UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MILENA MORAIS VIEIRA

RETINOL, PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS, CAROTENÓIDES, PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E BARREIRA FUNCIONAL INTESTINAL EM CRIANÇAS DE UMA COMUNIDADE URBANA DE FORTALEZA

FORTALEZA -CE
2007

MILENA MORAIS VIEIRA

RETINOL, PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS, CAROTENÓIDES, PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E BARREIRA FUNCIONAL INTESTINAL EM CRIANÇAS DE UMA COMUNIDADE URBANA DE FORTALEZA

Tese submetida à Coordenção do Programa de pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Fortaleza -CE

2007

V716r Vieira, Milena Morais
Retinol, proteínas transportadoras, carotenóides, proteínas de fase aguda e barreira funcional intestinal em crianças de uma comunidade urbana de Fortaleza / Milena Morais Vieira – Fortaleza, 2007.
173f. : il.
Orientador: Prof.Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza – CE.
1. Deficiência de vitamina A – criança. 2. Carotenóides. 3. Absorção intestinal. I. Lima, Aldo Ângelo Moreira (orient.). II. Título.
CDD 618.9239

MILENA MORAIS VIEIRA

RETINOL, PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS, CAROTENÓIDES, PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E BARREIRA FUNCIONAL INTESTINAL EM CRIANÇAS DE UMA COMUNIDADE URBANA DE FORTALEZA

Tese submetida à Coordenção do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia

Aprovada em 04 / 04 / 2007

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
Universidade Federal do Ceará - UFC

"A essência da pesquisa é o
discernimento e a sua meta é a vida,
a verdade e a justiça"

Mishine Asaf

Às minhas filhas, Isabela e Letícia, frutos de um grande amor, por me proporcionarem a alegria de ser mãe.

Ao meu marido, Luiz Sérgio, pelo exemplo de determinação e brilhantismo em tudo que faz.

Aos meus pais, Jáder e Selene, pelo grande exemplo de vida e incentivo para realização das minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Aldo Ângelo Moreira Lima, pela dedicação, paciência e ótimas idéias para realização deste objetivo.

Ao Professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, por sua valiosa orientação desde o início deste curso de doutorado.

Ao Professor William S. Blaner, da Universidade de Columbia, pelo período que passei em Nova York, todo o meu agradecimento por seus ensinamentos e uso de todo o material e equipamentos necessários para realização de parte dos experimentos desta tese.

Ao Professor Manassés Claudino Fonteles, pela ajuda na revisão deste trabalho.

À Professora Mary Valesca Gamble, da Universidade de Columbia em Nova York, por ter cedido as soluções padrões utilizadas nesta pesquisa.

Ao Professor Rajasekhar Ramakrishnan, estatístico da Universidade da Columbia em Nova York, que ajudou na realização da estatística para o cálculo dos dados do teste de radioimunoensaio.

À aluna de pós-doutorado em Nova York, Jisun Paik, pela orientação na parte técnica dos experimentos.

À comunidade Parque Universitário, especialmente às mães e crianças, pela recepção ao nosso trabalho e motivo maior deste estudo.

A todos os professores da pós-graduação que contribuíram em minha formação científica neste curso.

Às amigas do curso da pós-graduação, Renata, Virgínia e Raquel pelo excelente convívio durante o curso.

Ao Davis, pela ajuda na formatação da tese.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

E agradeço especialmente a Deus, por me conceder força e fé em todos os momentos.

RESUMO

A deficiência de vitamina A (DVA) é considerada um importante problema de saúde pública em todo o mundo e o papel da DVA na integridade epitelial intestinal ainda não está bem compreendido. O objetivo do trabalho foi investigar a associação do retinol (vitamina A) e carotenóides com a barreira funcional intestinal em crianças de uma comunidade urbana em Fortaleza, no Nordeste do Brasil. Participaram do estudo 102 crianças de 2 meses a 9 anos de idade. O estado nutricional das crianças foi avaliado através do escore "z" de peso por altura (WHZ), mostrando que 19,6% (20/102) das crianças apresentaram desnutrição leve ("z" escore de -1 a -2). Todas as crianças tiveram as concentrações de retinol determinadas e nenhuma estava severamente deficiente (< 0,35 μM); 2,9% (3/102) das crianças apresentaram níveis moderados de deficiência de vitamina A (0,36 - 0,70 μM); 20,6% (21/102) apresentaram leve deficiência (0,71 - 1,05 μM) e 76,5% (78/102) apresentaram concentrações suficientes de retinol no sangue (> 1,05 μM). A razão de lactulose/manitol (L/M) estava anormal em 49% (47/97) das crianças quando comparadas com crianças saudáveis de uma mesma região geográfica. Os carotenóides, luteína, β-criptoxantina e beta-caroteno no soro das crianças do Parque Universitário, apresentaram correlações inversas significativas com a razão de L/M. As proteínas de fase aguda (proteína C reativa, CRP e glicoproteína α_1-ácida, AGP) apresentaram correlações inversas com retinol. O retinol correlacionou-se significativamente com a proteína ligadora de retinol (RBP) e com a transtiretina (TTR). Esses dados sugerem que a alteração na barreira funcional intestinal provavelmente ocorreu através do caminho paracelular com baixas concentrações de carotenóides no soro. Os carotenóides, precursores do retinol, poderiam assim promover um melhor marcador para a barreira funcional intestinal alterada do que as medidas de RBP ou retinol. As concentrações sanguíneas de retinol correlacionaram-se com a RBP e TTR e correlacionaram-se inversamente com a AGP e com a CPR.

Palavras-chave: Vitamina A, Carotenóides, Barreira Funcional Intestinal

ABSTRACT

Vitamin A deficiency (VAD) is considered an important public health problem worldwide and the role of VAD on intestinal epithelial integrity is not well understood. To investigate the association of retinol (vitamin A) and carotenoids with the intestinal barrier function from children in an urban community in Fortaleza, Northeastern Brazil, one hundred and two children from 2 months to 9 years old participated in the study. The nutritional status of these children, measured by weight for height z-score (WHZ), showed that 19.6% (20/102) of them had mild malnutrition (-1 to –2 z-score). All children had their serum retinol concentration measured and none were severely deficient ($\leq$ 0.35 μM), 2.9% (3/102) were moderately (0.36 – 0.70 μM), 20.6% (21/102) were mildly (0.71 – 1.05 μM) deficiencies; 76.5% (78/102) were vitamin A sufficient (> 1.05 μM). The lactulose:mannitol (L/M) ratio was abnormal in 49% (47/97) of children when compared to healthy children in the same geographic area. Serum carotenoids, lutein, beta-cryptoxanthin and beta-carotene showed significant inverse correlation with the L/M ratio. Acute phase proteins (C-reactive protein; CRP; and α-acid glycoprotein; AGP) were significantly inversely correlated with retinol. Retinol was significantly correlated with retinol-binding protein (RBP), and with transthyretin (TTR). These data suggest a disruption of intestinal barrier function due to paracellular pathway with low serum concentrations of carotenoids. The retinol precursors, carotenoids, may provide a better marker for disrupted intestinal barrier function than measurements of RBP or retinol. Serum retinol concentrations correlate with RBP and TTR and inversely correlate with AGP and CRP.

Keywords: Vitamin A, Carotenoids, Intestinal Barrier Function.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Figura 1	Estruturas químicas de diferentes formas da vitamina A	26
Figura 2	Figura esquemática mostrando os dois mais importantes caminhos do metabolismo do β-caroteno: clivagem central e excêntrica	28
Figura 3	Representação Esquemática do Metabolismo do Retinol	30
Figura 4	Representação esquemática de como as diferentes formas da vitamina A podem chegar às células através do sangue	32
Figura 5	Representação esquemática do epitélio intestinal mostrando as junções de oclusão e adesão	45
Figura 6	Localização geográfica da comunidade urbana Parque Universitário, em Fortaleza, Ceará, Brasil	56
Figura 7	Fluxograma para o estudo da população participante no ensaio de intervensão nutricional	58
Figura 8	Curva Padrão do Retinol	65
Figura 9	Curva Padrão da Luteína	68
Figura 10	Curva Padrão da β-criptoxantina	69
Figura 11	Curva Padrão do Licopeno	70
Figura 12	Curva Padrão do β-caroteno	71
Figura 13	Protocolo experimental para realização do teste diferencial de permeabilidade intestinal utilizando lactulose e manitol	80
Figura 14	O gráfico mostra a concentração sanguínea da luteína para a razão da lactulose/manitol urinária para as crianças do Parque Universitário.	86
Figura 15	O gráfico mostra a concentração sanguínea da β-criptoxantina para a razão da lactulose/manitol	

	urinária para as crianças do Parque Universitário.	87
Figura 16	O gráfico mostra a concentração sanguínea do β-caroteno para a razão da lactulose/manitol urinária para as crianças do Parque Universitário.	88
Figura 17	Análise de regressão do retinol sanguíneo versus a proteína de ligação do retinol (RBP)	89
Figura 18	Análise de regressão do retinol sanguíneo versus transtaretina sanguínea (TTR)	90
Figura 19	Análise de regressão do retinol sanguíneo versus a proteína C-reativa (CRP)	91
Figura 20	Análise de regressão do retinol sanguíneo versus a glicoproteína α_1-ácida (AGP)	92
Figura 21	Curva de ROC para deficiência leve de vitamina A. Sensibilidade e especificidade foram calculadas para cada concentração da proteína ligadora de retinol encontradas na população em estudo para predizer leve deficiência de vitamina A	95
Figura 22	Curva de ROC para deficiência leve de vitamina A. Sensibilidade e especificidade foram calculadas para cada concentração da transtiretina na população em estudo para predizer leve deficiência de vitamina A	97

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
Tabela 1	Concentrações dos estoques de retinol e acetato de retinol	60
Tabela 2	Concentrações dos estoques dos carotenóides e echinenona	61
Tabela 3	Soluções padrões para o retinol/acetato de retinol	62
Tabela 4	Soluções padrões para carotenóides/echinenona	63
Tabela 5	Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para o retinol e acetato de retinol	64
Tabela 6	Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a luteína e echinenona	67
Tabela 7	Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para β-criptoxantina e echinenona	68
Tabela 8	Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para o licopeno e echinenona	69
Tabela 9	Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para o β-caroteno e echinenona	70
Tabela 10	Características demográficas das crianças do Parque Universitário em Fortaleza, Ceará, Brasil, estratificadas pela idade, sexo, estado nutricional, deficiência de vitamina A e teste de permeabilidade intestinal	84
Tabela 11	Distribuição da glicoproteína α_1-ácida (AGP) e da proteína C-reativa (CRP) pela concentração de retinol das crianças do Parque Universitário em Fortaleza, Ceará, Brasil.	93

Tabela 12 Uso da proteína ligadora de retinol (RBP) para predizer leve deficiência de vitamina A 94

Tabela 13 Uso da transtaretina (TTR) para predizer leve deficiência de vitamina A 96

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

%	Percentual
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma/ mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	micrômetro
μmol	Micromol
μmol/L	Micromol por Litro
aC	Antes de Cristo
AGP	glicoproteína α-ácida
BSA	Albumina do soro bovino
C_{18}	Carbono 18
Ca^{2+}	Cálcio
CCE	Enzima clivadora de carotenóides
CGH	Centro para Saúde Global
CIC	Citologia de impressão conjuntival
Cpm	Ciclo por minuto
CRABP	Porteína ligadora do ácido retinóico celular
CRBP	Proteína ligadora do retinol celular
CRP	Proteína C-reativa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Grama
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HAZ	Escore z de altura-por-idade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-PAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Amperimétrica Pulsada
I^{125}	Iodo 125

IBIMED	Instituto de Biomedicina
ICT	Citologia de impressão com transferência
IL-6	Interleucina-6
IPH	Índice de Pobreza Humana
Kda	KiloDalton
L/M	Lactulose/ Manitol
LRAT	Lecitil retinol acetiltransferase
Ltda	Companhia limitada
M	Molar
mCi	Miliquiri
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRDR	Dose-resposta relativa modificada
NaCl	Cloreto de sódio
Ng	Nanograma
NIH	Instituto Nacional de Saúde
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPAR	Receptor ativado do proliferador peroxisoma
RALDH	Retinal desidrogenase
RAR	Receptor do Ácido Retinoico
RBP	Proteína ligadora de retinol
RDH	Retinol desidrogenase
RDR	Dose-resposta relativa
REH	Hidrolade dos ésteres de retinila
RIA	Radioimunoensaio
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
ROC	“Receiver operating characteristic”
RolDH	Retinol desidrogenase

RXR	Receptor X do retinóide
SP	São Paulo
T_4	Tiroxina 4
TR	Receptor do hormônio da tireóide
Tris-HCL	Tris-ácido clorídrico
TTR	Transtiretina
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
Uva	Universidade da Virgínia
VAD	Deficiência de Vitamina A
VDR	Receptor da vitamina D
VIS	Espectrofotometria ultravioleta
VS	Espectrofotometria ultravioleta
WHZ	Escore Z de peso-por-altura

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS
RESUMO
ABSTRACT

1.	**INTRODUÇÃO**	22
1.1.	Importância Epidemiológica da Desnutrição	23
1.2.	Deficiência de Vitamina A	25
1.3.	Absorção e Metabolismo da Vitamina A	27
1.4.	Transporte e Distribuição da Vitamina A	32
1.4.1.	Proteína Ligadora de Retinol (RBP)	32
1.4.2.	Transtiretina	36
1.5	Fisiologia da Vitamina A	37
1.6.	Toxicidade da Vitamina A	39
1.7.	Avaliação da Deficiência de Vitamina A	40
1.8.	Vitamina A e Resposta de Fase Aguda às Infecções e Inflamações	42
1.9.	Vitamina A e Função Intestinal	45
1.9.1.	Vitamina A e Barreira Funcional Intestinal	49
1.9.2.	Medida da Permeabilidade Intestinal	51
1.10.	**JUSTIFICATIVA**	53
1.11.	**OBJETIVOS**	55
1.11.1	Objetivo Geral	55
1.11.2.	Objetivos Específicos	55
1.11.2.1.	Objetivo Primário	55
1.11.2.2.	Objetivos Secundários	55
2.	**MATERIAIS E MÉTODOS**	56
2.1.	Ética do Estudo	57
2.2.	Localização Geográfica do Estudo	57
2.3.	Delineamento do Estudo, Critérios de Qualificação e Exclusão da População do Estudo	58

2.4.	Sistema de Vigilância Familiar, Morbidade para Doenças, Medidas Antropométricas, Coleta e Manuseio das Amostras	59
2.5.	Drogas, Reagentes e Soluções Utilizadas	60
2.6.	Coletas das Amostras e Armazenamento	61
2.7.	Derteminação das Concentrações Séricas de Retinol e dos Carotenóides das Crianças do Parque Universitário	62
2.7.1.	Determinação das Concentrações dos Estoques padrões do Retinol e dos Carotenóides	62
2.7.2.	Determinação das Curvas Padrões para os Estoques de Retinol e dos Carotenóides	63
2.7.3.	Curva Padrão do Retinol	66
2.7.4.	Determinação da Concentração do Retinol Sanguíneo	67
2.7.5.	Curva Padrão dos Carotenóides	69
2.7.6.	Determinação da Concentração dos Carotenóides Sanguíneos	73
2.8.	Radioimunoensaio para Determinação das Concentrações da RBP ou da TTR Sanguíneas	74
2.8.1.	Iodinação da RBP ou da TTR	74
2.8.2.	Procedimento do Radioimuensaio	75
2.9.	Determinação das Proteínas de Fase Aguda: Proteína C-Reativa (CRP) e a Glicoproteína α-ácida (AGP)	77
2.9.1.	Procedimento do Teste de Imunodifusão Radial	78
2.9.1.1.	Placas de Imunodifusão Radial	78
2.9.1.2.	Aplicação dos Calibradores e das Amostras, Incubação e Determinação dos Diâmetros dos Anéis	78
2.9.2	Determinação da Proteína C-Reativa (CRP) e da Glicoproteína α-ácida (AGP)	79
2.10.	Teste da permeabilidade intestinal usando lactulose/manitol	79
2.10.1.	Açúcares e Reagentes	79
2.10.2.	Equipamentos	80
2.10.3.	Preparação das Amostras	80

2.10.4.	Protocolo do Teste de Permeabilidade com Lactulose e Manitol nas Crianças do Parque Universitário	81
2.11.	**ANÁLISE ESTATÍSTICA**	83
3.	**RESULTADOS**	84
3.1.	Características Demográficas das Crianças da Comunidade Urbana Parque Universitário em Fortaleza	85
3.2.	Ligação entre as Concentrações de Vitamina A Sanguíneas e a Manutenção da Integridade Intestinal nas Crianças do Parque Universitário em Fortaleza	87
3.3.	Relação entre a Proteína Ligadora de Retinol (RBP), a Transtiretina (TTR) e o Retinol Sanguíneos nas Crianças da Comunidade Urbana Parque Universitário	91
3.4.	Relação da Concentração do Retinol Sanguíneo e as Proteínas de Fase Aguda, Proteína C-Reativa (CRP) e Glicoproteínas α-ácida (AGP), nas Crianças da Comunidade Urbana Parque Universitário	93
3.5.	Avaliação da Concentração da Proteína Ligadora de Retinol (RBP) Sanguínea como Medida Alternativa de Retinol Sanguíneo	95
3.6.	Avaliação da Concentração da Transtiretina (TTR) Sanguínea como Medida Alternativa de Retinol Sanguíneo	97
4.	**DISCUSSÃO**	100
5.	**CONCLUSÕES**	110
6.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	112
7.	**ANEXOS**	148
7.1.	Listagem dos Resultados	149
7.1.1.	Anexo 1 – Concentração sanguínea de retinol (μM) para cada amostra das crianças da comunidade Parque Universitário	150
7.1.2.	Anexo 2 – Concentração sanguínea dos carotenóides (μM) em cada amostra das crianças da comunidade Parque Universitário	152

7.1.3. Anexo 3 – Etapas do procedimento experimental de radioimunoensaio 156
7.1.4. Anexo 4 – Concentrações sanguíneas da proteína ligadora de retinol (RBP) e da transtiretina (TTR) (μM) em cada amostra das crianças da comunidade Parque Universitário 158
7.1.5. Anexo 5 – Concentrações da proteína C-reativa (CRP) e da glicoproteína α-ácida (AGP) no sangue das crianças da comunidade Parque Universitário 162
7.1.6. Anexo 6 – Resultados da excreção de lactulose e manitol para cada criança da comunidade Parque Universitário 166
7.2. Termo de Consentimento 170
7.3. Questionários 171
7.4. Comissão de Ética 172
7.5. Resumo em Congresso 173
7.6. Trabalhos aceitos para publicação e publicados 174
7.7. Participação em projetos de pesquisa e declaração de desenvolvimento da pesquisa abordada na tese de doutoramento na Columbia University 175

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA DESNUTRIÇÃO

A desnutrição ou, mais corretamente, as deficiências nutricionais – porque são várias as modalidades de desnutrição – são doenças que decorrem do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou, ainda, com alguma freqüência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, geralmente motivado pela presença de doenças, em particular doenças infecciosas (MONTEIRO, 2003).

São causas relativamente comuns de desnutrição, sobretudo na infância, o desmame precoce, a higiene precária na preparação dos alimentos, o déficit específico da dieta em vitaminas e minerais e a incidência repetida de infecções, como as doenças diarréicas e parasitoses intestinais. Como a maioria das doenças, as deficiências nutricionais podem ser diagnosticadas por meio de exames clínicos e laboratoriais. Por serem biologicamente mais vulneráveis às diversas deficiências nutricionais, as crianças são habitualmente escolhidas como grupo indicador da presença de desnutrição na população, admitindo-se que o percentual de crianças com retardo de crescimento, uma das primeiras e mais precoces manifestações de desnutrição na infância, propicie uma excelente indicação do risco de deficiências nutricionais a que está exposta uma coletividade (MONTEIRO, 2003).

As dificuldades técnicas para medir de forma confiável a ingestão alimentar habitual dos indivíduos e suas correspondentes necessidades energéticas tornam difícil a mensuração direta da extensão da fome ou da deficiência energética crônica em uma população. De modo mais prático, essa aferição é feita a partir da avaliação das reservas energéticas dos indivíduos, mais especificamente avaliando-se a relação entre peso e altura, admitindo-se que o percentual de indivíduos com insuficiente relação peso/altura, portanto emagrecidos, expresse razoavelmente bem a magnitude da deficiência energética crônica na população. Uma vez que a deficiência energética crônica pode apresentar um componente sazonal importante e

variar intensamente de ano para ano, em função de variações no clima e na produção e disponibilidade de alimentos, recomenda-se que, em áreas de risco, a avaliação das reservas energéticas dos indivíduos seja feita de modo contínuo, sob a forma de sistemas de monitoramento (MONTEIRO, 2003).

Quando ocorrem episódios de diarréia persistente, torna-se mais evidente a desnutrição. Então, pode ser observado o ciclo vicioso entre o estado nutricional deteriorado e a diarréia contínua. O ciclo é o seguinte: a diarréia causa aumento da desnutrição; a desnutrição, por sua vez, aumenta a frequência, duração e severidade da diarréia, com conseqüente risco de morte (MCAULIFFE et al, 1986; CHEN et al, 1983; SCHORLING e GUERRANT, 1990; SCHORLING et al, 1990; GUERRANT et al, 1992). As diarréias agudas e persistentes estão associadas à severa alteração da parede intestinal, levando a uma diminuição na absorção, um aumento no catabolismo e anorexia, apresentando como consequência a desnutrição (MOLLA et al, 1983; BROWN et al, 1982; RAHAMAN e WAHED, 1983; GRAHAM et al, 1981).

Mesmo não existindo uma droga específica para o controle das doenças diarréicas, estudos no Nordeste do Brasil sugerem que quatro de oito pessoas com doenças diarréicas são acometidas de desidratação e desnutrição, e que geralmente ocorrem a cada ano, nos primeiros dois anos de vida. Essas doenças podem apresentar consequências profundas e duradouras para a saúde, para o crescimento, para o desenvolvimento cognitivo e para o desempenho escolar mesmo depois de vários anos (GUERRANT et al, 1999; AGNEW et al, 1998; NEWMAN et al, 1999; LIMA et al, 2000). Essas conseqüências potenciais da desnutrição e desidratação causadas pelas doenças diarréicas na infância, não deveriam provocar tanta surpresa, já que os primeiros dois anos de vida são considerados muito importantes para o crescimento e a formação de sinapses (DOBBING, 1990). Se esse estágio formativo for prejudicado, pode ser difícil compensar ou construir estas sinapses, mais tarde na vida.

1.2. DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A

As dietas de crianças em países em desenvolvimento são geralmente deficientes em muitos micronutrientes, incluindo a vitamina A, zinco e ferro (KHANDAIT et al, 2000; BAQUI et al, 2003; BOOTH e AUKETT, 1997; DE ANDRADA et al, 1997). A vitamina A é um nutriente que serve de base a vários estudos e apresenta-se como importante componente para redução da mortalidade por doenças diarréicas e desnutrição (SOMMER et al, 1984; RAMAKRISHNAN e MARTORELL, 1998; VILLAMOR e FAWZI, 2000).

Os efeitos da deficiência de vitamina A são conhecidos desde 1500 aC, quando a cegueira noturna era corriqueiramente diagnosticada (WOLF e PHIL, 1978). No começo do século passado, os efeitos da privação da vitamina A no organismo também já eram conhecidos (WOLBACH e HOWE, 1925). Mas, infelizmente, no começo do século XXI, essa deficiência ainda representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo uma das principais responsáveis pelas altas taxas de morbidade e mortalidade entre as crianças de países em desenvolvimento (TOMKINS, 2000), até em suas formas subclínicas (MILTON et al, 1987).

A deficiência de vitamina A é considerada um problema para a saúde pública, se 15% ou mais de uma população bem definida apresentarem as concentrações plasmáticas de retinol menores que 0,7 μmol/L (SOMMER e DAVIDSON, 2002). A deficiência de vitamina A é uma das principais causas de cegueira no mundo (UNDEWOOD e ARTHUR, 1996; GILBERT e FOSTER, 2001; KELLO e GILBERT, 2003), especialmente em países subdesenvolvidos (KAPIL e BHAVNA, 2002).

O combate à deficiência de vitamina A no mundo é um dos maiores desafios para a UNICEF e para a Organização Mundial de Saúde (SOMMER, 1998) e também para numerosas agências internacionais que lutam contra esse problema. Estimativas atuais indicam a presença de 127 milhões de crianças na pré-escola, com deficiência de vitamina A, e 4,4 milhões com xeroftalmia (WEST JR., 2002), a maioria delas morando em países subdesenvolvidos. Além disso, a estimativa é que 60% das crianças que desenvolvem xeroftalmia morrerão dentro de 1 ano (UNDERWOOD, 1998).

A deficiência de vitamina A ocorre inicialmente como resultado da ingestão insuficiente de alimentos contendo vitamina A. Entretanto, pode também ocorrer devido a certas condições que prejudicam a absorção de vitamina A, como infecções parasitárias e doenças intestinais, também condições que prejudicam a sua mobilização hepática como no caso de doenças hepáticas ou deficiência de proteína, condições que diminuem a sua reabsorção tubular renal e/ou que prejudicam a sua utilização pelo organismo, como no caso de hipertireoidismo, sepsis ou estresse (UNDERWOOD, 1984). A deficiência de vitamina A também está relacionada à alta freqüência de infecções e respostas inflamatórias associadas às infecções, causando um aumento na sua utilização, aumento da perda urinária de vitamina A e uma diminuição da sua mobilização hepática. As crianças em idade escolar e as mulheres grávidas, ou que estão amamentando, são os principais alvos para a deficiência de vitamina A, devido ao aumento da demanda de vitamina A pelo organismo, para suportar o rápido crescimento (UNDERWOOD, 1984).

As consequências da deficiência de vitamina A incluem manifestações oculares que são observadas em vários graus de xeroftalmia (conjunto de manifestações oculares associados à deficiência de vitamina A, podendo progredir de uma cegueira noturna até ulceração na córnea), aumento da morbidade e mortalidade, crescimento prejudicado, resposta imune e hematopoiesis prejudicadas, doenças de pele, anormalidades na reprodução entre outros problemas à saúde (UNDERWOOD, 1984).

A maior associação entre a deficiência de vitamina A com morbidade e mortalidade ocorre quando se apresentam doenças infecciosas como diarréia, sarampo, pneumonia, catapora, malária, vírus da imunodeficiência humana e outras (SEMBA, 1997).

1.3. ABSORÇÃO E METABOLISMO DA VITAMINA A

A vitamina A (**FIGURA 1**) presente no organismo é adquirida através da alimentação de produtos de origem animal, ou na forma de carotenóides que são sintetizados em plantas e em certos microorganismos como algumas bactérias, algas e fungos. Os carotenóides são um grupo de pigmentos que são bem espalhados na natureza e responsáveis pelas cores amarela, laranja, vermelha e roxa de muitas frutas, flores, pássaros, insetos e animais marinhos. Mais de 600 carotenóides têm sido isolados de fontes naturais, mas apenas aproximadamente 60 deles são detectados na dieta humana (MANGELS et al, 1993) e aproximadamente 20 deles no sangue e tecidos humanos (PARKER, 1989). O β-caroteno, α-caroteno, licopeno, luteína e β-criptoxantina são os carotenóides mais importantes presentes no corpo humano. Na dieta humana as fontes de plantas são os maiores contribuintes de carotenóides: cenoura, abóbora e vegetais de folhas verde-escuras para β-caroteno, cenoura para α-caroteno, tomate e melancia para licopeno, couve, ervilhas, espinafre e brócolis para luteína, e laranjas, pimentões vermelhos e mamão para β-criptoxantina (DURING e HARRISON, 2004).

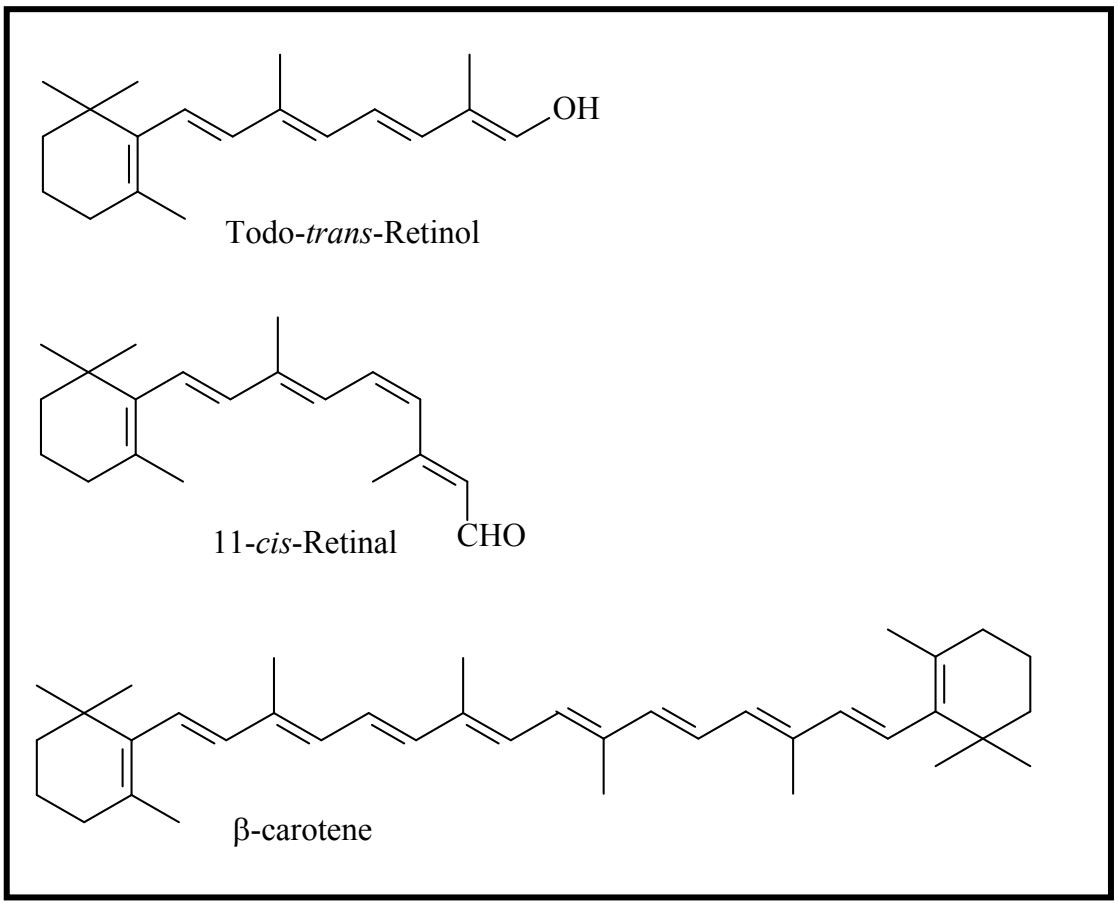

FIGURA - 1. Estruturas químicas de diferentes formas da vitamina A (Fonte: DEBIER e LARONDELLE, 2005)

A vitamina A pré-formada vem pela dieta na forma de ésteres de retinila mas também pode ser obtida em quantidades significantes como retinol e em quantidades ainda menores como ácido retinóico. Os ésteres de retinila provenientes da dieta são hidrolisados a retinol tanto dentro do lúmen do intestino delgado ou dentro da mucosa intestinal. Já os carotenóides obtidos na dieta são absorvidos pelas células da mucosa intestinal; e, por serem muito insolúveis em ambientes aquosos, eles são emulsificados com sais da bile e ácidos graxos livres dentro do lúmen do intestino, para sua transferência para dentro da mucosa (GOODMAN e BLANER, 1984; OLSON, 1989, 1990).

