



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Amanda de Paula Silva

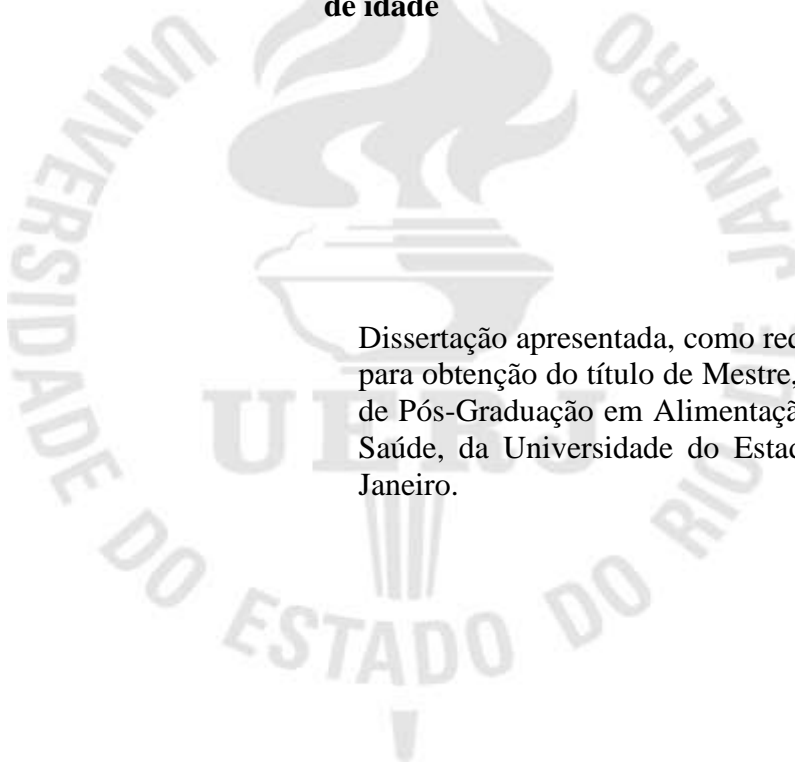
**Associação entre concentração séricas de retino e de hepcidina em  
crianças de 6 a 59 meses de idade**

Rio de Janeiro

2021

Amanda de Paula Silva

**Associação entre concentrações de retinol e de hepcidina em crianças de 6 a 59 meses de idade**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marta Citelli dos Reis

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Alessandra da Silva Pereira

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

S586 Silva, Amanda de Paula.  
Associação entre concentrações de retinol e de hepcidina em crianças de 6 a 59 meses de idade / Amanda de Paula Silva. – 2021.  
64 f.

Orientadora: Marta Citelli dos Reis  
Coorientadora: Alessandra da Silva Pereira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Nutrição.

1. JNutrição – Teses. 2. Retinol – Teses. 3. Anemia – Teses. 4. Crianças – Teses. 5. Inflamação – Teses. I. Reis, Marta Citelli dos. II. Pereira, Alessandra da Silva. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. III. Título.

bs

CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data

Amanda de Paula Silva

**Associação entre concentrações séricas de retinol e de hepcidina em crianças de 6 a 59  
meses de idade**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de junho de 2021.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Marta Citelli dos Reis (Orientadora)

Instituto de Nutrição - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Inês Rugani Ribeiro de Castro

Instituto de Nutrição - UERJ

---

Prof. Dr. Michel Carlos Mocellin

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Rio de Janeiro

2021

## **DEDICATÓRIA**

A todas as famílias que participaram desse estudo.  
Em especial, às crianças que foram protagonistas deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente e, sobretudo a Deus, ao permitir-me não apenas sonhar, mas por transformar meus sonhos em realidades. E a Nossa Senhora pela proteção incansável e diária.

Aos meus pais, Francisco e Nilcea, pela minha existência, pelo suporte e sustento. Em especial à minha mãe por sempre estar comigo em todas as minhas decisões e por me incentivar a ir além.

Ao meu marido, Maxuel, por acreditar nos meus sonhos e sonhar comigo ao longo dos últimos 10 anos, especialmente ao longo desse primeiro ano de casados vivendo uma pandemia. Agradeço por ser meu apoio amoroso e paciente em momentos de incertezas, estresses e expectativas.

À minha irmã, Bruna, pelas discussões no campo da saúde. E também pelas críticas que me instigam e me motivam a buscar o conhecimento.

Às minhas queridas orientadoras, Marta e Alessandra, por todo incentivo, amizade, ensinamentos e compreensão. Agradeço pela oportunidade de ampliar meus saberes através da reflexão crítica.

À banca examinadora por aceitar doar o seu tempo e suas contribuições para o sucesso dessa futura publicação.

A todos que participaram do projeto VITANEMIA, sem vocês nada seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, pelo financiamento deste projeto.

Às minhas amigas, por serem tão parceiras e incentivadoras mesmo com a distância necessária ao longo da pandemia.

A todos que torceram por mim, meu eterno agradecimento!

Em tempos de pandemia:

“Não importa o que aconteça, continue a nadar”

*Grahan Waters - Procurando Nemo, 2003*

## RESUMO

SILVA, Amanda de Paula. *Associação entre concentrações séricas de retinol e de hepcidina em crianças de 6 a 59 meses de idade*. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A anemia é uma das principais doenças carenciais no mundo e a deficiência de vitamina A (DVA), usualmente determinada pelas concentrações séricas de retinol, é uma das mais importantes deficiências nutricionais dos países em desenvolvimento. Acredita-se que a deficiência de ferro seja uma das principais causas de anemia, porém, esta pode ser determinada por diversos fatores. É possível que uma deficiência funcional de ferro se desenvolva por alterações na sua homeostase mesmo quando as reservas de ferro estejam adequadas. De forma sistêmica, a homeostase de ferro é controlada pelo hormônio hepcidina, que atua reduzindo a mobilização tecidual e absorção intestinal deste mineral. A síntese de hepcidina é ativada pela inflamação, mas este mecanismo de ativação foi pouco investigado em crianças. Adicionalmente, sabe-se que DVA tem sido associada à inflamação. O objetivo foi estudar a associação da vitamina A com anemia e concentrações séricas de hepcidina em crianças menores de cinco anos. Estudo transversal com 312 crianças de 6 a 59 meses usuárias do Sistema Único de Saúde no Rio de Janeiro, Brasil. Foi realizada uma regressão logística múltipla, testando anemia como desfecho, retinol e proteína C reativa (PCR) como variáveis preditivas. A associação entre hepcidina e retinol séricos, parâmetros hematológicos (ferritina, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e CHCM) e índice de massa corporal/idade (IMC/I) foi analisada pelo modelo linear generalizado (GLM) com e sem ajuste para PCR. Além disso, a análise de regressão logística foi usada para testar a anemia como desfecho e o retinol sérico como variável preditiva, usando a função de razão de chance. As análises foram ajustadas para sexo, idade, escolaridade materna e renda familiar. Foram incluídas no estudo 312 crianças. Destas, aproximadamente 67% tinham mais de 24 meses e 52% eram do sexo masculino. A prevalência de anemia foi 14,6%, a de anemia ferropriva foi 5,8% e a de deficiência de vitamina A foi 9,6%. O aumento das concentrações séricas de retinol sérico reduziu as chances de anemia (OR = 0,13; intervalo de confiança = 0,29-0,59). Quando não ajustado para PCR, no GLM, retinol foi um preditor de hepcidina sérica, juntamente com ferritina e IMC/I ( $\beta = -3,36, 0,14, 1,02$ , respectivamente;  $p = 0,032$ ). O retinol sérico associou-se inversamente à PCR ( $\beta = -0,025$ ;  $p = 0,000$ ). Indicadores socioeconômicos foram incluídos e não influenciaram os níveis de hepcidina na população estudada, sugerindo uma associação determinada por fatores biológicos. A associação observada entre os níveis de retinol e hepcidina pode explicar porque as estratégias para controlar a anemia baseadas apenas na suplementação de ferro têm um impacto limitado na prevalência geral da anemia. Na amostra estudada, a anemia sem deficiência de ferro estava presente em aproximadamente dois terços das crianças com anemia, o que poderia ser explicado pela anemia de inflamação e a necessidade de melhorar a compreensão da relação entre vitamina A, níveis de hepcidina e anemia em crianças. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a associação entre retinol sérico e hepcidina em crianças de 6 a 59 meses. **Conclusões:** A associação entre as concentrações séricas de retinol e hepcidina em crianças de 6 a 59 meses parece ser dependente de inflamação. Tomados em conjunto, os resultados reforçam a necessidade do desenvolvimento de novos estudos para melhor compreender a relação entre a vitamina A e a anemia de inflamação.

**Palavras-chave:** Retinol. Anemia. Inflamação. Hepcidina. Crianças.



## ABSTRACT

SILVA, Amanda de Paula. *Influence of vitamin A on anemia and serum hepcidin levels in children aged 6 to 59 months*. Dissertation (Master in Food, Nutrition and Health) – Institute of Nutrition, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, 2021.

Anemia is one of the main deficiency diseases in the world and the lack of vitamin A (VAD), usually determined by serum retinol concentrations, is one of the most important nutritional deficiencies in developing countries. Iron deficiency is believed to be one of the main causes of anemia, however, it can be determined by several factors. It is possible for a functional iron deficiency to develop due to changes in your homeostasis even when the iron stores are suitable. Systemically, iron homeostasis is controlled by the hormone hepcidin, which acts by reducing tissue mobilization and intestinal absorption of this mineral. Hepcidin synthesis is activated by the inflammation, but this activation mechanism has been poorly investigated in children. Additionally, it is known that VAD has been linked to inflammation. We aimed to evaluate the influence of serum retinol on hepcidin levels and anemia in children. This cross-sectional study included 312 children, aged 6–59 months, from Rio de Janeiro, Brazil. Multiple logistic regression was performed using anemia as the outcome and retinol and C-reactive protein (CRP) levels as predictive variables. The association between hepcidin and retinol levels, hematological parameters and body mass index (BMI) was analyzed using a generalized linear model with and without adjustment for CRP level. Logistic regression analysis was used to test anemia as an outcome and serum retinol level as a predictive variable using the odds ratio (OR) function. A total of 312 children were included in the study. Of them, about 67% were older than 24 months and 52% were male. Anemia was present in 14.6% of the children, 5.8% presented iron deficiency anemia and 9.6% had vitamin A deficiency. The increase in serum retinol levels reduced the chances of anemia (OR = 0.13; confidence interval = 0.29–0.59). When CRP level was not adjusted for in the multiple regression analyses, retinol level was a predictor of serum hepcidin levels, ferritin levels, and BMI/age ( $\beta = -3.36, 0.14, 1.02$ , respectively;  $p = 0.032$ ). Accordingly, serum retinol levels were inversely associated with CRP levels ( $\beta = -0.025$  and  $p = 0.000$ ). Socioeconomic indicators were included and did not influence hepcidin levels in the studied population, suggesting a connection determined by biological factors. The association observed between retinol and hepcidin levels may explain why strategies to control anemia based on iron supplementation alone have limited impact on the overall prevalence of anemia. In the sample studied, anemia without iron deficiency was present in approximately two-thirds of the children with anemia, which could be explained by inflammation anemia and the need to improve the understanding of the relationship between vitamin A, hepcidin levels, and anemia in children. To our knowledge, this is the first study to assess the connection between serum retinol and hepcidin in children aged 6 to 59 months. **Conclusions:** The association between serum retinol and hepcidin levels in children aged 6–59 months seems to be dependent on inflammation. Taken together, these results reinforce the need for nutritional care and public policies to include vitamin A supplementation in anemia prevention and treatment regimens.

**Keywords:** Retinol. Anemia. Inflammation. Hepcidin. Children

## RESUMEN

SILVA, Amanda de Paula. *Influencia de la vitamina A en la anemia y los niveles séricos de hepcidina en niños de 6 a 59 meses de edad*. Disertación (Maestría en Alimentación, Nutrición y Salud) - Instituto de Nutrición, Universidad Estatal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, 2021.

**Introducción:** La anemia es una de las principales enfermedades por carencia en el mundo y la deficiencia de vitamina A (VAD), en general, determinada por las concentraciones séricas de retinol, es una de las deficiencias nutricionales más importantes de los países en desarrollo. Se cree que la deficiencia de hierro sea una de las principales causas de anemia, sin embargo, esta puede ser determinada por distintos factores. Es posible que se desarrolle una deficiencia funcional de hierro debido a cambios en su homeostasis, aunque las reservas de hierro sean adecuadas. A nivel sistémico, la homeostasis del hierro está controlada por la hormona hepcidina, que actúa reduciendo la movilización tisular y la absorción intestinal de este mineral. La síntesis de hepcidina se activa por inflamación, pero este mecanismo de activación fue poco investigado en los niños. Además, se sabe que el VAD se ha relacionado con la inflamación. **Objetivo:** Esta disertación tuvo por objetivo evaluar la influencia de la vitamina A en los niveles séricos de hepcidina y anemia en los niños. **Métodos:** Se trata de un estudio transversal con 312 niños de 6 a 59 meses en Río de Janeiro, Brasil. Fue realizada una regresión logística múltiple, evaluando anemia como resultado, retinol y proteína C reactiva (PCR) como variables predictivas. La asociación entre la hepcidina sérica y el retinol, parámetros hematológicos (ferritina, hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM y CHCM e IMC se analizó mediante el modelo lineal generalizado (GLM) con y sin ajuste por PCR. Los análisis fueron ajustados por sexo, edad, educación materna e ingresos familiares. Además, se utilizó el análisis de regresión logística para evaluar la anemia como resultado y el retinol sérico como variable predictiva, utilizando la función de razón de posibilidades. **Resultados:** Se incluyeron 312 niños en el estudio. De estos, aproximadamente el 67% tenían más de 24 meses y el 52% eran del sexo masculino. La prevalencia de anemia fue del 14,6%, la anemia ferropénica fue del 5,8% y la deficiencia de vitamina A fue del 9,6%. El aumento del retinol sérico redujo la posibilidad de anemia (OR = 0,13; IC = [0,29-0,59]). Cuando no ajustado para PCR, en GLM, el retinol fue un predictor de la hepcidina sérica, junto con la ferritina y el índice de masa corporal/edad ( $\beta = -3,36, 0,14, 1,02$ , respectivamente;  $p = 0,032$ ). El retinol sérico se asoció inversamente con la PCR ( $\beta = -0,025$ ;  $p = 0,000$ ). Los indicadores socioeconómicos incluidos en el estudio no influyeron en los niveles de hepcidina en los individuos analizados, lo que indica una asociación determinada por factores biológicos. Al observar la asociación existente entre los niveles de retinol y hepcidina podemos entender claramente porque los métodos para controlar la anemia basados únicamente en la suplementación de hierro suelen tener poco éxito en la prevalencia general de la anemia. En la muestra estudiada, la anemia sin deficiencia de hierro estaba presente en aproximadamente dos tercios de los niños con anemia, lo que podría explicarse por la anemia de la inflamación y la necesidad de mejorar la comprensión de la relación entre la vitamina A, los niveles de hepcidina y la anemia en los niños. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa la asociación entre el retinol sérico y la hepcidina en niños de 6 a 59 meses. **Conclusiones:** La asociación entre el retinol sérico y la hepcidina parece depender de la inflamación en niños de 6 a 59 meses de edad. En conjunto, los resultados refuerzan la necesidad de políticas públicas y de atención nutricional que incluyan la vitamina A como estrategia para la prevención y el tratamiento de la anemia.

