2 amplifies the expression of transferrin receptors via intracellular iron level. *Immunology*, Oxford, v. 64, n. 2, p. 273-279, Jun 1988.

QUEIROZ, S.S; TORRES, M.A. Iron deficiency anemia in children. *J. Pediatr.*, Rio de Janeiro, v. 76, n. 3, p. S298-S304, Nov. 2000.

RICHARDSON, D.R. Mysteries of the transferrin-transferrin receptor 1 interaction uncovered. *Cell*, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 483-485, Feb. 2004.

ROY, C.N.; ENNS, C.A. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood*, New York, v. 96, n. 13, p. 4020-4027, Dec. 2000.

R'ZIK, S.; BEGUIN, Y. Serum soluble transferrin receptor concentration is an accurate estimate of the mass of tissue receptors. *Exp. Hematol.*, Amsterdam, v. 29, n. 6, p.677-685, June 2001.

SANTOS, P.C.; FALCÃO, R.P. Decreased lymphocyte subsets and K- cell activity in iron deficiency anemia. *Acta Haematol.*, Basel, v. 84, n. 3, p. 118-121, 1990.

SAWITSKY, B.; KARTER, R.; SAWITSKY, A. Lymphocyte response to phytomitogens in iron deficiency. *Am. J. Med. Sci.*, Philadelphia, v. 272, n. 2, p. 153-160, Set-Oct. 1976.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.*, London, v. 56(Suppl3), p. S46-S49, Aug. 2002.

SCHOFIELD, C.; ASHWORTH, A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? *Bull World Health Organ*, Geneva, v.74, n. 2, p. 223- 229, 1996.

SCHOLL, T.O.; HEDGER, M.L.; FISCHER, R.L.; SHEARER, J.W. Anemia vs iron deficiency increased risk of preterm delivery in a prospective study. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 55, n. 5, p. 985-988, May. 1992.

SHIH, Y.J.; BAYNES, R.D.; HUDSON, B.G.; FLOWERS, C.H.; SKIKNE, B.S.; COOK, J.D. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.265, n. 31, p.19077-19081, Nov. 1990.

SIDDIQUI, I.A.; RAHMAN, M.A.; JALEEL, A. Efficacy of daily vs weekly supplementation of iron in school children with low iron status. *J. Trop. Pediatr.*, London, v.50, n.5, p.276-278, Oct. 2004.

SOYANO, A.; CANDELLET, D.; LAYRISSE, M. Effect of iron deficiency on the mitogen-induced proliferative response of rat lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Applied Immunol.*, Basel, v. 69, n. 4, p. 353-357, 1982.

SRAI, S.K.S.; BOMFORD, A.; McARDLE, H.J. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, London, v. 15, n. 2, p. 243-259, Jun. 2002.

STOLZFUS, R. Summary: implication for research and programs. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 131, n. 2, p. 697S-701S, Feb. 2001.

TESTA, U. Recent developments in the understanding of iron metabolism. *Hematol. J.*, Houndmills, v. 3, n. 2, p. 63-89, Feb. 2002.

THEIL, E.C.; IRE's: a family of mRNA non-coding sequences. *Biochem. J.*, London, v. 304, n. pt 1, p. 1-11, Nov. 1994.

TROBRIDGE, P, FORBUSH, K, LEVIN, S. Positive and negative selection of thymocytes depends on Lck interaction with the CD4 and CD8 coreceptors. *J.Immunol.*, Baltimore, v. 166, n. 2, p. 809-918, Jan. 2001

TROST, L.B.; BERGFELD, W.F.; COLOGERAS, E. The diagnosis and treatment of iron deficiency and its potential relationship to hair loss. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 54, n. 5, p. 824-844, May. 2006.

VIEIRA, M.R.; GALVÃO, L.C.; FERNANDES, M.I.M. Relation of the disaccharidases in the small intestine of the rat to the degree of experimentally induced iron deficiency anemia. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 5, p. 539-544, May. 2000.

WARD, J.H.; KUSHNER, J.P.; KAPLAN, J. Transferrin receptors of human fibroblasts. Analysis of receptor properties and regulation. *Biochem. J.*, London, v. 208, n. 1, p. 19-26, Oct. 1982.

YANG, H.; PARKHOUSE, E.R.M.; WILEMAN, T. Monoclonal antibodies that identify the CD3 molecules expressed specifically at the surface of porcine cd-T cells. *Immunology*, Oxford, v. 115, n. 2, p. 189-196, Jun. 2005.

YOU, S.; WANG, Q. Ferritin in atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.*, Amsterdam, v. 357, n. 1, p. 1-16, July. 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia. Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu Editora, 2001. 1042 p.

ZHANG, A.; SHEFTEL, A.D.; PONKA, P. The anemia of “haemoglobin-deficit” (hbd/hbd) mice is caused by a defect in transferrin cycling. *Exp. Hematol.*, Copenhagen, v.34, n. 5, p. 593-598, May. 2006.

ZIMMERMANN, M.B.; CHAOUKI, N.; HURRELL, R.F. Iron deficiency due to consumption of a habitual diet low in bioavailable iron: a longitudinal cohort study in Moroccan children. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 115-121, Jan. 2005.