Dentro dos enterócitos, o retinol se liga à proteína ligadora de retinol celular (CRBP) II, uma proteína intracelular transportadora específica, que carrega uma molécula hidrofóbica de retinol através dos ambientes aquosos (BLOMHOFF et al, 1991; BLOMHOFF, 1994ab; ONG, 1994). A ligação com esta proteína permite a interação do retinol com as enzimas apropriadas para o seu metabolismo e lhe protege de oxidação e de outras transformações químicas.

Nos enterócitos, o β-caroteno pode passar por uma clivagem central ou uma clivagem excêntrica (**FIGURA 2**). Na clivagem central, o β-caroteno é clivado pela ação da enzima caroteno-15, 15'-dioxigenase, também conhecida como enzima clivadora de carotenóides (CCE), para formar retinal (forma aldeído da vitamina A), sendo esse o principal caminho que produz duas moléculas de retinal (GOODMAN e HUANG, 1965; OLSON E HAYAISHI, 1965). O retinal é então ligado ao CRBP II e reduzido a retinol pela enzima retinol desidrogenase. A clivagem excêntrica produz β-apo-carotenal com diferentes comprimentos de cadeias (ONG, 1994; DURING e HARRISON, 2004). O retinol derivado do carotenóide é metabolicamente indistinguível das outras formas de retinol que chegam pela dieta (VOGEL et al, 1999; GOODMAN E BLANER, 1984; BLANER e OLSON, 1994; GAMBLE e BLANER, 1999).

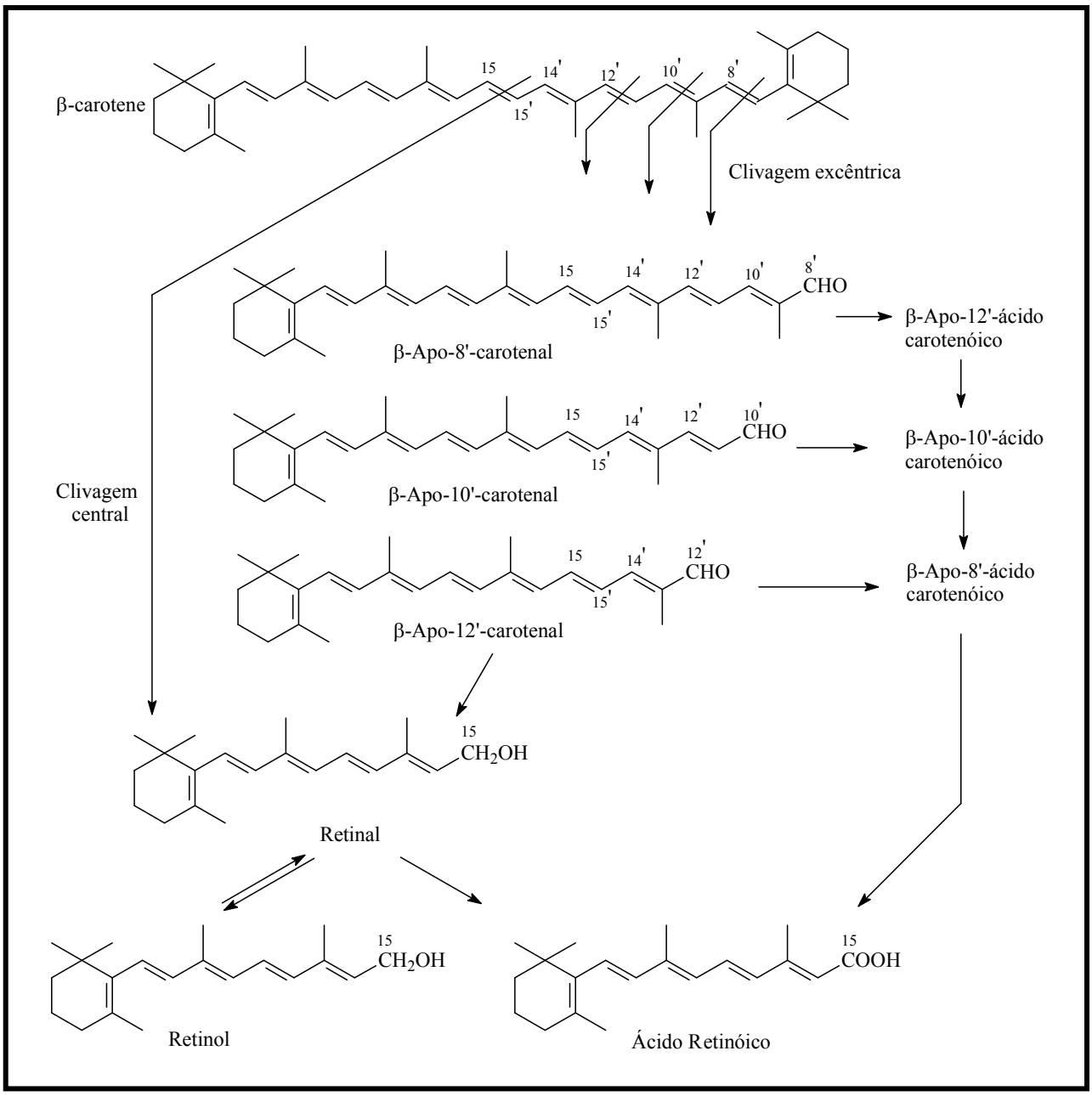

FIGURA 2 - Figura esquemática mostrando os dois mais importantes caminhos do metabolismo do β-caroteno: clivagem central e excêntrica (Fonte: DURING e HARRISON, 2004)

Assim, o retinol produzido no intestino, juntamente com o retinol adquirido na dieta e o retinol formado a partir dos carotenóides, passam por uma esterificação antes da sua incorporação nos quilomícrons. Esta conversão para ésteres é feita por duas enzimas: lecitil:retinol acetiltransferase (LRAT) e acetil CoA:retinol acetiltransferase. A primeira

esterifica o retinol ligado a CRBP II, enquanto que a última permite a esterificação do retinol livre presente na célula, no caso de uma ingestão importante de vitamina A e de saturação da CRBP II (BLOMHOFF et al, 1991; BLOMHOFF, 1994 b; ONG, 1994).

Os ésteres de retinila são, então, empacotados juntamente com outros lipídios provenientes da dieta nos quilomícrons. Os quilomícrons são secretados no sistema linfático e aproximadamente 75% da vitamina A proveniente da dieta é captada pelo fígado. Os ésteres de retinila nos quilomícrons são novamente hidrolisados, imediatamente depois da captação pelos hepatócitos. Os ésteres de retinila presentes nas células estreladas do fígado são convertidos à retinol pela hidrolase dos ésteres de retinila e o retinol é transferido para as células parenquimais. O retinol, então, pode ser secretado pelos hepatócitos na circulação, ligado a sua proteína transportadora chamada proteína ligadora de retinol (RBP). Este complexo binário está associado com outra proteína plasmática chamada transtiretina (TTR). De forma alternativa, o retinol pode ser armazenado no fígado (BLOMHOFF et al, 1991; BLOMHOFF, 1994 b; ONG, 1994).

Para sua atividade biológica, o retinol deve ser primeiramente oxidado a retinaldeído (11-cis-retinal, que é o cromóforo do pigmento visual chamado rodopsina) e subsequentemente oxidado a ácido retinóico, que é a principal forma ativa da vitamina A. O ácido retinóico age como ligante para fatores de transcrição modulando a expressão de um grande número de genes, incluindo os que codificam hormônios, fatores de crescimento, fatores de transcrição, receptores de membranas, proteínas da matriz extra-celular, proteínas estruturais e enzimas envolvidas em diversos processos metabólicos (MANGELSDORF et al, 1994; GUDAS et al, 1994) (**FIGURA 3**).

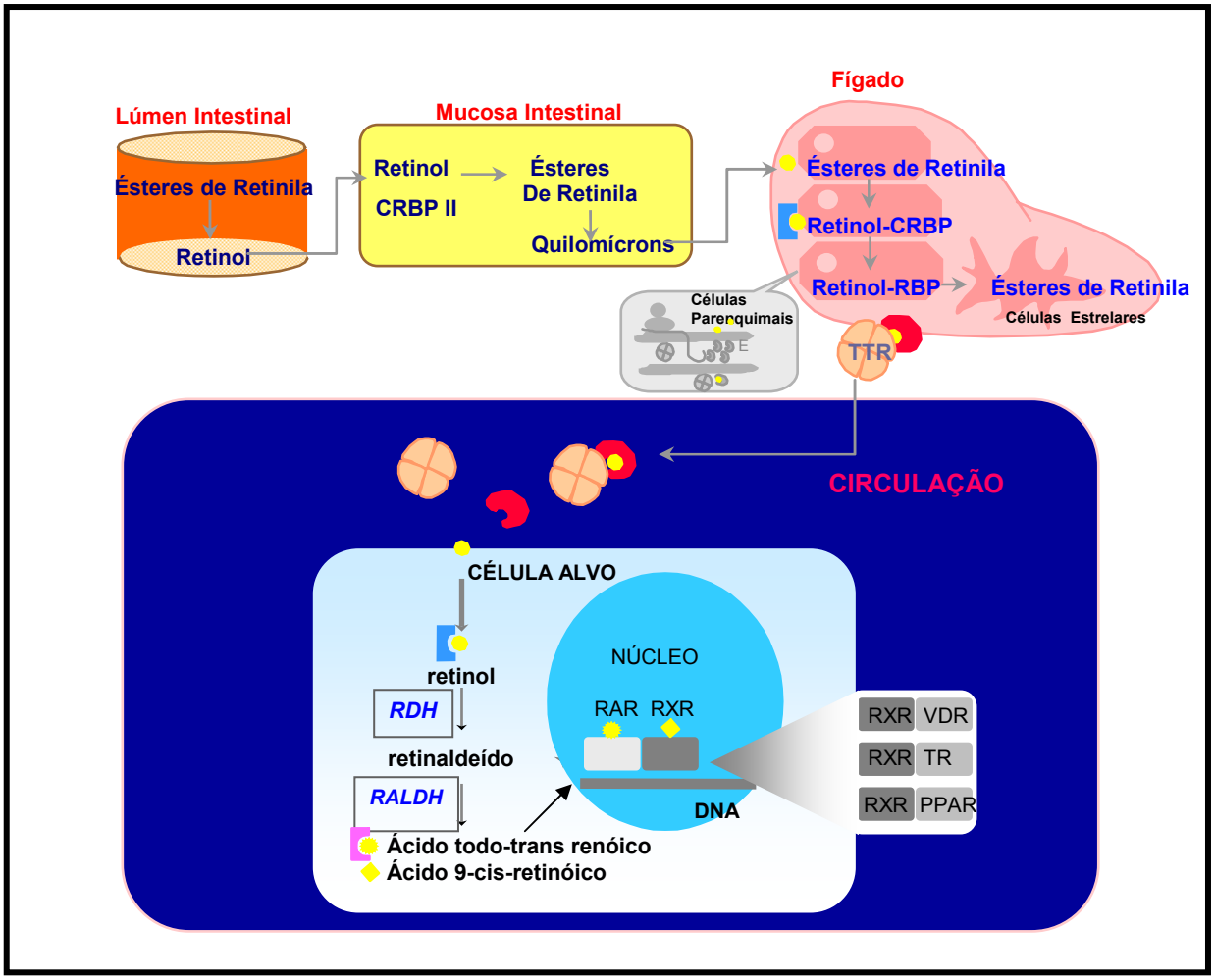

FIGURA 3 - Representação esquemática do metabolismo do retinol. CRBP, proteína de ligadora de retinol celular; RBP, proteína ligadora de retinol; TTR, transtiretina; RDH, retinol desidrogenase; RALDH, retinal desidrogenase; RAR, receptor do ácido retinóico, RXR, receptor X do retinóide; VDR, receptor da vitamina D; TR, receptor do hormônio da tireóide; PPAR, receptor ativado do proliferador peroxisoma.

1.4. TRANSPORTE E DISTRIBUIÇÃO DA VITAMINA A

1.4.1. Proteína Ligadora de Retinol (RBP)

Na circulação, 95% a 99% da vitamina A encontra-se ligada a sua proteína transportadora, chamada de protéina ligadora de retinol (RBP). A RBP foi isolada, pela primeira vez, em 1968 por Kanai e colaboradores (KANAI et al, 1968) apresentando-se como uma única cadeia polipeptídica

com peso molecular de aproximadamente 21 kDa, e com um sítio de ligação para o todo-*trans* retinol. Esse complexo binário está associado à outra proteína plasmática chamada transtiretina (TTR) (com molaridade 1:1) (MONACO et al, 1995). A formação desse complexo diminui a filtração glomerular e o catabolismo da RBP (SOPRANO e BLANER, 1994). Também a ligação da RBP à TTR aumenta a sua ligação ao retinol em aproximadamente duas vezes (NOY e XU, 1990). Na circulação, o complexo retinol-RBP apresenta uma meia-vida de aproximadamente 12 horas (INGENBLEEK et al, 1975) e as concentrações normais de RBP no sangue humano são de aproximadamente 40-60 μg/mL (~2-3 μM) (SOPRANO e BLANER, 1994; GOODMAN, 1984). O retinol é liberado pelo fígado junto ao RBP e já que a RBP tem apenas um sítio de grande afinidade para uma molécula de retinol, o retinol e a RBP existem na circulação em concentração aproximadamente equimolares (SMITH et al, 1973ab; INGENBLEEK et al, 1975). No organismo, os níveis de RBP são altamente regulados e permanecem constantes, exceto em caso de excesso ou insuficiência de vitamina A, ou no caso de doenças (KANAI et al, 1968).

A maioria dos tecidos adquire vitamina A através do retinol ligado a RBP (GOODMAN e BLANER, 1984). Acredita-se que o retinol entra na célula por difusão passiva ou através de um receptor para RBP (BLOMHOFF et al, 1991; BLOMHOFF,1994b). Muitos tecidos são conhecidos por expressarem receptores específicos na superfície celular que reconhecem o RBP. O mecanismo exato de transferência do retinol para a célula ainda está controverso e pode variar de um tecido para outro. Parece que a ligação do RBP ao seu receptor específico é obrigatória para a subsequente transferência do retinol para a célula (SILVAPRASADARAO e FINDLAY, 1988).

Acredita-se que o caminho predominante através do qual os tecidos adquirem os retinóides (retinol e seus análogos) seja através do retinol transportado pela RBP. No entanto, parece provável que outros retinóides na circulação sirvam também como fontes fisiológicas significantes de retinóides para os tecidos. Isto é claramente evidenciado pelo fenótipo dos ratos deficientes da RBP (totalmente desprovidos da RBP), apresentando níveis

praticamente indetectáveis de retinol (VOGEL et al, 1999; BLANER e OLSON, 1994; GAMBLE e BLANER, 1999). Um camundongo adulto com deficiência de RBP, mantido em uma dieta controlada, é viável e fértil mesmo com níveis extremamente baixos de retinol sanguíneo, sugerindo que estes caminhos alternativos de distribuição do retinol possam ser significantes para a distribuição dos retinóides para os tecidos (VOGEL et al, 1999; BLANER e OLSON, 1994; GAMBLE e BLANER, 1999). Alguns mecanismos independentes da RBP, através dos quais as células adquirem os retinóides, têm sido descritos Esses mecanismos incluem: (1) o do ácido retinóico livre, (2) os dos ésteres retinílicos em quilomícrons e quilomícrons remanescentes, (3) os dos glucoronídeos do retinol e do ácido retinóico solúveis em água e (4) os dos carotenóides pró-vitamina A que podem ser convertidos dentro dos tecidos a retinol e ácido retinóico (PAIK et al, 2004) (**FIGURA 4**).

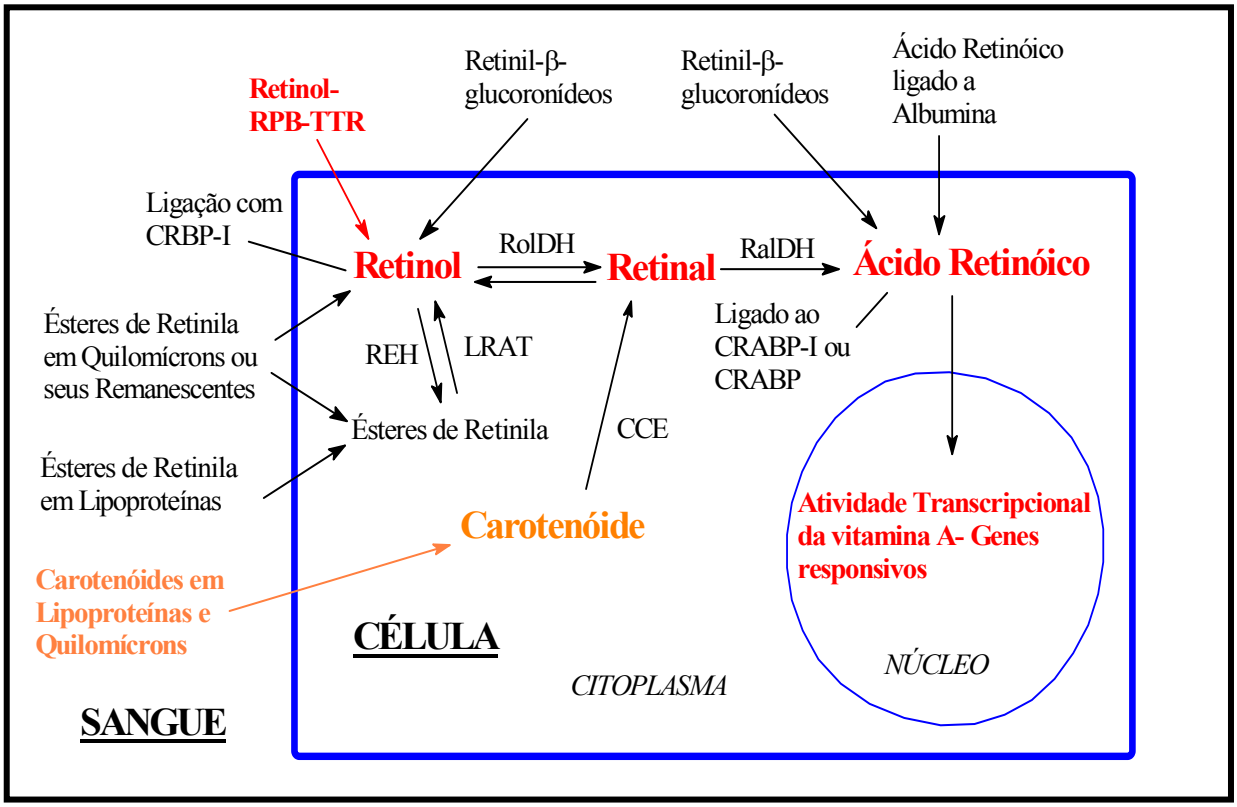

FIGURA 4 - Representação esquemática de como as diferentes formas da vitamina A podem chegar às células através do sangue (Fonte: PAIK et al, 2004). As abreviaturas desta figura estão descritas no texto a seguir.

Na **Figura 4**, o retinol ligado ao RBP e formando um complexo com a TTR é a forma predominante de vitamina A presente na circulação. O retinol captado pela célula pode ser tanto oxidado para retinal pela ação de uma das muitas retinol desidrogenases (RolDH) ou esterificadas a ésteres de retinila pela ação da lecitina:retinol acetiltrasferase (LRAT). Os ésteres de retinila presentes nas células podem ser hidrolisados a retinol pela ação da hidrolase dos ésteres de retinila (REH). Além do complexo retinol-RBP-TTR, depois do consumo de uma refeição rica em vitamina A, a circulação pode conter grandes quantidades de ésteres de retinila nos quilomícrons e nos seus remanescentes. Embora o fígado tenha a capacidade de captar a maioria da vitamina A da dieta, muitos tecidos captam alguma vitamina A da dieta presentes nos quilomícrons. O ácido retinóico ligado à albumina está presente na circulação, contudo os níveis são de apenas 0,1 a 0,4% daqueles do complexo retinol-RBP. Da mesma maneira, níveis relativamente baixos de retinil-β-glucoronídeos, de retinoil-β-glucoronídeos e de ésteres de retinila nas lipoproteínas também são encontrados na circulação.

Os carotenóides pró-vitamina A podem ser absorvidos intactos da dieta e são encontrados na circulação nos quilomícrons e nas lipoproteínas. O retinal formado tanto através da oxidação do retinol ou através da clivagem de um carotenóide pró-vitamina A, através da enzima clivadora dos carotenóides (CCE) é subsequentemente oxidado por uma retinal desidrogenase (RALDH) a ácido retinóico. O ácido retinóico pode agir dentro do núcleo da célula para regular a transcrição dos genes responsivos à vitamina A. Dentro das células, o retinol pode estar ligado à proteína ligadora de retinol celular, tipo I (CRBP-I) e o ácido retinóico pode ser encontrado ligado às proteínas ligadoras do ácido retinóico celular tipo I e tipo II (CRABP-I ou CRABP-II) (PAIK et al, 2004).

Em caso de deficiência de vitamina A, os níveis da proteína RBP no fígado estão de 3 a 10 vezes mais elevados do que nos fígados de animais recebendo uma dieta suficiente em retinóides (SOPRANO e BLANER, 1994; GOODMAN, 1984; SOPRANO et al, 1986). Os níveis do RNAm da RBP hepática não mostram diferença entre os dois estados nutricionais (SOPRANO e BLANER, 1994). Assim, está claro que os efeitos da deficiência

de vitamina A na secreção da RBP ocorre entre a tradução e a secreção da RBP do fígado.

1.4.2. Transtiretina (TTR)

A transtiretina (TTR) apresenta um importante papel funcional no transporte plasmático do hormônio da tireóide e do retinol. No organismo, o fígado e o plexo coróide são os principais tecidos de síntese e secreção da TTR (SOPRANO et al, 1985; HERBERT et al, 1986). No plasma, a TTR existe como um tretâmero de 55 kDa, de subunidades idênticas (KANDA et al, 1974; BLAKE et al, 1978). A TTR apresenta um sítio de ligação de alta afinidade pela tiroxina (T_4) (KANDA et al, 1974; FERGUSON et al, 1975; RAZ et al, 1970) e outro sítio de ligação para a RBP, sendo os dois sítios de ligação independentes (RAZ et al, 1970; VAN JAARSVELD et al, 1973). Como as concentrações da TTR plasmática estão normalmente de 2 a 3 vezes em excesso em relação às concentrações da RBP, a maior parte da RBP na circulação está ligada à TTR (GOODMAN, 1984; GOODMAN e BLANER, 1984; BLANER, 1989).

A eliminação do gene para TTR não é letal, e, de fato, camundongos deficientes em TTR são fenotipicamente normais, apesar dos níveis do complexo retinol-RBP na circulação serem de aproximadamente 5% do normal. Os níveis de ácido retinóico na circulação estão elevados de 2 a 4 vezes nesses animais (WEI et al, 1995). Os níveis de retinol hepáticos são os mesmos, tanto nos animais deficientes em TTR quanto nos animais controle. Já os níveis de RBP hepáticos estão 60% mais elevados nos camundongos deficientes em TTR em relação aos níveis de RBP hepáticos dos camundongos controle, sugerindo um bloqueio parcial da secreção da RBP (EPISKOPOU et al, 1993; WEI et al, 1995). Estudos de células hepáticas dessas duas linhagens de camundongos indicam que os níveis de RNAm e da liberação da RBP para o meio não são alteradas. Assim, parece que a acumulação da proteína RBP hepática ocorre devido ao aumento da síntese da RBP, ou pela diminuição da degradação intracelular da RBP. Contudo, a TTR pode não ser essencial para a liberação da RBP para todos os tecidos

ou tipos de células, já que alguns estudos com células não-hepáticas demonstraram que a síntese e a liberação da RBP pode ocorrer na ausência da TTR (ZOVICH et al, 1992; MELHUS et al, 1991; DAVIS e ONG, 1992).

1.5. FISIOLOGIA DA VITAMINA A

A vitamina A (retinol) é o precursor imediato de dois importantes metabólitos ativos: o retinaldeído (retinal), que tem um papel importante para visão, e o ácido retinóico, o qual serve como um mensageiro intracelular que afeta a transcrição de vários genes (WALD, 1968; GINGUERE et al, 1987). A vitamina A está envolvida no controle da diferenciação e proliferação de vários epitélios no organismo (REXER et al, 2001). O retinol e seus metabólitos são essenciais para o crescimento e diferenciação celular, particularmente do tecido epitelial (NAU e BLANNER, 1999).

Essas funções do retinol parecem ser mediadas através da ligação do ácido retinóico a receptores nucleares para retinóides. Os receptores para retinóides já identificados são os receptores do ácido retinóico (RAR) e os receptores X para retinóide (RXR) (CHAMBON, 1996). Esses receptores apresentam uma afinidade específica para algumas formas isoméricas do ácido retinóico: o RAR é responsivo para o ácido todo-*trans*-retinóico e o ácido 9-*cis*-retinóico, enquanto que o RXR é responsivo apenas para o ácido 9-*cis*-retinóico (CLAGETT-DAME e DELUCA, 2002; BONET et al, 2003; MARILL et al, 2003). Uma vez ativado pelos seus ligantes, o RAR se liga, como heterodímeros RAR-RXR, às sequências alvo específicas do DNA, chamadas de elementos responsivos para o ácido retinóico. Essa ligação leva à mudanças (ativação ou inibição) na expressão de genes que mediam efeitos biológicos (ROSS e GARDNER, 1994; NAPOLI, 1999; CLAGETT-DAME e DELUCA, 2002; BONET et al, 2003).

Os retinóides não apenas regulam a transcrição via ativação dos receptores específicos para retinóides. Eles também podem formar uma ligação covalente com algumas proteínas, podendo modificar as propriedades das proteínas alvos e assim a sua atividade (MARILL et al, 2003). Por exemplo, os retinóides parecem suprimir a atividade da proteína 1 ativada,

que medeia o sinal para os fatores de crescimento e promotores de tumores (KLAASSEN e BRAAKHUIS, 2002).

A forma ativa da vitamina A na visão é o retinal, o qual é derivado do retinol e dos ésteres de retinila da circulação. O ácido retinóico é inativo no processo da visão (ZILE e CULLUM, 1983). O retinal é essencial para visão no escuro como também para a percepção das cores. Ele está situado nos fotoreceptores da retina. Dois tipos de fotoreceptores estão presentes na retina: rodopsinas e iodopsinas (OLSON, 1984). Os primeiros estão localizados nos bastonetes e estão envolvidos na visão na luz fraca. Os últimos estão presentes nos cones e estão envolvidos na percepção das cores e na visão na luz forte. Estes dois receptores são compostos de uma molécula de 11-*cis*-retinal ligada covalentemente a uma proteína, a opsina (ZILE e CULLUM, 1983; PEPE, 1999). Na presença de luz, 11-cis retinal é convertido para todo-*trans*-retinal (OLSON, 1984). O todo-*trans*-retinal é então reduzido para todo-*trans*-retinol, que é isomerizado para a 11-*cis*-retinol por uma isomerase do retinol. A retinol desidrogenase finalmente oxida o 11-*cis*-retinol para o correspondente isômero do retinal. No escuro, o 11-*cis*-retinal combina-se novamente com a opsina e o complexo é regenerado (ZILE e CULLUM, 1983; OLSON, 1984; PEPE, 1999). Algumas moléculas de vitamina A são perdidas durante o ciclo. Assim, é necessário se ter um suplemento contínuo de todo-*trans*-retinol através da corrente sanguínea para gerar quantidades suficientes de pigmentos. A cegueira noturna e a visão dupla são sinais de hipo- e hipervitaminose A, respectivamente (BASU e DICKERSON, 1996).

A vitamina A também apresenta papel essencial na reprodução feminina, desde a implantação do embrião até o nascimento do neonato viável. Nos homens, o retinol e o ácido retinóico estão envolvidos na regulação da função testicular; a deficiência induz a cessação da espermatogênese e afeta a produção de testosterona (THOMPSON et al, 1963; ESKILD e HANSSON, 1994; LIVERA et al, 2002).

Durante a gestação, a vitamina A é transferida para o feto através da placenta. Esse suprimento é essencial, já que os retinóides estão envolvidos no crescimento e diferenciação celular do feto (ZACHMAN, 1995).

A vitamina A apresenta um papel essencial no desenvolvimento de órgãos tais como os pulmões (ZACHMAN, 1995; MASSARO et al, 2000; MENDELSON, 2000; CARDOSO, 2001; BIESALSKI e NOHR, 2003), coração (MENDELSOHN et al, 1999; ROSS et al, 2000) e esqueleto (YAMAGUCHI et al, 1998). O ácido retinóico também possibilita a organização do sistema vascular e nervoso (ROSS et al, 2000; MADEN, 2001; COLBERT, 2002).

Os ácidos todo-*trans*-retinóico e 9-*cis*-retinóico apresentam papel central na regulação do desenvolvimento, diferenciação e apoptose de células imunes, que são requeridas para o bom funcionamento da imunidade (SEMBA, 1998). O ácido retinóico também tem um papel na regeneração das barreiras das mucosas danificadas pela infecção. Os mecanismos moleculares pelos quais a vitamina A afeta a função imune ainda não foram bem examinados (STEPHENSON, 2001).

A vitamina A também é essencial para a diferenciação celular, explicando assim o seu papel na manutenção da integridade dos epitélios genitais, gastrointestinal e respiratório (MCLAREN, 1984; MCCULLOUGH et al, 1999; BIESALSKI e NOHR, 2003). O ácido retinóico controla a diferenciação das células epiteliais através da sua ligação com os receptores: receptores do ácido retinóico e receptores X para retinóides (BIESALSKI e NOHR, 2003). Em geral, a deficiência de vitamina A induz a problemas na integridade epitelial do olho, do trato respitatório, gastrointestinal e reprodutivo (MCCULLOUGH et al, 1999).

1.6. TOXICIDADE DA VITAMINA A

A toxicidade induzida pela dieta com retinóides ocorre com pouca frequência, desde que os retinóides pré-formados não são abundantes nos suplementos alimentares, com excessão do fígado, que geralmente não é consumido em grande quantidade. A toxicidade induzida pelo uso excessivo de suplementos ocorre, mas raramente, como os incidentes que foram reportados numa média de menos de dez casos por ano entre 1976 e 1987 (BENDICH e LANGSETH, 1989). O desenvolvimento da hipervitaminose A é influenciada pela composição do suplemento, o regime da dose, e possíveis

interações com outros micronutrientes (BENDICH e LANGSETH, 1989). Alterações nas concentrações de retinóides no sangue induzidos pela toxicidade da vitamina A incluem aumento dos ésteres de retinila e do ácido retinóico na circulação, e uma queda dos níveis do complexo retinol-RBP na circulação (GOODMAN, 1984). Tem sido demonstrado defeitos em crianças nascidas de mulheres fazendo o uso do ácido 13-cis retinóico (isotretinoin) para a pele, durante a gravidez (ISHIJIMA e SANDO, 1999).