**Palabras claves:** Retinol. Anemia. Inflamación. Hepcidin. Niños.

## PRINCIPAIS ACHADOS

A proposta desse estudo surgiu em função da necessidade de melhorar o entendimento sobre a relação entre vitamina A e anemia em crianças.

Os programas de prevenção e combate à anemia são elaborados com o pressuposto de que a anemia seja essencialmente uma doença causada pela falta de ferro. Mas, em muitos casos, a eficácia da prevenção da anemia possivelmente está ligada à participação de outros fatores além do ferro. No nosso estudo, observamos que 14,6% das crianças tinham anemia, mas somente 5,8% apresentavam deficiência de ferro. Esta situação em que a anemia está presente, mas não existe deficiência de ferro, ocorre mais comumente na presença de inflamação. Isso porque a inflamação produz um hormônio, chamado de hepcidina, que diminui a absorção intestinal e utilização do ferro no organismo humano.

Em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, outra importante carência nutricional é a deficiência de vitamina A. Sabe-se que a suplementação com vitamina A é capaz de diminuir os índices de anemia e que a deficiência de vitamina A provoca inflamação.

Por isso, investigamos a relação da vitamina A com a hepcidina em crianças menores de cinco anos. Nossos achados mostram que a vitamina A está associada às concentrações de hepcidina no sangue e à ocorrência de anemia. Mas essa influência depende da inflamação, mesmo que esta seja crônica e de baixo grau. Encontramos que quanto menores os valores de vitamina A nas crianças, maiores são os valores de hepcidina. E essa relação ocorre independentemente da influência das condições socioeconômicas, ou seja, parece existir uma relação biológica entre a vitamina A, hepcidina e anemia.

Além disso, os nossos resultados reforçam que os valores de hepcidina estão associados às reservas de ferro no organismo. Vimos também que os maiores concentrações de vitamina A no sangue estavam associadas a menor chance de ter anemia, ou seja, a vitamina A pode ser considerada como um fator de proteção contra a anemia.

Esta dissertação possibilita maior compreensão da relação entre vitamina A e hepcidina pois, até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar essa associação em crianças. Os resultados encontrados mostram a importância de considerar outros fatores, como a inflamação e deficiência de vitamina A, nas propostas de prevenção e tratamento da anemia em crianças menores de 5 anos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ação da hepcidina no metabolismo do ferro.

21

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                      |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Distribuição das características selecionadas de crianças de 6 a 59 meses do Brasil. | 42 |
| Tabela 2 – | Status de retinol, ferro e marcadores inflamatórios de crianças de 6 a 59 meses.     | 44 |
| Tabela 3 – | Análises de regressão logística com anemia como variável dependente.                 | 44 |
| Tabela 4 – | Análise de modelo linear generalizado com hepcidina como variável dependente.        | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |                                                                |
|--------|----------------------------------------------------------------|
| CHCM   | Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média                  |
| CLAE   | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                       |
| DNA    | Ácido Desoxirribonucleico                                      |
| DVA    | Deficiência de Vitamina A                                      |
| ENANI  | Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil             |
| E/I    | Estatura para Idade                                            |
| GLM    | Modelo Linear Generalizado                                     |
| HCM    | Hemoglobina Corpuscular Média                                  |
| IMC    | Índice de Massa Corporal                                       |
| IMC/I  | Índice de Massa Corporal para Idade                            |
| LFBN   | Laboratório de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição         |
| OMS    | Organização Mundial da Saúde                                   |
| PCR    | Proteína C reativa                                             |
| PNDS   | Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher |
| P/I    | Peso para Idade                                                |
| RBP    | Proteína Ligadora de Retinol                                   |
| SUS    | Sistema Único de Saúde                                         |
| TCLE   | Termo de consentimento Livre e Esclarecido                     |
| UBS    | Unidade Básica de Saúde                                        |
| UERJ   | Universidade Estadual do Rio de Janeiro                        |
| UNIRIO | Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro               |
| VA     | Vitamina A                                                     |
| VCM    | Volume Corpuscular Médio                                       |

## SUMÁRIO

|     |                                                                                                             |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                     | 14 |
| 1   | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....                                                                            | 17 |
| 1.1 | Anemia Ferropriva .....                                                                                     | 17 |
| 1.2 | Metabolismo do ferro.....                                                                                   | 19 |
| 1.3 | Inflamação e metabolismo do ferro .....                                                                     | 22 |
| 1.4 | Vitamina A: deficiência e metabolismo.....                                                                  | 23 |
| 1.5 | Relação entre deficiência de vitamina A e ferro.....                                                        | 25 |
| 2   | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....                                                                                  | 28 |
| 3   | <b>OBJETIVOS</b> .....                                                                                      | 29 |
| 3.1 | <b>Objetivo Geral</b> .....                                                                                 | 29 |
| 3.2 | <b>Objetivos Específicos</b> .....                                                                          | 29 |
| 4   | <b>MÉTODOS</b> .....                                                                                        | 30 |
| 4.1 | Desenho do estudo, população de estudo e amostragem .....                                                   | 30 |
| 4.2 | Coleta de dados .....                                                                                       | 31 |
| 4.3 | Análise Laboratorial .....                                                                                  | 31 |
| 4.4 | Variáveis de interesse .....                                                                                | 33 |
| 4.5 | Análise de dados e tratamento estatístico .....                                                             | 33 |
| 4.6 | Aspectos éticos .....                                                                                       | 34 |
| 4.7 | Financiamento.....                                                                                          | 35 |
| 5   | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                     | 36 |
| 5.1 | Artigo: Association of vitamin A with anemia and serum hepcidin levels in children aged 6 to 59 months..... | 36 |
|     | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                                                                           | 53 |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                    | 54 |
|     | <b>APÊNDICE A –Parecer do comitê de ética em pesquisa</b> .....                                             | 63 |
|     | <b>APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....                                        | 64 |

## INTRODUÇÃO

A anemia é uma das principais doenças carenciais no mundo e a deficiência de vitamina A (DVA) é considerada uma das mais importantes deficiências nutricionais dos países em desenvolvimento. Ambas representam grandes problemas de saúde pública. Mundialmente, a anemia atingiu em 2011 cerca de 273 milhões de crianças e a DVA, aproximadamente 190 milhões de crianças em idade pré-escolar (WHO, 2011, 2015). No Brasil, o relatório preliminar do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI - 2019) mostrou prevalência nacional de anemia de 10,0% e de 6,0% de DVA em menores de cinco anos (UFRJ, 2020). Na cidade do Rio de Janeiro, um estudo realizado com uma amostra probabilística de crianças entre 6 e 59 meses de idade usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS) encontrou uma prevalência de anemia de 13,7%, sendo 5,5% de anemia ferropriva e 13% de DVA(CASTRO et al., 2021).

Acredita-se que as principais causas de anemia sejam a deficiência de ferro e a inflamação, sendo os principais grupos de risco lactentes, pré-escolares, mulheres em idade fértil e gestantes (BRASIL, 2013a; DE OLIVEIRA et al., 2013; GANZ, 2019; WHO, 2015; ZAVALETA; ASTETE-ROBILLIARD, 2017).A anemia ferropriva pode provocar alterações funcionais no organismo, como retardo do desenvolvimento infantil, comprometimento da imunidade celular e diminuição da capacidade intelectual (HERMOSO et al., 2011; JÁUREGUI-LOBERA, 2014; ZAVALETA; ASTETE-ROBILLIARD, 2017).

A anemia ferropriva se dá por diversas causas, como inadequação da ingestão de ferro, perdas aumentadas, alterações de absorção ou modificações da biodisponibilidade deste mineral. É possível que uma deficiência funcional de ferro se desenvolva mesmo quando as reservas de ferro no organismo estão adequadas, devido a alterações na sua homeostase (GANZ, 2019; WHO, 2004).

A homeostase de ferro é regulada por dois mecanismos principais: intracelular e sistêmico. De forma sistêmica, o equilíbrio do ferro requer uma comunicação entre absorção, utilização e estoque que é realizada através da hepcidina, um regulador negativo da biodisponibilidade de ferro. A hepcidina é um hormônio peptídeo com papel chave na homeostase desse mineral no organismo. Sua síntese é ativada por processos inflamatórios e sua ação consiste em bloquear a absorção duodenal de ferro e a liberação de ferro do interior de macrófagos que reciclam glóbulos vermelhos senescentes(LEE, 2019;



SANGKHAE; NEMETH, 2017; WANG; BABITT, 2019). Portanto, a relação entre hepcidina e inflamação constitui aspecto biológico que pode contribuir para o que é chamado de deficiência funcional de ferro que pode ocasionar anemia de inflamação, condição em que as reservas de ferro no organismo são adequadas, porém este não se encontra disponível para eritropoiese (GANZ, 2019; WHO, 2004). A obesidade é uma das doenças inflamatórias que parece estar ligada a essa deficiência funcional de ferro (GIBSON et al., 2014).

A DVA também foi associada a processos inflamatórios (JIMENEZ et al., 2010; KONGSBK et al., 2006; MAHFUZ et al., 2019; QUEIROZ et al., 2013; SOMMER et al., 1983). Estes podem causar ou ser causados por DVA (WISEMAN; BAR-EL DADON; REIFEN, 2016). Além disso, a existência de relação entre DVA e anemia já foi reconhecida (FA, 1995; SEMBA; BLOEM, 2002), e sabe-se que há impacto na redução da prevalência de anemia ou deficiência de ferro causada pela suplementação de vitamina A (VA) (DA CUNHA; CAMPOS HANKINS; ARRUDA, 2018; JIMENEZ et al., 2010; MWANRI et al., 2000).

Vários mecanismos biológicos exercidos pela vitamina A (VA) parecem explicar essa relação, como o aumento no crescimento e diferenciação das células progenitoras eritrocitárias (BLOEM, 1995; CAÑETE et al., 2017; JIMENEZ et al., 2010), potencialização da imunidade, redução da inflamação (REIFEN, 2002; STEPHENSEN, 2001), além da modulação da biodisponibilidade e mobilização das reservas de ferro nos tecidos (ARRUDA; SIQUEIRA; DE VALÊNCIA, 2009; CITELLI et al., 2012; HAN et al., 2018; TSUCHIYA et al., 2009), que podem ser influenciadas pela inflamação (DA CUNHA; CAMPOS HANKINS; ARRUDA, 2018; GANZ, 2019; JIMENEZ et al., 2010; MWANRI et al., 2000). No entanto, a patogênese da anemia por deficiência de VA não foi bem caracterizada e compreendida.

Estudos experimentais observaram que a VA induz a síntese de proteínas responsáveis pelo transporte de ferro em células duodenais e que a DVA aumenta a expressão gênica de hepcidina (ARRUDA; SIQUEIRA; DE VALÊNCIA, 2009; CITELLI et al., 2012; TSUCHIYA et al., 2009) e compromete sua via de sinalização (MENDES et al., 2016). Portanto, é plausível que a VA possa afetar a homeostase do ferro por meio da modulação da hepcidina e que a DVA possa levar ao acúmulo desse mineral nos tecidos.

A associação entre os estados nutricionais de ferro e VA por meio da regulação da síntese de hepcidina pode justificar porque as estratégias para controlar a anemia baseadas exclusivamente na suplementação de ferro têm um impacto limitado na prevalência geral de

anemia, especialmente em crianças, as quais são mais vulneráveis à ocorrência desse agravo. É necessário, portanto, o aprimoramento da compreensão da relação entre VA e hepcidina em crianças.

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Anemia Ferropriva

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a anemia atingia cerca de 273 milhões (43%) de crianças globalmente em 2011 (WHO, 2015). Ela pode ser caracterizada como uma condição na qual a concentração sanguínea de hemoglobina é insuficiente para atender as necessidades fisiológicas exigidas pelo organismo. Consiste em um agravo recorrente e amplamente distribuído que afeta populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2004, 2015).

No Brasil, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher de 2006 (PNDS-2006) evidenciou que a prevalência de anemia em crianças foi de 20,9% em todo país. A região Nordeste apresentou a maior prevalência (25,5%) e a Norte, a menor (10,4%). Na região Sudeste, a prevalência foi de 22,6% (BRASIL, 2009). Mais recentemente, o relatório preliminar do ENANI - 2019 mostrou prevalência nacional de anemia de 10,0% em menores de cinco anos (UFRJ, 2020).

Uma revisão sistemática com metanálise de estudos observacionais de base populacional representativos de cidades e creches, regiões ou estados do Brasil evidenciou uma prevalência média ponderada pelo tamanho amostral de 40,1% (VIEIRA; FERREIRA, 2010). Um estudo realizado com uma amostra probabilística e representativa de crianças menores de 5 anos usuárias do SUS no município do Rio de Janeiro evidenciou que a prevalência de anemia foi de 13,7%, sendo 5,5% de anemia ferropriva. A prevalência de anemia foi maior (28,1%) nas crianças menores de 2 anos e menor (7,0%) nas crianças com 2 anos ou mais (CASTRO et al., 2021).

A anemia pode ser determinada por diversos fatores (ANDRÉ et al., 2018; CARDOSO et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2013; DIANA et al., 2019; ENGLE-STONE et al., 2017; PETRY et al., 2019; ZANIN et al., 2015), porém acredita-se que cerca de metade dos casos em todo mundo esteja associada à deficiência de ferro que se não corrigida pode levar a anemia ferropriva, consequência de níveis insuficientes desse mineral no organismo, variando entre grupos populacionais e localidades (WHO, 2015). As outras causas são relacionadas à inflamação, deficiências de folato, cianocobalamina ou vitamina A, infecções parasitárias, doenças hereditária, fatores sociais, entre outros (ANDRÉ et al., 2018; CARDOSO et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2013; DIANA et al.,

2019; ENGLE-STONE et al., 2017; MAHFUZ et al., 2019; PETRY et al., 2019; ZANIN et al., 2015).

As necessidades de ferro aumentam durante o crescimento, em especial entre menores de 5 anos de idade e na adolescência. Durante a gravidez, aumentam as necessidades de ferro em decorrência da eritropoiese materna e fetal e do crescimento fetal. Portanto, ao considerar esses fatores, não surpreende que as crianças, as gestantes e as mulheres em idade fértil estejam entre os grupos mais vulneráveis para a ocorrência desse agravo. No mundo, essa condição é considerada a carência nutricional de maior magnitude e tem destaque pela prevalência elevada em todos os segmentos sociais. Em virtude das altas prevalências e da estreita relação com o desenvolvimento das crianças, esta é considerada um grave problema de saúde pública (BRASIL, 2013a; WHO, 2015).

A deficiência de ferro pode ser dividida em três estágios de desenvolvimento no organismo. O primeiro estágio consiste na depleção das reservas desse mineral, que pode ser avaliada pela diminuição da ferritina sérica, porém sem comprometimento do ferro funcional e dos níveis séricos de ferro. Caso não haja intervenção, ocorre queda nas concentrações de ferro sérico e observam-se mudanças no perfil bioquímico: redução na saturação da transferrina, enquanto seus receptores na circulação e superfície das células aumentam, ou seja, há um aumento da capacidade de ligação do ferro. O estágio final da carência de ferro, conhecido como anemia ferropriva, expressa-se pela diminuição na síntese de hemoglobina e tem implicações agudas e crônicas para saúde (ÖZDEMIR, 2015; ZAVALETA; ASTETE-ROBILLIARD, 2017).