A maior parte dos estudos toxicológicos é feita para determinar a segurança dos retinóides sintéticos. Paradoxalmente, os efeitos tóxicos de muitos retinóides sintéticos se parecem com os efeitos vistos na deficiência da vitamina A, como a cegueira-noturna. Isto ocorre porque muitos retinóides sintéticos causam uma redução nos níveis de retinol-RBP na circulação, possivelmente pela sua ligação com a RBP hepática recém sintetizada e prevenindo a sua secreção (ARMSTRONG et al, 1994).

1.7. AVALIAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A

A deficiência de vitamina A só se torna evidente quando ela progride para um estágio severo, por isso fica limitada uma detecção mais inicial da deficiência de vitamina A clinicamente. Existem, no entanto, algumas técnicas para avaliar a concentração da vitamina A, como as descritas a seguir.

Avaliação do retinol sanguíneo, que apesar de ser o método mais comumente aplicado, apresenta algumas desvantagens, pois muitas vezes o retinol sanguíneo pode não refletir completamente as reservas de retinol do corpo, sendo caro e exigindo técnica especializada para sua medida. Também a presença de febre (STEPHENSEN et al, 1994; ALVAREZ et al, 1995; FRIIS et al, 1996; MITRA et al, 1998) e diarréia (BLOEM et al, 1990; CABALLERO et al, 1996; AKINYINKA et al, 2000), com consequente elevação das proteínas de fase aguda, causam a redução nas concentrações de retinol sanguíneo, (THURNHAM et al, 2002) e podem induzir a um erro de interpretação dos resultados (STEPHENSEN, 2000).

Os valores do retinol sanguíneo que são indicativos da deficiência de vitamina A, identificam indivíduos com severa deficiência de vitamina A

(retinol sanguíneo $\leq$ 0,35 μM), com moderada deficiência de vitamina A (retinol sanguíneo entre 0,36 – 0,70 μM), com leve deficiência de vitamina A (retinol sanguíneo entre 0,71 – 1,05 μM) e com níveis suficientes de vitamina A (retinol sanguíneo > 1,05 μM) (UNDERWOOD, 1994).

A determinação da proteína ligadora de retinol (RBP), parece ser uma boa medida alternativa para o retinol sanguíneo, pois, apesar da RBP, como o retinol, não refletirem os estoques de vitamina A no fígado, na presença de uma infecção, a análise da RBP para o diagnóstico de deficiência de vitamina A oferece algumas vantagens: a) é um método mais simples e mais barato que a dosagem de retinol, desde que não necessita da tecnologia da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); b) requer apenas 10 μL de sangue; c) a RBP não degrada na presença dos raios ultravioleta; e d) apresenta potencial de aplicação nos campos de pesquisa (GAMBLE et al, 2001).

Testes funcionais como o de dose-resposta relativa (RDR) (AMEDEE-MANESME et al, 1984; LOERCH et al, 1979) e o teste RDR modificado (DUITSMAN et al, 1995) têm sido desenvolvidos para acessar as reservas de retinol do fígado. Nesses testes, mede-se a magnitude da liberação do retinol-RBP do fígado para circulação, em resposta a uma dose oral de retinol para o RDR, ou de um análogo do retinol para o teste de dose-resposta relativa modificada (MRDR). Uma resposta exagerada na circulação indica acúmulo de RBP no fígado, devido à deficiência de vitamina A e estoques inadequados de retinol hepático. O RDR requer duas amostras de sangue, e ambos os testes requerem administração de retinol ou de um análogo de retinol, e a coleta das amostras de sangue é feita depois de 5 horas, e ambos necessitam da tecnologia da HPLC.

Um método capaz de estimar quantitativamente os estoques totais de retinol do corpo é a técnica de diluição de um isótopo (FURR et al, 1989). Esse método, entretanto, requer instrumentos sofisticados (HPLC e espectrofotometria de massa acoplada à cromatografia gasosa) e o uso de um isótopo estável, sendo, desse modo, uma técnica impraticável para estudos populacionais.

Os níveis de retinol no leite materno tem sido sugerido como um indicador dos níveis de vitamina A populacionais. Foi demonstrado por Stotzlfus e colaboradores (1993), que as concentrações do retinol do leite materno são mais sensíveis às alterações do estado nutricional da vitamina A do que as concentrações de retinol sanguíneo; entretanto, existe uma variação considerável no retinol materno pela manhã e entre as mamadas (UNDERWOOD, 1994).

Outras técnicas existentes são a citologia de impressão conjuntival (CIC) e a citologia de impressão com transferência (ICT), em que células epiteliais conjuntivais são coletadas em uma tira de papel de filtro de éster-celulose, da pálpebra inferior do olho. O tipo e a morfologia das células são avaliadas usando microscopia comum com luz natural. Na deficiência de vitamina A, existe a ausência ou diminuição das células caliciformes e as células epiteliais apresentam uma aparência escamosa e achatada, com núcleo pequeno. Essas técnicas são limitadas pela dificuldade de obtenção das amostras, pois as crianças ficam amedrontadas com o procedimento da coleta, sendo culturalmente inaceitável e, além do mais, demonstrou ser uma ferramenta de baixa sensibilidade e especificidade para detecção da deficiência de vitamina A (UNDERWOOD, 1994).

Portanto, é importante a identificação de populações com risco de deficiência de vitamina A, para que esses grupos se beneficiem de intervenções que melhorem o seu estado nutricional de vitamina A, evitando os riscos de morbidade e mortalidade descritos anteriormente.

1.8. VITAMINA A E RESPOSTA DE FASE AGUDA ÀS INFECÇÕES E INFLAMAÇÕES

As concentrações de retinol sanguíneo são normalmente mantidas com apenas pequenas alterações em indivíduos com estoques adequados de vitamina A no fígado. Quando os estoques do fígado são esgotados, as concentrações de retinol sanguíneo diminuem. Assim, o retinol sanguíneo é um indicador útil da concentração de vitamina A e pode ser usado para identificar indivíduos com reservas de vitamina A no fígado, que estejam

diminuídos ou esgotados (GIBSON, 1990; UNDERWOOD, 1994). No entanto, as concentrações de retinol sanguíneo diminuem transitoriamente durante uma resposta de fase aguda a infeções (MITRA et al, 1998; BEISEL, 1998; THURNHAM, 1997; ROSS e STEPHENSEN, 1996; FILTEAU et al, 1993). Esta diminuição não reflete mudanças nos estoques de vitamina A no fígado e, assim, pode interferir com o uso do retinol sanguíneo como um indicador da concentração de vitamina A. Mudanças similares ocorrem com outros micronutrientes, incluindo o ferro e o zinco (KLASING, 1988). Nas populações em que as infecções são altamente predominantes, como crianças morando em áreas pobres de países em desenvolvimento, esse fenômeno pode ser uma fonte de resultados falso-positivos em pesquisas designadas para se determinar a predominância de deficiência de micronutrientes (BROWN et al, 1993).

Quanto mais grave for a infecção (que pode ser mensurada pela temperatura do corpo ou pela concentração de uma proteína de fase aguda positiva), maior será a diminuição do retinol sanguíneo. Esta diminuição é transitória e o retinol sanguíneo tipicamente retorna para os níveis da pré-infecção dentro de alguns dias (MITRA et al, 1998). Alguns mecanismos, provavelmente contribuem para essa diminuição transitória. O aumento da permeabilidade vascular nos sítios da inflamação pode levar ao extravazamento da RBP no espaço extravascular, e assim diminuir os seus níveis sanguíneos. Também, o retinol pode se perder na urina durante uma infecção. Um estudo demonstrou que dentre as crianças que foram hospitalizadas com disenteria, as que perderam 0,1 μmol de retinol por dia na urina (8% das crianças, que significa 15% da concentração basal de retinol requerida pela organização Mundial de Saúde e da Organização de Alimentos e Agricultura), apresentaram concentrações de retinol sanguíneo mais baixas do que as crianças que excretaram menos retinol (MITRA et al, 1998), o que sugere que a perda urinária contribui para diminuir os níveis de retinol sanguíneo. Mas esse efeito parece ser significante apenas em infecções severas. Acredita-se que a principal razão para a diminuição do retinol sanguíneo durante uma infecção relativamente leve, é que a síntese do RNAm da RBP pelo fígado esteja diminuída durante uma reação de fase

aguda, resultando na diminuição da liberação do retinol-RBP pelo fígado (ROSALES et al, 1996).

A interpretação de dados das concentrações de nutrientes na circulação como a vitamina A, fica, assim, dificultada com infecções (BROWN et al, 1993; BEISEL, 1976), e por isso tem sido sugerido que proteínas de fase aguda possam ser usadas para interpretar os dados séricos de retinol de populações com alta prevalência de infecções (FILTEAU et al, 1993; PARACHA et al, 2000; QUADRO et al, 2000).

A resposta de fase aguda é a reação imediata do organismo às infecções e inflamações. Mudanças na síntese de proteínas de fase aguda mantêm a homeostase do organismo e reverte o dano tecidual. Dentre as proteínas que se mantêm elevadas na resposta de fase aguda, a proteina C-reativa (CRP) e a glicoproteína α-ácida (AGP) são geralmente utilizadas para avaliar a presença de uma resposta de fase aguda. Elas são escolhidas pelos seus diferentes tempos de curso depois da infecção. A CRP demonstra um rápido crescimento e queda durante a resposta de fase aguda (aumenta dentro das 6 primeiras horas da infecção e alcança a sua concentração máxima dentro de 24-48 horas) (FLECK e MYERS, 1985; CALVIN et al, 1988), enquanto a concentração da AGP demora mais para subir e atinge sua concentração máxima em 2-5 dias depois da infecção (FLECK e MYERS, 1985; STUART e WHICHER, 1988), apresentando um curso mais semelhante ao retinol na circulação (BANKS et al, 1995).

Mudanças no curso dos níveis de retinol, RBP e TTR durante uma resposta de fase aguda ainda não foram bem estudadas. Já tem sido demonstrado em estudos experimentais em ratos uma cinética de pequena duração (mais de 24 horas) do retinol e RBP plasmáticos depois da inflamação induzida por lipopolisacarídio, e uma cinética mais tardia para TTR (ROSALES et al, 1996). Estudo em pacientes com câncer que receberam IL-6 subcutânea (uma citocina chave envolvida na resposta de fase aguda) revelou que o RBP e o TTR caem para um valor muito baixo em 48 a 96 horas depois da injeção de IL-6 e depois aumentam para níveis semelhantes ou mais elevados aos da pré-injeção em 3 a 9 dias depois da terapia (BANKS et al, 1995).

A RBP e a TTR estão diminuídas durante uma reação de fase aguda, independente dos níveis de retinol armazenados no fígado e da presença ou ausência de deficiência de vitamina A. Estudos sugerem que a fisiologia do retinol ligado a RBP mantêm os dois bem correlacionados, mesmo em casos de uma resposta de fase aguda (ROSALES e ROSS, 1998; RAMSDEN et al, 1978; TABONE,1992). Tem sido proposto que a razão RBP:TTR possa servir como uma ferramenta para determinação da concentração de vitamina A, podendo distinguir entre uma deficiência de vitamina A e baixos níveis de retinol passageiros causados por uma reação de fase aguda (ROSALES e ROSS, 1998). Isto está baseado no fato de que embora a RBP e a TTR sejam proteínas negativas de fase aguda (RAMSDEN et al, 1978), a RBP está diminuída durante a deficiência de vitamina A enquanto que a TTR não está ou está pouco diminuída (ROSALES e ROSS, 1998). Assim, a relação entre a RBP e a TTR deverá manter-se constante durante uma resposta de fase aguda, na ausência da deficiência de vitamina A, mas deverá diminuir durante deficiência de vitamina A, mesmo que se tenha uma resposta de fase aguda (ROSALES e ROSS, 1998). Assim, a infecção sozinha tem pouco efeito na razão RBP:TTR, enquanto que a deficência de vitamina A diminui esta razão.

ROSALES e ROSS (1998) demonstraram que a razão RBP:TTR mostrou-se útil para se avaliar o estado nutricional da vitamina A em ratos submetidos a uma inflamação aguda e em crianças com sarampo. No entanto, esta razão não demonstrou refletir a concentração de vitamina A em crianças se recuperando de uma severa desnutrição (DONNEN et al, 1998). Estudos mais aprofundados são necessários para se determinar para quais indivíduos esta marcação pode ser útil.

1.9. VITAMINA A E FUNÇÃO INTESTINAL

As células epiteliais revestem a mucosa gastrointestinal e formam uma importante barreira que protege os tecidos subepiteliais contra uma grande variedade de substâncias nocivas, alérgenos, vírus e patógenos microbianos luminais. O epitélio intestinal apresenta duas propriedades: uma de barreira

para proteção contra diversos agentes presentes no lúmen; e a propriedade funcional de transporte de moléculas importantes para a vida. A permeabilidade intestinal refere-se à barreira funcional e a passagem de marcadores é geralmente utilizada para medir essa permeabilidade (MENZIES, 1983; TRAVIS e MENZIES, 1992). Assim, define-se permeabilidade como um fluxo de solutos através de uma unidade de área de membrana num certo tempo. A permeabilidade, em outras palavras, se refere à facilidade com que a superfície da mucosa intestinal pode ser penetrada por substâncias e marcadores por difusão sem intermediadores de constituintes específicos.

A efetividade e estabilidade da barreira epitelial dependem de um complexo de proteínas que compõem diferentes junções intercelulares, as quais incluem as junções de oclusão, as zônulas de adesão e os desmossomas (CEREIJIDO et al, 2000; COLLARES-BUZATO et al, 1994; GUMBINER, 1996; MITIC e ANDERSON, 1998; TAKEICHI, 1990; YAP et al, 1997). Estas junções completamente circundam a região subapical das células epiteliais e mantêm a integridade estrutural e a função fisiológica do epitélio (CEREIJIDO et al, 1998; GUMBINER et al, 1988; GUMBINER, 1996). As junções de oclusão e adesão apresentam uma organização estrutural comum, e seus complexos de ligação são constituídos de componentes trans-membrânicos com função adesiva e proteínas adaptadoras citosólicas que promovem uma ligação direta ou indireta ao citoesqueleto. A junção de oclusão é a mais superficial destes complexos de ligação, e une as células epiteliais de uma maneira que previne mesmo as pequenas moléculas de escapar por entre as células (CEREIJIDO et al, 2000; CEREIJIDO et al, 1998; MADARA, 1998; NUSRAT et al, 2000). Imediatamente abaixo das junções de oclusão estão as junções de adesão ricas em caderina que medeia a forte adesão de célula para célula (ADAMS et al, 1996; ANGRES et al, 1996; GUMBINER et al, 1988; GUMBINER, 1996) (**FIGURA 5**).

Evidências crescentes sugerem que a reunião das junções de oclusão entre as células epiteliais requer primeiramente a formação das junções de adesão, e assim a alteração das junções de adesão dependentes da caderina modula a formação das junções de oclusão e a função da barreira epitelial

paracelular (ALEXANDER et al, 1993; FUJIMORI e TAKEICHI, 1993; MAN et al, 2000; SILICIANO e GOODENOUGH, 1988; TROXELL et al, 2000; VENKITESWARAN et al, 2002). As caderinas são um grupo de moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} essenciais para a indução e manutenção dos contatos intercelulares (ANGST et al, 2001; GUMBINER, 1996; TAKEICHI, 1990). A caderina-E é primeiramente encontrada nas junções de adesão e é a principal caderina expressa nas células epiteliais, incluindo as caderinas do trato gastrointestinal (GUMBINER, 1996; HANBY et al, 1996; SHORE e NELSON, 1991; TAKEICHI, 1990). A forte adesão célula-célula mediada pela caderina-E parece ser necessária para a função da barreira epitelial, e os sinais que são transmitidos através das junções de adesão podem também regular as junções de oclusão (ANGST et al, 2001; MAN et al, 2000; TAKEICHI, 1990; VARLAMOV et al, 1997).

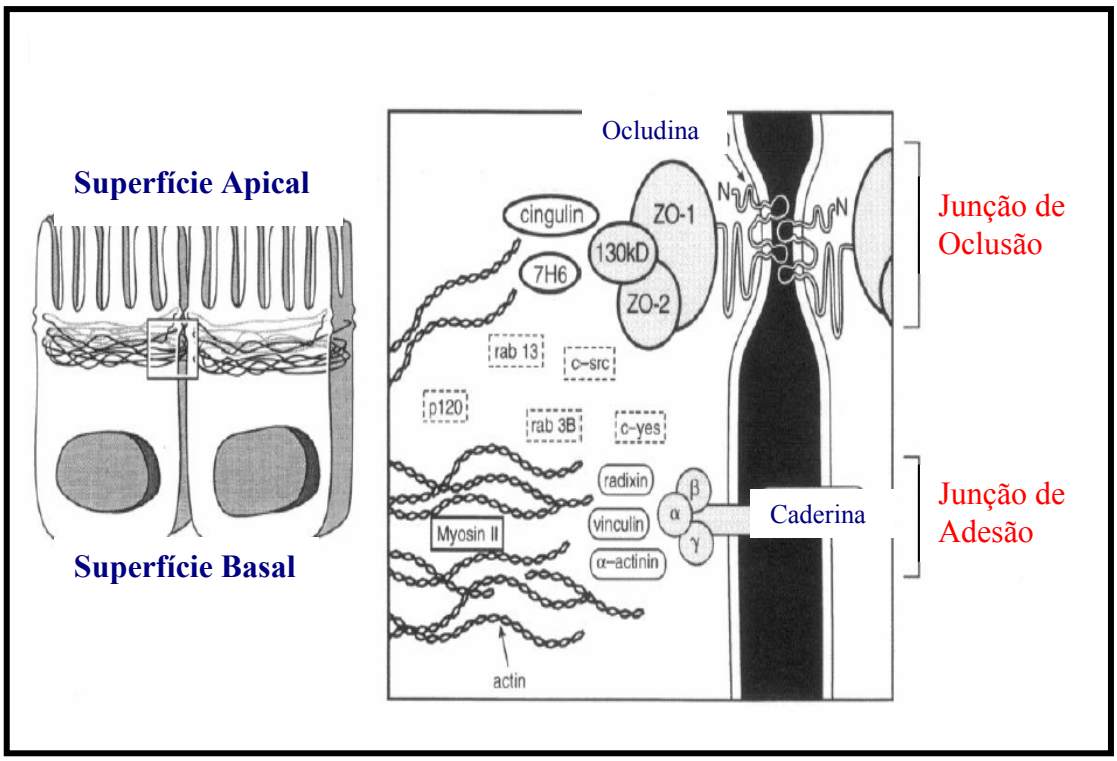

FIGURA 5 - Representação esquemática do epitélio intestinal mostrando as junções de oclusão e adesão (Fonte: ANDERSON e VAN ITALLIE, 1995).

A manutenção da integridade do epitélio gastrointestinal é determinada pelo balanço entre fatores que causam danos e fatores que protegem o

epitélio, incluindo a rápida restituição. O dano na mucosa ocorre comumente por um leve trauma físico durante a digestão, até um dano localizado pela ingestão de álcool, aspirina, e/ou compostos antiinflamatórios não-esteroidais, por uma infecção por *Helicobacter pylori* ou por várias doenças que acometem o homem, como doenças diarréicas, celíaca, de Crohn e colite ulcerativa, que estão frequentemente associadas com alterações na integridade e permeabilidade intestinais. Na maioria das favelas do Nordeste do Brasil, as crianças nos seus primeiros dois anos de vida, apresentam índices de doenças diarréicas que estão entre os mais altos de todo o mundo (SCHORLING et al, 1990).

O restabelecimento da integridade da mucosa intestinal e a reparação de feridas e úlceras requerem a ação das células epiteliais as quais regulam as redes de sinalização que controlam a expressão de genes, sobrevida, migração e proliferação. Na resposta aguda a um dano, as células lesadas são descartadas e as células viáveis remanescentes de áreas adjacentes ou localizadas logo abaixo da superfície lesada, migram para cobrir a área desnuda. Esta restituição precoce promove o fechamento de feridas superficiais como uma conseqüência da migração de células epiteliais para a área afetada, num processo que é independente da proliferação das células epiteliais (RUTTEN e ITO, 1983; SILEN e ITO, 1985). Ao contrário deste rápido processo de reparação, o dano mais profundo e as úlceras crônicas manifestam respostas complexas que requerem a formação de RNAm *de novo*, síntese de proteínas e replicação celular. A rápida restituição epitelial é um processo complexo que é regulado por numerosos fatores incluindo muitos nutrientes como a vitamina A.

Poucos estudos in vitro, especialmente aqueles usando modelos para o epitélio intestinal (PLATTEROTI et al, 1993; MCCORMACK et al, 1996; FUKUSHIMA et al, 1998) demonstraram, a nível molecular, que os retinóides são importantes para a diferenciação do epitélio intestinal. Apenas alguns estudos têm investigado o papel dos receptores nucleares e seus ligantes na formação das junções de oclusão e permeabilidade paracelular. Alguns deles (TOBIOKA et al, 1996; SATOH et al, 1996; KUBOTA et al, 2001) sugerem que muitos componentes das junções de oclusão são alvos para os

retinóides, embora nenhum destes estudos se referem ao epitélio intestinal. Já estudos mais recentes, usando uma linhagem celular intestinal chamada Caco-2, demonstraram que os retinóides têm um impacto na integridade epitelial intestinal através do seu efeito na diferenciação e permeabilidade intestinal (BALTES et al, 2004). Neste estudo, demonstrou-se um aumento da expressão de um gene para uma das proteínas associadas às junções de oclusão, claudina-2.

1.9.1. Vitamina A e Barreira Funcional Intestinal

A vitamina A e seus análogos são reguladores nutricionais chaves para o crescimento e diferenciação das células intestinais epiteliais. Estudos demonstram que a deficiência de vitamina A diminui a altura do vilus do intestino delgado e a atividade dissacarídica, e piora o dano intestinal em doenças inflamatórias intestinais experimentais em ratos (WARDEN et al, 1997). Também, durante quimioterapia, ratos com deficiência de vitamina A induzida pela dieta apresentaram aumento do dano intestinal, o qual foi prevenido pela suplementação com vitamina A (WARDEN et al, 1997). A suplementação com vitamina A também previne alguns dos efeitos colaterais iniciais de radiação no intestino delgado (BEYZADEOGLU et al, 1997). Esse efeito protetor pode parcialmente ser resultado da capacidade da vitamina A de induzir a diferenciação das células da cripta, tornando essas células menos susceptíveis a danos em seu genoma (RUIFROK et al, 1996). Também, a vitamina A tem propriedades antioxidantes que podem reduzir a sensibilidade celular a radiação.

A vitamina A também parece regular os estágios iniciais de adaptação intestinal depois de procedimento cirúrgico no intestino delgado de ratos, através do aumento da proliferação das células da cripta do intestino em adaptação (WANG et al, 1997). SWARTZ-BASILE e colaboradores (2000) demonstraram que a depleção preexistente de vitamina A significativamente inibiu a resposta adaptativa do intestino delgado a um procedimento cirúrgico em uma grande área do intestino delgado, enquanto que a suplementação com vitamina A rapidamente melhorou a resposta adaptativa quando

comparados com os ratos deficientes em vitamina A (SWARTZ-BASILE et al, 2000). Muitos estudos em países em desenvolvimento sugerem que a suplementação com vitamina A a indivíduos com carência de vitamina A diminui o risco de diarréia e da disfunção da barreira intestinal, demonstrando o papel importante desse nutriente no reparo e na função da mucosa intestinal (DUGGAN et al, 2002).

MCCULLOUGH e colaboradores (1999) demonstraram que um dos principais alvos dos efeitos imunomoduladores da vitamina A poderia ser o intestino. A maioria dos agentes infecciosos entram no organismo através da superfície epitelial da nasofaringe, do intestino, dos pulmões e do trato genitourinário. Essas superfícies são protegidas por agentes solúveis como muco, lisoenzimas, fatores do complemento, proteínas de fase aguda e também por fagócitos. Existe evidência de que a integridade da superfície celular influencia a susceptibilidade do organismo às infecções. Em particular, onde se tem uma baixa integridade intestinal, existe risco aumentado da translocação bacteriana através da parede intestinal com consequente aumento do risco de infecções (BERG, 1983; ALEXANDER, 1998).

Não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual a vitamina A atua na infecção, mas pode ser possível que ela atue diretamente nas células imunes, ou como os tecidos do intestino são capazes de usar os nutrientes tanto da parte serosa da mucosa quanto do lúmen, pode ser possível que a vitamina A proveniente da dieta atue diretamente no intestino para restaurar sua integridade e assim reduzir a translocação bacteriana e o risco de outras infecções (THURNHAM et al, 2000). ROSS (1992) sugeriu também, que o papel da vitamina A de regular a diferenciação celular poderia, pelo menos parcialmente, explicar a influência da mesma nas barreiras epiteliais, competência imune, resistência à cicatrização e recuperação.

Como já foi mencionado anteriormente, a desnutrição e a diarréia são uns dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento, e as interações entre eles são sinergéticas, bi-direcionais e complexas (GUERRANT et al, 1992; GUERRANT et al, 2000; SCHORLING et al, 1990; MOORE et al, 2000; MATA, 1992), compondo o “ciclo vicioso” (GUERRANT, 1998). Neste ciclo vicioso, o dano intestinal, como uma das consequências da

diarréia (BARBOZA et al, 1999; BEHRENS et al, 1987; PIRES et al, 1999; LUNN et al, 1991a), pode ser responsável pela desnutrição (LUNN et al, 1991a; LUNN et al, 1991b), e tanto o dano intestinal como a desnutrição aumentam a predisposição para diarréia (GUERRANT et al, 1992; SCHORLING et al, 1990; LUNN et al, 1991a; BAHL et al, 1998). Além disso, a deficiência de vitamina A é comum em crianças desnutridas, e por isso tem se tornado foco de interesse. Alguns estudos em modelos animais têm demonstrado o relacionamento entre a permeabilidade da mucosa intestinal e a vitamina A (HOLLAND et al, 1993; CHAUHAN e KANSAL, 1989). Por conseguinte, torna-se plausível admitir que suplementação com vitamina A em crianças, possa ajudar a quebrar esse ciclo vicioso da mucosa (LUNN et al, 1989; NORTHROP et al, 1990).

1.9.2. Medida da Permeabilidade Intestinal

Moléculas inertes passam através das superfícies absortivas de acordo com o gradiente de concentração, da área da superfície e do tempo, como também da permeabilidade da mucosa intestinal. A mucosa demonstra uma discriminação acentuada no tocante a dimensão molecular e solubilidade das moléculas inertes e esta discriminação torna-se prejudicada com o dano na mucosa (MENZIES et al, 1983). O teste de absorção da xilose foi usado como procedimento preliminar para avaliar a integridade gastrointestinal (HUBBLE e LITTLEJOHN, 1963), mas apresentou limitações. Há variáveis como o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal, o fluxo sanguíneo e a função renal que reduzem a correlação entre a absorção ou excreção da xilose e o grau do dano na mucosa (LAMABADUSURIYA et al, 1975). Já os testes de absorção de dois açúcares, como a lactulose e o manitol, não são afetados na mesma extensão por tais limitações.

Mais recentemente, estudos têm demonstrado um possível relacionamento entre vitamina A e integridade intestinal usando o teste de lactulose/manitol (QUADRO et al, 2000; THURNHAM et al, 2000; CHEN et al, 2003). Trata-se de um método não invasivo para medir a função da parede intestinal prejudicada. Tanto a lactulose quanto o manitol são açúcares

hidrofílicos e apresentam baixa afinidade pelo sistema de transporte monossacarídico da mucosa intestinal, sendo assim, absorvidos passivamente e apresentam a vantagem de não serem metabolizados. Depois da sua captação, estes açúcares são excretados intactos na urina (LIMA et al, 1997; WYATT et al, 1993; PEARSON et al, 1982; LAKER e MENZIES, 1977). O manitol, teoricamente, entra na célula através da via transcelular ou seja através da membrana celular, enquanto a lactulose entra na célula através da via paracelular ou seja por entre as células, no espaço constituído pelas zônulas de oclusões, pelo espaço intercelular, pelas zonas de extrusões resultantes da morte de células e ainda pelas áreas de ulcerações.

Consequentemente, a perda da integridade da mucosa intestinal causaria um aumento na passagem de lactulose, enquanto que a perda das áreas absorptivas diminuiria a absorção do manitol (FLEMING et al, 1990). Assim, a razão da permeabilidade entre lactulose/manitol promove uma medida quantitativa da integridade e função intestinal. Esta razão está aumentada na doença de Crohn, na diarréia quando se tem má absorção e em pacientes infectados pelo vírus HIV com ou sem diarréia (LIMA et al, 1997; WYATT et al, 1993; PEARSON et al, 1982; FORD et al, 1985; DEITCH, 1990).

QUADRO e colaboradores (2000) demontraram que pessoas com severa deficiência de vitamina A estariam mais propensas a apresentar uma razão relativamente aumentada (anormal) da razão da lactulose/manitol. Eles demonstraram que a captação de manitol foi significativamente maior em crianças com maiores concentrações de retinol, sugerindo assim o papel da vitamina A na manutenção da área eptelial do intestino responsável pela absorção.

1.10. JUSTIFICATIVA

A desnutrição, como também a deficiência de vitamina A e doenças infecciosas, especialmente infecções entéricas e infecções respiratórias agudas, são problemas de saúde comuns de países em desenvolvimento (NALIN e RUSSEL 1980; GROTTO et al, 2003; LONG et al, 2006). Uma das razões mais importantes para duração prolongada de episódios de diarréia parece ser o atraso no reparo da mucosa intestinal que aumenta o risco do ciclo vicioso da diarréia e desnutrição. A integridade intestinal em crianças de áreas em desenvolvimento é geralmente comprometida, e as anormalidades estão ligadas à deficiência de vitamina A e diminuição no crescimento (DEWAN et al, 1995; CHEN et al, 2003). A comunidade urbana Parque Universitário está localizada

A vitamina A apresenta um papel muito importante na diferenciação celular e este fato é importante para o crescimento e manutenção da integridade epitelial (DEWAN et al, 1995; QUADRO et al, 2000; CHEN et al, 2003). A deficiência de vitamina A induz mudanças na integridade epitelial numa grande variedade de superfícies epiteliais tais como do olho, pele, traquéia, glândulas salivares, epitélio vaginal e trato gastrointestinal. Deste modo, as pesquisas por métodos seguros para se avaliar o estado da deficiência de vitamina A, a nível subclínico, têm sido intensificadas, com o intuito de se identificar as comunidades onde este problema de saúde pública possa existir, já que a suplementação com vitamina A tem se mostrado efetiva na redução da mortalidade infantil em comunidades deficientes desta vitamina (BEATON et al, 1993). Por isso, este trabalho é de grande importância para a comunidade urbana Parque Universitário, já que se foi proposto demonstrar o grau de deficiência de vitamina A nesta comunidade, o estado nutricional destas crianças, promovendo indícios de necessidade de suplementação com vitamina A.

As crianças com desnutrição severa e deficiência de vitamina A apresentam baixas concentrações de retinol sanguíneo e este fato significativamente se correlaciona com a alteração da função da barreira intestinal (QUADRO et al, 2000; CHEN et al, 2003). Intervenções clínicas

nutricionais tanto com retinol quanto com carotenóides avaliaram o progresso da disfunção da barreira intestinal em crianças com desnutrição leve a moderada (CHEN et al, 2003; THURNHAM et al, 2000). Dois estudos de intervenção realizados na Índia forneceram retinol para crianças hospitalizadas (média de idade, 9 meses) e provenientes de um centro de saúde comunitário. Todas as crianças que receberam retinol demonstraram uma melhora significativa na integridade intestinal (THURNHAM et al, 2000). No Brasil, um estudo de intervenção usando retinol em crianças de 2-97 meses de idade também demonstrou uma melhora na integridade intestinal (CHEN et al, 2003). No sul da África, mulheres infectadas com o vírus do HIV que tomaram suplementos de retinol e β-caroteno tiveram menos deteriorização da integridade intestinal nas suas crianças que se tornaram infectadas pelos vírus do HIV (FILTEAU et al, 2001). Dados *in vitro* da função da barreira intestinal mostraram um efeito específico do retinol e carotenóides, sugerindo que esses nutrientes co-regulem a integridade intestinal (BRIVIBA et al, 2001; SWARTZ-BASILE et al 2003; NAGIRA et al, 2006).

Assim, este trabalho tem como hipóteses a associação das concentrações de retinol e carotenóides no soro das crianças da comunidade urbana Parque Universitário com a função da barreira intestinal, e a correlação da concentração do retinol sanguíneo com as concentrações da proteína de ligação do retinol (RBP) sanguínea, com a transtiretina (TTR) e com as proteínas de uma resposta de fase aguda.

1.11. OBJETIVOS

1.11.1. Objetivo Geral

- Analisar a relação da vitamina A, proteínas transportadoras e proteínas de fase aguda com a permeabilidade intestinal e estado nutricional em crianças da comunidade urbana Parque Universitário em Fortaleza.

1.11.2. Objetivos Específicos

1.11.2.1. Objetivo Primário

- Determinar a associação entre retinol e carotenóides com a barreira funcional intestinal em crianças de uma comunidade urbana carente de Fortaleza.

1.11.2.2. Objetivos Secundários

- Determinar o grau de deficiência de vitamina A em crianças de uma comunidade urbana carente em Fortaleza

- Investigar se a proteína ligadora de retinol (RBP) e a transtiretina (TTR) representam boas medidas alternativas para o retinol plasmático nesta população

- Investigar se os níveis de retinol estão associados com uma resposta de fase aguda ou com infecções intestinais nesta população

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ÉTICA DO ESTUDO

O protocolo do estudo e o consentimento dos pais das crianças estão de acordo com os padrões dos comitês de ética de investigação humana das instituições responsáveis, Universidade Federal do Ceará (UFC), Universidade da Virgínia (UVa) e o “National Institute of Health” (NIH). Este estudo está registrado como parte de um ensaio clínico na Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (http://www.clinicaltrials.gov).

2.2. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO ESTUDO

A população deste estudo está localizada em uma comunidade urbana chamada Parque Universitário, em Fortaleza, Ceará, no Nordeste do Brasil (**FIGURA 6**). A comunidade urbana Parque Universitário está localizada a mais ou menos cinco quilômetros dos laboratórios da Unidade de Pesquisa Clínica & Instituto de Biomedicina / Centro para Saúde Global (UPC & IBIMED / CGH) em Fortaleza. Fortaleza tem aproximadamente 2,6 milhões de habitantes e o índice de mortalidade infantil é de 35 crianças com menos de um ano de idade para mil nascidos vivos. A prevalência para deficiência de vitamina A nessa cidade é de quarenta por cento em crianças de 0,5 - 4,9 anos de idade (RAMALHO et al, 2002).

Os dados do census feito no ano de 1998 no Parque Universitário mostraram uma população de 3541 habitantes, sendo que 27% (957) deles são crianças menores de nove anos de idade. Os parentes ou tutores das crianças de dois meses a nove anos de idade foram convidados a participar do protocolo do estudo após assinarem a folha de consentimento.

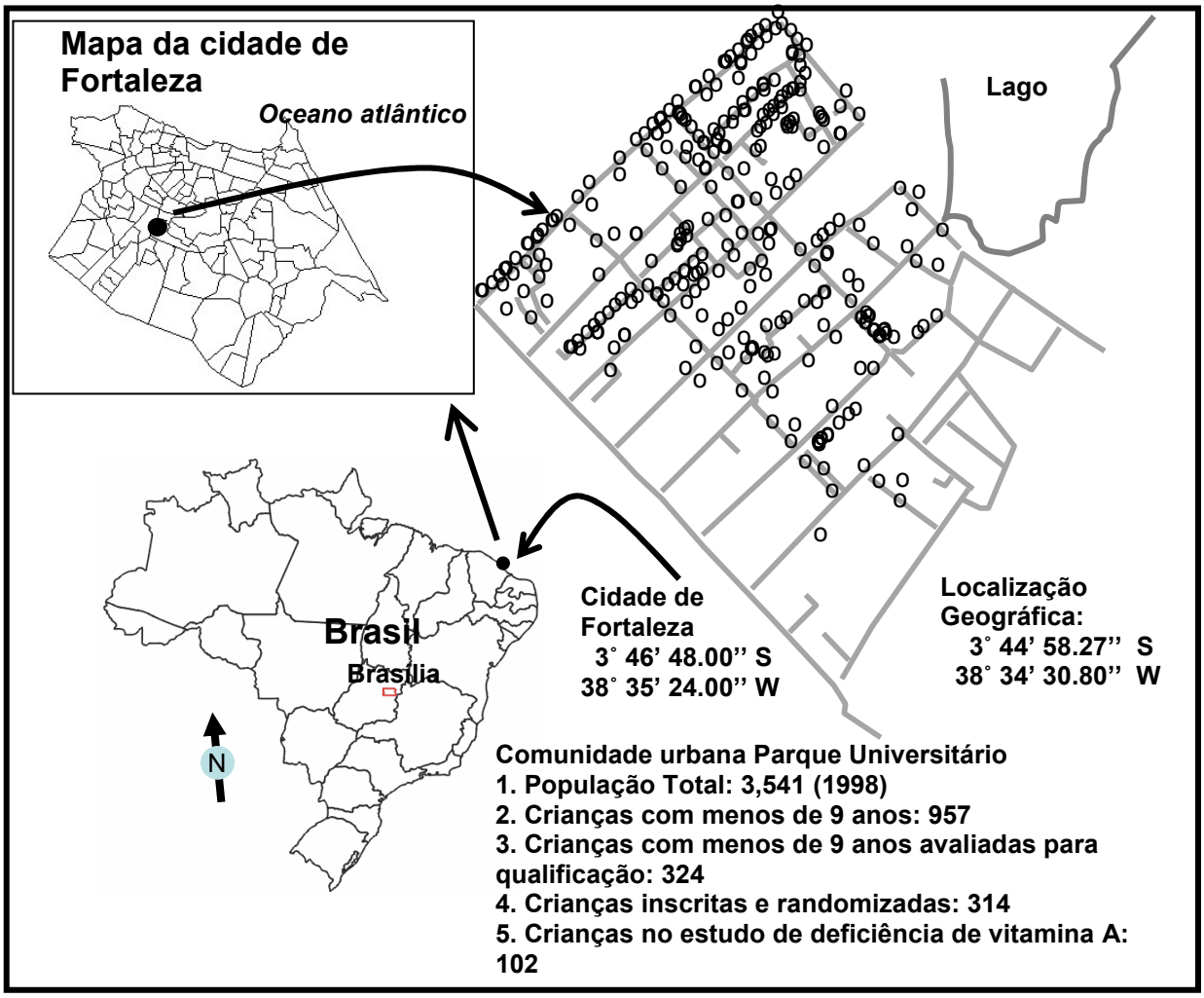

FIGURA 6 - Localização geográfica da comunidade urbana Parque Universitário, em Fortaleza, Ceará, Brasil

2.3. DELINEAMENTO DO ESTUDO, CRITÉRIOS DE QUALIFICAÇÃO E EXCLUSÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo faz parte de um ensaio prospectivo duplo-cego randomizado (fase III). O ensaio clínico, no total, qualificou 314 crianças nos grupos de estudo e os dados iniciais das primeiras 102 crianças foram reportados neste trabalho (**FIGURA 7**). Os dados analisados neste estudo foram coletados de Junho de 2000 até Agosto de 2001 e, o ensaio completo de intervenção terminou em Outubro de 2005 (dados ainda não publicados e análises em processo). Cada criança qualificada para o protocolo do estudo foi colocada em grupos restritos por randomização para receber zinco, retinol,

zinco+retinol ou placebo e então randomizados novamente para receber glutamina ou placebo. A lista de randomização principal foi guardada e o código foi quebrado no final do ensaio clínico. Os critérios de inclusão que foram usados para a inscrição de cada criança foram os seguintes: (a) crianças com 2 meses a nove anos de idade com escore de altura-por-idade (HAZ) menores que a média (-0,06) para a comunidade do Parque Universitário; (b) ser um morador desta comunidade urbana; e (c) o pai ou guardião assinar um termo de consentimento. Critérios de exclusão também foram usados para a qualificação das crianças como os seguintes: (a) crianças que amamentavam exclusivamente; (b) crianças que participaram em qualquer estudo nos últimos dois anos; e (c) crianças com febre > 38 °C quando foram inscritas para o estudo.

2.4. SISTEMA DE VIGILÂNCIA FAMILIAR, MORBIDADE PARA DOENÇAS, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS, COLETA E MANUSEIO DAS AMOSTRAS

O time de vigilância (uma enfermeira coordenadora de campo e três assistentes sociais) visitavam as mães para entrevista duas vezes por semana e na primeira visita pediam o formulário de consentimento e aplicavam um questionário para a família com informações demográficas, sócio-econômicas, sanitárias, de higiene e educacional. As doenças diarréicas, morbidade de outras doenças e regime de alimentação foram avaliados em um outro questionário duas vezes por semana.

A equipe de campo qualificada e treinada também coletou medidas de peso e altura usando métodos calibrados e técnicas padrões para cada criança, na primeira visita familiar e a cada três meses depois disso, para avaliar o estado nutricional de cada criança. As crianças vestindo roupas leves foram pesadas usando uma balança digital calibrada (Tanita Solar Scale, Tanita Corporation of American Inc., Arlington, IL) com precisão de 100 g. A altura da crianças foi medida com as crianças deitadas na posição supina (para crianças menores de 24 meses de idade) ou na posição em pé

(para crianças com pelo menos 24 meses de idade) usando uma trena antropométrica com acurácia de 0,1 cm.

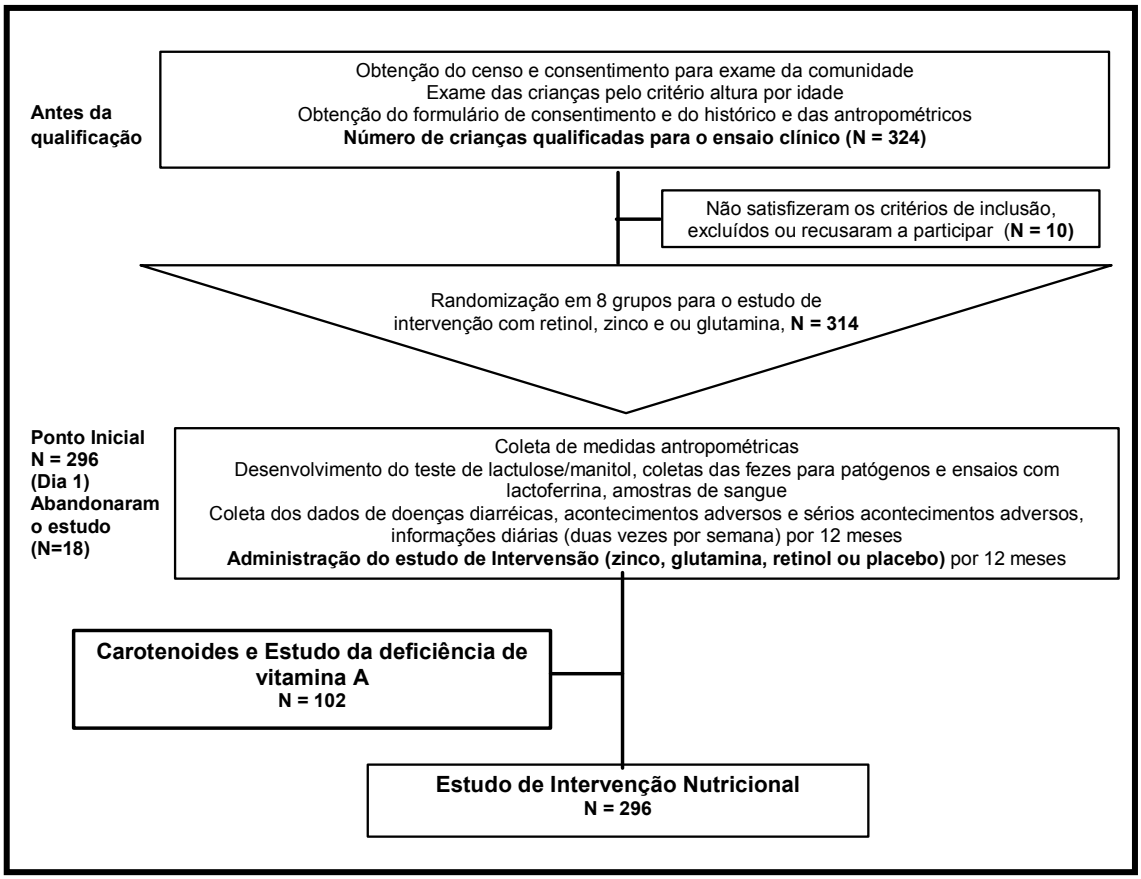

FIGURA 7 - Fluxograma para o estudo da população participante no ensaio de intervensão nutricional

2.5. DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Acetonitrila para HPLC (A 998-4, Fisher, New York, NY)
- Hexano para HPLC (H 302-4, Fisher, New York, NY)
- Metanol para HPLC (A 452-4, Fisher, New York, NY)
- Diclorometano para HPLC (D 143-4, Fisher, New York, NY)
- Lactoperoxidase do leite bovino (Sigma, St Louis, MO)
- Tampão de acetato de sódio (Fisher, New York, NY)
- Solução de H_2O_2 (Fisher, New York, NY)

- RBP e TTR humana (Doado pelo Prof. Blaner, Columbia University New York, NY)
- Iodo radioativo ^{125}I (New England Nuclear, Boston, MA)
- Tampão de Tris-HCl (Fisher, New York, NY)
- Cloreto de sódio (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Soro de albumina bovina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Lactulose (Luitpold Produtos Farmacêuticos Ltda, Barueri, SP)
- Manitol (HenriFarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP)
- Clorhexidina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Glicosamina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Meblibiose (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Inositol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Sorbitol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Glicose (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)
- Lactose (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)

2.6. COLETA DAS AMOSTRAS E ARMAZENAMENTO

De cada criança participante no estudo, uma amostra de sangue foi coletada em um tubo separador de soro envolvido com papel alumínio e armazenado imediatamente em 4°C sempre protegido da luz. No mesmo dia, no laboratório, as células foram separadas do soro numa centrífuga de mesa (200 X g, 10 min, temperatura ambiente). Amostras do soro foram colocadas em gelo seco, e enviadas de Fortaleza para Nova York, por correio expresso 24 horas e não foram descongeladas até a análise de retinol. Foi tomado todo o cuidado para que estas amostras não fossem expostas a nenhum tipo de luz desde a coleta até a análise de retinol.

2.7. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE RETINOL E DE CAROTENÓIDES DAS CRIANÇAS DO PARQUE UNIVERSITÁRIO

Para a determinação das concentrações séricas do retinol e dos carotenóides foram inicialmente feitas medidas das concentrações de estoques padrões do retinol e dos carotenóides, e a partir daí calculada uma curva padrão para a determinação de suas concentrações sanguíneas, como mostrado a seguir.

2.7.1. Determinação das concentrações dos estoques padrões do retinol e dos carotenóides

O estoques concentrados (de concentrações não definidas, ainda a serem calculadas) utilizados como parâmetros para determinação da concentração sérica do retinol, dos carotenóides e dos seus respectivos padrões internos (acetato de retinol e echinenona) foram cedidos pela Profa. Mary Gamble da Universidade de Columbia em Nova York.

As concentrações dos estoques de retinol e acetato de retinol foram determinadas, após diluição dos estoques concentrados (concentração desconhecida) com etanol, por espectrofotometria ultravioleta-VIS (detectados entre 280 – 350 nm), como visto na **TABELA 1**.

TABELA 1 - Concentrações dos estoques de retinol e acetato de retinol

Parâmetros	**Retinol**	**Ac-Retinol**
Diluição do estoque	1:100	1:60
Coeficiente de Extinção	1845	1560
O.D. *	0,372	0,366
λ_{max}	325	326
Concentração do estoque diluído	201,63 ng/100 μL	234,62 ng/100 μL
Concentração do estoque	20,2 μg/100 μL	14,08 μg/100 μL

*absorbância no espectrofotômetro

As concentrações dos estoques dos carotenóides e echinenona foram determinadas, após diluição dos estoques concentrados (concentrações desconhecidas) com hexano (a β-criptoxantina foi diluída com uma mistura de 10% éter dietílico/90% hexano), por espectrofotometria ultravioleta-VIS (detectados entre 380 – 490 nm), como visto na **TABELA 2**.

TABELA 2 - Concentrações dos estoques dos carotenóides e echinenona

Parâmetros	**Luteína**	**β-criptoxantina**	**Licopeno**	**β-caroteno**	**Echinenona**
Diluição do estoque	----------	1:5	1:10	1:90	1:10
Coeficiente de Extinção	2250	2386	3450	2592	2160
O.D.*	0,570	0,413	0,617	0,4189	0,444
λ_{max}	450	450	471	450	456
Concentração do estoque diluído	----------	173,09 ng/100 μL	178,84 ng/100 μL	161,61 ng/100 μL	205,55 ng/100 μL
Concentração do estoque	0,2533 μg/100 μL	0,865 μg/100 μL	1,79 μg/100 μL	14,54 μg/100 μL	2,055 μg/100 μL

*absorbância no espectrofotômetro

2.7.2. Determinação das curvas padrões para os estoques de retinol e dos carotenóides

Depois de determinadas as concentrações dos estoques de retinol e acetato de retinol foram preparados 5 soluções padrões para o retinol/acetato de retinol de diferentes “massa”/”massa” (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1), como mostrados na **TABELA 3**.

TABELA 3. Soluções padrões para o retinol/acetato de retinol

Componentes	Diluições (μg)				
	3:1	**2:1**	**1:1**	**0,5:1**	**0,25:1**
Acetato de retinol	3 μg	3 μg	3 μg	3 μg	3 μg
Retinol	9 μg	6 μg	3 μg	1,5 μg	0,75 μg
	Diluições (μL)				
	3:1	**2:1**	**1:1**	**0,5:1**	**0,25:1**
Acetato de retinol (0,1408 μg/μL)	21,31 μL	21,31 μL	21,31 μL	21,31 μL	21,31 μL
Retinol (0,202 μg/μL)	44,55 μL	29,70 μL	14,85 μL	7,43 μL	3,71 μL

Cada mistura de acetato de retinol e retinol foi então evaporada em nitrogênio gasoso. Depois de evaporado o solvente, os resíduos foram reconstituídos com 2 mL de uma mistura de solventes usado com solvente de corrida no HPLC (Acetato de nitrila:cloreto de metileno:metanol = 70:15:15). Depois da reconstituição foram injetados 20 μL de cada mistura no HPLC de fase reversa para obtenção das áreas sob a curva padrão do retinol e acetato de retinol e assim calcular a concentração do retinol no sangue de cada criança do Parque Universitário, como explicado no ítem 2.7.4.

Depois de determinadas as concentrações dos estoques dos carotenóides e echinenona foram preparados 5 padrões para os carotenóides/echinenona de diferentes “massa”/ “massa” (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1), como demostrados na **TABELA 4**.

TABELA 4 - Soluções padrões para carotenóides/echinenona

Componentes	**Diluição (μg)**				
	3:1	**2:1**	**1:1**	**0,5:1**	**0,25:1**
Echinenona	3 μg	3 μg	3 μg	3 μg	3 μg
Luteína	9 μg	6 μg	3 μg	1,5 μg	0,75 μg
β-criptoxantina	9 μg	6 μg	3 μg	1,5 μg	0,75 μg
Licopeno	9 μg	6 μg	3 μg	1,5 μg	0,75 μg
β-caroteno	9 μg	6 μg	3 μg	1,5 μg	0,75 μg
	Diluição (μL)				
	3:1	**2:1**	**1:1**	**0,5:1**	**0,25:1**
Echinenona (0,02055 μg/μL)	145,99 μL	145,99 μL	145,99 μL	145,99 μL	145,99 μL
Luteína (0,002533 μg/μL)	3553,1 μL	2368,7 μL	1184,4 μL	592,2 μL	296,09 μL
β-criptoxantina (0,00865 μg/μL)	1040,5 μL	693,6 μL	346,8 μL	173,4 μL	86,7 μL
Licopeno (0,0179 μg/μL)	502,79 μL	335,2 μL	167,6 μL	83,8 μL	41,9 μL
β-caroteno (0,1454 μg/μL)	61,9 μL	41,3 μL	20,6 μL	10,32 μL	5,2 μL

Cada mistura dos carotenóides com a echinenona foi então evaporada em nitrogênio gasoso. Depois de evaporado o solvente, os resíduos foram reconstituídos com 2 mL de uma mistura de solventes usado com solvente de corrida no HPLC (Acetato de nitrila:cloreto de metileno:metanol = 70:15:15). Depois da reconstituição foram injetados 20 μL de cada mistura no HPLC de fase reversa para obtenção das áreas sob a curva padrão de cada carotenóide e da echinenona e assim calcular-se a concentração de cada carotenóide no sangue das crianças do Parque Universitário, como explicado no ítem 2.7.6.

2.7.3. Curva Padrão do Retinol

Os padrões para o retinol/acetato de retinol de diferentes "massa"/"massa" (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1) foram injetados no HPLC e foram obtidos os cromatogramas com as áreas integradas sob os picos do HPLC para o retinol e acetato de retinol, e através dessas áreas foi determinada a curva padrão para o retinol, obtendo-se a equação da reta ($y = 0,9462x + 0,388$; $R^2 = 0,9984$), utilizada para o cálculo da concentração do retinol sanguíneo das crianças do Parque Universitário, como mostrado na **TABELA 5, FIGURA 8**.

TABELA 5 - Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para o retinol e acetato de retinol

Massa Retinol/massa Ac. de Retinol (M/M)	**Área do Retinol obtida por HPLC**	**Área de Ac. de Retinol obtida por HPLC**	**Área do Retinol /Área de Ac. de retinol (A/A)**
3	426242	148943	2,861779
2	270952	140595	1,927181
1	154690	145854	1,060581
0,5	77976	161613	0,482486
0,25	38656	155583	0,248459

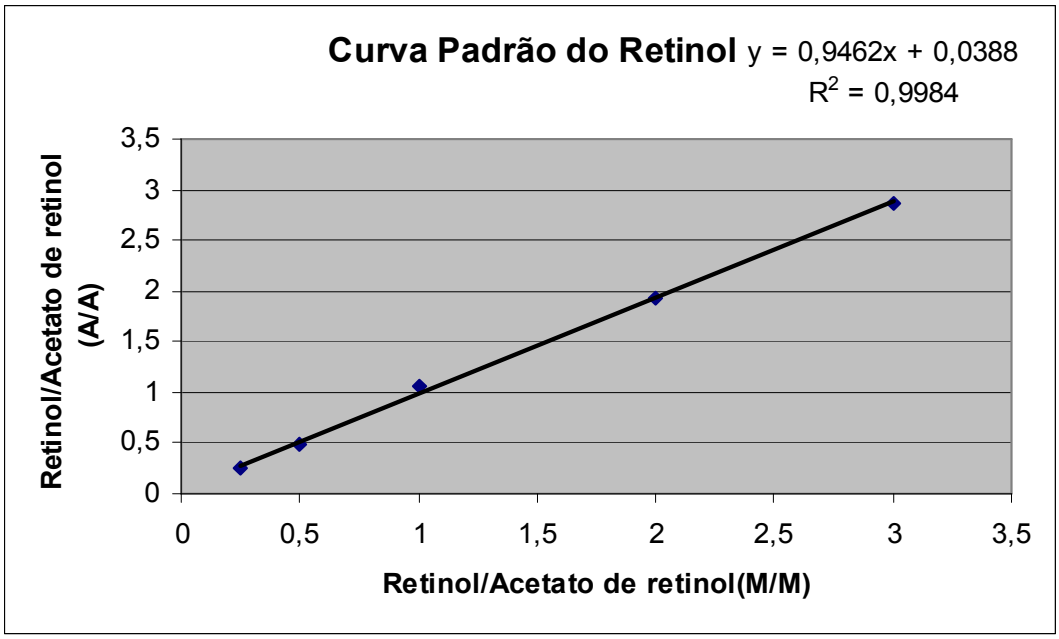

FIGURA 8. Curva Padrão do Retinol determinada com as áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, para o retinol e acetato de retinol (A/A) e com os padrões obtidos pelas diferentes razões de massa/massa (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1) para retinol/acetato de retinol (M/M).

2.7.4. Determinação da concentração do retinol sérico

O retinol sanguíneo foi medido utilizando-se amostras de 200 μL de cada soro através do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de fase reversa (REDLICH et al, 1996). Este método emprega um padrão interno que consiste em uma massa conhecida de acetato de retinol que foi adicionado a 0,2 mL de etanol e a 0,2 mL do soro. As amostras de soro foram desnaturadas com o etanol (1:1 de volume) e o retinol foi extraído com 2,5 mL de hexano próprio para uso em HPLC. O extrato hexânico foi lavado com 0,5 mL de água deionizada e a fase hexânica foi evaporada até à secagem com nitrogênio gasoso. O retinol extraído foi redissolvido com 40 μL de uma mistura de solventes utilizada como fase móvel para o HPLC (Acetonitrila:Metanol:Diclorometano = 70:15:15). Então, o retinol foi analisado por HPLC de fase reversa (FURR et al, 1994). O retinol em cada amostra de

sangue analisada foi quantificado comparando-se as áreas integradas sob os picos do HPLC com uma curva padrão, que relaciona as áreas integradas sob os picos com massas conhecidas de retinol e do padrão de acetato de retinol preparados, usando-se coeficientes de extinção publicados para retinol e acetato de retinol (FURR et al, 1994).

O retinol foi detectado pelo método de HPLC de fase reversa em uma coluna de C_{18} Ultrasphere (5 μm) de 250 x 4,6-mm (Beckman Instrumentos, Inc, Fullerton, CA), utilizando uma fase móvel que consiste em acetonitrila:metanol:diclorometano (70:15:15, de volume) sendo o fluxo do solvente de 1,8 mL/min. A coluna preparativa foi precedida de uma pré-coluna (C_{18}). O retinol foi detectado a 325 nm usando-se um monitor de absorbância ultravioleta (996 Photodiode Array; Waters Inc, Milford, MA). Também foram detectados os carotenóides a 450 nm, usando-se o monitor de absorbância ultravioleta.

Para a determinação da concentração sanguínea do retinol de cada amostra das crianças, utilizou-se a equação da reta obtida com a curva padrão do retinol (y = 0,9462x + 0,388), sendo o x = concentração do retinol em ng/200 μL dividido pela concentração do padrão de acetato de retinol em ng/100 μL diluído em 5x, e o y = área integrada sob o pico do HPLC para o retinol dividido pela área integrada sob o pico do HPLC para o acetato de retinol. Retinol (ng/200μL) = Ac. de retinol ng/100 μL [(Área Retinol/área Ac de retinol) – 0,0388] / 0,9462

A concentração final do retinol em **μM** foi determinada dividindo-se a concentração do retinol em ng/200 μL pelo peso molecular do retinol (PM=286,5), multiplicando este resultado por 5.

Retinol (μM) = (Retinol ng/200μL /Peso molecular) x 5

Fazendo-se os cálculos pelo Microsoft Excel, foram obtidas as concentrações do retinol sanguíneo de cada criança em μM, como observado na listagem de resultados, em anexo, no item 7.1.1. **ANEXO 1**.

2.7.5. Curva Padrão dos Carotenóides

Os padrões para os carotenóides/echinenona de diferentes "massa"/"massa" (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1) foram injetados no HPLC e foram obtidos os cromatogramas com as áreas integradas sob os picos da HPLC para a luteína, β-criptoxantina, licopeno, β-caroteno e o padrão echinenona. Com essas áreas foram determinadas as curvas padrões para cada carotenóide e obtidas suas respectivas equações da reta (y = 1,1189x + 0,2307 R^2 = 0,9614 para a Luteína; y = 1,2235x – 0,0108; R^2 = 0,9998 para a β-criptoxantina; y = 0,4208x + 0,1002 R^2 = 0,9715 para o Licopeno e y = 1,0837x + 0,0556 R^2 = 0,9986 para o β-caroteno), utilizadas para o cálculo da concentração dos carotenóides sanguíneos das crianças da comunidade Parque Universitário, como mostrado nas **TABELAS 6, 7, 8, 9** e nas **FIGURAS 9, 10,11, 12.**

TABELA 6 - Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a luteína e echinenona

Massa Luteína /Massa Echinenona (M/M)	Área Luteína obtida por HPLC	Área Echinenona obtida por HPLC	Área Luteína /Área Echinenona(A/A)
3	441108	125116	3,525592
2	308578	128704	2,397579
1	244935	136126	1,799326
0,5	79398	128070	0,619958
0,25	47370	130130	0,364021

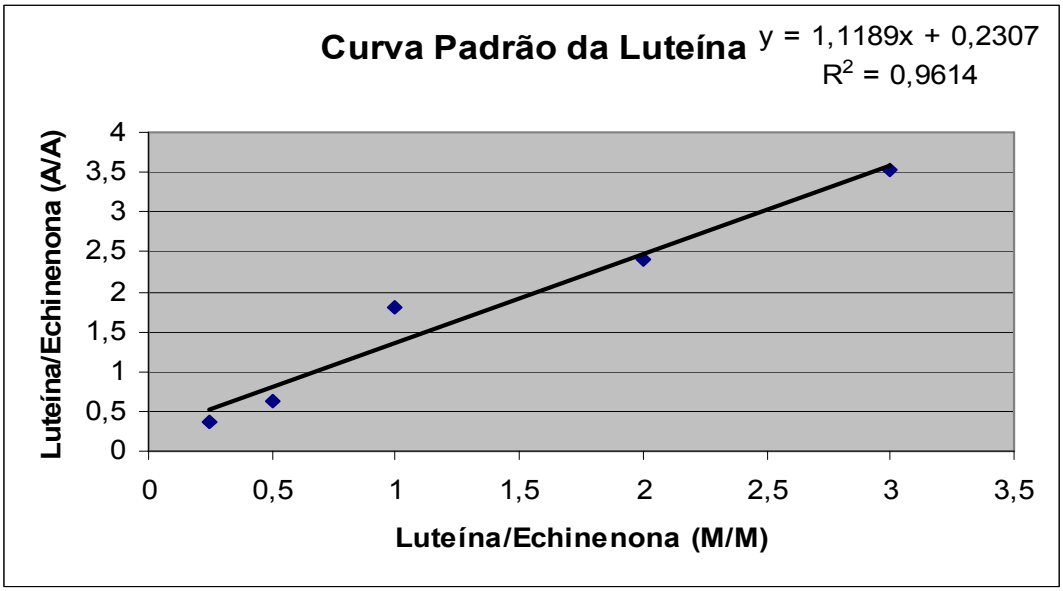

FIGURA 9 - Curva Padrão da Luteína determinada com as áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a Luteína /Echinenona (A/A) e com os padrões obtidos pelas diferentes razões de massa/massa (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1) para Luteína/Echinenona (M/M).