A concentração de ferritina é considerada um bom marcador de reservas de ferro e o melhor indicador de resposta a uma intervenção com suplementação de ferro. Por isso, esta deve ser usada, juntamente com as dosagens de hemoglobina, para avaliar a deficiência de ferro em indivíduos aparentemente saudáveis. Para caracterização de anemia ferropriva, utilizam-se os seguintes parâmetros: hemoglobina menor que 11mg/dL e ferritina menor que 12µg/L. Porém, em indivíduos com infecção ou inflamação, uma concentração de ferritina abaixo de 30 µg/L em crianças pode ser usada para indicar deficiência de ferro (WHO, 2020). Em estudos populacionais, também é importante ajustar os marcadores do metabolismo do ferro, considerando a inflamação, para avaliar a deficiência desse mineral (MEI et al., 2017; NAMASTE et al., 2017a, 2017b; SUCHDEV et al., 2017; WHO, 2020). Uma dessas abordagens consiste em excluir os indivíduos com proteína C reativa (PCR) acima de 5 mg/L ou utilizar o ponto de corte da ferritina de 30 µg/L (WHO, 2020).

As consequências da anemia ferropriva para a saúde de crianças incluem alterações da pele e das mucosas, cansaço e fadiga(GLOVER; JACOBS, 1972), comprometimento da imunidade celular e atraso do desenvolvimento psicomotor e cognitivo (BRASIL, 2013a). Com isso, há uma diminuição da capacidade de aprendizado, com significativa redução da qualidade de vida. Há uma estreita relação dessa condição com o desenvolvimento cognitivo e intelectual na infância, podendo ocasionar baixo rendimento escolar em idades posteriores (JÁUREGUI-LOBERA, 2014; ZAVALETA; ASTETE-ROBILLIARD, 2017).

Sabe-se que a deficiência de ferro se dá por diversas causas, como inadequação da ingestão deste mineral, perdas aumentadas ou modificações de sua biodisponibilidade (WHO, 2004). Diferentes estratégias têm sido adotadas no Brasil para prevenção e controle da deficiência de ferro e da anemia ferropriva, como a fortificação obrigatória das farinhas de trigo e milho e a suplementação profilática para grupos de risco. Porém, a anemia continua sendo um problema de saúde pública em todas as regiões do país(BRASIL, 2009, 2013a; VIEIRA; FERREIRA, 2010).Mais recentemente, o relatório preliminar do ENANI – 2019 mostrou uma prevalência nacional de 10,0% de anemia em crianças menores de cinco anos (UFRJ, 2020).Além disso, é possível que uma deficiência funcional de ferro se desenvolva mesmo quando as reservas de ferro no organismo estão adequadas(WHO, 2004). Tal deficiência funcional pode ter influência de outros fatores que não são considerados na formulação das estratégias para o enfrentamento da anemia.

## 1.2 Metabolismo do ferro

O ferro é um dos vários metais essenciais para o organismo. Possui grande habilidade em aceitar e doar elétrons, o que o torna imprescindível para diversas reações biológicas, sendo vital para a homeostase celular. Mostra-se como um componente essencial na síntese da molécula de mioglobina, para a formação de diversas proteínas, para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e para o metabolismo energético. É, portanto, imprescindível para a fisiologia humana, sendo obtido através da alimentação (ANDREWS; GANZ, 2019; GROTO, 2010; WANG; BABITT, 2019).

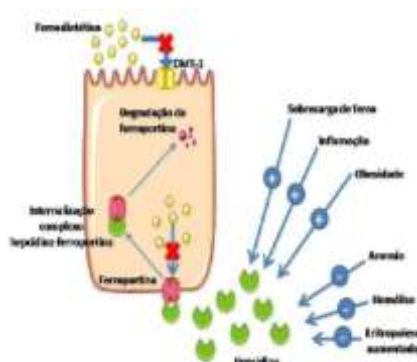
O papel principal do ferro na biologia de mamíferos é ligar-se ao oxigênio na hemoglobina e na mioglobina e catalisar a transferência enzimática de elétrons por enzimas

não-dependentes, incluindo citocromos, peroxidases, ribonucleotídeosredutases e catalases. As mesmas propriedades que tornam o ferro útil para essas funções também podem levar à toxicidade, pelo fato de participar da geração de radicais livres, incluindo o íon superóxido. Portanto, sua propriedade química que envolve reações de oxirredução é fundamental para o organismo humano e o balanço das quantidades de ferro deve ser cuidadosamente regulado a fim de se evitarem os efeitos prejudiciais tanto da deficiência quanto da sobrecarga deste nutriente (ANDREWS; GANZ, 2019; GROTTTO, 2010; WANG; BABITT, 2019).

O metabolismo do ferro é complexo e envolve diversas etapas desde sua ingestão até sua excreção. O ferro é um íon carregado que não pode se difundir livremente através das membranas celulares. Muitas moléculas, como diferentes proteínas, foram identificadas desempenhando papel essencial nesse processo homeostático, tais como ferritina, transferrina, proteínas reguladoras de ferro, hepcidina e matriptase. Outras proteínas como hemoglobina e muitas enzimas precisam de ferro para suas funções, sendo, portanto, os produtos finais do metabolismo do ferro (ANDREWS; GANZ, 2019; GROTTTO, 2010; WALDVOGEL-ABRAMOWSKI et al., 2014; WANG; BABITT, 2019).

Uma quantidade de aproximadamente 1-2 mg de ferro são absorvidos pelo intestino e cerca de 25 mg são necessários diariamente para a produção de hemoglobina nos eritrócitos em amadurecimento. Com isso, sabe-se que a maior parte do ferro utilizada em nosso organismo provém da reciclagem realizada por macrófagos residentes no baço, os quais fagocitam hemácias senescentes e recuperam o ferro, conforme já mencionado. A homeostase de ferro é regulada por dois mecanismos principais: intracelular e sistêmico. O mecanismo sistêmico de controle da homeostase de ferro é regulado pela hepcidina, conforme pode ser observado na Figura 1 (ANDREWS; GANZ, 2019; CHASTON et al., 2008; DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2015; GROTTTO, 2010; WALDVOGEL-ABRAMOWSKI et al., 2014; WANG; BABITT, 2019).

Figura 1: Ação da hepcidina no metabolismo do ferro.



Fonte: Adaptado de CARDOSO (2018)

A hepcidina é o hormônio-chave na regulação dos níveis de ferro e sabidamente funciona como um regulador negativo do metabolismo do ferro com objetivo de manter a homeostase desse mineral no organismo. Sua ação consiste em bloquear a absorção duodenal de ferro e sua reciclagem em macrófagos reticuloendoteliais residentes no baço e no fígado. Portanto, a sua produção precisa ser devidamente controlada (CANALI et al., 2017; CHASTON et al., 2008; CLARK et al., 2011; LAFTAH et al., 2004; LEE, 2019; MASTROGIANNAKI et al., 2009; NICOLAS et al., 2002; RIVERA et al., 2005; YAMAJI et al., 2004).

A deficiência de ferro pode ser causada por ingestão inadequada do mineral, perda excessiva de sangue ou utilização excessiva. O aporte inadequado de ferro pode resultar de uma dieta com baixa quantidade de ferro ou baixa qualidade (biodisponibilidade). Mas, é necessário considerar que fatores como distúrbios intestinais e inflamação podem prejudicar a absorção de ferro nos indivíduos (WHO, 2020). São conhecidos pelo menos quatro mecanismos reguladores da absorção intestinal de ferro: estoque, demanda eritropoiética, hipóxia e inflamação (GROTTO, 2010; SANGKHAE; NEMETH, 2017; WANG; BABITT, 2019). É provável que a hepcidina seja o fator comum a esses quatro reguladores. Assim, o equilíbrio do ferro requer uma comunicação entre absorção, utilização e armazenamento; comunicação feita pela hepcidina (ANDREWS; GANZ, 2019; GROTTO, 2010; WANG; BABITT, 2016). A taxa de fluxo de ferro através deste sistema de transporte é dependente da expressão da ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos e macrófagos reticuloendoteliais, residentes no baço (LAFTAH et al., 2004; SANGKHAE; NEMETH, 2017).

A interação hepcidina-ferroportina desempenha uma função central na regulação da quantidade e distribuição de ferro por todo o corpo. A ferroportina é altamente expressa em

enterócitos e macrófagos duodenais (DONOVAN et al., 2000). Ao ligar-se à ferroportina, a hepcidina promove sua fosforilação, internalização e degradação lisossômica (NEMETH et al., 2004a). Conseqüentemente, quando a concentração de hepcidina circulante está elevada, a absorção e reciclagem de ferro são inibidos. Nos enterócitos, há um bloqueio na absorção do ferro, pois este fica impossibilitado de se ligar à ferroportina e seguir do interior do enterócito para o plasma. O mesmo ocorre nos macrófagos reticuloendoteliais que reciclam o ferro, promovendo seu acúmulo no interior da célula. Com isso, através da sua interação com a ferroportina, a hepcidina reduz a biodisponibilidade do ferro, tornando-o indisponível para hematopoiese (BABITT et al., 2007; CANONNE-HERGAUX et al., 2006; CHASTON et al., 2008; DELABY et al., 2005; LAFTAH et al., 2004; LEE, 2019; MASTROGIANNAKI et al., 2009; RIVERA et al., 2005; THEURL et al., 2008). Há, portanto, um papel importante da hepcidina na determinação da eficiência geral da absorção e utilização de ferro.

### 1.3 Inflamação e metabolismo do ferro

Sabidamente, muitos micro-organismos requerem ferro devido ao seu envolvimento em processos celulares básicos. Dada a associação do ferro e sua potencial utilização por micro-organismos na infecção, é importante reduzir a biodisponibilidade do ferro extracelular a fim de impedir a utilização por patógenos. A descoberta do eixo hepcidina-ferroportina fornece evidências confirmatórias do papel protetor da hepcidina como uma resposta de retenção de ferro (BABITT et al., 2007; CANONNE-HERGAUX et al., 2006; CHASTON et al., 2008; DELABY et al., 2005; LAFTAH et al., 2004; LEE, 2019; MASTROGIANNAKI et al., 2009; RIVERA et al., 2005; THEURL et al., 2008).

Durante a inflamação, citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina-6, estimulam um aumento da expressão da hepcidina circulante (CANALI et al., 2017; NEMETH et al., 2003, 2004b; WRIGHTING; ANDREWS, 2006; ZHANG; ROVIN, 2010). Porém, é importante ressaltar que a hepcidina também é elevada diretamente pela resposta imune inata (ARMITAGE et al., 2011) e é, portanto, aumentada em uma variedade de inflamações.

O impulso fisiológico para redução da biodisponibilidade do ferro com o aumento da expressão da hepcidina na inflamação pode contribuir para o que é chamado de



deficiência funcional de ferro, que pode causar a anemia de inflamação, situação/condição em que os estoques de ferro no organismo são adequados, porém este não se encontra disponível para eritropoiese (WHO, 2004). Fato evidenciado quando, mesmo após a suplementação de ferro, não se observa impacto efetivo na correção do estado de anemia em pacientes que apresentam elevação da PCR (IQBAL et al., 2015).

A utilização da hepcidina como indicador útil da deficiência de ferro em adultos e crianças foi proposta levando-se em consideração a importância da hepcidina como regulador negativo da biodisponibilidade do ferro e, também, que seus níveis séricos se mostram significativamente associados ao estado de ferro no organismo. A hepcidina pode ser considerada como uma ferramenta promissora em testes de diagnóstico para o estado nutricional de ferro porque tem o potencial de diferenciar a anemia por deficiência de ferro ou anemia da inflamação e informar sobre a capacidade de responder à suplementação oral de ferro (BAH et al., 2017; CHOI et al., 2012; GIRELLI; NEMETH; SWINKELS, 2016; PASRICHA et al., 2014).

A inflamação mostra-se como aspecto biológico capaz de impulsionar o desenvolvimento da anemia por meio da hepcidina e pode ser um fator que contribui para a falta de resposta à suplementação de ferro em alguns casos. Portanto, estratégias para controlar a anemia com base exclusivamente na suplementação de ferro provavelmente terão um impacto limitado na resolução desse agravo.

#### **1.4 Vitamina A: deficiência e metabolismo**

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel que desempenha um papel fundamental na visão, crescimento, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e fetal, imunidade e preservação de pele e mucosas. Trata-se de um termo genérico que se refere a diferentes compostos que apresentam diversas atividades metabólicas, como o álcool, aldeído e o ácido, presentes, respectivamente, nas estruturas do retinol, retinaldeído e ácido retinóico (CONAWAY; HENNING; LERNER, 2013; VIDAILHET et al., 2017).

A vitamina A desempenha suas funções principalmente através do ácido retinóico, que é sua principal forma ativa, cujos efeitos são mediados pelos receptores do ácido retinóico e pelos receptores retinóide X. São fatores de transcrição que atuam na regulação de centenas de genes envolvidos em muitos processos, por exemplo, crescimento,

multiplicação e diferenciação celular, imunidade, hematopoiese e homeostase tecidual (CONAWAY; HENNING; LERNER, 2013; VIDAILHET et al., 2017).

As formas ativas dessa vitamina são encontradas em tecidos animais e suas concentrações são maiores no fígado, seu principal órgão de armazenamento. Nos vegetais, encontram-se os carotenoides, que, ao serem metabolizados no organismo, podem produzir retinoides, porém, apenas 50 dos 600 tipos de carotenoides encontrados possuem atividade de pró-vitamina A expressiva, sendo o de maior atividade pró-vitáminica o  $\beta$ -caroteno (DE BRITO NOGUEIRA, 2019; VIDAILHET et al., 2017).

A DVA ocorre quando a reserva de VA no organismo está baixa. Para essa avaliação, utiliza-se um ponto de corte para a concentração sérica de retinol ( $<0,70 \mu\text{mol/L}$ ) (BRASIL, 2013b; WHO, 2011). É considerada uma das mais importantes deficiências nutricionais dos países em desenvolvimento, sendo a principal causa de cegueira evitável. Esta pode ser considerada um problema de saúde pública de fácil prevenção (WHO, 2011). No entanto, sabe-se que a carência subclínica, sem sinais como xerofthalmia e ceratomalacia, pode contribuir para a morbidade e mortalidade em crianças e recém-nascidos, devido a quadros de imunodeficiência de origem exclusivamente nutricional (BRASIL, 2013b; QUEIROZ et al., 2013).

Em nível mundial, a DVA afetou em 2011 proximadamente 19 milhões de mulheres grávidas e 190 milhões de crianças em idade pré-escolar (WHO, 2011). No Brasil, a PNDS-2006 evidenciou que 17,4% das crianças apresentavam DVA. As maiores prevalências foram no Sudeste (21,6%) e Nordeste (19%), porém o problema se estende para todas as regiões do país (BRASIL, 2009). Mais recentemente, o relatório preliminar do ENANI – 2019 mostrou uma prevalência nacional de 6,0% de DVA em menores de cinco anos (UFRJ, 2020). Um estudo realizado com uma amostra probabilística e representativa de crianças menores de 5 anos usuárias do SUS no município do Rio de Janeiro evidenciou que a prevalência de DVA de 13% (CASTRO et al., 2021).

Assim como a anemia, a DVA também pode estar associada a processos inflamatórios. Essa associação foi demonstrada inicialmente pelo aumento da frequência de infecções em ratos com DVA (GREEN; MELLANBY, 1930). Posteriormente, diferentes estudos mostraram a associação entre níveis de retinol ou sinais clínicos de sua deficiência e prevalência de infecções subclínicas, inflamação aguda, diarreia, doenças respiratórias, parasitoses e mortalidade em crianças (KONGSBAK et al., 2006; MAHFUZ et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2016; QUEIROZ et al., 2013; SOMMER et al., 1983).

A DVA compromete o sistema imunológico (KUVIBIDILA et al., 2018), diminuindo a resistência a doenças e infecções e podendo levar levando à morte (MASON et al., 2001). E, ainda, considerando a associação significativa entre inflamação e DVA, evidências sugerem a necessidade de ajuste para inflamação ao estimar a sua prevalência, pois esta se mostra significativamente associada com a redução dos níveis de retinol plasmático (LARSON et al., 2017, 2018). Acredita-se que a inflamação possa reduzir as concentrações de retinol plasmático devido à diminuição nas proteínas de transporte do retinol após 24 horas do início do quadro infeccioso (LARSON et al., 2018). Além da relação dos níveis séricos de retinol e processos inflamatórios, a relação com a deficiência de ferro também vem sendo estudada, conforme descrito a seguir.

### **1.5 Relação entre deficiência de vitamina A e ferro**

A associação entre DVA e anemia ou deficiência de ferro já está bem documentada (CHEN et al., 2009; GONDIM et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016; PETRY et al., 2019; SARAIVA et al., 2014; ZANIN et al., 2015). O retinol sérico apresentou associação direta com níveis de hemoglobina, hematócrito, saturação de transferrina e níveis de ferro (CHEN et al., 2009; DIANA et al., 2019; MARIATH et al., 2010; SILVA et al., 2008). E, ainda, a redução na prevalência de anemia e/ou melhora do quadro de anemia após a suplementação de vitamina A também foram observadas (AHMED; KHAN; JACKSON, 2001; DA CUNHA; CAMPOS HANKINS; ARRUDA, 2018; JIMENEZ et al., 2010; MWANRI et al., 2000). Tais estudos evidenciam uma relação entre vitamina A e ferro.

Há uma relação inversa entre as reservas de vitamina A e ferro no fígado (STAAB et al., 1984). A partir desta informação, foi sugerido que o estado nutricional alterado de vitamina A não interferia diretamente no processo absorptivo do ferro, mas, sim, na mobilização do mineral armazenado em nível hepático e no aumento da utilização na eritropoiese (BLOEM et al., 1990). No entanto, a base do mecanismo da influência do retinol no metabolismo do ferro ainda não era conhecida.

Acreditava-se que a ligação entre ferro e vitamina A devia-se exclusivamente ao fato de ambos serem transportados por proteínas de fase aguda negativa, transferrina e proteína ligadora de retinol (RBP), as quais têm sua síntese reprimida na presença de

infecção. Assim, com baixas concentrações de retinol, a infecção seria mais facilmente instalada e haveria acúmulo de ferro no fígado, causando anemia (BLOEM, 1995; THURNHAM, 1993). A chave dessa hipótese apresentada estava no fato de a vitamina A apresentar propriedades imunológicas (GREEN; MELLANBY, 1930; KUVIBIDILA et al., 2018).

Estudos em animais e culturas celulares foram realizados com objetivo de explorar essa relação, encontrando diferentes mecanismos que sugerem a modulação da homeostase do ferro pelo retinol. Citam-se alguns desses mecanismos de ação da vitamina A: papel na regulação da liberação de ferro do fígado (MEJIA; HODGES; RUCKER, 1979; STAAB et al., 1984); regulação da proteína reguladora de ferro-2 afetando, as expressões gênicas de ferritina e transferrina (JIANG et al., 2012); estímulo da produção de eritropoietina através da regulação de um elemento de resposta da região promotora do gene da eritropoietina (ZIMMERMANN et al., 2006); regulação da expressão de genes hepáticos (MCCLINTICK et al., 2006). No que se refere aos genes hepáticos, destaca-se uma relação com os fatores que ativam a transcrição de hepcidina (ARRUDA; SIQUEIRA; DE VALÊNCIA, 2009; CITELLI et al., 2012; HAN et al., 2018; TSUCHIYA et al., 2009) e o comprometimento da sua via de sinalização (MENDES et al., 2016).

A regulação positiva da expressão da hepcidina promovida pela alteração no estado nutricional de vitamina A pode afetar diretamente a homeostase do ferro com tendência de acúmulo desse mineral no fígado. A DVA, portanto, tem como consequência o aprisionamento do ferro no interior de macrófagos que reciclam glóbulos vermelhos senescentes, tornando-o indisponível para a eritropoiese e, conseqüentemente, para a síntese de hemoglobina (ARRUDA; SIQUEIRA; DE VALÊNCIA, 2009; CITELLI et al., 2012; MENDES et al., 2016; TSUCHIYA et al., 2009).

Considerando a importância da hepcidina como regulador negativo da biodisponibilidade do ferro, destaca-se a relevância em se compreender se a relação entre vitamina A e metabolismo de ferro, observada em modelos experimentais (CITELLI et al., 2012), também ocorre em crianças.

Atualmente não existem evidências que vinculem o estado nutricional de vitamina A aos níveis circulantes de hepcidina em crianças. Porém, um estudo realizado com idosos encontrou níveis séricos de hepcidina significativamente maiores no grupo com DVA comparados com aqueles que apresentavam retinol sérico normal. Os níveis de retinol foram inversamente associados às concentrações de hepcidina, após o ajuste para a condição inflamatória (DE LA CRUZ-GÓNGORA et al., 2019).

A associação entre ferro e vitamina A, através da regulação da expressão da hepcidina, pode justificar, ao menos em parte, porque a suplementação e a fortificação de ferro como medidas de prevenção e controle do quadro de anemia têm impactado positivamente a saúde das crianças, no entanto, isoladamente, não têm conseguido solucionar o problema de saúde pública da anemia.

## 2 JUSTIFICATIVA

O controle e a prevenção de anemia têm destaque nas agendas das políticas públicas de saúde e nutrição, principalmente para grupos onde a ocorrência dessa condição é crítica, como as crianças, que são mais vulneráveis. Isso porque a anemia gera impacto para a saúde e para o crescimento e o desenvolvimento adequados na infância.

Considerando a elevada prevalência de anemia, observa-se que, até o presente momento, as intervenções para tratamento e prevenção não têm sido suficientes para reverter plenamente seus agravos e quadros epidemiológicos. Um dos possíveis motivos para essa aparente limitação em reduzir a prevalência de anemia é que muitos programas e suas intervenções são elaborados com o pressuposto apenas de corrigir o aporte de ferro. Isso significa que o papel de outras causas pode ter sido subestimado.

Sugere-se que, em muitos casos, a eficácia do tratamento da anemia esteja ligada à participação complexa de outros fatores que contribuem para o surgimento desse quadro. É possível que uma deficiência funcional de ferro se desenvolva mesmo quando as reservas de ferro apresentam níveis adequados. Isso ocorre mais comumente na presença de inflamação pela ação da hepcidina, marcador do metabolismo do ferro que reduz sua biodisponibilidade.

A deficiência de outros nutrientes, como a vitamina A, também pode estar associada ao desenvolvimento da anemia. Estudos com animais e com a população idosa evidenciaram uma associação inversa entre os níveis de retinol e de hepcidina. Com isso, observa-se que a relação entre retinol e hepcidina precisa ser elucidada a fim de melhorar o entendimento da relação entre vitamina A e hepcidina ou anemia em crianças.

O presente estudo tem como objetivo estudar a associação da vitamina A com anemia e concentrações séricas de hepcidina em crianças menores de cinco anos. É sugerido como hipótese que o DVA seja preditivo de anemia devido à sua influência na hepcidina. Os resultados deste estudo podem contribuir com estratégias de prevenção e tratamento da anemia.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a associação do retinol sérico com níveis de hepcidina e com anemia em crianças de 6 a 59 meses.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar se as concentrações de retinol sérico modificam as chances de ocorrência de anemia.

Avaliar a influência das concentrações de retinol sérico na inflamação.

Avaliar a influência das concentrações de retinol sérico sobre as concentrações séricas de hepcidina.

Verificar a influência dos indicadores socioeconômicos na associação entre as concentrações séricas de retinol e hepcidina.

## 4 MÉTODOS

O presente estudo é um desdobramento do estudo “Anemia e deficiência de vitamina A em pré-escolares: magnitude em uma grande metrópole e validação de métodos diagnósticos”, fruto da parceria entre a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), a Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), a Escola Nacional de Saúde Pública e o Instituto Nacional de Câncer.

Frente à adoção, em 2005, pelo Ministério da Saúde, da suplementação profilática universal com megadoses de vitamina A para crianças menores de cinco anos em realidades em que a deficiência deste nutriente não era reconhecida como endêmica, o objetivo desse estudo maior foi avaliar o estado nutricional de crianças usuárias do SUS do município do Rio de Janeiro a fim de examinar a pertinência da implementação desta ação profilática. Foram selecionadas crianças de 6 a 59 meses, sendo excluídas do estudo se aquelas que apresentaram doenças infecciosas agudas que poderiam interferir no diagnóstico de anemia ou DVA, como pneumonia e otite, entre outras, além de anemia falciforme e hepatopatias (CARNEIRO et al., 2020; PEREIRA et al., 2020).

### 4.1 Desenho do estudo, população de estudo e amostragem

Estudo transversal que foi realizado com uma subamostra de crianças de 6 a 59 meses de idade assistidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do SUS no município do Rio de Janeiro, oriundas do estudo maior citado anteriormente.

O cálculo do tamanho amostral foi realizado no programa Stata® v.10. Levaram-se em consideração valores de correlação entre concentrações de retinol e hepcidina como variáveis contínuas com os seguintes parâmetros: R1 (ausência de relação) de 0.00, R2 (valor observado na literatura) 0.40 (DE LA CRUZ-GÓNGORA et al., 2019), precisão absoluta do estudo de 0.10 e nível de confiança de 95%. Aplicando-se esses parâmetros, chegou-se a um total de 62 crianças (BUJANG; BAHARUM, 2016). O banco de dados utilizado dispõe, para 312 crianças, das variáveis de interesse para o presente estudo.



## 4.2 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada de julho a dezembro de 2014, gerando o banco de dados que foi utilizado pelo presente estudo.

Foi realizada entrevista com a mãe ou responsável para preenchimento do questionário contendo perguntas sobre caracterização sociodemográfica. Foram coletadas as medidas antropométricas da criança (massa corporal em balança portátil Tanita® e comprimento (menores de dois anos com antropômetro Sanny®) ou estatura (dois ou mais anos de idade com antropômetro Altuxata®). A avaliação do estado nutricional foi realizada utilizando-se o escore z das curvas de referências a OMS: peso para idade (P/I), altura para idade (E/I) e índice de massa corporal para idade (IMC/I) foram calculados usando os dados de referência de crescimento (WHO, 2009).

A coleta das amostras de sangue por punção venosa foi realizada por técnicos em Patologia Clínica treinados pela coordenação do projeto e com experiência em coleta de sangue de crianças. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em dois tubos: um com gel separador para análise do retinol e outro com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) para análise da hemoglobina.

Com o objetivo de separar o soro do plasma, após 20 minutos da coleta, os tubos com gel separador foram centrifugados por 10 minutos em centrífuga portátil da marca Centribio, modelo 80-2B, velocidade de 4000 RPM, sendo, em seguida, armazenados em estante para tubos, na posição vertical. Estes mesmos tubos foram envolvidos em papel alumínio para evitar exposição à luz e mantidos a 4°C até o momento do transporte para o laboratório, sendo então transportados em temperatura de no máximo 8°C até quatro horas após a coleta do sangue.

## 4.3 Análise Laboratorial

O processamento das amostras de sangue para realização do hemograma completo e para armazenamento das alíquotas de soro foi realizado no Laboratório de Lípidos (LabLip) da UERJ. As alíquotas de soro foram armazenadas a -80°C até o momento das análises. A quantificação de PCR em soro era realizada no mesmo dia da coleta. No caso do retinol

sérico, as análises foram realizadas em no máximo três semanas após a coleta de sangue. A quantificação da hepcidina sérica foi realizada em até 18 meses após a coleta. As amostras contidas no tubo com EDTA foram utilizadas para a realização do hemograma completo, que se deu no mesmo dia em que o sangue foi coletado.

Para determinação do hemograma completo, o sangue foi submetido à contagem automatizada no Contador Hematológico Automatizado XS1000i Sysmex®, utilizando-se Kit: Stromatolyser - 4 DS – marca Sysmex. Foram obtidos dados de dosagem de hemoglobina, determinação de hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e contagem de leucócitos.

As alíquotas de soro foram transportadas até o Laboratório de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição (LFBN), acondicionadas em gelo seco. O retinol sérico foi dosado pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), no LFBN da UERJ, utilizando-se método de extração adaptada (HESS et al., 1991). Para cada 280 µL de soro foram adicionados 700 µL de etanol:água (2:1) e 800 µL de hexano (Tedia; grau de pureza para CLAE). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em agitador automático e centrifugadas a 1500 x g durante 3 minutos, em temperatura ambiente. Foram transferidos 560 µL da fase apolar para um tubo (denominado tubo 1) e adicionados 700 µL de hexano à fase polar (denominado tubo 2). A mistura foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a centrifugação, foram recolhidos 560 µL da fase apolar, os quais foram adicionados ao tubo 1. Ao tubo 2 foram adicionados 600 µL de hexano. A mistura foi homogeneizada e centrifugada novamente, e a fase apolar foi novamente recolhida e adicionada ao tubo 1. O volume final de sobrenadante do tubo 1 foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio, em temperatura ambiente. Para a análise cromatográfica do retinol, o extrato seco foi suspenso em 300 µL de metanol (Tedia; grau de pureza para CLAE). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna tipo C18 (Kromasil®, 150 mm x 4,6 mm); fase móvel: 100% metanol; fluxo: 1,0 ml/minuto; temperatura de 25°C; Detector UV/Vis/DAD (do inglês: *diode array detector*) = 325 nm, volume de injeção de 5 µL; equipamento CLAE, Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity (PEREIRA, 2018).

As concentrações séricas de proteína C reativa ultrasensível (PCRus) foram analisadas por nefelometria (Biosystems). Foi realizado ensaio imunoenzimático para as análises de ferritina sérica (kit Symbiosys, ALKA Tecnologia®, São Paulo, Brasil) e hepcidina-25 sérica bioativa (DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemanha). As instruções

dos fabricantes foram seguidas para realização destas análises.

#### 4.4 Variáveis de interesse

As variáveis sociodemográficas e de saúde incluídas foram sexo, faixa etária, renda familiar em dólares americanos, escolaridade da mãe, presença de anemia (nível de hemoglobina  $<11$  g/dL) [2], anemia ferropriva (nível de hemoglobina  $<11$  g/dL e nível de ferritina  $<12\mu\text{g} / \text{L}$  quando  $\text{PCR} \leq 5$  mg / L; ou ferritina  $<30 \mu\text{g} / \text{L}$  quando  $\text{PCR} > 5$  mg/L [7] e VAD (nível de retinol  $<0,70 \mu\text{mol} / \text{L}$ ) [34], ou VAD ajustado para inflamação [35], P/I, E/I e IMC / A. O desfecho primário foi o nível de hepcidina (ng/mL), que foi analisado como uma variável contínua. As seguintes variáveis foram testadas como variáveis de predição do nível de hepcidina: nível de retinol sérico ( $\mu\text{mol/L}$ ), parâmetros hematológicos e bioquímicos (níveis de ferritina [ $\mu\text{g/L}$ ], hemoglobina [g / dL], hematócrito [%], volume corpuscular médio (MCV) [fL], hemoglobina corpuscular média (MCH) [pg], concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC) [%] e leucócitos [mil /  $\text{mm}^3$ ]), IMC/I (escore z) e nível de PCR (mg / L). Os grupos de sexo e idade foram incluídos como variáveis de ajuste.