Tabela 7 - Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a β-criptoxantina e echinenona

Massa β-criptoxantina / Massa echinenona (M/M)	**Área β-criptoxantina obtida por HPLC**	**Área Echinenona obtida por HPLC**	**Área β-criptoxantina/ Área echinenona (A/A)**
3	460541	125116	3,680912
2	309809	128704	2,407144
1	163458	136126	1,200785
0,5	77627	128070	0,606129
0,25	40292	130130	0,309629

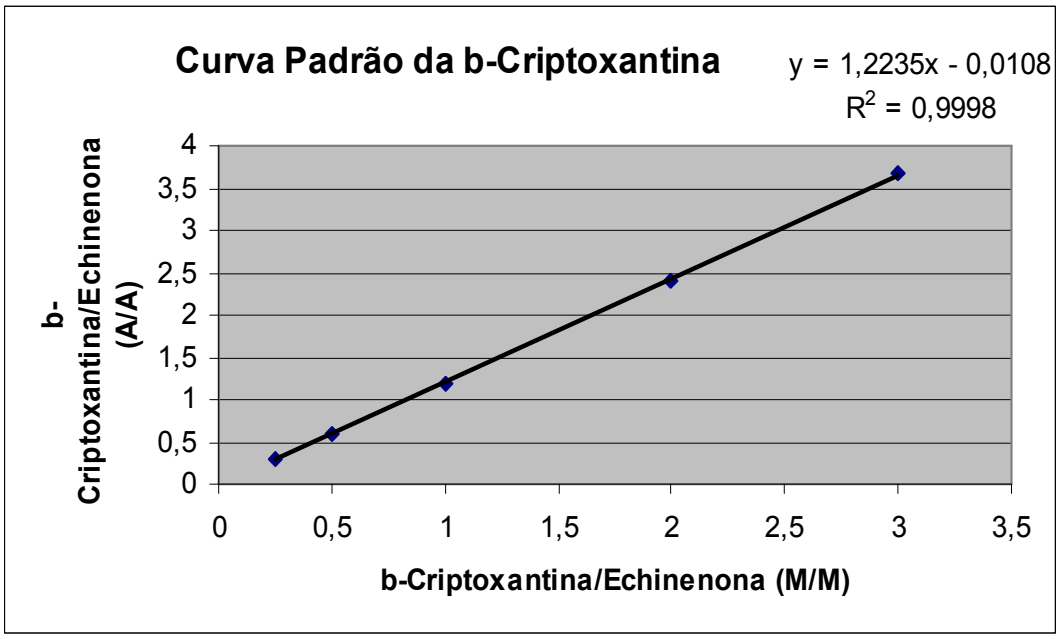

FIGURA 10 - Curva Padrão da β-criptoxantina determinada com as áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a β-criptoxantina /Echinenona (A/A), e com os padrões obtidos pelas diferentes razões de massa/massa (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1) para a β-criptoxantina/Echinenona (M/M).

TABELA 8 - Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para o licopeno e echinenona

Massa Licopeno/ Massa echinenona (M/M)	**Área Licopeno obtida por HPLC**	**Área Echinenona obtida por HPLC**	**Área licopeno/ Área echinenona (A/A)**
3	159884	125116	1,277886
2	137640	128704	1,069431
1	72558	136126	0,533021
0,5	40234	128070	0,314156
0,25	19136	130130	0,147053

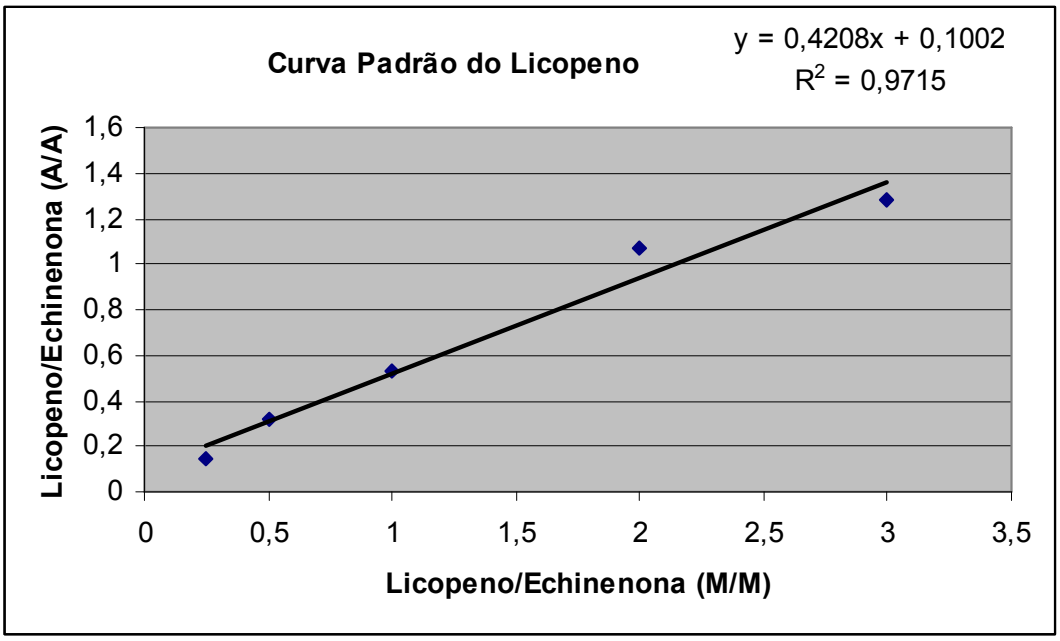

FIGURA 11 - Curva Padrão do Licopeno determinada com as áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Licopeno /Echinenona (A/A), e com os padrões obtidos pelas diferentes razões de massa/massa (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1) para o Licopeno/Echinenona (M/M).

TABELA 9 - Áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para o β-caroteno e echinenona

Massa β-caroteno Massa echinenona (M/M)	**Área β-caroteno obtida por HPLC**	**Área Echinenona obtida por HPLC**	**Área β-caroteno/ Área echinenona (A/A)**
3	410598	125116	3,281739
2	289673	128704	2,250692
1	156340	136126	1,148495
0,5	83287	128070	0,650324
0,25	34061	130130	0,261746

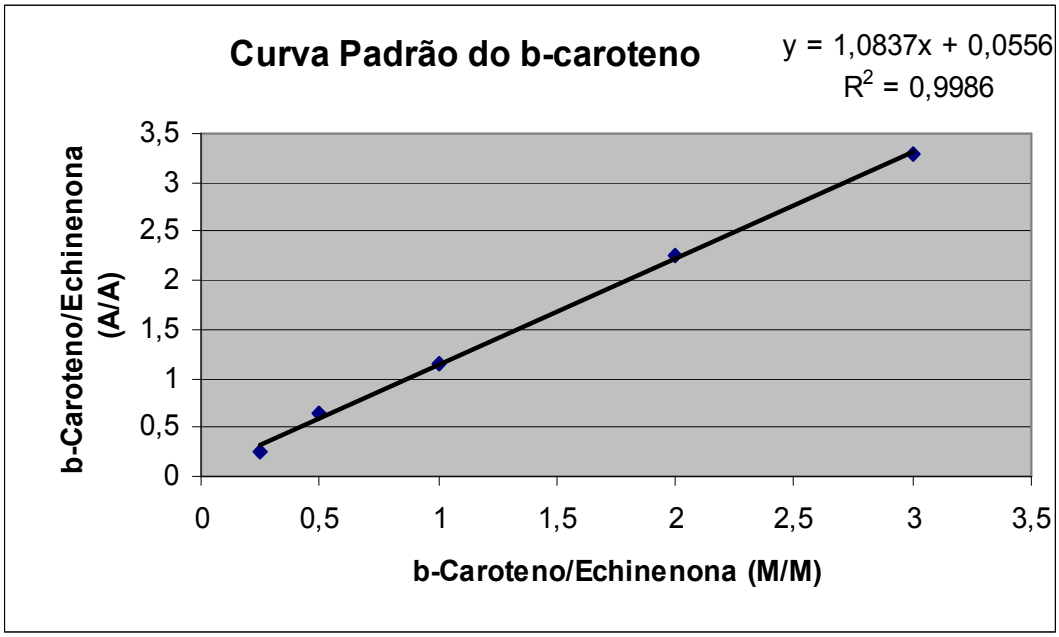

FIGURA 12 - Curva Padrão do β-caroteno determinada com as áreas integradas sob os picos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o β-caroteno /Echinenona (A/A), e com os padrões obtidos pelas diferentes razões de massa/massa (3:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1) para o β-caroteno/Echinenona (M/M).

2.7.6. Determinação da concentração dos carotenóides sanguíneos

Os carotenóides foram extraídos dos soros pelo mesmo procedimento e juntamente com o retinol. Os carotenóides (luteína, β-criptoxantina, licopeno e β-caroteno) em cada amostra de sangue analisada foram quantificados comparando-se as áreas integradas sob os picos do HPLC com uma curva padrão, que relaciona as áreas integradas sob os picos com massas conhecidas da luteína, da β-criptoxantina, do licopeno, do β-caroteno e do padrão echinenona, que foram preparados usando-se coeficientes de extinção publicados para luteína, β-criptoxantina, licopeno, β-caroteno e echinenona (FURR et al, 1994).

Para a determinação da concentração sanguínea dos carotenóides de cada amostra das crianças, utilizou-se a equação da reta obtida para cada carotenóide como: y = 1,1189x + 0,2307 para a Luteína; y = 1,2235x – 0,0108

para a β-criptoxantina; y = 0,4208x + 0,1002 para o Licopeno e, y = 1,0837x + 0,0556 para o β-caroteno; sendo o x = concentração de cada carotenóide em ng/200 μL dividido pela concentração do padrão echinenona em ng/100 μL diluído em 5 vezes, e o y = área integrada sob o pico do HPLC, para cada carotenóide, dividido pela área integrada sob o pico do HPLC para a echinenona. **Ex.: β-caroteno (ng/200μL) = Echinenona ng/100 μL [(Área β-caroteno /área Echinenona) – 0,0556] / 1,0837**

A concentração final do retinol em **μM** foi determinada dividindo-se a concentração de cada carotenóide em ng/200 μL pelo peso molecular de cada carotenóide (PM=568,9 para a Luteína; PM=552,9 para a β-criptoxantina; PM=536,9 para o Licopeno; PM=536,9 para o β-caroteno) e, multiplicando este resultado por 5.

Ex.: β-caroteno (μM) = (β-caroteno ng/200μL /536,9) x 5

Fazendo-se os cálculos pelo Microsoft Excel, foram obtidas as concentraçõs de cada carotenóide sanguíneo de cada criança, em μM, como observado na listagem de resultados, em anexo, no item 7.1.2. **ANEXO 2**.

2.8. Radioimunoensaio para determinação das concentrações da RBP ou da TTR sanguíneas

2.8.1. Iodação da RBP ou da TTR

A iodação da proteína ligadora de retinol (RBP) ou da transtiretina (TTR) é necessária para o procedimento do radioimunoensaio para a determinação da RBP ou da TTR sanguínea. Para tanto, a RBP ou a TTR pura foram iodinadas pelo procedimento da lactoperoxidase, como descrito por MIYACHI e colaboradores (1977). Para este propósito, foi preparada uma solução estoque contendo 1 mg da lactoperoxidase do leite bovino (Sigma, St Louis, MO) em 1 ml de um tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,6) e estocada a -20°C antes do uso. Imediatamente antes do uso preparou-se uma solução de H_2O_2 a 0,002% (v/v), através da diluição de 0,1 ml de H_2O_2 a

30% (v/v) em 10 ml de água deionizada, seguida de uma nova diluição de 0,1 ml desta nova solução de H_2O_2 em 15 ml de água deionizada.

A iodinação da RBP ou da TTR foi conduzida pela adição de 10 μL de uma solução estoque de RBP ou de TTR purificada (humana), contendo 5 μg de RBP ou TTR em água, 25 μL de um tampão de acetato de sódio a 0,4 M (pH 5,6) e 1 mCi de iodo radiotivo (^{125}I) (New England Nuclear, Boston, MA) em um tubo de vidro de 10x75 mm. Depois misturou-se suavemente os reagentes. À essa mistura foi adicionada 10 μL de uma solução de lactoperoxidase, a qual foi preparada imediatamente antes do uso pela diluição de 0,1 mL da solução estoque de lactoperoxidase em 10 mL de um tampão de acetato de sódio a 0,1 M (pH=5,6), e o tubo foi novamente agitado para misturar. Para se iniciar a reação enzimática foi adicionado 10 μL de uma solução de H_2O_2 a 0,002%, e o tubo da reação foi agitado para misturar, depois incubado a 37°C durante 30 minutos. A RBP ou a TTR marcadas com ^{125}I foram separadas de outras substâncias ligadas ao ^{125}I através de cromatografia em uma coluna PD-10 (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, NJ) em um tampão contendo 70 mM de Tris-HCl (pH=8,6), contendo 70 mM de NaCl e 1% de albumina do soro bovino (BSA).

A RBP ou TTR marcada com ^{125}I foram armazenadas a -20°C em um tampão de 70 mM de Tris-HCl (pH=8,6), contendo 70 mM de NaCl e 5% de BSA. Nestas condições de armazenamento, a RBP ou a TTR marcada com ^{125}I podem ser usadas em radioimunoensaio por no máximo dois meses.

2.8.2. Procedimento do Radioimuensaio

As concentrações de RBP ou de TTR sanguíneas foram determinadas usando-se 25 μL de cada soro das crianças para RBP e 12,5 μL de cada soro para TTR através do método sensível e específico de radioimunoensaio descrito na literatura (BLANER, 1990). Os anticorpos usados para as análises foram obtidos de coelho anti-RBP ou TTR humano gerado contra RBP ou TTR purificados de soros humanos. A RBP ou TTR usadas para gerar estes antisoros e os padrões usados nos radioimunioensaios foram purificados

através de eletroforesis em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida tingidos com corante “Coomassie blue” e a especificidade desta purificação foi medida através de análises de Western blot.

Reagentes utilizados para o radioimunoensaio: Tampão RIA (50 mM Tris-HCl, pH 8.6 contendo 1% BSA); RBP ou TTR marcados com ^{125}I diluídos com Tampão RIA; antisoro anti-RBP ou anti-TTR; solução de polietileno glicol e o tampão de precipitação [0,2 g de γ-globulina bovina (Schwarz/Mann Biotech, Cleveland, OH) dissolvido em 12 mL de água deonizada, adicionada a 56 mL de tampão RIA; e a esta γ-globulina bovina contendo tampão RIA foi adicionada 32 mL de solução de polietileno glicol].

Procedimento: Os reagentes para o radioimunoensaio foram adicionados em tubos de poliestireno (12 x 75 mm) na seguinte ordem:

(a) 100 μL da amostra a ser analisada (solução padrão de RBP ou TTR; ou amostra do sangue diluída).

(b) 200 μL da diluição da RBP ou TTR marcados com ^{125}I (~20.000 cpm)

(c) 200 μL da diluição dos antisoros anti-RBP ou anti-TTR (a diluição final dos antisoros foram de 1/10.000 – 1/20.000 (v/v)).

As soluções adicionadas aos tubos foram, então, bem misturadas com um agitador vortex e incubadas a 4°C durante 3 dias. Para precipitar as imunoglobulinas depois de 3 dias, 1,5 mL do recém preparado tampão de precipitação foi adicionado a cada tubo e misturado com um misturador vortex. Os tubos foram então centrifugados a 1900 g durante 45 minutos a 4°C. O sobrenadante transparente resultante foi removido por aspiração e o pelete marcado com ^{125}I, que está presente em cada tubo, foi contado em um contador de ondas gama. O procedimento experimental está demonstrado no no item 7.1.3. **ANEXO 3.**

Com os resultados da contagem de cada amostra pelo contador de ondas gama e com os resultados das curvas padrões, obteve-se a concentração da RBP ou da TTR em ng utilizando-se um programa de estatística adaptado pelo Prof. Rajasekhar da Universidade de Columbia em Nova York, o qual utiliza análise de regressão e análise de variância

(ANOVA) para obtenção dos resultados. Para se chegar às concentrações da RBP e da TTR em μM, utilizou-se a seguinte fórmula, também relacionada ao mesmo programa de estatística. Assim, colocando-se os resultados de cada amostra, obtidos pela contagem no contador de ondas gama, têm-se imediadamente os resultados em μM.

Concentração da RBP ou da TTR (μM) = (ng de cada amostra x fator de diluição x 10) ÷ peso molecular da RBP ou da TTR

Peso molecular da RBP = 21000 KD

Peso molecular da TTR = 55000 KD

A concentrações sanguíneas da RBP e da TTR foram determinadas, obtendo-se os valores das concentrações em μM, como mostrado na listagem de resultados, em anexo, no item 7.1.4. **ANEXO 4.** Os espaços em branco correspondem às concentrações que não foram calculadas devido a quantidade insuficiente de amostra de sangue das crianças.

2.9. Determinação das proteínas de fase aguda: proteína C-reativa (CRP) e glicoproteína α-ácida (AGP)

A proteína C-reativa (CRP) e a glicoproteína α_1-ácida (AGP) foram medidas em cada amostra de soro através da técnica de imunodifusão radial que é rotineiramente utilizada para a medida da concentração de vários antígenos solúveis (geralmente proteínas) em flúidos biológicos (proteína C-reativa humana "LL"NANORID^{TM} e glicoproteína α_1-ácida BINDARID^{TM} kits de imunodifusão radial da Binding Site Ltd, Birmingham, UK). Estas proteínas de fase aguda positivas foram selecionadas pelos seus diferentes cursos de tempo depois da infecção: CRP aumenta e cai rapidamente, enquanto a AGP apresenta um curso de tempo mais lento. Os limites de referência usados para indicar uma resposta de fase aguda positiva foram os sugeridos pelo fabricante, como $>$ 0.67 μmol/l ($>$ 8 mg/l) para CPR e $>$ 22 μmol/l ($>$ 1000 mg/l) para AGP.

A técnica de imunodifusão radial envolve a difusão radial do antígeno de um poço cilíndrico através de um gel de agarose contendo um anticorpo mono-específico apropriado. Os complexos antígeno-anticorpo formam, nas condições apropriadas, um anel de precipitação. O tamanho do anel aumenta até que o equilibrio seja alcançado entre a formação e a quebra desses complexos. Nesse estágio, uma relação linear existe entre o quadrado do diâmetro do anel e a concentração do antígeno. Uma tabela de referência é fornecida pelo produtor (baseada em uma curva de calibração linear ideal), a qual converte os diâmetros dos anéis diretamente para concentração da proteína em estudo.

2.9.1. Procedimento do teste de Imunodifusão Radial

2.9.1.1. Placas de Imunodifusão Radial

Para evitar contaminação do gel, as placas foram usadas em um ambiente livre de poeira. As placas foram retiradas do pacote protetor e abertas. Cuidados foram tomados quanto a presença de umidade e algum dano no gel da placa, deixando-as abertas por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente antes do uso.

2.9.1.2. Aplicação dos calibradores e das amostras, incubação e determinação dos diâmetros dos anéis

O calibrador, o controle e as amostras de soro das crianças foram misturadas gentilmente antes do uso. Os poços da placa foram preenchidos com 5 μL do calibrador, do controle e de cada amostra teste. Depois da aplicação das amostras, as placas foram cobertas com as tampas e incubadas a temperatura ambiente (aproximadamente 20 a 24°C) por 72 horas. Para que o gel das placas não ressecasse durante a incubação, as placas foram mantidas em caixas plásticas fechadas, contendo papel toalha umedecido. Os diâmetros finais dos anéis podem ser afetados pela temperatura, por isso já está determinado pelo fabricante que o tamanho

esperado do anel para o calibrador é de 9 mm (± 0,3 mm) quando incubado na temperatura de 20 a 24°C. Os extremos de temperatura foram evitados. Para a amostra controle, esperava-se uma concentração de mais ou menos 10% da concentração determinada pelo fabricante. Depois de 72 horas de difusão, os diâmetros dos anéis foram medidos com um leitor apropriado para imunodifusão radial. A concentração das proteínas, glicoproteína α_1-ácida e da proteína C-reativa, foram determinadas diretamente comparando-se os diâmetros dos anéis formados para cada amostra, com tabelas de referência para concentração de ambas as proteínas fornecidas pelo fabricante.

2.9.2. Determinação da proteína C-reativa (CRP) e da glicoproteína α-ácida (AGP)

Comparando-se os resultados da medida dos diâmetros dos anéis formados para cada amostra das crianças da comunidade do Parque Universitário, com as tabelas de referência para a CRP e para a AGP, foram obtidas as concentrações para CRP e AGP no sangue das crianças, como mostrado na listagem de resultados, em anexo, no item 7.1.5. **ANEXO 5**.

Os espaços em branco correspondem às concentrações que não foram calculadas devido à quantidade insuficiente de amostra de sangue das crianças.

2.10. TESTE DA PERMEABILIDADE INTESTINAL USANDO LACTULOSE/MANITOL

2.10.1. Açúcares e Reagentes

Mio-inositol, D-(+)-glicosamina, sorbitol, manitol, D-(+)-glicose, melibiose, β-lactose e lactulose foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) e utilizados como açúcares-padrões para análise em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD). Hidróxido de sódio e carbonato 50% (v/v) foram usados como eluentes para coluna de cromatografia.

2.10.2. Equipamentos

O sistema analisador de carbohidrato BioLC HPLC, a que foram adicionado o módulo de bomba gradiente GPM-2, o módulo eluente de gás EDM-II e o detector pulsátil amperométrico PAD-II com eletrodos de ouro foram adquirido da Dionex (Sunnyvale, CA). A coluna de troca-aniônica CarboPac MA-1 (250 mm x 4.0 mm I.D., pelicular resin) com o módulo de proteção também adquirido da Dionex. As injeções foram realizadas automaticamente através do “autosampler”.

2.10.3. Preparação das Amostras

Para padronização e calibração das amostras usando HPLC-PAD, preparou-se dois grupos de soluções denominadas de soluções-padrões como já descrito na literatura (BARBOZA JR et al, 1999). Cada grupo foi composto de quatro açúcares-padrões na concentração de 0,06 mM para cada açúcar. Os grupos foram divididos em Grupo I, glicosamina, manitol, melibiose e lactulose, e Grupo II, inositol, sorbitol, glicose e lactose. As soluções-padrões, contendo os mesmos açúcares, foram injetadas no início de cada experimento para calibração do HPLC-PAD, bem como a cada quatro amostras para compensar a perda de sensibilidade resultante do acúmulo de materiais nos eletrodos de ouro para detecção. Para analisar a variação intra-experimento, utilizou-se os padrões dos Grupos I e II na concentração de 0,1 mM. Cinquenta microlitros de cada grupo foram utilizados para dosagens sucessivas (N = 4). Para avaliar a variação inter-experimento, preparou-se quatro amostras independentes dos Grupos I e II na concentração de 1,0 mM. A partir das soluções originais, diluiu-se os açúcares-padrões nas seguintes concentrações: 1,0; 0,3; 0,1; 0,03 e 0,01 mM, respectivamente. De cada solução, tirou-se 50 μL para dosagem no HPLC-PAD.

As amostras de urina (50 μL) de cada criança deste estudo, foram diluídas em 50 μL de uma solução contendo melibiose (3,6 mM) e adicionada água bisdestilada e deonizada no volume de 2,9 mL. Após filtração (0,22 μ),

50 μL foram utilizados para dosagem no HPLC-PAD. As concentrações e tempos de retenções foram armazenadas e utilizadas depois para análise.

2.10.4. Protocolo do Teste de permeabilidade com lactulose e manitol nas crianças do Parque Universitário

O teste da lactulose/manitol foi feito como já descrito na literatura (BAO et al, 1996; LIMA et al, 1997; BARBOZA JR et al, 1999). Após três horas de jejum, as crianças tomaram a solução-teste (2 mL/kg) contendo as formulações galênicas de manitol (50 mg/mL) e lactulose (250 mg/mL) (**FIGURA 13**). O manitol foi adquirido da HenriFarma Produtos Químicos e Farmac. Ltda., São Paulo, SP e a lactulose (Lactulona) da Luitpold Produtos Farmacêuticos Ltda. Barueri, SP. A urina foi coletada por 5 horas em recipiente contendo 1 mL de clorhexidina (40 mg/mL) adquirida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O volume total de urina foi anotado e uma amostra de 10 ml foi estocada a - 20°C para posterior dosagem de lactulose e manitol pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD) (BARBOZA JR et al, 1999). O sistema analisador de carbohidrato BioLC CLAE, a que foi adicionado o módulo de bomba gradiente GPM-2, o módulo eluente de gás EDM-II e o detector pulsatil amperométrico PAD-II com eletrodos de ouro foram adquiridos de Dionex (Sunnyvale, CA). A coluna de troca-aniônica CarboPAC MA-1 (250 mm x 4.0 mm I.D., pelicular resin) com o módulo de proteção foi também adquirida da Dionex. As injeções foram realizadas automaticamente através do “autosampler” (BARBOZA JR et al, 1999).

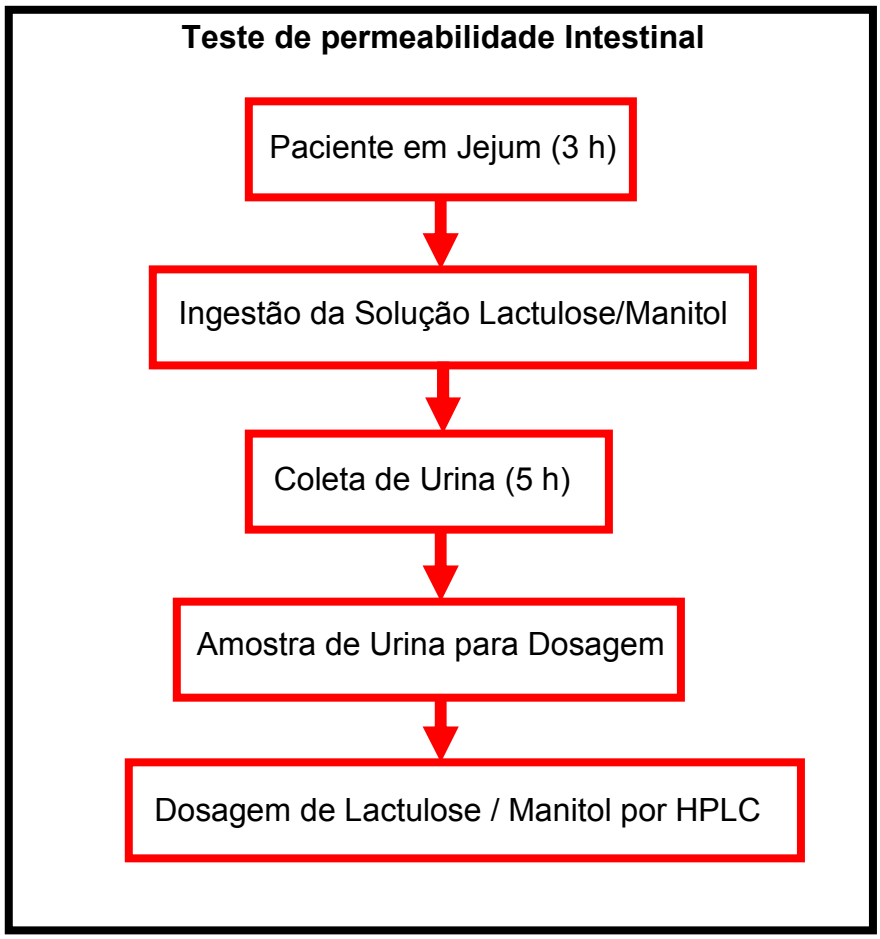

Figura 13 - Protocolo experimental para realização do teste diferencial de permeabilidade intestinal utilizando lactulose e manitol (Fonte: BARBOZA JR et al, 1999).

Os resultados do teste de permeabilidade intestinal, demonstrado pela excreção de lactulose e manitol, para cada criança da comunidade Parque Universitário, estão descritos na listagem de resultados, no item 7.1.6. **ANEXO 6**.

2.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados e computados duas vezes por pessoas diferentes e a validação foi feita usando um programa chamado “Access” (Microsoft Co., Cupertino, CA). O programa EpiInfo and Nutstat (version 6.0 do Centro de Controle de Doenças, Atlanta, GA) foi usado para calcular os parâmetros antropométricos. As análises estatísticas foram feitas usando um Pacote Estatítico para Ciências Sociais (versão 11.5 from SPSS Inc., Chicago, IL). Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

O percentual de excreção urinária da lactulose e do manitol foi calculado usando o programa excel (Microsoft Co., Cupertino, CA). Os dados da razão de lactulose:mannitol foram apresentados como média e desvio padrão. Análise de regressão foi aplicada para determinar os coeficientes de correlação do teste de permeabilidade intestinal para retinol ou carotenóides.

As relações do retinol-RBP, retinol-TTR, retinol-CRP e retinol-AGP foram analisadas por regressão linear simples. As concentrações de retinol sanguíneas entre as crianças, passando por uma resposta de fase aguda ou não passando por uma resposta de fase aguda, foram comparadas usando o teste t de Student.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DAS CRIANÇAS DA COMUNIDADE URBANA PARQUE UNIVERSITÁRIO EM FORTALEZA.

A **TABELA 10** mostra a distribuição das crianças da comunidade urbana Parque Universitário em Fortaleza por idade, sexo e grau de desnutrição. A média da idade das crianças foi de 41 meses (variação: 5 – 110 meses), e 49% (50/102) das crianças eram do sexo masculino e 51% (52/102) eram do sexo feminino. Usando os parâmetros peso/altura (perda de peso), peso/idade e altura/idade (atrofiação) para crianças do Parque Universitário, mostrou-se que 20%, 50% e 66% foram considerados desnutridas, respectivamente.