#### 4.5 Análise de dados e tratamento estatístico

Os dados foram analisados com o software STATA, versão 13.0 (StataCorp LLC, College Station, TX, EUA). Foi realizada análise descritiva dos dados e as distribuições de frequência, medidas de tendência central e dispersão. Para análise da normalidade das variáveis contínuas, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk.

Como a variável de desfecho apresentou distribuição assimétrica positiva, foi utilizado o modelo linear generalizado (GLM), família gama, função de identidade para avaliar a associação entre os níveis de hepcidina, níveis de retinol sérico, outros parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito, HCM, VCM, CHCM e ferritina), PCR e IMC/I. As análises foram realizadas com e sem ajuste para PCR, ambos ajustados para sexo e idade, renda familiar e escolaridade da mãe, seguindo o protocolo *backward*.

Foi realizada análise de regressão logística múltipla, na qual a anemia foi testada como desfecho e os níveis de retinol e PCR como variáveis preditoras após o ajuste para sexo e idade. Tanto na análise logística quanto na GLM, as variáveis que apresentaram  $p < 0,2$  nas análises simples foram incluídas nos modelos de regressão múltipla. Posteriormente, foi adotado um valor de significância de 5% para as análises de regressão múltipla para obtenção do modelo final.

Foram realizadas análises de regressão linear simples em que a PCR (mg / L) foi considerada como variável dependente e o retinol ( $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) ou VAD (presença) como variáveis independentes. As variáveis de ajuste foram idade, sexo, renda familiar, escolaridade materna e Z-IMC / I. Foi adotado um valor de significância de 5%.

#### 4.6 Aspectos éticos

O estudo “Anemia e deficiência de vitamina A em pré-escolares: magnitude em uma grande metrópole e validação de métodos diagnósticos” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro sob o número 203A/2013 (Apêndice A).

Os pais ou responsáveis foram esclarecidos quanto aos riscos e benefícios de participação no estudo. Foram estudadas somente as crianças cujos pais ou responsáveis concordaram com sua participação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Assentimento.

Os resultados dos exames de sangue foram devolvidos pelos pesquisadores diretamente aos responsáveis das crianças estudadas em data pré-agendada. As crianças que apresentaram alguma intercorrência foram encaminhadas para atendimento na UBS em que foi realizado o estudo.

O estudo traz como benefícios: a possibilidade de relacionar variáveis que interferem no metabolismo do ferro e se relacionam diretamente com a anemia entre crianças, o que poderá subsidiar o direcionamento de futuras intervenções a serem adotadas por profissionais.

#### **4.7 Financiamento**

O presente estudo foi financiado Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 480804/2013-3 e 408401/2017-6), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

## 5 RESULTADOS

5.1 **Artigo:** Association of vitamin A with anemia and serum hepcidin levels in children aged 6 to 59 months

Submetido ao periódico “Nutrition” em 11 de Maio de 2021

### **Association of vitamin A with anemia and serum hepcidin levels in children aged 6 to 59 months**

Amanda de Paula Silva<sup>1</sup>, Alessandra da Silva Pereira<sup>2</sup>, Bruno Francisco Teixeira Simões<sup>3</sup>, Juliana Omena<sup>1</sup>, Cláudia dos Santos Cople-Rodrigues<sup>1</sup>, Inês Rugani Ribeiro de Castro<sup>1</sup>, Marta Citelli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Escola de Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

\*Corresponding author:

Marta Citelli

Departamento de Nutrição Básica e Experimental,

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 20550-900, Rio de Janeiro, Brazil

[martacitelli@gmail.com](mailto:martacitelli@gmail.com)

E-mail addresses: [amanda.de.paula@hotmail.com](mailto:amanda.de.paula@hotmail.com) (A. Silva), [aspnutri@gmail.com](mailto:aspnutri@gmail.com) (A. Pereira), [bruno.simoed@uniriotec.br](mailto:bruno.simoed@uniriotec.br) (B. Simões), [omenaju@gmail.com](mailto:omenaju@gmail.com) (J. Omena), [claudiacople@gmail.com](mailto:claudiacople@gmail.com) (C. Cople-Rodrigues), [inesrrc@uol.com.br](mailto:inesrrc@uol.com.br) (I. Castro), [martacitelli@gmail.com](mailto:martacitelli@gmail.com) (M. Citelli).

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Luísa Melo for excellent technical assistance.

**Financial Support:** This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processes # 480804/2013-3 and 408401/2017-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Finance Code 001) and Health Secretariat of the Municipality of Rio de Janeiro (Finance Code 00).

**Conflict of Interest:** None.

**Abstract**

**Objective:** To evaluate the association between serum retinol, hepcidin levels and anemia in children.

**Methods:** This cross-sectional study included 312 children, aged 6–59 months, from Rio de Janeiro, Brazil. The association between hepcidin and retinol levels, hematological parameters and body mass index (BMI) was analyzed using a generalized linear model with and without adjustment for CRP level. Logistic regression analysis was used to test anemia as an outcome and serum retinol level as a predictive variable using the odds ratio (OR) function.

**Results:** Anemia was present in 14.6% of the children, 5.8% presented iron deficiency anemia and 9.6% had vitamin A deficiency. The increase in serum retinol levels reduced the chances of anemia (OR = 0.13; confidence interval = 0.29–0.59). When CRP level was not adjusted for in the multiple regression analyses, retinol, ferritin levels and BMI/age were predictors of serum hepcidin levels ( $\beta = -3.36, 0.14, 1.02$ , respectively;  $p = 0.032$ ). Accordingly, serum retinol levels were inversely associated with CRP levels ( $\beta = -0.025$  and  $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** The association between serum retinol and hepcidin levels in children aged 6–59 months seems to be dependent on inflammation. Taken together, the results reinforce the need for the development of further studies to better understand the relationship between vitamin A and anemia of inflammation.

**Keywords:** Retinol; Anemia; Inflammation; Hepcidin, Children.

Abbreviations: BMI, body mass index; BMI/A, body mass index for age; CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; H/A, height/age; OR, odds ratio; PHC, Primary health care; SUS, Sistema Único de Saúde; VAD, Vitamin A deficiency; W/A, weight/age

## Introduction

Anemia and vitamin A deficiency (VAD) are major public health problems [1-3]. Worldwide, anemia affects approximately 273 million children (42.6%) and VAD is detected in approximately 190 million preschool aged children (33.3%) [2,3]. In Brazil, a preliminary report of the National Study on Child Food and Nutrition (ENANI - 2019) has shown that the national prevalence of anemia and VAD is 10.0% and 6.0%, respectively, among children under five years of age [1].

The main causes of anemia are believed to be iron deficiency and inflammation, and the high risk groups are infants, preschoolers, women of reproductive age, and pregnant women [2,4,5]. Iron deficiency anemia can cause functional changes in the body, such as delayed development, impaired cellular immunity, and decreased intellectual capacity [6]. Iron deficiency may occur due to several causes, such as inadequate intake, increased loss, changes in absorption pattern, or changes in bioavailability of iron.

It is possible that a functional deficiency of iron develops even when the iron stores in the body are adequate due to changes in iron homeostasis, as it occurs in the presence of inflammation [5,7]. Anemia of inflammation has been characterized as mild to moderately severe anemia, with hemoglobin concentrations ranging from 7 to 12 g/dL [5]. It develops in the context of systemic inflammation, due to the decrease in red blood cell production, and it is accompanied by a modest reduction in half-life of red blood cells. Unlike iron deficiency anemia, in anemia of inflammation, iron stores are preserved. Thus, anemia of inflammation is primarily a disorder of iron distribution [5].

Iron homeostasis is regulated by two main mechanisms: intracellular and systemic. Systematically, iron balance requires communication between absorption, use, and storage, which is carried out through hepcidin; hepcidin is a hormone that acts as a negative regulator of serum iron concentration and plays a key role in iron homeostasis in the body. Inflammatory processes activate its synthesis, and its action consists of blocking the duodenal absorption of iron and efflux of iron from reticuloendothelial macrophages that recycle senescent red blood cells [8–10]. Therefore, the relationship between hepcidin and inflammation can contribute to the development of anemia of inflammation [5, 7]. Relatively mild systemic inflammatory states, such as obesity, are clinically relevant and may induce the increase in serum hepcidin levels [5, 11].

VAD has also been linked to inflammatory processes [12–14,15]. Inflammation can cause or be caused by VAD [16]. The existence of a relationship between VAD and anemia is well recognized [17-19]. It is also known that vitamin A supplementation reduces the



prevalence of anemia [14,20,21]. This relationship can be explained by several vitamin A related biological mechanisms, such as the increase in the growth and differentiation of erythrocyte progenitor cells [14,22], potentiation of immunity, reduction of inflammation [28,29], and modulation of bioavailability and mobilization of tissue iron stores [25–37], which may be influenced by inflammation [5,14,20,21]. However, the pathogenesis of anemia due to VAD has not been well characterized.

Experimental studies have shown that vitamin A induces the synthesis of proteins responsible for iron transport in duodenal cells and that VAD increases hepcidin gene expression [26,27] and compromises its signaling pathway [28]. Therefore, it is plausible that in humans retinol may affect iron homeostasis through hepcidin modulation and that VAD can lead to the accumulation of this mineral in tissues.

The present investigation aimed to study the association between retinol and hepcidin levels in children under five years of age. It is suggested that VA is predictive of anemia due to its influence on hepcidin levels. The results of this study can contribute to strategies for the prevention and treatment of anemia.

## **Methods**

This was a cross-sectional study carried out with a sub-sample of children aged 6 months to 59 months, who were under the Primary Health Care (PHC) of public health system (Sistema Único de Saúde; SUS) in the city of Rio de Janeiro, from a larger study entitled “Anemia and vitamin A deficiency in preschoolers: magnitude in a large metropolis and validation of diagnostic methods (VITANEMIA)” [32] that studied a probabilistic sample of this group. Children with infectious diseases, such as pneumonia and otitis, sickle cell disease, and liver diseases were excluded from the study.

The size of the sub-sample used in the present study was calculated using the Stata® v.13 program. Correlation values between retinol and hepcidin levels were considered as continuous variables with the following parameters: R1 (null value) of 0.00, R2 (value observed in the literature) of 0.40 [29], absolute study precision of 0.10, and 95% confidence interval [30]. By applying these parameters, the calculated sample size was 62 children. For the development of this study, a database of 312 children that included the variables of interest was used.

The Rio de Janeiro Municipal Health Office Ethics Committee for Research with Humans (no. 203A/2013) approved this study. The study was conducted only on children

whose parents or guardians agreed to their participation and signed a free and informed consent form.

#### *Data collect*

Data were collected from July to December 2014. The guardians who agreed to participate in the study attended the PHC and answered a questionnaire about sociodemographic characteristics, their child's health status, and other data of interest related to the larger study.

Blood samples were collected by venipuncture by trained clinical pathology technicians with experience in collecting blood from children. After collection, the samples were placed in two tubes: one with a gel clot activator for retinol and hepcidin levels and other serum analyses and the other with ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) for hemoglobin analysis. The gel clot activator tube was centrifuged for 10 min in a CentriBio portable centrifuge (model 80-2B, speed of 4000 rpm), kept at 8°C for up to four hours after blood collection, and protected from light. The serum was then aliquoted in amber tubes and stored at -80°C until analysis. Weight was measured using a portable Tanita® scale. Length was measured using an anthropometer Sanny®, and height was measured using Altuxata®. Trained professionals measured the weight, length, and height. Nutritional status was assessed using the following indices: weight/age (W/A), height/age (H/A), and body mass index for age (BMI/A) were calculated using the growth reference data [31]. More details are available from previously published studies [32].

#### *Laboratory analysis*

Blood samples were processed for hemoglobin analysis at the Lipids Laboratory of our University. The EDTA tube was subjected to automated counting in an Automated Hematological Counter XS1000i Sysmex® using a Stromatolyser-4 DS-Sysmex on the same day that the blood was collected. Serum retinol was measured by high performance liquid chromatography at the Physiopathology and Nutrition Biochemistry Laboratory of our University using an adapted extraction method [33]. Serum concentrations of ultrasensitive C-reactive protein (CRP) were analyzed using nephelometry (Biosystems). An immunoenzymatic assay was performed to analyze serum ferritin (Symbiosys kit, ALKA Tecnologia®, São Paulo, Brazil) and bioactive serum hepcidin-25 levels (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). The manufacturer's instructions were followed.

The coefficient of variation of the measurements of retinol, hepcidin, ferritin, CRP and hemoglobin levels were 7.7%, 5.4%, 2.5%, 8.8% and 0.45%, respectively.

### *Variables of interest*

Sociodemographic and health variables included were sex, age group, family income in American dollars, mother's education, presence of anemia (hemoglobin level < 11 g/dL) [2], iron deficiency anemia (hemoglobin level < 11 g/dL and ferritin level < 12 µg/L when CRP was ≤ 5 mg/L; or ferritin < 30 µg/L when CRP was > 5 mg/L [7], and VAD (retinol level < 0.70 µmol/L) [34], or VAD adjusted for inflammation [35], W/A, H/A, and BMI/A. The primary outcome was hepcidin level (ng/mL), which was analyzed as a continuous variable. The following variables were tested as hepcidin level prediction variables: serum retinol level (µmol/L), hematological and biochemical parameters (levels of ferritin [µg/L], hemoglobin [g/dL], hematocrit [%], mean corpuscular volume (MCV) [fL], mean corpuscular hemoglobin (MCH) [pg], mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) [%], and leukocytes [thousand/mm<sup>3</sup>]), BMI (z-score), and CRP level (mg/L). Sex and age groups were included as adjustment variables.

### *Data analysis and statistical treatment*

Data were analyzed using STATA software (version 13.0; StataCorp LLC, College Station, TX, USA). Descriptive analysis of the data was performed. The frequency distributions, measures of central tendency, and dispersion were calculated. A Shapiro-Wilk test was used to analyze the normality of the continuous variables.

As the outcome variable (hepcidin) presented positive asymmetric distribution, we used a generalized linear model (GLM) with gamma family identity function to assess the association between hepcidin levels, serum retinol levels, other hematological parameters (levels of hemoglobin, hematocrit, MCH, MCV, MCHC and ferritin), CRP level, and BMI. The analyses were performed with and without adjusting for CRP levels. In both analyses, sex, age, family income in American dollars, and mother's education were adjusted for, following the backward protocol.

Multiple logistic regression analysis was performed, in which anemia was tested as an outcome and retinol and CRP levels as predictor variables after adjusting for sex and age. In both logistic and GLM analyses, variables that presented  $p < 0.2$  in the simple analyses were included in the multiple regression models. Subsequently, a significance value of 5% was adopted for the multiple regression analyses to obtain the final model.

Simple linear regression analyses were performed in which CRP (mg/L) was considered as the dependent variable and retinol ( $\mu\text{mol/L}$ ) or VAD (presence) as the independent variables. The adjustment variables were age, sex, family income, maternal education and Z-BMI/A. A significance value of 5% was adopted.

## Results

In this study, 312 children aged 6 to 59 months were included. Of these, approximately 67% were older than 24 months and 52% were male (Table 1). The prevalence of anemia and VAD was 14.6% and 9.6%, respectively, and 5.8% of the children presented iron deficiency anemia. Due to the study design, in which all children were users of the SUS, maternal education was primarily at secondary school level and the family income was mostly less than \$619.

Table 1: Distribution of selected characteristics of children aged 6 to 59 months from Brazil.

| <b>Sociodemographic and health variables</b> | <b>n (%)</b> |
|----------------------------------------------|--------------|
| <b>Sex</b>                                   |              |
| Female                                       | 151 (48.40)  |
| Male                                         | 161 (51.60)  |
| <b>Age range (months)</b>                    |              |
| 6-23                                         | 104 (33.33)  |
| 24-59                                        | 208 (66.67)  |
| <b>Weight/age (z score)<sup>1</sup></b>      |              |
| < -3.0                                       | 2 (0.64)     |
| -3.0   -2.0                                  | 2 (0.64)     |
| -2.0   -1.0                                  | 288 (92.31)  |
| > 2.0                                        | 20 (6.41)    |
| <b>Height/age (z score)<sup>1</sup></b>      |              |
| < -3.0                                       | 2 (0.64)     |
| -3.0   -2.0                                  | 13 (4.17)    |
| $\geq$ -2.0                                  | 297 (95.19)  |
| <b>BMI/age (z score)<sup>1</sup></b>         |              |
| < -3.0                                       | 2 (0.64)     |
| -3.0   -2.0                                  | 0 (0.00)     |

|                                                                 |             |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| -2.0 † 1.0                                                      | 204 (65.38) |
| 1.0 † 2.0                                                       | 74 (23.72)  |
| 2.0 † 3.0                                                       | 23 (7.37)   |
| > 3.0                                                           | 9 (2.88)    |
| <b>Family income in American dollars</b>                        |             |
| < 155                                                           | 8 (2.58)    |
| 155–309                                                         | 29 (9.35)   |
| 310–619                                                         | 136 (43.80) |
| 620–929                                                         | 59 (19.03)  |
| ≥ 930                                                           | 53 (17.10)  |
| Did not know how to inform                                      | 25 (8.06)   |
| <b>Mother's education</b>                                       |             |
| Lower primary school                                            | 64 (20.71)  |
| Primary school                                                  | 99 (32.04)  |
| Secondary school                                                | 133 (43.04) |
| Higher education                                                | 11 (3.56)   |
| <b>Prevalence of anemia<sup>2</sup></b>                         | 45 (14.56)  |
| <b>Iron deficiency anemia<sup>3</sup></b>                       | 18 (5.80)   |
| <b>Prevalence of VAD<sup>4</sup></b>                            | 30 (9.62)   |
| <b>Prevalence of VAD, adjusted for inflammation<sup>5</sup></b> | 29 (9.32)   |
| <b>CRP &gt; 5 mg/L</b>                                          | 1 (0.32)    |

---

<sup>1</sup>Classification according to World Health Organization [31]. <sup>2</sup>Presence of anemia: hemoglobin level <11 g/dL [2]. <sup>3</sup>Presence of iron deficiency anemia: hemoglobin level < 11 g/dL and ferritin <12 µg/L when CRP is ≤ 5 mg/L or ferritin < 30µg/L when CRP is > 5 mg/L [7]. <sup>4</sup>Presence of VAD: retinol level <0.70µmol/L [34]. n = 312. <sup>5</sup>Prevalence of VAD, adjusted for inflammation [35]. BMI, body mass index; VAD, vitamin A deficiency; CRP, C-reactive protein.

As shown in Table 2, the studied children did not present high levels of inflammation, which was expected based on the exclusion criteria. Retinol P25 levels were found to be above the value considered adequate, corroborating the low prevalence of VAD. In addition, the median ferritin and P25 values were above the lower limit, corroborating the finding of a low prevalence of iron deficiency among the children.

**Table 2:** Retinol status, iron and inflammatory markers of children aged 6 to 59 months.

| Variables                             | Median (IQR)  | P25   | P75   |
|---------------------------------------|---------------|-------|-------|
| Hepcidin (ng/mL)                      | 6.57 (6.24)   | 4.48  | 10.72 |
| Hemoglobin (g/dL)                     | 11.90 (1.30)  | 11.30 | 12.60 |
| Ferritin ( $\mu\text{g/L}$ )          | 31.00 (29.00) | 16.00 | 45.00 |
| Hematocrit (%)                        | 35.80 (3.70)  | 34.00 | 37.70 |
| Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ )         | 1.00 (0.32)   | 0.84  | 1.16  |
| CRP (mg/L)                            | 0.04 (0.22)   | 0.01  | 0.23  |
| Leukocytes (thousand/ $\text{mm}^3$ ) | 8.70 (3.90)   | 7.00  | 10.90 |

CRP, C-reactive protein; IQR, interquartile range.

Logistic regression showed that an increase in serum retinol level of 1  $\mu\text{mol/L}$  reduced the chances of anemia occurring by 87% (OR = 0.13) in children aged 6 to 59 months (Table 3). On the other hand, VAD was not significantly associated with anemia (Table 3). Similarly, serum retinol levels were inversely associated with serum CRP levels ( $\beta = -0.2317$ ,  $p = 0.006$ ; CI = -0.398 to -0.065; data not shown) but VAD was not significantly associated with CRP concentrations ( $\beta = -0.4429$ ,  $p = 0.070$ ; CI = -0.9221 to 0.0362; data not shown).

**Table 3:** Logistic regression analyses with anemia as the dependent variable

| Independent variables         | $\beta$ | OR   | 95% CI       | p       |
|-------------------------------|---------|------|--------------|---------|
| Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ ) | - 2.08  | 0.13 | 0.029 – 0.56 | < 0.001 |
| Presence of VAD               | 0.473   | 1.61 | 0.578 – 4.46 | 0.364   |

Adjustment were made for sex, age, BMI/A (z-score), family income and mother's education. BMI, body mass index; VAD, vitamin A deficiency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

The simple analyses showed a direct and significant association between hepcidin level and CRP level ( $\beta = 11.33$ ,  $p < 0.001$ ), ferritin level ( $\beta = 0.15$ ,  $p < 0.001$ ), leukocyte counts ( $\beta = 0.81$ ,  $p < 0.001$ ), W/A ( $\beta = 0.78$ ,  $p = 0.08$ ), BMI/A ( $\beta = 1.17$ ,  $p < 0.01$ ), and an inverse and significant association with retinol ( $\beta = -3.67$ ,  $p = 0.06$ ) (data not shown).

When performing multiple regression analysis, retinol was not significantly associated with hepcidin ( $p = 0.36$ ). However, in the crude model, without adjustment for CRP level, serum retinol, ferritin, and BMI/A ( $\beta = -3.36$ , 0.14, 1.02, respectively) remained in the final model (Table 4). The socioeconomic indicators included in the model did not influence hepcidin levels in the study population. Alternatively, VAD was tested as an

independent variable, replacing retinol concentrations. However, in both the crude and the CRP-adjusted model, VAD was not significantly associated with hepcidin (data not shown).

**Table 4:** Generalized linear model analyses with hepcidin as the dependent variable

|                               | Not adjusted for CRP |               |         | Adjusted for CRP |              |         |
|-------------------------------|----------------------|---------------|---------|------------------|--------------|---------|
|                               | $\beta$              | 95% CI        | p       | $\beta$          | 95% CI       | p       |
| Retinol ( $\mu\text{mol/L}$ ) | -3.36                | -6.38 – -0.33 | 0.03    | -1.43            | -4.19 - 1.33 | 0.309   |
| Ferritin ( $\mu\text{g/L}$ )  | 0.14                 | 0.09 – 0.19   | < 0.001 | 0.10             | 0.06 – 0.15  | < 0.001 |
| BMI/A (z-score)               | 1.02                 | 0.43 – 1.61   | < 0.001 | 0.70             | 0.20 – 1.21  | 0.010   |
| CRP (mg/L)                    | -                    | -             | -       | 8.06             | 3.72 – 12.40 | < 0.001 |

GLM to assess the association between hepcidin levels, serum retinol levels, hematological parameters, CRP level and BMI/A. The analyses were performed with and without adjustment for CRP, both adjusted for sex and age, family income and mother's education. AIC = 6.5183. BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; AIC, Akaike information criterion.

## Discussion

In this study, serum retinol levels were associated with serum hepcidin levels, and this association was dependent on inflammation. To the best of our knowledge, this is the first study to assess this association in children aged 6–59 months. Inflammation is known to greatly increase hepcidin synthesis, which is important in the pathogenesis of anemia of inflammation [5]. The results here presented suggest that vitamin A perhaps may play a role in the pathophysiology of anemia of inflammation, in which hepcidin is an important mediator, corroborating findings from previous experimental studies [25–28].

We observed that an increase in serum retinol level reduced the chances of anemia. Although the biological mechanisms by which VA can modulate the development of anemia are not completely clear, it is known that VA is necessary for hematopoiesis [22]. Furthermore, previous data indicated that vitamin A deficiency (VAD) can induce and aggravate inflammation [16,23,24]. It is known that the production of hepcidin is increased in the presence of inflammation as a defense mechanism of the human body to decrease the extracellular availability of iron. This may lead to functional iron deficiency, and consequently, anemia of inflammation [5,36,37]. These data supported a line of reasoning in which VAD could modulate hepcidin and cause anemia. However, in the present study, VAD was not significantly associated with CRP, hepcidin or anemia, but serum retinol

concentrations were inversely and significantly associated with CRP, hepcidin and anemia. In the multiple regression model without adjustment for CRP level, an inverse and statistically significant association between retinol and hepcidin levels was observed. This association did not occur when the model was adjusted for CRP level. This result is in agreement with the possibility that inflammation might modulate the association between retinol and hepcidin. It is worth noting that relatively mild systemic inflammatory states may induce the increase in serum hepcidin levels [5, 11].

As far as we know, only one study previously investigated the association between hepcidin and retinol. A cross-sectional study carried out in Mexico with 783 individuals over 60 years of age showed that hepcidin levels, after adjusting for sex, age, and inflammation, were significantly higher in the group with VAD than in the group without VAD, showing that VAD status was inversely associated with hepcidin levels [29].

Further studies are needed to elucidate how the iron regulatory system works in children and to identify the factors that can lead to anemia of inflammation in preschoolers. It is worth mentioning that the children studied here had at most low-grade chronic inflammation, which, nevertheless, appeared to influence serum hepcidin levels. Furthermore, hepcidin serum levels can vary during human growth and development [3,38-40].

In the present study, BMI/A was directly associated with serum hepcidin levels, independent of inflammation. Previously, a study carried out in the State of Bahia, Brazil with 376 children showed that overweight children had a higher prevalence of tissue iron deficiency, as measured by serum ferritin level (30.6 vs. 12.5%, respectively;  $p = 0.002$ ) and chronic inflammation (alpha acid glycoprotein-1  $> 25 \mu\text{mol/L}$ ) (18.9 vs. 10.0%, respectively;  $p = 0.025$ ), compared with their normal-weight counterparts. Tissue iron deficiency in those preschoolers was associated, at least in part, with adipose-related inflammation. The role of adiposity-related inflammation in tissue iron deficiency should always be considered, even among groups of children with a relatively low prevalence of overweight [11].

Given that anemia and VAD are more prevalent in the lower socioeconomic strata [3,13], socioeconomic indicators were included in the multiple regression model. However, possibly due to the socio-economic homogeneity of the studied sample, we were able to verify that the relationship between vitamin A and hepcidin levels seems to exist regardless of the influence of socioeconomic conditions.



In addition, the inverse association observed between serum retinol and CRP levels corroborates the protective effect that retinol seems to exert against anemia, wherein an increase of 1  $\mu\text{mol/L}$  retinol reduced the chances of anemia by 87%. The association between VAD and anemia is well documented [19,41-43]. Serum retinol level has been shown to be directly associated with hemoglobin, hematocrit, transferrin saturation, and iron levels [41,44]. However, in the present study, VAD was not associated with hepcidin while retinol concentrations were. Inflammation is believed to reduce plasma retinol levels due to a decrease in the concentration of retinol transport proteins 24 h after the onset of infection [35]. However, a reduction in the prevalence of anemia and/or an improvement in anemia after vitamin A supplementation has also been observed [14,20,21,45].

Here, the observed prevalence of VAD was 9.6%. Since 2005, the Ministry of Health of Brazil has been developing the National Vitamin A Supplementation Program in areas considered to be at risk. In 2012, the program was expanded to the entire country, including the Southeast region (area where the study is located). Important measures were implemented by the program for children: promotion of exclusive breastfeeding up to the 6th month and complementary breastfeeding up to 2 years of age or more; promotion of adequate and healthy diet, ensuring information to encourage the consumption of foods sources of vitamin A by the population; periodic and regular prophylactic supplementation of children aged 6 to 59 months, with megadoses of vitamin A. Currently, the program has been less effective, but the data analyzed in this study were collected in 2014, when these public policies were more effective.

The results of the present study corroborate previous findings [46,47] regarding the association between hepcidin and ferritin levels or another indicator of iron stores in the body. Limitations of the present study include the cross-sectional design, which limits the ability to infer causality. Further studies are needed to explore this issue because the association between hepcidin and vitamin A is far from obvious. Vitamin A can reduce inflammation. Conversely, inflammatory processes can decrease vitamin A concentrations [48]. Therefore, it is note worth that many chronic inflammatory diseases can reduce serum retinol concentrations. So, ultimately, the study design did not allow to understand whether the decrease in retinol concentrations caused inflammation and, consequently, hepcidin modulation; or whether inflammatory conditions modulated both retinol and hepcidin. In anyway, the results suggested that vitamin A is associated with the key molecules of the anemia of inflammation.

The association between hepcidin level and inflammation evidenced in this study has been previously reported [49-50]. Given the importance of hepcidin in iron homeostasis, its level has already been suggested as a useful indicator for differentiating iron deficiency anemia and inflammation related anemia [5].

The observed association between retinol and hepcidin levels may explain why strategies to control anemia based solely on iron supplementation have a limited impact on the overall prevalence of anemia. Here, we observed that iron deficiency anemia was present in approximately only one-third of the children with anemia. Therefore, it is necessary to improve our understanding about the relationship between vitamin A, hepcidin levels, and anemia in children.

## **Conclusion**

The association between serum retinol and hepcidin levels seems to be dependent on inflammation in children aged 6–59 months. Taken together, the results reinforce the need to develop further studies to better understand the relationship between vitamin A and anemia of inflammation.

## **References**

- [1] Universidade Federal do Rio Janeiro. Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil – ENANI-2019: Resultados preliminares – Prevalência de anemia e deficiência de vitamina A entre crianças brasileiras de 6 a 59 meses. UFRJ, 2020:28. [https://enani.nutricao.ufrj.br/wp-content/uploads/2020/12/Relatorio-parcial-Micronutrientes\\_ENANI-2019.pdf](https://enani.nutricao.ufrj.br/wp-content/uploads/2020/12/Relatorio-parcial-Micronutrientes_ENANI-2019.pdf)
- [2] World Health Organization. The global prevalence of anaemia in 2011. Geneva, 2015:1–48.
- [3] World Health Organization. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency. *Iris*, 2009:55.
- [4] Brasil. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais. Ministério Da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde – Departamento de Atenção Básica. Brasil, 2013:1-27.
- [5] Ganz T. Anemia of inflammation. *N Engl J Med* 2019;381:1148–57.