A prevalência da deficiência de vitamina A tendo como base o retinol sérico para um total de 102 crianças foi resumida na **TABELA 10**. 24% (24/102) das crianças mostraram concentrações de vitamina A insuficientes (retinol $\leq$ 1,05 μM), embora apenas 3% (3/102) apresentaram deficiência moderada de vitamina A e nenhuma apresentou deficiência severa de vitamina A. O teste de permeabilidade intestinal foi alterado em 49% (47/97) do total das crianças testadas (**TABELA 10**).

TABELA 10 - Características demográficas das crianças do Parque Universitário em Fortaleza, Ceará, Brasil, estratificadas pela idade, sexo, estado nutricional, deficiência de vitamina A e teste de permeabilidade intestinal

Características	**Dados de Base**		
Idade (meses)			
Média (variação)	41 (5 – 110)		
Sexo			
Masculino	50 (49%)		
Feminino	52 (51%)		
Total	102 (100)		
	Parâmetros Antropométricos [1]		
Grau de Desnutrição [2]	**Peso/Altura**	**Peso/Idade**	**Altura/Idade**
Normal (≥ -1)	82 (80,4)	51 (50,0)	35 (34,3)
Leve [-2; -1)	20 (19,6)	42 (41,2)	48 (47,1)
Moderado [-3; -2)	-	9 (8,8)	16 (15,7)
Severa (< -3)	-	-	3 (2,9)
Total	102 (100)	102 (100)	102 (100)
Grau de DVA (μM) [3]	**Número de Crianças (%)**		
Suficiente (> 1,05)	78 (76,5)		
Leve (0,70;1,05]	21 (20,6)		
Moderada (0,35;0,70]	3 (2,9)		
Severa (≤ 0,35)	-		
Total	102 (100)		
Razão Lactulose:manitol [4]	**Número de Crianças (%)**		
Normal (< 0,0864)	50 (51,5)		
Anormal (≥ 0,0864)	47 (48,5)		
Total	97 (100)		

[1] Número de crianças e percentual em cada parâmetro antropométrico estratificado pelo grau de desnutrição.

[2] Grau de desnutrição mensurado pelos intervalos dos escores-Z.

[3]Grau de Deficiência de Vitamina A (DVA) através dos intervalos das concentrações do retinol sanguíneo (μM).

[4] A razão da lactulose:manitol foi considerada anormal como propósito de comparação se a razão estivesse ≥ 0,0864. Este valor é igual a média normal ± desvio padrão (Castro et al, 2003).

3.2. LIGAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE VITAMINA A SANGUÍNEAS E A MANUTENÇÃO DA INTEGRIDADE INTESTINAL NAS CRIANÇAS DO PARQUE UNIVERSITÁRIO EM FORTALEZA.

Também foi explorada neste estudo a associação entre as concentrações sanguíneas de vitamina A e a manutenção da integridade intestinal nas crianças do Parque Universitário em Fortaleza através do teste de lactulose/manitol. Foi observado que não houve correlação significativa entre as concentrações de retinol com o manitol ($r = 0,132$; $p = 0,196$), lactulose ($r = 0,035$; $p = 0,727$) ou com a razão de lactulose/manitol ($r = 0,046$; $p = 0,652$). As concentrações de carotenóides comuns da dieta (luteína, beta-criptoxantina, licopeno e beta-caroteno) para todas as amostras de sangue coletadas das crianças deste estudo, também foram medidas por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram observadas correlações inversas significantes entre os carotenóides, luteína ($r = -0,293$; $p = 0,004$), β-criptoxantina ($r = -0,210$; $p = 0,039$) e β-caroteno ($r = -0,225$; $p = 0,027$) com a razão de lactulose/manitol, como mostrado nas **Figuras 14, 15 e 16**. Também, foi observada correlação inversa significante entre os carotenóides, luteína ($r = -0,202$; $p = 0,046$), β-criptoxantina ($r = -0,187$; $p = 0,066$) e β-caroteno ($r = -0,155$; $p = 0,128$) e a excreção urinária de lactulose, mas não com a excreção urinária de manitol.

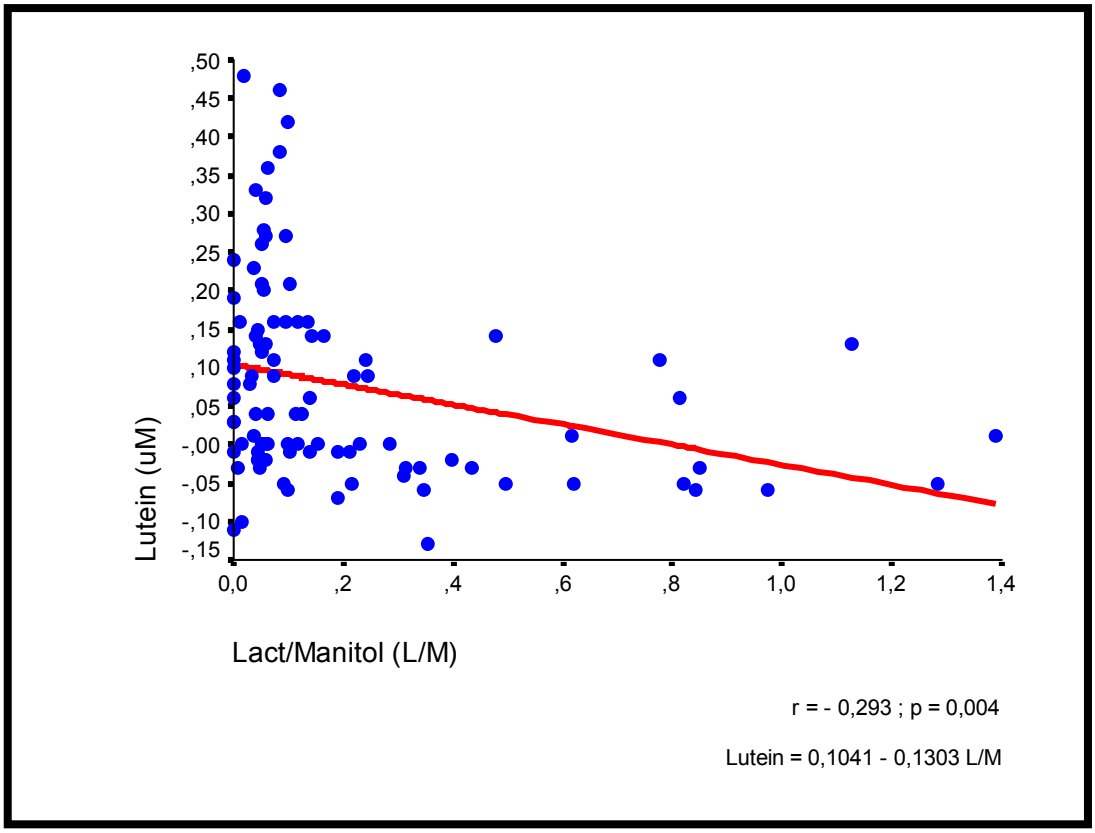

FIGURA 14 – O gráfico mostra a concentração sanguínea da luteína para a razão da lactulose/manitol urinária para as crianças do Parque Universitário. As análises de regressão dos dados indicaram que a concentração sanguínea da luteína correlacionou-se inversamente com a razão de lactulose/manitol urinária (r = -0,293, p = 0,004). A razão da lactulose/manitol urinária reflete o percentual de cada dose excretada na urina.

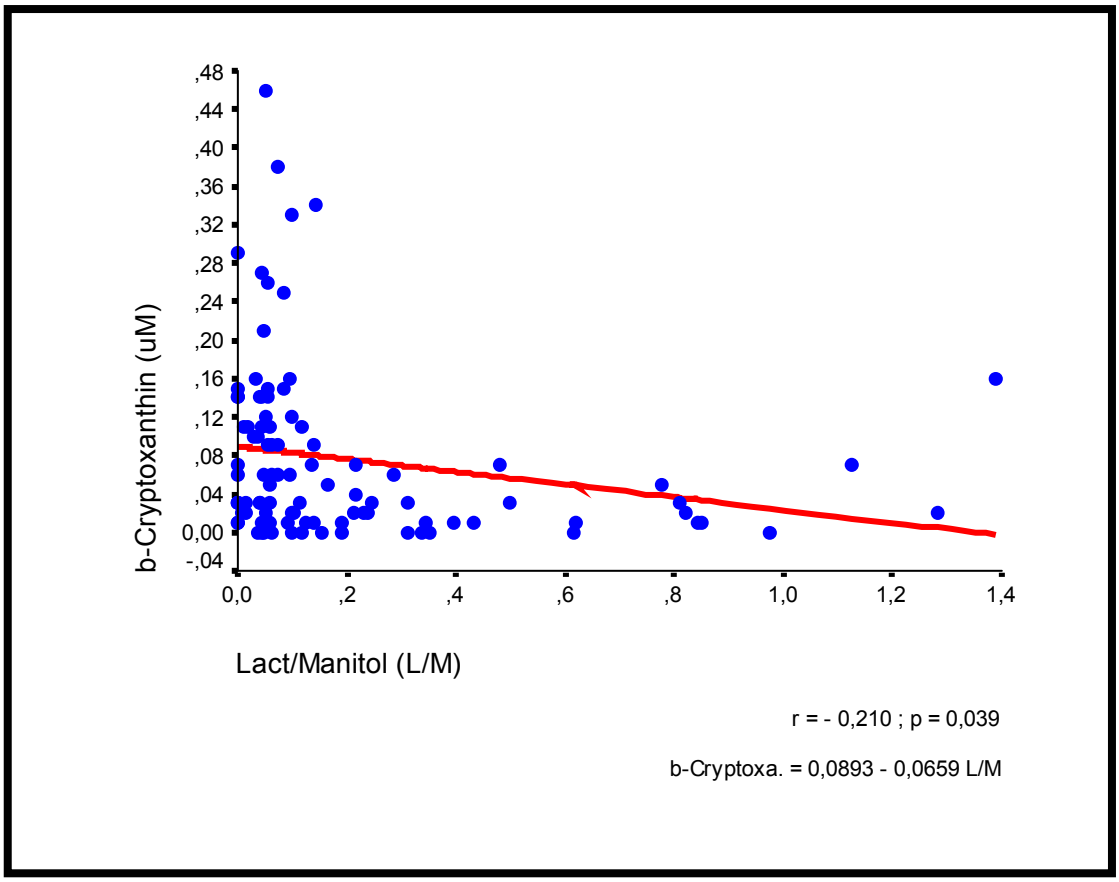

FIGURA 15 – O gráfico mostra a concentração sanguínea da β-criptoxantina para a razão da lactulose/manitol urinária para as crianças do Parque Universitário. As análises de regressão dos dados indicaram que a concentração sanguínea da β-criptoxantina correlacionou-se inversamente com a razão de lactulose/manitol urinária (r = -0,210, p = 0,039). A razão da lactulose/manitol urinária reflete o percentual de cada dose excretada na urina.

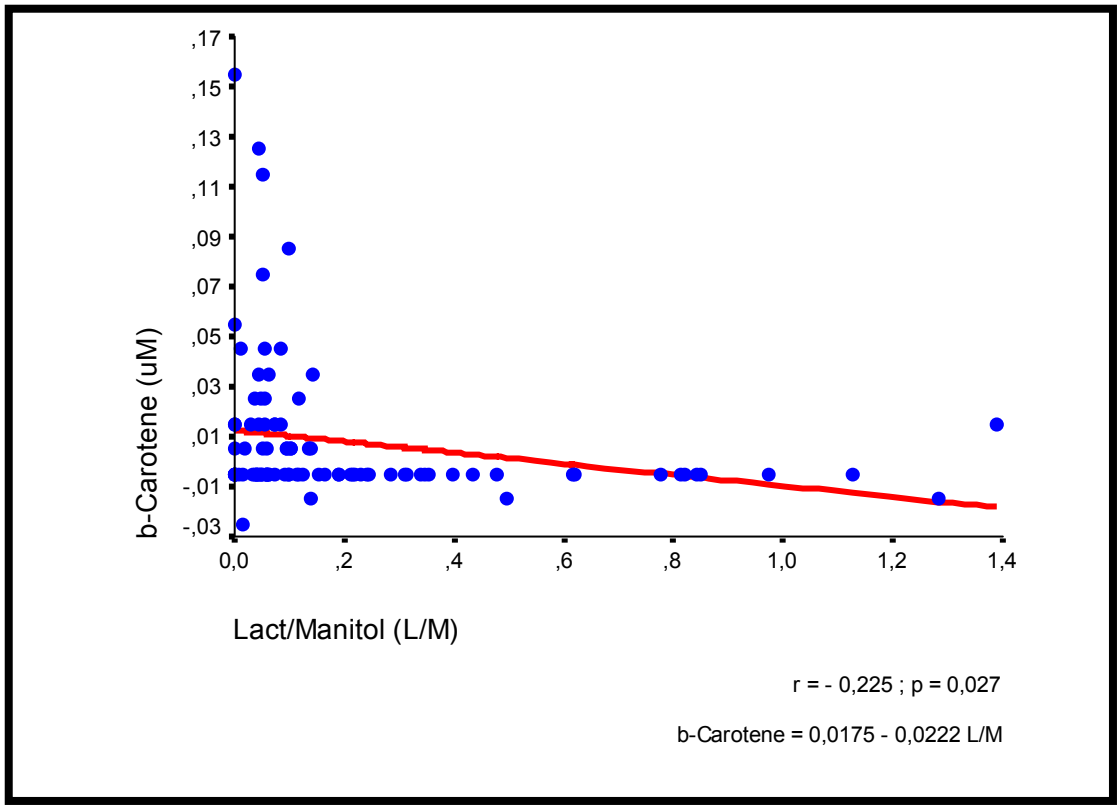

FIGURA 16 – O gráfico mostra os níveis séricos do β-caroteno para a razão da lactulose/manitol urinária para as crianças do Parque Universitário. As análises de regressão dos dados indicaram que as concentrações sanguíneas do β-caroteno correlacionaram-se inversamente com a razão de lactulose/manitol urinária (r = -0,225, p = 0,027). A razão da lactulose/manitol urinária reflete o percentual de cada dose excretada na urina.

3.3. RELAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA LIGADORA DE RETINOL (RBP), A TRANSTIRETINA (TTR) E O RETINOL SANGUÍNEO NAS CRIANÇAS DA COMUNIDADE URBANA PARQUE UNIVERSITÁRIO

Foi determinada a relação entre a RBP e o retinol no soro de 99 crianças do Parque Universitário, que foi ilustrada na **FIGURA 17**. A reta da **FIGURA 17** representa o melhor ajuste entre os valores de retinol e RBP. O retinol e a RBP apresentam uma correlação linear (r = 0,447). O retinol também se correlaciona com a TTR (r = 0,4530) como mostrado na **FIGURA 18**.

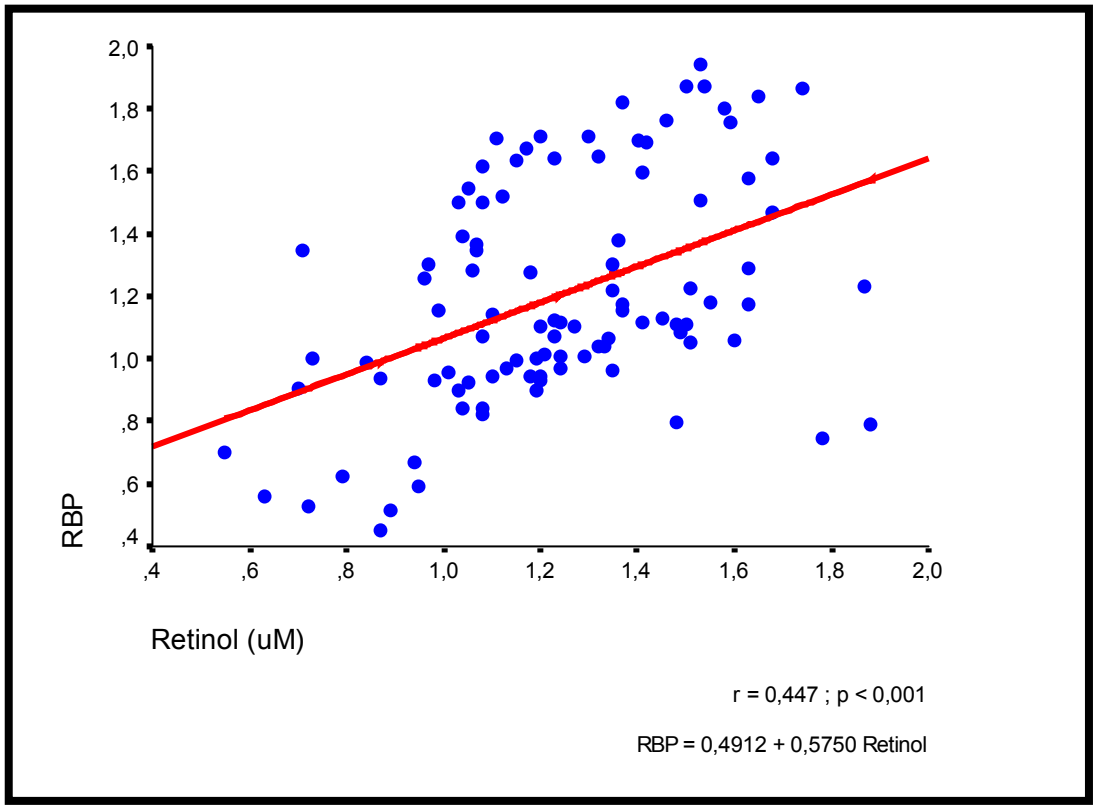

FIGURA 17 - Análise de regressão do retinol sanguíneo versus a proteína de ligação do retinol (RBP); n = 99. A reta representa o melhor ajuste dos dados. A raiz quadrada média do erro residual do retinol em volta do melhor ajuste da reta foi 0,447 (p < 0,001).

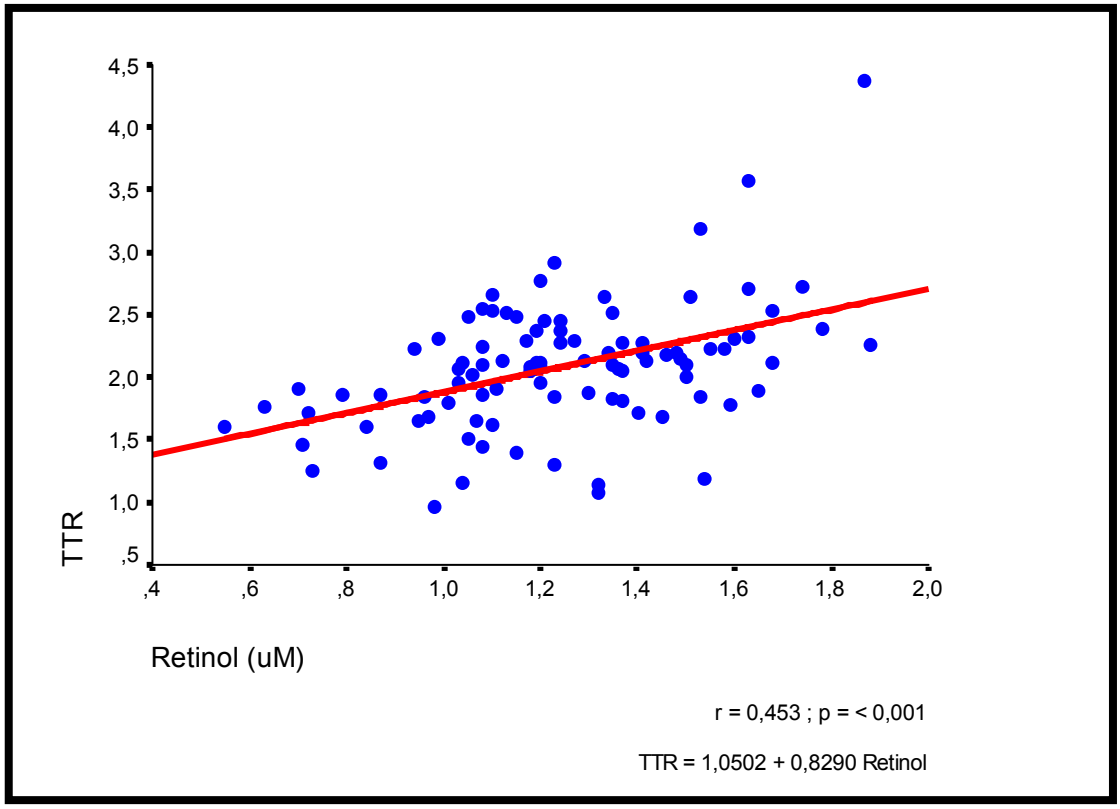

FIGURA 18 - Análise de regressão do retinol sanguíneo versus transtiretina sanguínea (TTR); n = 96. A reta representa o melhor ajuste dos dados. A raiz quadrada média do erro residual do retinol em volta do melhor ajuste da reta foi 0,453 ($p < 0,001$).

3.4. RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE RETINOL SANGUÍNEO E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, PROTEÍNA C-REATIVA (CRP) E GLICOPROTEÍNA α-ÁCIDA (AGP), NAS CRIANÇAS DA COMUNIDADE URBANA PARQUE UNIVERSITÁRIO

O retinol correlacionou-se inversamente com as proteínas de fase aguda positivas, tais como, CRP (r = -0,3583) e AGP (r = -0,3627), como pode ser visto nas **FIGURAS 19 e 20**, respectivamente.

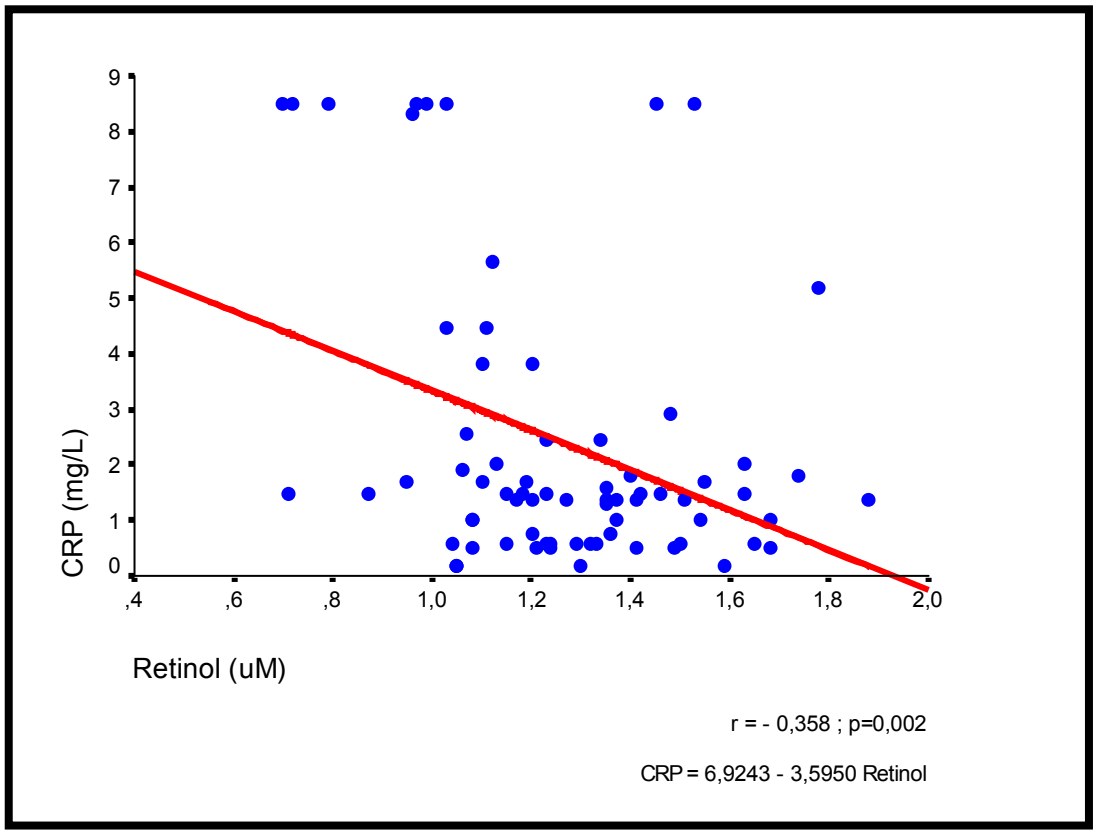

FIGURA 19 - Análise de regressão do retinol sanguíneo versus a proteína C-reativa (CRP); n = 72. A reta representa o melhor ajuste dos dados. A raiz quadrada média do erro residual do retinol em volta do melhor ajuste da reta foi 0,358 (p = 0,002).

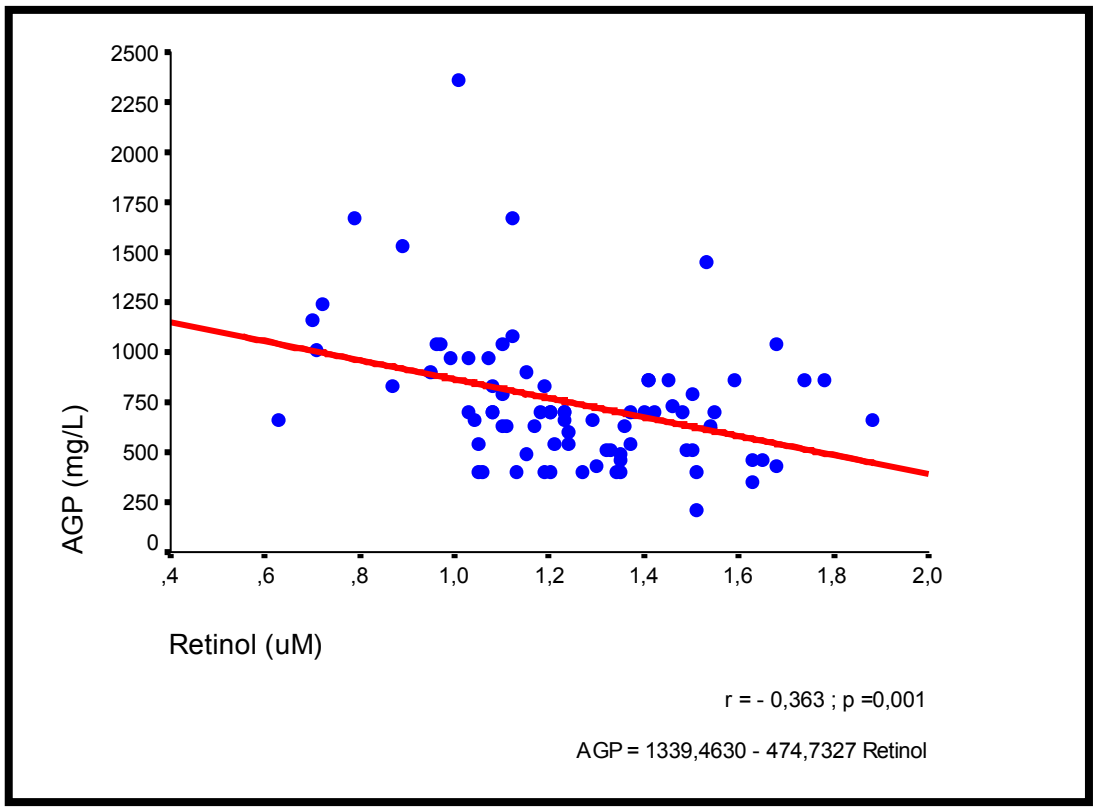

FIGURA 20 - Análise de regressão do retinol sanguíneo versus a glicoproteína α_1-ácida (AGP); n = 80. A reta representa o melhor ajuste dos dados. A raiz quadrada média do erro residual do retinol em volta do melhor ajuste da reta foi –0,363 (p = 0,001).

Sabendo-se que a concentração de retinol sanguíneo pode ser influenciada por infecções, as concentrações de retinol foram comparadas entre as crianças enfrentando uma reação de fase aguda positiva, ou não enfrentando (reação de fase aguda negativa). A CRP estava elevada (> 8 mg/L) em 9 de 72 crianças e a AGP estava elevada (> 1000 mg/L) em 13 das 80 crianças estudadas. Quando a CRP estava elevada (> 8 mg/L), 7 de 9 crianças apresentavam as concentrações de retinol $\leq$ 1,05 μM ($p < 0,0001$ pelo teste Chi-square), e quando a AGP estava elevada (> 1000 mg/L), 8 de 13 crianças apresentavam as contrações de retinol $\leq$ 1,05 μM ($p < 0,0001$ pelo teste Chi-square), como mostrado na **TABELA 11**.

TABELA 11 - Distribuição da glicoproteína α_1-ácida (AGP) e da proteína C-reativa (CRP) pela concentração de retinol das crianças do Parque Universitário em Fortaleza, Ceará, Brasil.

Concentração de retinol sanguíneo (μM)	AGP*				CRP**			
	< 1000 mg/L		> 1000 mg/L		< 8 mg/L		> 8mg/L	
	n	%	n	%	n	%	n	%
≤ 1,05	9	13,4	8	61,5	7	11,1	7	77,8
> 1,05	58	86,6	5	38,5	56	88,9	2	22,2

*p = 0,0006

**p < 0,0001

3.5. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA LIGADORA DE RETINOL (RBP) SANGUÍNEA COMO MEDIDA ALTERNATIVA DE RETINOL SANGUÍNEO

Para avaliar a concentração de RBP sanguínea como medida alternativa de retinol sanguíneo, foi calculado um ponto de corte de 1,003 μM de RBP através da curva de ROC ("Receiver Operating Characteristic") (BLOMHOFF et al, 1991) que corresponde a 1,05 μM retinol, resultando em 70,8% de sensibilidade e 80,0% de especificidade. Como mostrado na **TABELA 12**, tendo como base um ponto de corte de 1,003 μM de RBP, 17 das 24 crianças com concentrações de retinol sanguíneo ≤ 1,05 μM seriam corretamente identificadas como apresentando leve deficiência de vitamina A, enquanto 7 crianças seriam incorretamente identificadas como apresentando concentrações suficientes de vitamina A, representando 70,8% de sensibilidade. Das 75 crianças com concentrações de retinol > 1,05 μM, 60 seriam corretamente identificadas como não apresentando deficiência de vitamina A leve, enquanto 15 crianças seriam incorretamente identificadas como apresentando deficiência leve de vitamina A, representando 80,0% de

especificidade. As curvas de ROC ilustram graficamente o efeito de se usar pontos de corte alternativos, e que foram gerados para caracterizar a medida da concentração de RBP como uma medida alternativa para o retinol sanguíneo (HABICHT et al, 1982). A curva de ROC para a análise do RBP como medida alternativa para o retinol é mostrada na **FIGURA 21**. A área integrada sob a curva foi 0,779, mostrando um grau muito bom de entendimento entre a RBP e o retinol sanguíneo como determinantes da deficiência de vitamina A.