- [6] Hermoso M, Vucic V, Vollhardt C, Arsic A, Roman-Viñas B, Iglesia-Altaba I, et al. The effect of iron on cognitive development and function in infants, children and adolescents: a systematic review. *Ann Nutr Metab* 2011;59:154-165.
- [7] World Health Organization. Guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations. Geneva, 2020.
- [8] Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin. *Adv Nutr An Int Rev J* 2017;8:126–36.
- [9] Lee FS. At the crossroads of oxygen and iron sensing: Hepcidin control of HIF-2 $\alpha$ . *J Clin Invest* 2019;129:72–4.
- [10] Wang CY, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood* 2019;133:18–29.
- [11] Gibson RS, Bailey KB, Williams S, Houghton L, Costa-Ribeiro HC, Mattos AP, et al. Tissue iron deficiency and adiposity-related inflammation in disadvantaged preschoolers from NE Brazil. *Eur J Clin Nutr* 2014;68:887–91.
- [12] Sommer A, Hussaini G, Tarwotjo I, Susanto D. Increased Mortality in Children With Mild Vitamin a Deficiency. *Lancet* 1983;322:585–8.
- [13] Kongsbak K, Wahed MA, Friis H, Thilsted SH. Acute-phase protein levels, diarrhoea, *Trichuris trichiura* and maternal education are predictors of serum retinol: a cross-sectional study of children in a Dhaka slum, Bangladesh. *Br J Nutr* 2006;96:725–34.
- [14] Jimenez C, Leets I, Puche R, Anzola E, Montilla R, Parra C, et al. A single dose of vitamin A improves haemoglobin concentration, retinol status and phagocytic function of neutrophils in preschool children. *Br J Nutr* 2010;103:798–802.
- [15] Mahfuz M, Murray-kolb LE, Hasan SMT, Das S, Fahim SM, Alam MA, et al. nutrients Why Do Children in Slums Suffer from Anemia, Iron, Zinc and Vitamin A Deficiency ? Results from a Birth Cohort Study in Dhaka. *Nutrients* 2019;11:1–18.
- [16] Wiseman EM, Bar-El Dadon S, Reifen R. The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;57:3703–14.
- [17] Semba RD, Bloem MW. The anemia of vitamin a deficiency: Epidemiology and pathogenesis. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:271–81.
- [18] World Health Organization. Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control. Geneva, 2017.
- [19] Visser, M., Van Zyl, T., Hanekom, S. M., Baumgartner, J., van der Hoeven, M., Taljaard-Krugell, C., et al. Nutrient patterns and their relation to anemia and iron status in 5-to 12-y-old children in South Africa. *Nutrition* 2019;62:194-200.

- [20] Mwanri L, Worsley A, Ryan P, Masika J. Supplemental Vitamin A Improves Anemia and Growth in Anemic School. *Am Soc Nutr Sci* 2000;130:2691–6.
- [21] da Cunha M de SB, Campos Hankins NA, Arruda SF. Effect of vitamin A supplementation on iron status in humans: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018;59:1767–81.
- [22] Cañete A, Cano E, Muñoz-Chápuli R, Carmona R. Role of Vitamin A/Retinoic Acid in Regulation of Embryonic and Adult Hematopoiesis. *Nutrients* 2017;9(2):159.
- [23] Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* 2001;21:167-92.
- [24] Reifen, R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. *Proc Nutr Soc* 2002;61:397-400
- [25] Arruda SF, Siqueira EM de A, de Valência FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition* 2009;25:472–8.
- [26] Tsuchiya H, Akechi Y, Ikeda R, Nishio R, Sakabe T, Terabayashi K, et al. Suppressive Effects of Retinoids on Iron-Induced Oxidative Stress in the Liver. *Gastroenterology* 2009;136:341-350.
- [27] Citelli M, Bittencourt LL, Da Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C. Vitamin a modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res* 2012;149:64–70.
- [28] Mendes JFR, De Almeida Siqueira EM, De Brito e Silva JGM, Arruda SF. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism independent of hemojuvelin (Hfe2) and bone morphogenetic protein 6 (Bmp6) transcript levels. *Genes Nutr* 2016;11:1–7.
- [29] De La Cruz-Góngora V, Salinas-Rodríguez A, Villalpando S, Flores-Aldana M. Serum retinol but not 25(OH)D status is associated with serum hepcidin levels in older Mexican adults. *Nutrients* 2019;11:1–15.
- [30] Bujang MA, Baharum N. Sample Size Guideline for Correlation Analysis. *World J Soc Sci Res* 2016;3:37–46.
- [31] World Health Organization. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. Geneva, 2006.
- [32] Pereira ADS, De Castro IRR, Bezerra FF, Neto JFN, Da Silva ACF. Reproducibility and validity of portable haemoglobinometer for the diagnosis of anaemia in children under the age of 5 years. *J Nutr Sci* 2020:1–9.

- [33] Hess D, Keller HE, Oberlin B, Bonfanti R, Schüep W. Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *Int J Vitam Nutr Res* 1991;61:232—238.
- [34] World Health Organization. Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. Geneva, 2011:3–7.
- [35] Larson LM, Guo J, Williams AM, Young MF, Ismaily S, Addo OY, Thurnham D, Tanumihardjo SA, Suchdev PS, Northrop-Clewes CA. Approaches to assess vitamin A status in settings of inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. *Nutrients*. 2018;10:1100. doi: 10.3390/nu10081100.
- [36] Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271–6.
- [37] Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006;108:3204–9.
- [38] Donker AE, Galesloot TE, Laarakkers CM, Klaver SM, Bakkeren DL, Swinkels DW. Standardized serum hepcidin values in Dutch children: Set point relative to body iron changes during childhood. *Pediatr Blood Cancer* 2020;67:1–11.
- [39] Armitage AE, Agbla SC, Betts M, Sise EA, Jallow MW, Sambou E, et al. Rapid growth is a dominant predictor of hepcidin suppression and declining ferritin in Gambian infants. *Haematologica* 2019;104:1542–53.
- [40] Mupfudze TG, Stoltzfus RJ, Rukobo S, Moulton LH, Humphrey JH, Prendergast AJ. Hepcidin decreases over the first year of life in healthy African infants. *Br J Haematol* 2014;164:150–3.
- [41] Chen K, Zhang X, Li TY, Chen L, Qu P, Liu YX. Co-assessment of iron, vitamin A and growth status to investigate anemia in preschool children in suburb Chongqing, China. *World J Pediatr* 2009;5:275–81.
- [42] Zanin FHC, da Silva CA, Bonomo É, Teixeira RA, Pereira CA de J, dos Santos KB, et al. Determinants of Iron Deficiency Anemia in a Cohort of Children Aged 6-71 Months Living in the Northeast of Minas Gerais , Brazil. *PLoS One* 2015;10:1–14.
- [43] Petry N, Jallow B, Sawo Y, Darboe MK, Barrow S, Sarr A, et al. Micronutrient Deficiencies, Nutritional Status and the Determinants of Anemia in Children 0–59 Months of Age and Non-Pregnant Women of Reproductive Age in The Gambia. *Nutrients* 2019;11:1–20.

- [44] Diana A, Purnamasari DM, Rahmannia S, Luftimas DE, Haszard JJ, Gibson RS, et al. Multimicronutrient Biomarkers Are Related to Anemia during Infancy in Indonesia : A Repeated Cross-Sectional Study. *Curr Dev Nutr* 2019;3:1–9.
- [45] Ahmed F, Khan MR, Jackson AA. Concomitant supplemental vitamin A enhances the response to weekly supplemental iron and folic acid in anemic teenagers in. *Am J Clin Nutr* 2001;74:108–15.
- [46] Jiang S, Wang C xu, Lan L, Zhao D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition* 2012;28:281–7.
- [47] Mupfudze TG, Stoltzfus RJ, Rukobo S, Moulton LH, Humphrey JH, Prendergast AJ. Plasma concentrations of hepcidin in anemic zimbabwean infants. *PLoS One* 2015;10:1–15.
- [48] Wiseman EM, Bar-El Dadon S, Reifen R. The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57:3703-3714. doi: 10.1080/10408398.2016.1160362.
- [49] Babbitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007;117:1933–9.
- [50] Pasricha SR, Atkinson SH, Armitage AE, Khandwala S, Veenemans J, Cox SE, et al. Expression of the iron hormone hepcidin distinguishes different types of Anemia in African children. *Sci Transl Med* 2014;6.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação foi idealizada com o objetivo de avaliar a influência do retinol sérico nos níveis de hepcidina e na anemia em crianças de 6 a 59 meses. Essa proposta surgiu a partir da necessidade melhorar o entendimento da relação entre vitamina A e hepcidina ou anemia em crianças, considerando a elevada prevalência de anemia e que as intervenções para tratamento e prevenção não têm sido suficientes para reverter plenamente seus agravos e quadros epidemiológicos.

Os achados evidenciaram que as concentrações séricas de retinol foram inversamente associados aos níveis séricos de hepcidina e a inflamação parece participar da modulação exercida pelo retinol na hepcidina. A anemia por deficiência de ferro estava presente em aproximadamente um terço das crianças com anemia e os outros dois terços talvez possam, em parte, ser explicados pela anemia de inflamação. Vale ressaltar que as crianças aqui estudadas apresentavam, no máximo, inflamação crônica de baixo grau, que, no entanto, parecia influenciar os níveis séricos de hepcidina.

Além disso, foi possível observar que o aumento das concentrações séricas de retinol reduz as chances de ocorrência de anemia, podendo ser considerado como um fator de proteção. Os resultados do presente estudo corroboram achados anteriores em relação à associação entre os níveis de hepcidina e ferritina ou outro indicador de estoque de ferro no corpo, assim como a sua associação com a inflamação. O IMC/I esteve diretamente associado aos níveis séricos de hepcidina, independentemente da inflamação. E, possivelmente devido à homogeneidade socioeconômica da amostra estudada, verificou-se que a relação entre os níveis de vitamina A e hepcidina parece existir independentemente da influência das condições socioeconômicas.

Os resultados desta dissertação possibilitam maior compreensão da relação entre retinol e metabolismo de ferro em crianças, pois até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar essa associação em crianças de 6 a 59 meses de idade. As limitações do presente estudo incluem o pequeno tamanho da amostra e o delineamento transversal, o que limita a capacidade de inferir causalidade. Mais estudos são necessários para elucidar como o sistema regulador do ferro funciona em crianças e para identificar os fatores que podem levar à anemia ou inflamação em pré-escolares.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, F.; KHAN, M. R.; JACKSON, A. A. Concomitant supplemental vitamin A enhances the response to weekly supplemental iron and folic acid in anemic teenagers in. **Am J Clin Nutr**, v. 74, p. 108–115, 2001.
- ANDRÉ, H. P. et al. Food and nutrition insecurity indicators associated with iron deficiency anemia in Brazilian children: A systematic review. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 23, n. 4, p. 1159–1167, 2018.
- ANDREWS, N. C.; GANZ, T. The Molecular Basis of Iron Metabolism. **Molecular Hematology: Third Edition**, p. 161–172, 2019.
- ARMITAGE, A. E. et al. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. **Blood**, v. 118, n. 15, p. 4129–4139, 2011.
- ARRUDA, S. F.; SIQUEIRA, E. M. DE A.; DE VALÊNCIA, F. F. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. **Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 472–478, 2009.
- BABITT, J. L. et al. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1933–1939, 2007.
- BAH, A. et al. Serum Hepcidin Concentrations Decline during Pregnancy and May Identify Iron Deficiency: Analysis of a Longitudinal Pregnancy Cohort in The Gambia. **The Journal of Nutrition**, v. 147, n. 6, p. 1131–1137, 2017.
- BLOEM, B. Y. M. W. Interdependence of vitamin A and iron : an important association for programmes of anaemia control. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, p. 501–508, 1995.
- BLOEM, M. W. et al. Vitamin A intervention: Short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 76–79, 1990.
- BRASIL. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher PNDS 2006 Dimensões do Processo Reprodutivo e da Saúde da Criança**. [s.l: s.n.]. v. 1
- BRASIL. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde - Departamento de Atenção Básica**, v. 1, p. 27, 2013a.
- BRASIL. Manual de Condutas Gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A. **Manual de Condutas Gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A**, p. 34, 2013b.



BUJANG, M. A.; BAHARUM, N. Sample Size Guideline for Correlation Analysis. **World Journal of Social Science Research**, v. 3, n. 1, p. 37–46, 2016.

CANALI, S. et al. Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice. **Blood**, v. 129, n. 4, p. 405–414, 2017.

CAÑETE, A. et al. Role of vitamin a/retinoic acid in regulation of embryonic and adult hematopoiesis. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 1–18, 2017.

CANONNE-HERGAUX, F. et al. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins Franc. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. v. 290, n. n. 1, p. G156–G163, 2006.

CARDOSO, M. A. et al. Underlying factors associated with anemia in amazonian children: A population-based, cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

CARNEIRO, L. B. V. et al. Associação entre insegurança alimentar e níveis de hemoglobina e retinol em crianças assistidas pelo Sistema Único de Saúde no Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de saude publica**, v. 36, n. (1)e00243418, p. 1–12, 2020.

CASTRO, I. R. R. DE et al. Prevalência de anemia e deficiência de vitamina A e consumo de ferro e de vitamina A entre crianças usuárias do Sistema Único de Saúde na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, 2021.

CHASTON, T. et al. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. p. 374–382, 2008.

CHEN, K. et al. Co-assessment of iron, vitamin A and growth status to investigate anemia in preschool children in suburb Chongqing, China. **World Journal of Pediatrics**, v. 5, n. 4, p. 275–281, 2009.

CHOI, H. S. et al. Serum hepcidin levels and iron parameters in children with iron deficiency. **Korean Journal of Hematology**, v. 47, n. 4, p. 286–292, 2012.

CITELLI, M. et al. Vitamin a modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. **Biological Trace Element Research**, v. 149, n. 1, p. 64–70, 2012.

CLARK, R. J. et al. Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. **Chemistry and Biology**, v. 18, n. 3, p. 336–343, 2011.

CONAWAY, H. H.; HENNING, P.; LERNER, U. H. Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 6, p. 766–797, 2013.

DA CUNHA, M. DE S. B.; CAMPOS HANKINS, N. A.; ARRUDA, S. F. Effect of vitamin A supplementation on iron status in humans: A systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 11, p. 1767–1781,

2018.

DE BRITO NOGUEIRA, T. B. ET AL. Acessibilidade, biodisponibilidade e consumo de alimentos ricos em carotenoides e vitamina A em crianças de até 5 anos. **Revista de Alimentação, Nutrição e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2019.

DE LA CRUZ-GÓNGORA, V. et al. Serum retinol but not 25(OH)D status is associated with serum hepcidin levels in older Mexican adults. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1–15, 2019.

DE OLIVEIRA, A. P. D. N. et al. Prevalência de anemia e sua associação com aspectos sociodemográficos e antropométricos em crianças de Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 18, n. 11, p. 3273–3280, 2013.

DE OLIVEIRA JÚNIOR, W. V. et al. Inflammation and poor response to treatment with erythropoietin in chronic kidney disease. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 37, n. 2, p. 255–263, 2015.

DELABY, C. et al. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. **The American Society of Hematology**, v. 106, n. 12, p. 3979–3984, 2005.

DIANA, A. et al. Multimicronutrient Biomarkers Are Related to Anemia during Infancy in Indonesia : A Repeated Cross-Sectional Study. **Current developments in nutritio**, v. 3, n. 5, p. 1–9, 2019.

DONOVAN, A. et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 776–781, 2000.

ENGLE-STONE, R. et al. Predictors of anemia in preschool children: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, p. 402S-415S, 2017.

FA, O. Anemia due to other nutritional deficiencies. In: **Williams' Hematology, 5th edn, ed. E Beutler, MA Lichtman, BS Coller & TJ Kipps. New York: McGraw-Hi.** [s.l: s.n.]. p. 511 – 515.