TABELA 12 - Uso da proteína ligadora de retinol (RBP) para predizer deficiência leve de vitamina A determinada pela concentração de retinol (70,8% de sensibilidade; 80,0% de especificidade)

RBP	**Deficiência de vitamina A**		**Total**
	Retinol ≤ 1,05 μM	**Retinol > 1,05 μM**	
≤ 1,003 μM	17	15	32
> 1,003 μM	7	60	67
Total	24	75	99

p < 0,0001

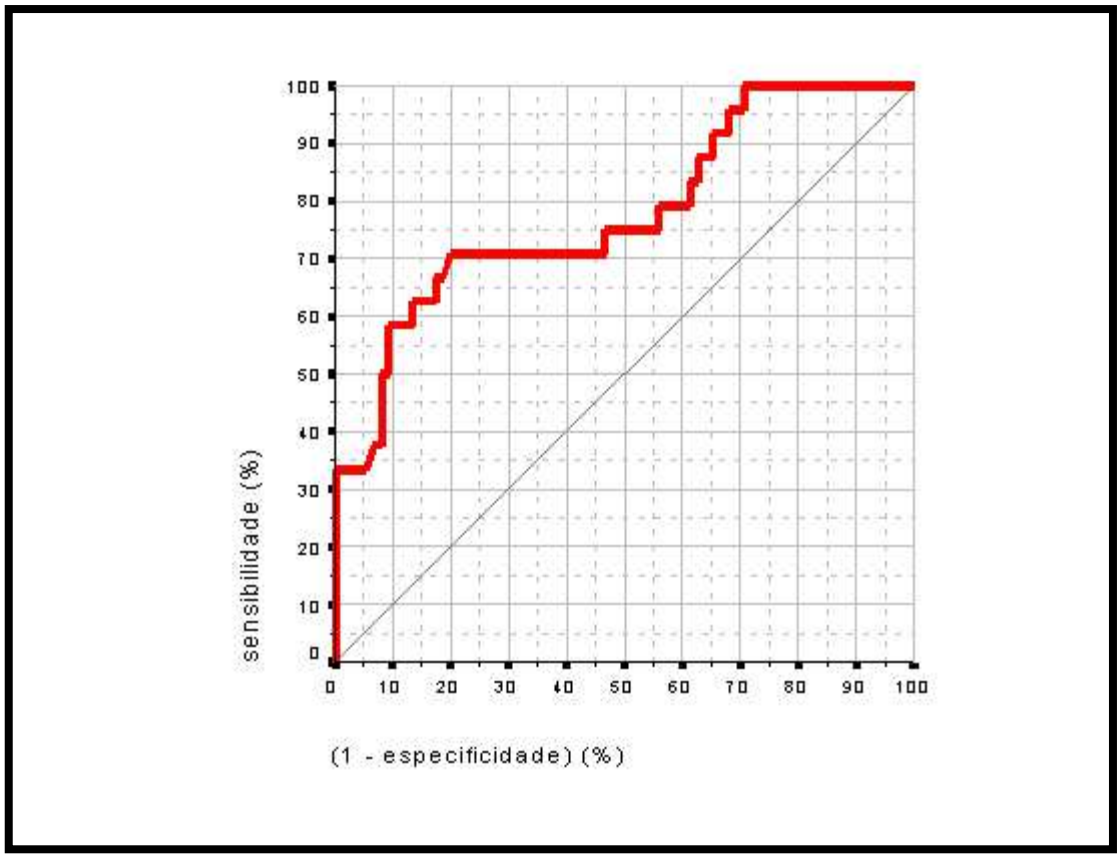

FIGURA 21 - Curva de ROC para deficiência leve de vitamina A. Sensibilidade e especificidade foram calculadas para cada concentração da proteína ligadora de retinol encontradas na população em estudo para predizer leve deficiência de vitamina A (ou seja, < 1,05 μM de retinol). Quanto maior a sensibilidade e a especificidade de cada ponto de corte, mais próxima a área sob a curva será igual a 1, sendo 1 o indicador perfeito. A área sob a curva foi igual a 0,779.

3.6. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA TRANSTIRETINA (TTR) SANGUÍNEA COMO MEDIDA ALTERNATIVA DE RETINOL SANGUÍNEO

Avaliando-se a concentração de TTR sanguínea como medida alternativa de retinol sanguíneo foi calculado um ponto de corte de 1,931 μM de TTR através da curva de ROC (BLOMHOFF et al, 1991) que corresponde a 1,05 μM de retinol. Como pode ser visto na **TABELA 13**, tendo como base um ponto de corte de 1,931 μM para a TTR, 17 das 23 crianças com

concentrações de retinol sanguíneo ≤ 1,05 μM seriam corretamente identificadas como apresentando leve deficiência de vitamina A, enquanto 6 crianças seriam incorretamente identificadas como apresentando níveis suficientes de vitamina A, representando 73,9% de sensibilidade. Das 73 crianças com concentrações de retinol > 1,05 μM, 54 crianças seriam corretamente identificadas como não apresentando deficiência leve de vitamina A, enquanto que 19 crianças seriam incorretamente identificadas como apresentando deficiência leve de vitamina A, representando 74,0% de especificidade. A curva de ROC para a análise da TTR como medida alternativa para o retinol é mostrada na **FIGURA 22**. A área integrada sob a curva foi 0,781, mostrando um grau muito bom de entendimento entre a TTR e o retinol sanguíneo como determinantes da deficiência de vitamina A.

TABELA 13 - Uso da transtaretina (TTR) para predizer deficiência leve de vitamina A, como determinada pela concentração do retinol (73,9% de sensibilidade, 74,0% de especificidade)

TTR	**Deficiência de vitamina A**		**Total**
	Retinol ≤ 1,05 μM	**Retinol > 1,05 μM**	
≤ 1,931 μM	17	19	36
> 1,931 μM	6	54	60
Total	23	73	96

p < 0,0001

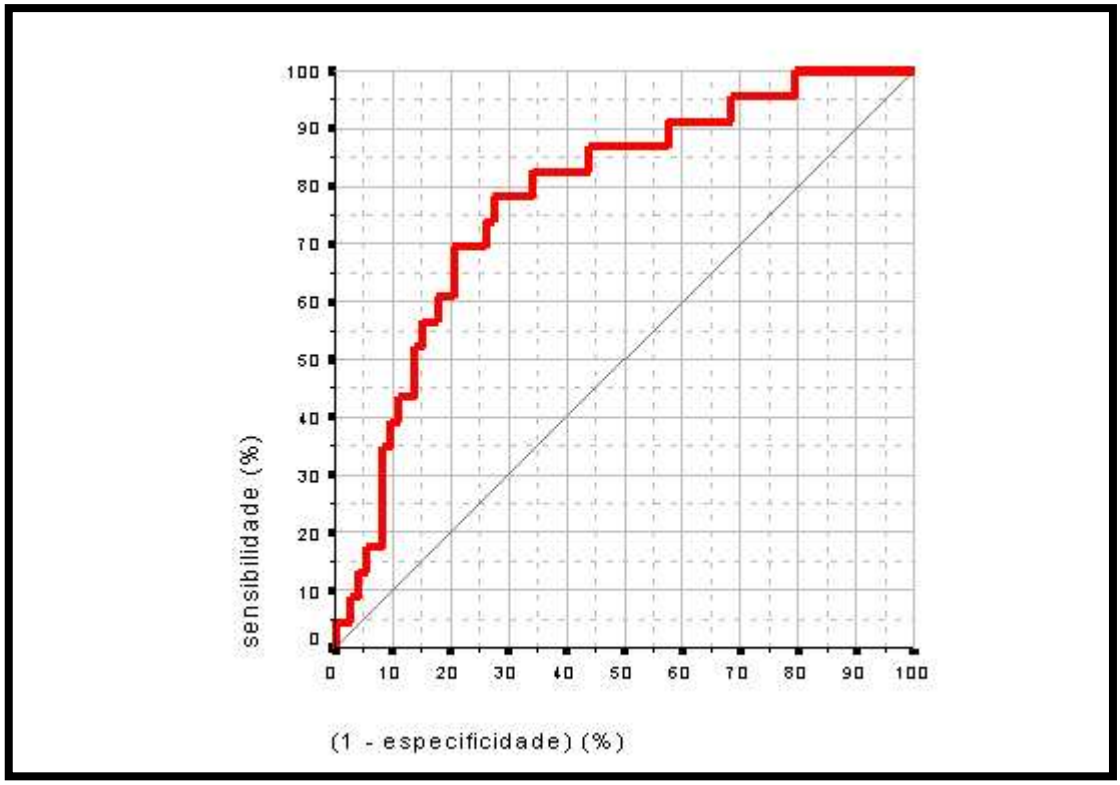

FIGURA 22 - Curva de ROC para deficiência leve de vitamina A. Sensibilidade e especificidade foram calculadas para cada concentração da transtiretina na população em estudo para predizer leve deficiência de vitamina A (ou seja, < 1,05 μM de retinol). Quanto maior a sensibilidade e a especificidade de cada ponto de corte, mais próxima a área sob a curva será igual a 1, sendo 1 o indicador perfeito. A área sob a curva foi igual a 0,781.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A desnutrição, medida pelo retardo do crescimento infantil, alcança cerca de 10% das crianças do Brasil. Na região em situação mais favorável – as áreas urbanas do Centro-Sul – a ocorrência de crianças de baixa estatura é rara e sua freqüência é apenas pouco superior à observada em países desenvolvidos, enquanto na região em situação menos favorável – o Nordeste rural – o problema alcança uma em cada quatro crianças, condição que aproxima essa região dos países mais pobres de mundo. Diferenças regionais quanto ao poder aquisitivo das famílias não explicam inteiramente o excesso relativo de desnutrição infantil no Norte e Nordeste e nas áreas rurais dessa última região (MONTEIRO, 2003).

O Nordeste brasileiro, por se tratar de uma das regiões mais pobres do país, com Índice de Pobreza Humana (IPH) de 46%, onde carências nutricionais como a desnutrição energético-protéica e a anemia ferropriva atingem uma grande parcela da população, tem sido alvo de muitos estudos sobre a situação da hipovitaminose A (PAIVA et al, 2006). A população do presente estudo está localizada em uma comunidade urbana chamada Parque Universitário, em Fortaleza no Nordeste do Brasil, com alto índice de prevalência de desnutrição e deficiência de vitamina A.

Em janeiro de 2000, a Organização Mundial de Saúde considerou a deficiência de vitamina A ainda um importante problema de saúde pública no Brasil (GOODMAN et al, 2000). Os inquéritos de consumo alimentar realizados nos últimos 25 anos em âmbito nacional, regional ou local indicam que a ingestão de vitamina A de fontes naturais (incluindo pró-vitamina A) é extremamente baixa em 60% ou mais da população, com uma adequação inferior a 50%. A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) reconhece que, da ingestão média total de vitamina A na América do Sul, 50% provêm de fontes vegetais (pró-vitamina A carotenóides). A monotonia alimentar prevalente entre as diversas camadas da população, principalmente as mais pobres, contribui para a manutenção do quadro que prevalece até hoje (RAMALHO et al, 2002).

Intervenções nutricionais e outros programas de saúde pública podem salvar até 2,5 milhões de crianças por ano em todo o mundo e podem também prevenir que mais ou menos quinhentas mil crianças apresentem cegueira irreverssível associada com a deficiência de vitamina A (RAMALHO et al, 2002; VITAL, 1993; OMS, 1982). Durante muitas décadas o problema de deficiência de vitamina A associado com a função da barreira intestinal, reprodução e função imunológica foi ignorado provavelmente por causa da falta de métodos para se avaliar a deficiência de vitamina A sub-clínica e pré-patológica. O presente estudo foi conduzido primeiramente para examinar a associação dos carotenóides e retinol com a função da barreira intestinal nas crianças da comunidade urbana Parque Universitário, localizada no Nordeste do Brasil, como já foi mencionado, uma região de alta prevalência de deficiência de vitamina A.

A deficiência de vitamina A é um importante problema em mais de 60 países, especialmente na Ásia, África e América Latina, onde o índice de prevalência é considerado muito alto (RAMALHO et al, 2002, STOLTZFUS e UNDERWOOD 1995). A Organização Mundial da Saúde (WHO) incluiu o Brasil como um país com altos índices para deficiência de vitamina A sub-clínica (RAMALHO et al, 2002). No Nordeste do Brasil, a prevalência para deficiência de vitamina A, usando a concentração de retinol no soro, foi de 49% (máximo aceitável é de 20%) para crianças de 2 a 8 anos de idade (RAMALHO et al, 2002; OMS, 1982; STOLTZFUS e UNDERWOOD, 1995; MORA et al, 1998). Em 1991, a prevalência de deficiência de vitamina A na cidade de Fortaleza foi de 40% para crianças de 0,5 a 4,9 anos de idade (RAMALHO et al, 2002). No presente estudo foi encontrada uma prevalência de 26% de deficiência de vitamina A em crianças de 0,4 a 9 anos de idade. Esses dados estão consistentes com a alta prevalência de deficiência de vitamina A reportada nesta região. Estes dados também estão consistentes com a alta frequência de desnutrição moderada nesta população selecionada para o ensaio de intervenção nutricional (STOLTZFUS e UNDERWOOD, 1995).

A vitamina A é um termo genérico para uma variedade de compostos relacionados, incluindo o retinol, ácido retinóico e carotenóides pró-vitamina

A. O retinol é formado durante hidrólises no intestino delgado onde é captado ativamente pelos enterócitos. O mais ativo carotenóide pró-vitamina A é o todo-trans-β-caroteno, o qual está presente nas frutas amerelas/laranjas e nos vegetais verde escuros. As células intestinais convertem os carotenóides pró-vitamina A a retinaldeídos, que são na sua maioria reduzidos a retinol (McCULLOUGH et al, 1999).

A vitamina A apresenta papel essencial na visão e diferenciação celular, sendo a última particularmente importante no crescimento, reprodução e resposta imune, e na manutenção da integridade epitelial. Nenhuma deficiência nutricional é mais sinérgica com infecção do que a da vitamina A. Os dois principais mecanismos envolvidos na prevenção de doenças são os efeitos da vitamina A no sistema imune e os efeitos na integridade epitelial. Alterações no epitélio de órgãos vitais ocorrem logo cedo na deficiência de vitamina A, sugerindo um importante papel da vitamina A na barreira funcional (MCCULLOUGH ET al, 1999).

O retinol e seus metabólitos são conhecidos por apresentar papel essencial no desenvolvimento e função de várias células, inclusive as células epiteliais do trato digestivo. Entre os metabólitos do retinol, o ácido retinóico é o composto mais ativo e tem mostrado papel essencial na proliferação e diferenciação celular. Tem sido demonstrado que os níveis de ácido retinóico apresentam-se 3-4 vezes mais altos na cripta em proliferação do que no vilo celular completamente diferenciado (THOMAS et al, 2005).

Muitos estudos epidemiológicos têm relatado que o consumo de alimentos ricos em carotenóides está associado com risco reduzido de certos cânceres, doenças cardiovasculares e degeneração macular relacionada a idade. Esses efeitos preventivos dos carotenóides poderiam estar relacionados com sua função como precursor da vitamina A e/ou com suas ações como antioxidantes e moduladores da resposta imune (DURING e HARRISON, 2005). Alguns carotenóides pró-vitamina A escapam da clivagem a retinol na mucosa intestinal e são absorvidos intactos da dieta. Assim esses carotenóides pró-vitamina A podem servir também como fonte importante de vitamina A nos tecidos (PAIK et al, 2004).

O retinol e os carotenóides são essenciais para o crescimento normal das células, diferenciação e manutenção dos tecidos epiteliais (ZAIGER et al, 2004; PARK et al, 1997). Os retinóides regulam a expressão de proteínas do ciclo celular e das enzimas da barreira intestinal envolvidas no processo da digestão (ZIEGLER et al, 2003; ZAIGER et al, 2004). Também, o retinol está associado com as proteínas das junções de oclusão entre as células e com as proteínas das junções de adesão (BALTES et al, 2004). Os carotenóides pró-vitamina A, como o alfa e beta-caroteno são precursores do retinol e todos os carotenóides são conhecidos como potentes e efetivos sequestradores de radicais livres de oxigênio (KHACHIK et al, 1995; NAGIRA et al, 2006). De fato, dados recentemente publicados mostraram que carotenóides, como a luteína, melhoraram a alteração das células intestinais da barreira funcional induzida por uma substância da peroxidação lipídica chamada butilhidroperoxida terciária (NAGIRA et al, 2006).

Para explorar a possível ligação entre os carotenóides e retinol na manutenção da integridade intestinal nas crianças da comunidade urbana Parque Universitário em Fortaleza, foi usado neste estudo o teste de lactulose/manitol. Este teste promove um método não-invasivo para avaliar alterações na função da barreira intestinal, podendo ser demonstrado por dois açúcares os quais são pobremente metabolizados. A excreção urinária diferenciada depois da ingestão de dois açúcares de diferentes pesos moleculares pode ser usada como index de permeabilidade para avaliar dano na mucosa. Lactulose e manitol são úteis para investigar a integridade do intestino. Depois da absorção, os dois açúcares são excretados intactos na urina (LIMA et al, 1997; WYATT et al, 1993; PEARSON et al, 1982). O manitol, um monossacarídeo, é absorvido por via transcelular através dos poros aquosos da membrana epitelial da célula; assim a absorção é proporcional a área de aborção do epitélio. Em contraste, a lactulose, um dissacarídeo, é absorvido por via paracelular. Assim, a absorção da lactulose é aumentada pela barreira intestinal danificada (LIMA et al, 1997; WYATT et al, 1993; PEARSON et al, 1982). A razão da permeabilidade da latulose/manitol promove uma medida quantitativa da integridade e função intestinais.

Baseados nos dados do presente estudo, as crianças do Parque Universitário com leve ou moderada deficiência de vitamina A apresentaram uma razão relativamente normal de lactulose/manitol, apesar de que tem sido demonstrado na literatura que crianças com severa deficiência de vitamina A apresentaram uma correlação inversa da concentração do retinol sanguíneo com a razão de lactulose/manitol, sugerindo uma alteração da barreira intestinal funcional (QUADRO et al, 2000). O que foi mostrado de novidade neste estudo foi a inversa correlação de carotenóides com a razão da lactulose/manitol, mostrando que, provavelmente, a baixa concentração dos carotenóides (precursores do retinol) no soro das crianças do Parque Universitário poderia ter influência na alteração da função da barreira intestinal. A inversa correlação dos carotenóides (especialmente com a luteína) foi também vista com o percentual de excreção urinária da lactulose, mas não com o manitol. Estes dados dão suporte às alterações no caminho paracelular e não na área de absorção medida pelo percentual de excreção urinária. Assim, não seria provável que essas crianças desnutridas tivessem a absorção de carotenóides prejudicada.

Novas metodologias são necessárias para a avaliação simples e rápida da deficiência de vitamina A em estudos de campo. Um método comumente usado para a avaliação do status de vitamina A em populações é a medida das concentrações de retinol no soro ou plasma usando cromatrografia liquída de alta eficiência (HPLC). A medida da concentração de retinol por cromatografia líquida de alta eficiência, entretanto requer instrumentos caros e pode não ser apropriada para trabalho de campo. Em locais onde os suportes tecnológicos e os recursos são limitados, deve-se procurar metodologias alternativas para a avaliação da deficiência de vitamina A. Tem sido proposto que a proteína ligadora do retinol (RBP) sanguínea pode ser usada como medida alternativa para as concentrações plasmáticas de retinol (GAMBLE et al, 2001). A RBP é uma proteína sintetizada no fígado e está presente no soro ou plasma num complexo de 1:1:1 com o retinol e a transtiretina (TTR) (SEMBA et al, 2002). A única função fisiológica conhecida da proteína ligadora do retinol é levar o retinol para os tecidos (GOODMAN, 1984; VOGEL et al, 1999). Neste estudo foi

mostrado que as concentrações de retinol plasmáticas das crianças do Parque Universitário apresentaram boa correlação com a RBP e com a TTR. Esta observação está de acordo com a fisiologia do transporte e metabolismo da vitamina A, que na corrente sanguínea, está ligada à proteína ligadora de retinol, representando 95-99% da vitamina A presente na circulação, estando este complexo binário associado à outra proteína plasmática, a transtiretina (GAMBLE e BLANER, 1999). Em condições normais, a RBP e o retinol co-existem na circulação em concentrações aproximadamente equimolares (BLOMHOFF et al, 1991), e mudam apenas em resposta ao estado nutricional de vitamina A e em caso de doenças (GAMBLE e BLANER, 1999).

Para determinar se as concentrações da RBP poderiam corretamente classificar as crianças do Parque Universitário na deficiência leve de vitamina A (retinol < 1,05 μM) comparadas com as concentrações de retinol usadas para o mesmo propósito, foi calculado o ponto de corte de 1,003 μM para RBP através da curva de ROC ("Receiver operating characteristic curve"). Este ponto de corte corresponde a 1,05 μM retinol, o qual resulta em 70,8% de sensibilidade e 80,0% de especificidade, indicando que no presente estudo a RBP classifica essencialmente tantas crianças com deficiência leve de vitamina A quanto o retinol. Embora a RBP, como o retinol, possa não refletir com precisão as reservas de vitamina A no fígado durante uma infecção, a análise da RBP para o diagnóstico da deficiência de vitamina A oferece muitas vantagens: a) é mais simples e mais barata que a do retinol, já que não necessita da tecnologia do HPLC; b) requer pequenos volumes de sangue; c) a RBP não está propensa à degradação por ultravioleta; d) a RBP é menos sensível à temperatura que o retinol; e) pode ser potencialmente aplicada no trabalho de campo. Esses fatores não são triviais, considerando-se o clima tropical e o acesso limitado a uma refrigeração adequada e também a laboratórios de pesquisa nos países em que muitas destas pesquisas são desenvolvidas (WHO, 1988; MALVY et al, 1993; PARVIAINEN e YLITALO, 1983; GULAMALI et al, 1985; BEETHAM et al, 1985; BERNARD et al, 1982, GAMBLE et al, 2001).

As concentrações da TTR foram também testadas como medidas alternativas para o retinol e, com a população do presente estudo, a TTR

também classificou corretamente as crianças apresentando leve deficiência de vitamina A (retinol < 1,05 μM), comparadas com as concentrações de retinol. Um ponto de corte de 1,931 μM para a TTR, calculado pela curva de ROC e correspondendo a 1,05 μM de retinol resultou em 73,9% de sensibilidade e 74,0% de especificidade. Assim, para a população do presente estudo, RBP e TTR predizem bem as concentrações de retinol sanguíneos.

Embora muitas condições afetem as concentrações de retinol e RBP na circulação (VOGEL et al, 1999; GAMBLE e BLANER, 1999), uma resposta de fase aguda é um fator particularmente relevante para populações que apresentam alta incidência de deficiência de vitamina A e alta prevalência de doenças infecciosas. Uma resposta de fase aguda é caracterizada por uma expressão significante de algumas proteínas, tais como a proteína C reativa (CRP) e a glicoproteína α-ácida (AGP), e diminuição na expressão de outras proteínas. A RBP e o retinol estão diminuídos durante uma resposta de fase aguda, independente dos estoques de retinol hepáticos (GAMBLE e BLANER, 1999; COUTSOUDIS et al, 1991; KANAKOUDI et al, 1995; ROSALES e ROSS, 1998). O retinol e a RBP demonstraram correlação positiva durante sarampo, condição que promove uma pronunciada resposta de fase aguda (Coutsoudis et al, 1991).

Foi demonstrado em ratos e também em pacientes com baixos estoques de vitamina A hepática que a razão molar da proteína ligadora de retinol plasmática com a transtiretina (RBP:TTR) seletivamente diagnostica deficiência de vitamina A durante inflamação. A deficiência de vitamina A resulta em uma redução diferencial da RBP em relação a TTR, assim reduzindo a razão molar de RBP:TTR. Durante uma inflamação, pelo contrário, ocorre uma redução de ambos RBP e TTR (ROSALES e ROSS, 1998; ROSALES et al, 2002).

O presente estudo está de acordo com as demonstrações publicadas anteriormente, onde as concentrações de retinol sanguíneas diminuem como uma função da elevação sanguínea das proteínas de fase aguda as quais estão frequentemente associadas com doenças infecciosas tais como infecções respiratórias e entéricas altamente prevalentes nas crianças desta

comunidade urbana do Nordeste do Brasil (STOLTZFUS e UNDERWOOD 1995; LIMA et al, 2000; CASTRO et al, 2003). Isto pode influenciar significativamente a correlação da deficiência de vitamina A com a função da barreira intestinal como demonstrado previamente em dados de deficiência de vitamina A severa em crianças de uma mesma área geográfica (QUADRO et al, 2000). Também, dados da literatura estão de acordo com os dados do presente estudo no qual não houve correlação da razão molar RBP:TTR nas crianças com alto risco de doenças infecciosas (FILTEAU et al, 2000; DONNEN et al, 2001). Assim, a razão molar da RBP:TTR sanguínea não foi útil para avaliar a deficiência de vitamina A nas crianças do Parque Universitário.

Já os carotenóides neste estudo não apresentaram associação com as proteínas de fase aguda e sua concentração sérica esteve mais estável mesmo no caso de deficiência de vitamina A. Esta é provavelmente uma explicação para a associação funcional dos carotenóides com a função da barreira intestinal vista neste trabalho. Dados da literatura demonstram (OLSON, 1998, capítulo 33) que o consumo de carotenóides está associado a efeitos benéficos para a saúde humana, tais como um risco reduzido de certos tipos de cânceres, de doenças cardiovasculares e da degenaração macular relicionada a idade. Estes efeitos preventivos dos carotenóides podem estar relacionados a sua principal função como precursores da vitamina A e/ou suas ações como anti-oxidantes, moduladores da resposta imune e indutores da comunicação nas junções de oclusão. De acordo com os achados neste estudo e de dados da literatura, pode-se postular que os carotenóides melhoram a disfunção da barreira intestinal, potencialmente via sequestro de radicais livres de oxigênio ou via manutenção das proteínas das junções de oclusão e adesão.

Assim pode-se concluir com os dados do presente estudo, que as crianças da comunidade urbana Parque Universitário em Fortaleza, Ceará, Brasil, com leve deficiência de vitamina A e desnutrição, frequentemente apresentam a função da barreira intestinal comprometida. As concentrações de retinol séricas não conseguiu predizer as alterações da função da barreira intestinal neste estudo. Já as concentrações séricas dos carotenóides

(luteína, beta-criptoxantina e beta-caroteno), precursores do retinol, correlacionaram-se inversamente com a função da barreira intestinal alterada. Também, as concentrações sanguíneas de retinol correlacionaram-se com RBP e TTR e correlacionaram-se inversamente com AGP e CRP. Os carotenóides podem assim proporcionar um melhor marcador para as alterações na função da barreira intestinal, do que as medidas de retinol e RBP sanguíneas.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- Esta população de crianças da comunidade urbana Parque Universitário em Fortaleza pode ser classificada como apresentando desnutrição leve.

- Os resultados sugerem uma correlação funcional com os carotenóides, luteína, beta-criptoxantina e beta-caroteno, que são precursores do retinol, com a barreira funcional intestinal. Entretanto, nestas crianças não houve associação das concentrações do retinol sérico com a barreira funcional intestinal.

- O retinol sérico correlacionou-se funcionalmente com as concentrações de RBP e de TTR, de acordo com a fisiologia do transporte e metabolismo da vitamina A.

- O retinol sérico correlacionou-se inversamente com a AGP e a CPR, estando diminuído durante uma resposta de fase aguda, independente dos estoques de retinol hepáticos.

- As concentrações de RBP e de TTR foram boas medidas alternativas ao retinol sanguíneo nesta população de crianças com baixa prevalência de deficiência de vitamina A.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS CL, NELSON WJ, SMITH SJ. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reogarnization during development of cell-cell adhesion. **J Cell Biol**; v.135, p.1899-1911, 1996.

AGNEW DG, LIMA AA, NEWMAN RD, WUHIB T, MOORE RD, GUERRANT RL, SEARS CL. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. **J Infect Dis**, v.177, p.754-760, 1998.

AKINYINKA OO, USEN SOI, AKANNI AO, FALADE AG, OLUMESE PE. Risk factors for low serum retinol in Nigerian children. **J Trop Pediatr**, v.46, p.250-251, 2000.

ALEXANDER JS, BLASCHUK OW, HASELTON FR. An N-cadherin-like protein contributes to solute barrier maintenance in cultured endothelium. **J Cell Physiol**, v.156, p.610-618, 1993.

ALEXANDER JW. Bacterial translocation during enteral and parenteral nutrition. **Proc Nutr Soc**, v.57, p.389-393, 1998.

ALVAREZ JO, SALAZAR-LINDO E, KOHATSU J, MIARANDA P, STEPHENSEN CB. Urinary excretion of retinol in children with acute diarrhea. **Am J Clin Nutr**, v.61, p.1273-1276, 1995.

AMEDEE-MANESME O, ANDERSON D, OLSON JA. Relation of the relative dose response to liver concentrations of vitamin A in generally well-nourished surgical patients. **Am J Clin Nutr**, v.39, p.898-902, 1984.

ANDERSON JM, VAN ITALLIE M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of regulation of paracelular permeability. **American J Physiol**, v.269, p.G467-G475, 1995.

ANGRES B, BARTH A, NELSON WJ. Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated cell adhesion using a quantitiative adhesion assay. **J Cell Biol,** v.134, p.549-557, 1996.

ANGST BD, MARCOZZI C, MAGEE AI. The cadherin super-family: diversity in form and function. **J Cell Sci,** v.114, p.629-641, 2001.

ARMSTRONG RB, ASHENFELTER KO, ECKHOFF C, LEVIN AA, SHAPIRO SS. **General and reproductive toxicology of retinoids.** In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine. 2 ed. New York: Raven Press, p.545-572, 1994.

BAHL R, BHANDARI N, HAMBIDGE KM, BHAN MK. Plasma zinc as a predictor of diarrheal and respiratory morbidity in children in an urban slum setting. **Am J Clin Nutr**, v.68 (Suppl 2), p.S414-S417, 1998.

BALTES S, NAU H, LAMPEN A. All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions. **Develop Growth Differ,** v.46(6), p.503-514, 2004.

BANKS RE, FORBES MA, STORR M, HIGGINSON J, THOMPSON D, RAYNES J, ILLINGWORTH JM, PERREN TJ, SELBY PJ, WHICHER JT. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. **Clin Exp Immunol**, v.102, p.217-223, 1995.

BAO Y, SILVA TMJ, GUERRANT RL, LIMA AAM, FOX JW. Direct analysis of mannitol, lactulose, and glucose in urine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection. Clinical evaluation of intestinal permeability in human immunodeficiency virus infection. **J Chromatogr B Biomed Appl,** v.685, p.105-112, 1996.

BAQUI AH, ZAMAN K, PERSSON LA, EL ARIFEEN S, YUNUS M, BEQUM N, BLACK RE. Simultaneous weekly supplementation of iron and zinc is associated with lower morbidity due to diarrhea and acute lower respiratory infection in Bangladeshi infants. **J Nutr,** v.133, p.4150-4157, 2003.