GANZ, T. Anemia of inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 12, p. 1148–1157, 2019.

GIBSON, R. S. et al. Tissue iron deficiency and adiposity-related inflammation in disadvantaged preschoolers from NE Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 8, p. 887–891, 2014.

GIRELLI, D.; NEMETH, E.; SWINKELS, D. W. Blood Spotlight Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. **Blood**, v. 127, n. 23, p. 2809–2814, 2016.

GLOVER, J.; JACOBS, A. Activity Pattern of Iron-Deficient Rats. **British Medical Journal**, v. 2, p. 627–628, 1972.

GONDIM, S. S. R. et al. Relação entre níveis de hemoglobina, concentração de retinol sérico e estado nutricional em crianças de 6 a 59 meses do Estado da Paraíba. **Revista de Nutricao**, v. 25, n. 4, p. 441–449, 2012.

GREEN, H. N.; MELLANBY, E. Carotene and Vitamin A: The Anti-Infective Action of Carotene. **British journal of experimental pathology**, v. 11, n. 2, p. 81, 1930.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 8–17, 2010.

HAN, L. et al. Retinoic acid modulates iron metabolism imbalance in anemia of inflammation induced by LPS via reversely regulating hepcidin and ferroportin expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 507, n. 1–4, p. 280–285, 2018.

HERMOSO, M. et al. The effect of iron on cognitive development and function in infants, children and adolescents: A systematic review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 59, n. 2–4, p. 154–165, 2011.

HESS, D. et al. Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. **International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition**, v. 61, n. 3, p. 232–238, 1991.

IQBAL, T. et al. Clinical Significance of C-Reactive Protein Levels in Predicting Responsiveness to Iron Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease and Iron Deficiency Anemia. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 5, p. 1375–1381, 2015.

JÁUREGUI-LOBERA, I. Iron deficiency and cognitive functions. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 2087–2095, 2014.

JIANG, S. et al. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. **Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 281–287, 2012.

JIMENEZ, C. et al. A single dose of vitamin A improves haemoglobin concentration, retinol status and phagocytic function of neutrophils in preschool children. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 6, p. 798–802, 2010.

KONGSBAK, K. et al. Acute-phase protein levels, diarrhoea, *Trichuris trichiura* and maternal education are predictors of serum retinol: a cross-sectional study of children in a Dhaka slum, Bangladesh. **The British journal of nutrition**, v. 96, n. 4, p. 725–34, 2006.

KUVIBIDILA, S. R. et al. Clinical Observations , Plasma Retinol Concentrations , and In

Vitro Lymphocyte Functions in Children With Sickle Cell Disease. **Ochsner Journal**, v. 18, p. 308–317, 2018.

LAFTAH, A. H. et al. Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. **The American Society of Hematology**, v. 103, n. 10, p. 3940–3944, 2004.

LARSON, L. M. et al. Adjusting retinol-binding protein concentrations for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. (Suppl), p. 390S-401S, 2017.

LARSON, L. M. et al. Approaches to assess vitamin a status in settings of inflammation: Biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants of anemia (BRINDA) project. **Nutrients**, v. 10, n. 8, 2018.

LEE, F. S. At the crossroads of oxygen and iron sensing: Hepcidin control of HIF-2 $\alpha$ . **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 1, p. 72–74, 2019.

MAHFUZ, M. et al. nutrients Why Do Children in Slums Suffer from Anemia , Iron , Zinc , and Vitamin A Deficiency ? Results from a Birth Cohort Study in Dhaka. **Nutrients**, v. 11, n. 3025, p. 1–18, 2019.

MARIATH, A. B. et al. Iron status and serum retinol levels among children and adolescents attended by a family health strategy team in Itajaí, Santa Catarina State. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 15, n. 2, p. 509–516, 2010.

MASON, J. B. et al. **The Micronutrient Report. Current Progress and Trends in the Control of Vitamin A, Iodine, and Iron Deficiencies.** [s.l: s.n.].

MASTROGIANNAKI, M. et al. HIF-2 $\alpha$ , but not HIF-1 $\alpha$ , promotes iron absorption in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 5, p. 1–8, 2009.

MCCLINTICK, J. N. et al. Global effects of vitamin A deficiency on gene expression in rat liver : evidence for hypoandrogenism. v. 17, p. 345–355, 2006.

MEI, Z. et al. Adjusting total body iron for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, p. 383S-389S, 2017.

MEJIA, L. A.; HODGES, R. E.; RUCKER, A. B. Role of Vitamin A in the Absorption , and Distribution of Iron in the Rat1 Retention. **The Journal of nutrition**, v. 109, n. 1, p. 129–137, 1979.

MENDES, J. F. R. et al. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism independent of hemojuvelin (Hfe2) and bone morphogenetic protein 6 (Bmp6) transcript levels. **Genes and Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2016.

MWANRI, L. et al. Supplemental Vitamin A Improves Anemia and Growth in Anemic School. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 130, n. 11, p. 2691–2696, 2000.

NAMASTE, S. M. et al. Adjusting ferritin concentrations for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. (suppl\_1), p. 359S-371S, 2017a.

NAMASTE, S. M. et al. Methodologic approach for the Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, p. 333S-347S, 2017b.

NEMETH, E. et al. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2461–2463, 2003.

NEMETH, E. et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090–2093, 2004a.

NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1271–1276, 2004b.

NICOLAS, G. et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4596–4601, 2002.

OLIVEIRA, C. S. DE M. et al. Anemia e deficiência de micronutrientes em lactentes atendidos em unidades básicas de saúde em Rio Branco, Acre, Brasil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 517–529, 2016.

ÖZDEMİR, N. Iron deficiency anemia from diagnosis to treatment in children. **Turk Pediatri Arsivi**, v. 50, n. 1, p. 11–19, 2015.

PASRICHA, S. R. et al. Expression of the iron hormone hepcidin distinguishes different types of Anemia in African children. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 235, 2014.

PEREIRA, A. D. S. et al. Reproducibility and validity of portable haemoglobinometer for the diagnosis of anaemia in children under the age of 5 years. **Journal of Nutritional Science**, p. 1–9, 2020.

PEREIRA, A. DA S. P. **Avaliação do desempenho de métodos diagnósticos de anemia e deficiência de vitamina A em crianças menores de cinco anos Rio de Janeiro**. [s.l.] Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

PETRY, N. et al. Micronutrient Deficiencies, Nutritional Status and the Determinants of Anemia in Children 0–59 Months of Age and Non-Pregnant Women of Reproductive Age in The Gambia. **Nutrients**, v. 11, n. 2275, p. 1–20, 2019.

QUEIROZ, D. DE et al. Vitamin A deficiency and associated factors in children in urban areas. **Revista de saúde pública**, v. 47, n. 2, p. 248–256, 2013.

REIFEN, R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 3, p. 397–400, 2002.

RIVERA, S. et al. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. **Blood**, v. 106, n. 6, p. 2196–2199, 2005.

SANGKHAE, V.; NEMETH, E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 1, p. 126–136, 2017.

SARAIVA, B. C. A. et al. Iron deficiency and anemia are associated with low retinol levels in children aged 1 to 5 years. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 90, n. 6, p. 593–599, 2014.

SEMBA, R. D.; BLOEM, M. W. The anemia of vitamin a deficiency: Epidemiology and pathogenesis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 271–281, 2002.

SILVA, R. D. C. R. et al. Relação entre os níveis de vitamina a e os marcadores bioquímicos do estado nutricional de ferro em crianças e adolescentes. **Revista de Nutricao**, v. 21, n. 3, p. 285–291, 2008.

SOMMER, A. et al. Increased Mortality in Children With Mild Vitamin a Deficiency. **The Lancet**, v. 322, n. 8350, p. 585–588, 1983.

STAAB, D. B. et al. Relationship between Vitamin A and Iron in the Liver1-2. **The Journal of nutrition**, v. 114, n. 5, p. 840–844, 1984.

STEPHENSON, C. B. Vitamin A, Infection and immune function. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 167–192, 2001.

SUCHDEV, P. S. et al. Assessment of iron status in settings of inflammation: Challenges and potential approaches. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, p. 1626S-1633S, 2017.

THEURL, I. et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2392–2399, 2008.

THURNHAM, D. Vitamin A, iron, and haemopoiesis (commentary). **The Lancet**, v. 342, p. 1312–1313, 1993.

TSUCHIYA, H. et al. Suppressive Effects of Retinoids on Iron-Induced Oxidative Stress in the Liver. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 341- 350.e8, 2009.

UFRJ, U. F. DO R. DE J. Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil – ENANI-

2019: Resultados preliminares – Prevalência de anemia e deficiência de vitamina A entre crianças brasileiras de 6 a 59 meses. **UFRJ: Rio de Janeiro**, p. 28, 2020.

VIDAILHET, M. et al. Vitamine A chez l'enfant : mise au point du Comité de nutrition de la Société française de pédiatrie. **Archives de Pédiatrie**, v. 24, n. 3, p. 288–297, 2017.

VIEIRA, R. C. DA S.; FERREIRA, H. DA S. Prevalência de anemia em crianças Brasileiras, segundo diferentes cenários epidemiológicos. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 3, p. 433–444, 2010.

WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S. et al. Physiology of iron metabolism. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 213–221, 2014.

WANG, C. Y.; BABITT, J. L. Heparin regulation in the anemia of inflammation. **Current Opinion in Hematology**, v. 23, n. 3, p. 189–197, 2016.

WANG, C. Y.; BABITT, J. L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 18–29, 2019.

WHO. Assessing the iron status of populations: including literature reviews. **Geneva; World Health Organization**, v. 2, n. 6, p. 655–666, 2004.

WHO. HO Child Growth Standards. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 51, n. 12, p. 1002–1002, 2009.

WHO. Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. **Geneva, World Health Organization**, p. 3–7, 2011.

WHO. The global prevalence of anaemia in 2011. **Geneva: World Health Organization**, p. 1–48, 2015.

WHO. WHO guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations. **Geneva: World Health Organization**, 2020.

WISEMAN, E. M.; BAR-EL DADON, S.; REIFEN, R. The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3703–3714, 2016.

WRIGHTING, D. M.; ANDREWS, N. C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3204–3209, 2006.

YAMAJI, S. et al. Brief report Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. v. 104, n. 90, p. 2178–2180, 2004.

ZANIN, F. H. C. et al. Determinants of Iron Deficiency Anemia in a Cohort of Children Aged 6-71 Months Living in the Northeast of Minas Gerais , Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, p.

1–14, 2015.

ZAVALETA, N.; ASTETE-ROBILLIARD, L. Effect of anemia on child development: Long-term consequences. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 34, n. 4, p. 716–722, 2017.

ZHANG, X.; ROVIN, B. H. Hepcidin expression by human monocytes in response to adhesion and pro-inflammatory cytokines. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1800, n. 12, p. 1262–1267, 2010.

ZIMMERMANN, M. B. et al. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 3, p. 580–586, 2006.



## APÊNDICE A – Parecer do comitê de ética em pesquisa



Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº 203A/2013

Rio de Janeiro, 24 de julho de 2013.

Sr(a) Pesquisador(a),

Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - CEP SMSDC-RJ, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 466/12 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:

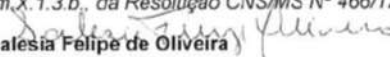
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Coordenadora:</b><br/>Salesia Felipe de Oliveira</p> <p><b>Vice-Coordenadores:</b><br/>Pedro Paulo Magalhães Chrispim</p> <p><b>Membros:</b><br/>Carla Moura Cazelli<br/>Carlos Alberto Pereira de Oliveira<br/>Fátima Meirelles Pereira Gomes<br/>José M. Salame<br/>Livia Beiral Forni<br/>Maria Alice Gunzburguer Costa Lima<br/>Martine Gerbauld<br/>Nara da Rocha Saraiva<br/>Sônia Ruth V. de Miranda Chaves<br/>Vitória Regia Csorio Vellozo</p> <p><b>Secretária Executiva</b><br/>Brígida Araújo de Carvalho Silva<br/>Renata Guedes Ferreira</p> | <p><b>PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 93/13.</b></p> <p><b>TÍTULO:</b> Anemia e deficiência de vitamina em pré-escolares: magnitude em uma grande metrópole e validação de método diagnósticos.</p> <p><b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL:</b> Inês Rugani Ribeiro de Castro.</p> <p><b>UNIDADE (S) ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:</b> Unidades Básicas da Secretaria Municipal de Saúde.</p> <p><b>DATA DA APRECIÇÃO:</b> 19/07/2013.</p> <p><b>PARECER:</b> APROVADO.</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Atentamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata (*item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12*).

O CEP/SMSDC-RJ deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (*item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12*). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas a este CEP/SMSDC-RJ, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Acrescentamos que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (*item IV.3 .d., da Resolução CNS/MS Nº 466/12*) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (*item IV.5.d., da Resolução CNS/MS Nº 466/12*).

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12*).

  
**Salesia Felipe de Oliveira**  
 Coordenadora  
 Comitê de Ética em Pesquisa

## APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezada(o) mãe ou responsável,

O(a) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo: **“Anemia e deficiência de vitamina A em pré-escolares: magnitude em uma grande metrópole e validação de métodos diagnósticos”**, desenvolvido pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro em parceria com diversas instituições de ensino e pesquisa.

O objetivo desse estudo é conhecer a saúde e alimentação de crianças menores de cinco anos atendidas nas Unidades Básicas de Saúde do município e, também, saber se a anemia e a deficiência de vitamina A acontecem com muita frequência nesse grupo. Além disso, esse estudo permitirá avaliar a qualidade de alguns dos métodos utilizados para diagnóstico da anemia e da deficiência de vitamina A.

Para isso, o(a) senhor(a) irá responder um questionário com perguntas sobre saúde e alimentação da criança e sobre dados sociais da família. Além disso, a criança será medida e pesada para avaliar o estado nutricional dela. Para saber se ela está com anemia ou deficiência de vitamina será coletado um pouco de sangue da veia do braço dela e do dedo da mão (se a criança tiver um ano ou mais de idade) ou do calcânhar (se a criança for menor de um ano de idade), usando material descartável. Poderá ficar uma mancha roxa no local da coleta de sangue. Para evitar isso, a coleta será realizada por profissionais treinados para esse procedimento.

Depois de responder o questionário, o(a) Sr(a) receberá um folheto com dicas sobre alimentação saudável para a criança. O(A) Sr(a) receberá os resultados da avaliação nutricional e do exame de sangue na unidade de saúde em dia e horário agendados hoje conosco depois da coleta de sangue. Se a criança apresentar alguma alteração nutricional ou no exame de sangue, ela será encaminhada para atendimento nesta unidade de saúde. Na divulgação dos resultados do estudo, as informações do(a) seu(sua) filho(a) não serão identificadas.

Para que seu(sua) filho(a) participe deste estudo, precisamos de sua autorização por escrito. O(A) Senhor(a) pode não concordar que seu(sua) filho(a) participe do estudo ou pode desistir de participar em qualquer momento, não havendo nenhum tipo de consequência para ele(a).

Para outras informações ou esclarecimento de dúvidas em qualquer momento do estudo, você pode entrar em contato com o responsável pelo estudo, Inês Rugani Ribeiro de Castro, pelo telefone 2334-0063.

O(A) Sr(a) autoriza a participação de seu (sua) filho(a) na pesquisa?  Sim  Não

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_

Inês Rugani Ribeiro de Castro (Pesquisador): \_\_\_\_\_

Unidade de Saúde: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2014