BARBOZA JR MS, SILVA TMJ, GUERRANT RL, LIMA AAM. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Br J Med Biol Res,** v.32, p.1499-1504, 1999.

BASU TK, DICKERSON JWT. **Vitamin A** In: Vitamins in Human Health and Disease. Wallingford, UK: CAB International, p.148-177, 1996.

BEATON GH, MARTORELL R, ARONSON KJ, EDMONSTON B, MCCABE G, ROSS AC, HARVEY B. **Effectiveness of vitamin A supplementation in the control of young child morbidity and mortality in developing countries.** (Discussion paper no. 13). Geneva: United Nations Administrative Committee on Coordination/ Subcommitte on Nutrition State of the Art Series Nutrition Policy,1993.

BEETHAM R, DAWNAY A, LANDON J, CATTELL WR. A radioimmunoassay for retinol-binding protein in serum and urine. **Clin Chem,** v.31, p.1364-1367, 1985.

BEHRENS RH, LUNN PG, NORTHROP CA, HANLON PW, NEALE G. Factors affecting the integrity of the intestinal mucosa of Gambian children. **Am J Clin Nutr** , v.45, p.1433-1441, 1987.

BEISEL WR. Infection-induced depression of serum retinol – a component of the acute phase response or a consequence? **Am J Clin Nutr,** v.68, p.993-994, 1998.

BEISEL WR. Trace elements in infectious processes. **Med Clin North Am,** v.60, p.831-849, 1976.

BENDICH A, LANGSETHE L. Safety of vitamin A. **Am J Clin Nutr,** v.49, p.358-371, 1989.

BERG RD. **Translocation of indogenous bacteria from the intestinal tract**. In: Eentges DJ, ed. Human intestinal microflora in health and disease. New York: Academic Press, p.333-352, 1983.

BERNARD AM, MOREAU D, LAUWERYS RR. Latex immunoassay of retinol-binding protein. **Clin Chem**, v.28, p.167-1171, 1982.

BEYZADEOGLU M, BALKAN M, DEMIRIZ M, TIBET H, DIRICAN B, ONER K, PAK Y. Protective effect of vitamin A on acute radiation injury in the small intestine. **Radiat Med,** v.15, p.1-5, 1997.

BIESALSKI HK, NOHR D. Importance of vitamin A for lung function and development. **Mol Aspects Med,** v.24, p.431-440, 2003.

BLAKE CC, GEISOW MJ, OATELY SJ, RERAT B, RERAT C. Structure of prealbumin: secundary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 A. **J Mol Biol,** v.121, p.339-356, 1978.

BLANER WS, OSLON JA. **Retinol and retinoic acid metabolism**. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The Retinoids: biology, chemistry, and medicine. 2nd ed. New York: Raven Press, p.229-256, 1994.

BLANER WS. Radioimmunoassays for retinol-biding protein, cellular retinol-binding protein, and cellular retinoic acid-binding protein. **Methods Enzymol,** v.189, p.270-281, 1990.

BLANER WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. **Endocr Rev,** v.10, p.308-316, 1989.

BLOEM MW, WEDEL M, EGGER RJ, SPEEK AJ, SCHRIJVER J, SAOWAKONTHA S, SCHREURS WHP. Mild vitamin A deficiency and risk of respiratory tract diseases and diarrhea in preschool and school children in northeastern Thailand. **Am J Epidemiol**, v.131, p.332-339, 1990.

BLOMHOFF R, GREEN MH, GREEN JB, BERG T, NORUM KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport and storage. **Physiol Rev,** v.71, p.951-990, 1991.

BLOMHOFF R. **Overview of vitamin A metabolism and function.** In Vitamin A in Health and Disease (Blomhoff R, editor) New York: Marcel Dekker, p.1-35, 1994 (a).

BLOMHOFF R. Transport and metabolism of vitamin A. **Nutr Rev,** v.52, p. 13S - 23S, 1994 (b).

BONET ML, RIBOT J, FELIPE F, PALOU A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. **Cell Mol Life Sci**, v.60, p.1311-1321, 2003.

BOOTH IW, AUKETT MA. Iron deficiency anemia in infancy and early childhood. **Arch Dis Child**, v.76, p.549-53, 1997.

BRIVIBA K, SCHNABELE K, SCHWERTLE E, BLOCKHAUS M, RECHKEMMER G. Beta-carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis. **Biol Chem**, v.382(12), p.1663-1668, 2001.

BROWN KH, BLACK RE, BECKER S, NAHAR S, SAWYER J. Consumption of foods and nutrients by weanlings in rural Bangladesh. **Am J Clin Nutr,** v.36, p.878-889, 1982.

BROWN KH, LANATA CF, YUEN ML, PEERSON JM, BUTRON B, LONNERDAL B. Potential magnitude of the misclassification of a population's trace element status due to infection: example from a survey of young Peruvian children. **Am J Clin Nutr,** v.58, p.549-554, 1993.

CABALLERO E, RIVERA G, NELSON DP. Encuesta nacional sobre la vitamina A en Panamá. **Bol Ofic Sanit Panam**, v.120, p.181-188, 1996.

CALVIN J, NEALE G, FOTHERBY KJ, PRICE CP. The relative merits of acute phase proteins in the recognition of inflammatory conditions. **Ann Clin Biochem,** v.25, p.60-66, 1988.

CARDOSO WV. Molecular regulation of lung development. **Annu Rev Physiol**, v.63, p.471-494, 2001.

CASTRO MX, SOARES AM, FONSECA W, REY LC, GUERRANT RL, LIMA AA. Common infectious diseases and skin test energy in children from an urban slum in northeast Brazil. **Braz J Infec Dis,** v.7(6), p.387-394, 2003.

CEREIJIDO M, SHOSHANI L, CONTRERAS RG. Molecular Physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.279, p.G477-G482, 2000.

CEREIJIDO M, VALDES J, SHOSHANI L, CONTRERAS RG. Role of tight junctions in stablishing and mantaining cell polarity. **Annu Rev Physiol,** v.60, p.161-177, 1998.

CHAMBON P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J,** v.10, p.940-954, 1996.

CHAUHAN MJ, KANSAL VK. Effect of vitamin A deficiency on rat intestinal digestive e absorptive functions. **Indian J Med Res**, v.90, p.448-452, 1989.

CHEN LC, SCRIMSHAW NS, eds. **Diarrhea and malnutrition: interactions, mechanisms, and interventions.** New York, NY: Plenum Press, p.3-19, 1983.

CHEN P, SOARES AM, LIMA AAM, GAMBLE MV, SCHORLING JB, CONWAY M, BARRET LJ, BLANER WS, GUERRANT RL. Association of vitamin A and zinc status with altered intestinal permeability: analyses of cohort data from Northeastern Brazil. **J Health Popul Nutr,** v.21(4), p.309-315, 2003.

CLAGETT-DAME M, DELUCA HF. The role of vitaminA in mammalian reproduction and embryonic development. **Annu Rev Nutr**, v. 22, p.347-381, 2002.

COLBERT MC. Retinoids and cardiovascular development defects. **Cardiovasc Toxicol,** v.2, p.25-39, 2002.

COLLARES-BUZATO CB, MCEWAN GT, JEPSON MA, SIMMONS NL, HIRSTBH. Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca2+ in cultured epithelia. **Biochim Biophys Acta,** v.1222, p.147-158, 1994.

COUTSOUDIS A, COOVADIA HM, BROUGHTON M, SALISBURY RT, ELSON I. Micronutrient utilisation during measles treated with vitamin A or placebo. **Inter J Vitam Nutr Res**, v.61, p.199-204, 1991.

DAVIS JT, ONG DE. Synthesis and secretion of retinol-binding protein by cultured rat Sertoli cells. **Biol Reprod,** v.47, p.528-533, 1992.

DE ANDRADA I, CASTILLO M, WALKER T. Psychomotor development and behavior in iron deficient anemic infants. **Nutr Rev**, v. 55, p.125 -132, 1997.

DEBIER C, LARONDELLE Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. **Br J Nutr,** v.93, p.153-174, 2005.

DEITCH EA. Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury. **Surgery** , v.107, p.411-416, 1990.

DEWAN V, PATWARI AK, JAIN M, DEWAN N. A randomized controlled trial of vitamina A supplementation in acute diarrhea. **Indian Pediatrics,** v.32, p.21-25, 1995.

DOBBING J. Boyd Orr memorial lecture. Early nutrition and later achievement. **Proc Nutr Sci,** v.49, p.103-118, 1990.

DONNEN PH, DRAMAIX M, BRASSEUR D, BITWE R, BISIMWA G, HENNART PH. The molar ratio of serum retinol-binding protein (RBP) to

transthyretin (TTR) is not useful to assess vitamin A status during infection in hospitalized children. **Eur J Clin Nutr**, v.55, p.1043-1047, 2001.

DONNEN PH, DRAMAIX M, BRASSEUR D, BITWE R, VERTOGEN F, HENNART PH. Randomized placebo-controlled clinical trial of the effect of a single high-dose or daily low-doses of vitamin A supplementation on morbidity of hospitalized malnourished children. **Am J Clin Nutr**, v.68, p.1254-1260, 1998.

DUGGAN C, GANNON J, WALKER WA. Protective nutrients and functional foods for gastrointestinal tract. **Am J Clin Nutr,** v.75, p.789-808, 2002.

DUITSMAN PK, COOK LR, TANUMIHARDJO SA, OLSON JA. Vitamin A inadequacy in socioeconomically disadvantaged pregnant Iowan women as assessed by the modified relative dose response (MRDR) test. **Nutr Res,** v.15, p.1263-1276, 1995.

DURING A, HARRISON EH. An in vitro model to study the intestinal absorption of carotenoids. **Food Res Internatiol,** v.38, p.1001-1008, 2005.

DURING A, HARRISON EH. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Arch Biochem Biophys,** v.430, p.77-88, 2004.

EPISKOPOU V, MAEDA S, NISHIGUCHI S, SHIMADA K, GAITANARIS GA, GOTTESMAN ME, ROBERTSON EJ. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.90, p.2375-2379, 1993.

ESKILD W, HANSSON V. **Vitamin A functions in the reproductive organs**. In Vitamin A in Health and Disease (Blomhoff R, editor). New York: Marcel Dekker, p.531-561, 1994.

FERGUSON RN, EDELHOCH H, SAROFF HA, ROBBINS J, CAHNNANN HJ. Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin. Preparation of tritium-labeled 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid. **Biochemistry,** v.14, p.282-289, 1975.

FILTEAU SM, MORRIS SS, ABBOTT RA, TOMKINS AM, KIRKWOOD BR, ARTHUR P, ROSS DA, GYAPONG JO, RAYNES JG. Influence of morbity on serum retinol of children in a community-based study in Northern Ghana. **Am J Clin Nutr**, v.58, p.192-197, 1993.

FILTEAU SM, ROLLINS NC, COUTSOUDIS A, SULLIVAN KR, WILLUMSEN JF, TOMKINS AM. The effect of antenatal vitamin A and beta-carotene supplementation on gut integrity of infants of HIV-infected South African women. **J Pediatr Gastroenterol Nutr,** v.32(4), p.465-470, 2001.

FILTEAU SM, WILLUMSEN JF, SULLIVAN K, GAMBLE MV. Use of the retinol-binding protein: transthyretin ratio for assessment of vitamin A status during the acute-phase response. **Br J Nutr,** v. 83, p.513-520, 2000.

FLECK A, MYERS MA. **Diagnostic and prognostic significance of the acute-phase proteins.** In: The Acute-Phase Response to Injury and Infection (Gordon AH, Koj A, eds). Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands, p.249-271, 1985.

FLEMING SC, KAPEMBWA MS, LAKER MF, LEVIN GE, GRIFFIN GE. Rapid and simultaneous determination of lactulose and manitol in urine, by HPLC

with pulsed amperometric detection, for use in studies of intestinal permeability. **Clinical Chemistry**, v.36, p.797-799, 1990.

FORD RPK, MENZIES IS, PHILLIPIS AD, WALKER-SMITH JA, TURNER MW. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. **J Pediatr Gastroenterol Nutr,** v.4, p.568-574, 1985.

FRIIS H, NDHLOVU P, KAONDERA K, SANDSTROM B, MICHAELSEN KF, VENNERVALD BJ, CHRISTENSEN NO. Serum concentration of micronutrients in relation to schistosomiasia and indicators of infection: a cross-sectional study among rural Zimbabwean school children. **Eur J Clin Nutr,** v.50, p.386-391, 1996.

FUJIMORI T, TAKEICHI M. Disruption of epithelial cell-cell adhesion by exogenous expression of a mutated nonfunctional N-cadherin. **Mol Biol Cell** v.4, p.37-47, 1993.

FUKUSHIMA K, SASAKI I, TAKAHASHI K, NAITO H, OGAWA H, SATO S, MATSUNO S. Lipopolysaccharide exhibits synergistic enhancement of butyrate-induced and retinoic acid-mediated alkaline phosphatase activity on small intestinal epithelial cell line, IEC-6. **Digestion,** v.59, p.683-688, 1998.

FURR HC, AMEDEE-MANESME O, CLIFFORD AJ, BERGEN HR, JONES AD, ANDERSON DP, OLSON JA. Vitamin A concentrations in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans. **Am J Clin Nutr,** v.49, p.713-716, 1989.

FURR HC, BARUA AB, OLSON JA. **Analytical methods**. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The retinoids: biology, chemistry and medicine. 2nd ed. New York: Raven Press, p.179-210, 1994.

GAMBLE MV, BLANER WS. **Factors affecting blood levels of vitamin A**. Chapter 1. In: Livrea MA, ed., Vitamin A and Retinoids: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications (MCBU). Basel, Switzerland: Birkhauser Verlog, p.1-16, 1999.

GAMBLE MV, RAMAKRISHNAN R, PALAFOX NA, BRIAND K, BERGLUND L, BLANER WS. Retinol binding protein as a surrogate measure for serum retinol: studies in vitamin A-deficient children from the Republic of the Marshall Islands. **Am J Clin Nutr**, v.73, p.594-601, 2001.

GIBSON RS. **Principles of nutritional Assessment**. New York: Oxford University Press, 1990.

GIGUERE V, ONG ES, SEGUL P, EVANS RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. **Nature,** v.330, p.624-629, 1987.

GILBERT C, FOSTER A. Childhood blidness in the context of VISION 2020 – the right to sight. **Bull World Health Organ,** v.79, p.227-232, 2001.

GOODMAN DS, BLANER WS. **Biosynthesis, absorption, and hepatic metabolism of retinol.** In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The Retinoids. Vol 2 New York: Academic Press, p.1-39, 1984.

GOODMAN DS, HUANG HS. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. **Science,** v.149, p.879-880, 1965.

GOODMAN DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. **N Engl J Med, v.**310, p.1023-1031, 1984.

GOODMAN T, DALMIYA N, DE BENOIST B, SCHULTINK W. Polio as platform: using national immunization days to deliver vitamin A supplements. **Bull World Health Organ,** v.78, p.305-314, 2000.

GRAHAM GG, CREED HM, MACLEAN WC JR, RABOLD J, MELLITS ED. Determinants of growth among poor children: effect of expenditure for food on nutrient sources. **Am J Clin Nutr,** v.34, p.562-567, 1981.

GROTTO I, MIMOUNI M, GDALEVICH M, MINOUNI D. Vitamin A supplementation and childhood morbidity from diarrhea and respiratory infections: a meta-analysis. **J Pediatr**, v.142, p.297-304, 2003.

GUDAS LJ, SPORN MB, ROBERTS AB. **Cellular biology and biochemistry of the retinoids.** In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The retinoids: biology, chemistry and medicine. New York: Raven Press, p.443-520, 1994.

GUERRANT DI, MOORE SR, LIMA AA, PATRICK PD, SCHORLING JB, GUERRANT RL. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in Northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg,** v.61, p.707-713, 1999.

GUERRANT RL, LIMA AA, DAVIDSON F. Micronutrients and infection: interactions and implications with enteric and other infections and future priorities. **J Infect Dis**, v.182 (Suppl 1), p.S134-S138, 2000.

GUERRANT RL, SCHORLING JB, MCAULIFFE JF, DESOUZA MA. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am J Trop Med Hyg,** v.47 (suppl), p.28-35, 1992.

GUERRANT RL. Why America must care about tropical medicine: threats to global health and security from tropical infectious diseases. **Am J Trop Med Hyg,** v.59, p.3-16, 1998.

GULAMALI F, KEEGAN TE, NUMEROF B, CHRENKA B, WIRTH F, PLEBAN PA. Kinetic nephelometric determination of trasnthyretin and retinol-binding protein in neonatal serum**. Clin Chim Acta**, v.147, p197-204 ,1985.

GUMBINER B, STEVENSON B, GRIMALDI A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. **J Cell Biol**, v.107, p.1575-1587, 1988.

GUMBINER BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell,** v.84, p.345-357, 1996.

HABICHT JP, MEYERS LD, BROWNIE C. Indicators for identifying and couting the improperly nourished. **Am J Clin Nutr,** v.35 (Suppl 5), p.S1241-S1254, 1982.

HANBY AM, CHINERY R, POULSOM R, PLAYFORD RJ, PIGNATELLI M. Down regulation of E-cadherin in the reparative epitheium of the human gastrointestinal tract. **Am L Pathol,** v.148, p.723-729, 1996.

HERBERT J, WILCOX J, PHAM KT, FREMEAU RT, ZEVIANI M, DWORK A, SOPRANO DA, MAKOVER A, GOODMAN DS, ZIMMERMAN EA, BOBERTS JL, SCHON EA. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Wein Mitchell award**. Neurology,** v.36, p.900-911, 1986.

HOLLAND RE, PFEIFFER CJ, BRUNS NJ, WEBB KE JR. Morphologic alterations in small intestinal epithelium of lambs fed vitamin A-depleted diet. **Dig Dis Sci**, v.38, p.333-343, 1993.

HUBBLE D, LITTLEJOHN S. D-Xylose excretion test in coeliac disease in childhood. **Archives of Disease in Childhood**, v.38, p.476-480, 1963.

INGENBLEEK Y, VAN DEN SCHRIECK HG, DE NAYER P, DE VISSCHER M. The role of retinol-binding protein in protein-calorie malnutrition. **Metabolism,** v.24, p.633-641, 1975.

ISHIJIMA K, SANDO I. Multiple temporal bone anomalies in isotretinoin syndrome: a temporal bone histopathologic case report. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.125, p.1385-1388, 1999.

KANAI M, RAZ A, GOODMAN DS. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. **J Clin Invest,** v.47, p.2025-2044, 1968.

KANAKOUDI F, DROSSOU V, TZIMOULI V, DIAMANTI E, KONSTANTINDIS T, GERMENIS A, KROMENOPOULOS G. Serum concentrations of 10 acute-phase proteins in healthy term and preterm infants from birth to age 6 months. **Clin Chem,** v.41, p.605-608, 1995.

KANDA Y, GOODMAN DS, CANFIELD RE, MORGAN FJ. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. **J Biol Chem**, v.249, p.6796-6805, 1974.

KAPIL U, BHAVNA M. Adverse effects of poor micronutrients status during childhood and adolescence. **Nutr Rev,** v.60 (Suppl 2), p.S84-S90, 2002.

KELLO AB, GILBERT C. Causes of severe visual impairment and blidness in children in schools for the blind in the Ethiopia. **Br J Ophthalmol,** v.87, p.526-530, 2003.

KHACHIK F, BEECHER GR, SMITH JC JR. Lutein, Lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. **J Cell Biochem Suppl,** v.22, p.236-246, 1995.

KHANDAIT DW, VASUDEO ND, ZODPEY SP, KUMBHALKAR DT. Risk factors for subclinical vitamin A deficiency in children under the age of 6 years. **J Trop Pediatr,** v.46, p.239-241, 2000.

KLAASSEN I, BRAAKHUIS BJ. Anticancer activity and mechanism of action of retinoids in oral and pharyngeal cancer. **Oral Oncol,** v.38(6), p.532-542, Review, 2002.

KLASING KC. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. **J Nutr,** v.118, p.1436-1446, 1988.

KUBOTA H, CHIBA H, TAKAKUWA Y, OSANAI M, TOBIOKA H, KOHAMA G, MORI M, SAWADA N. Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. **Exp Cell Res,** v.263, p.163-172, 2001.

LAKER MF, MENZIES IS. Increase in human intestinal permeability following ingestion of hypertonic solutions. **J Physiol,** v.265, p.881-894, 1977.

LAMABADUSURIYA SP, PACKER S, HARRIES JT. Limitations of the xylose tolerance test as a screening procedure in childhood coeliac disease. **Archives of Disease in Childhood,** v.50, p.34-39, 1975.

LIMA AAM, MOORE SR, BARBOZA MS JR, SOARES AM, SCHLEUPNER MA, NEWMAN RD, SEARS CL, NATARO JP, FEDORKO DP, WUHIBT, SCHORLING JB, GUERRANT RL. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J Infect Dis,** v.181, p.1643-51, 2000.

LIMA AAM, SILVA TMJ, GIFONI AMR, BARRET LJ, MCAULIFFE IT, BAO Y, FOX JW, FEDORKO DP, GUERRANT RL. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am J Gastroenterol,** v.92, p.1861-1866, 1997.

LIVERA G, ROUILLER-FABRE V, PAIRAULT C, LEVACHER C, HABERT R. Regulation and pertubation of testicular functions by vitamin A. **Reproduction,** v.124, p.173-180, 2002.

LOERCH JD, UNDERWOOD BA, LEWIS KC. Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as an indicator of hepatic vitamin A reserves in rats. **J Nutrv,** v.109(5), p.778-786, 1979.

LONG KZ, MONTOYA Y, HERTZMARK E, SANTOS JI, ROSADO J. A double-blind, randomized, clinical trial of the effect of vitamin A and zinc supplementation on diarrheal disease and respiratory tract infections in children in Mexico City, Mexico. **Am J Clin Nutr**, v.83, p.693-700, 2006.

LUNN PG, NORTHROP CA, NORTHROP AJ. Automated enzymatic assays for the determination of intestinal permeability probes in urine. 2. Mannitol. **Clinica Chimica Acta,** v.183, p.163-170, 1989.

LUNN PG, NORTHROP-CLEWES CA, DOWNES RM. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. **Lancet,** v.338, p.907-910, 1991(b).

LUNN PG, NORTHROP-CLEWES CA, DOWNES RM. Recent developments in the nutritional management of diarrhea. 2. Chronic diarrhea and malnutrition in The Gambia: studies on intestinal permeability. **Trans R Soci Trop Med Hyg**, v.85, p.8-11, 1991(a).

MADARA JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. **Annu Rev Physiol**, v.60, p.143-159, 1998.

MADEN M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development**. In Rev Cytol,** v.209, p.1-77, 2001.

MALVY DJ, POVEDA JD, DEBRUYNE M, BURTSCHY B, DOSTALOVA L, AMEDEE-MANESME O. Immunonephelometry and radial immunodiffusion compared for mesuring serum retinol-binding protein. **Eur J Clin Chem Clin Biochem,** v.31, p.47-48, 1993.

MAN Y, HART VJ, RING CJA, SANJAR S, WEST MR. Loss of epithelial integrity resulting from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection. **Am J Respir Cell Mol Biol,** v.23, p.610-617, 2000.

MANGELS AR, HOLDEN JM, BEECHER GR, FORMAN MR, LANZA E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **J Am Diet Assoc,** v.93 (3), p.284-296, 1993.

MANGELSDORF DM, UMESONO K, EVANS RM. **The retinoid receptors**. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The retinoids: biology, chemistry and medicine. New York: Raven Press, p.319-350, 1994.

MARILL J, IDRES N, CAPRON CC, NGUYEN E, CHABOT GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. **Curr Drug Metab**, v.4, p.1-10, 2003.

MASSARO GD, MASSARO D, CHAN WY, CLERCH LB, GHYSELINCK N, CHAMBON P, CHANDRARATNA R. Retinoic acid receptor-beta: an endogenous inhibtor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. **Physiol Genomics**, v.4, p.51-57, 2000.

MATA L. Diarrheal disease as a cause of malnutrition. **Am J Trop Med Hyg**, v.47, p.16-27, 1992.

MCAULIFFE JF, SHIELDS DS, DE SOUZA MA, SAKELL J, SCHORLING J, GUERRANT RL. Prolonged and recurring diarrhea in the northeast of Brazil: examination of cases from a community-based study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr,** v.5, p.902-906, 1986.

MCCORMACK SA, VIAR MJ, TAGUE L, JOHNSON LR. Altered distribution of the nuclear receptor RAR beta accompanies proliferation and differentiation changes caused by retinoic acid in Caco-2 cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim,** v.32, p.53-61, 1996.

MCCULLOUGH FSW, NORTHROP-CLEWES CA, THURNHAM DI. The effect of vitamin A on epithelial integrity**. Proc Nutr Soc,** v.58, p.289-293, 1999.

MCLAREN DS. **Vitamin A deficiency and toxicity**. In Nutrition Review's Present Knowledge in Nutrition. Washington, DC: The Nutrition Foudation, p.192-208, 1984.

MELHUS H, NILSSON T, PETERSON PA, RASK L. Retinol-binding protein and transthyretin expressed in HeLa cells from a complex in the endoplasmic reticulum in both the absence and the presence of retinol. **Exp Cell Res**, v.197, p.119-124, 1991.

MENDELSOHN C, BATOURINA E, FUNG S, GILBERT T, DODD J. Stroma cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. **Development**, v.126, p.1139-1148, 1999.

MENDELSON CR. Role od transcription factors in foetal lung development and surfactant protein gene expression. **Annu Rev Physiol**, v.62, p.875-915, 2000.

MENZIES IS. **Transmucosal passage of inert molecules in health and disease.** In: Skadhauge E & Heintze K, eds. Intestinal absorption and secretion. Falk Symposium 36. Lancaster: MTP Press Ltda, p.527-543, 1983.

MILTON RC, REDDY V, NAIDU AN. Mild vitamin A deficiency and chilhood morbidity – an Indian experience. **Am J Clin Nutr,** v.46, p.827-829, 1987.

MITIC LL, ANDERSON JM. Molecular architecture of tight junctions. **Annu Rev Physiol**, v.60, p.121-142, 1998.

MITRA AK, ALVAREZ JO, GUAY-WOODFORD L, FUCHS GL, WAHED MA, STEPHENSEN CB. Urinary retinol excretion and kidney function in children with shigellosis. **Am J Clin Nutr,** v.68, p.1095-1103, 1998.

MIYACHI Y, MIZUCHI A, SATO K. Preparation of iodinated cyclic GMP derivatives by a lactoperoxidase method. **Anal Biochem,** v.77(2), p.429-35, 1977.

MOLLA AM, MOLLA A, SARKER SA, RAHAMAN MM. **Food intake during and after recovery from diarrhea in children**. Chen LC, Scrimshaw NS, eds. Diarrhea and Malnutrition: Interactions, Mechanisms and Interventions. New York: Plenum Press, p.155-160, 1983.

MONACO HL, RIZZI M, CODA A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-biding protein. **Science**, v.268, p.1039-1041, 1995.

MONTEIRO CA. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. **Estudos Avançados**, v.17(48), p.7-20, 2003.

MOORE SR, LIMA AA, SCHORLING JB, BARBOZA MS JR., SOARES AM, GUERRANT RL. Changes over time in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown, 1989 to 1996. **Int J Infect Dis,** v.4, p.179-186, 2000.

MORA JO, GUERI M, MORA OL. Vitamin A deficiency in Latin America and the Caribbean: an overview. **Rev Panam Salud Publica,** v.4(3), p.178-186, 1998.

NAGIRA M, TOMITA M, MIZUNO S, KUMATA M, AYABE T, HAYASHI M. Ischemia/reperfusion injury in the monolayers of human intestinal epithelial cell line Caco-2 and its recovery by antioxidants. **Drug Metab Pharmacokinet** v.21(3), 230-237, 2006.

NALIN DR, RUSSEL R. Vitamin A, xerophthalmia and diarrhea. **Lancet**, v.2, p.1411, 1980.

NAPOLI JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. **Biochim Biophys Acta,** v.1440, p.139-162, 1999.

NAU H, BLANNER WJ (eds). **The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action.** New York: Springer, 1999.

NEWMAN RD, SEARS CL, MOORE RD, NATARO JP, WUHIB T, AGNEW DA, GUERRANT RL, LIMA AA. Longitudinal study of Cryptosporidium infection in children in northeastern Brazil**. J Infect Dis,** v.180, p.167-175, 1999.

NORTHROP CA, LUNN PG, BEHRENS RH. Automated enzymatic assays for the determination of intestinal permeability probes in urine. 1. Lactulose and lactose. **Clinica Chimica Acta,** v.187, p.163-170, 1990.

NOY N, XU ZJ. Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanisms of uptake by cells. **Biochemistry,** v.29, p.3878-3883, 1990.

NUSRAT A, PARKOS CA, VRKADE P, FOLEY CS, LIANG TW, INNIS-WHITEHOUSE EASTBURN KK, MADARA JL. Tight junctions are membrane microdomains. **J Cell Sci**, v.113, p.1771-1781, 2000.

OLSON JA. **Carotenoids**. In Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC (Eds), Modern human nutrition in health and disease (9^{th} ed). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.

OLSON JA, HAYAISHI O. The enzymatic cleavage of β-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. **Proc Natl Acad Sci USA,** v.54, p.364-1370, 1965.

OLSON JA. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β-carotene into vitamin A. **J Nutr,** v.119, p.105-108, 1989.

OLSON JA. **Vitamin A**. In Nutrition Review's Present Knowledge in Nutrition. Washington, DC: The Nutrition Foundation, p. 177-191, 1984.

OLSON JA. **Vitamin A**. In: Machlin LJ (ed) Handbook of vitamins 2nd edn. Dekker, New York, p.1-57, 1990.

ONG DE. **Absorption of vitamin A in Health and Disease** (Blomhoff R, editor) New York: Marcel Dekker, p. 37-72, 1994.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Prevención y tratamiento de la carencia de vitamina A y de la xeroftalmia.** Ginebra: OMS (Série Informes Técnicos, 672); 1982.

PAIK J, VOGEL S, QUADRO L, PIANTEDOSI R, GOTTESMAN M, LAI K, HAMBERGER L, VIEIRA MM, BLANER WS. Vitamin A: Overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. **J Nutr**, v.134, p.276S-280S, 2004.

PAIVA AA, RONDÓ PHC, GONÇALVES-CARVALHO CMR, ILLISON VK, PEREIRA JA, VAZ-DE-LIMA LRA, OLIVEIRA CA, UEDA M, BERGAMASCHI DP. Prevalência de deficiência de vitamina A e fatores associados em pré-escolares de Teresina, Piauí, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v.22(9), p.1979-1987, 2006.

PARACHA PI, JAMIL A, NORTHROP-CLEVES CA, THURNHAM DI. Interpretation of vitamin A status in apparently healthy Pakistani children by using markers of subclinical infection. **Am J Clin Nutr**, v.72, p.1164-1169, 2000.

PARK CK, ISHIMI Y, OHMURA M, YAMAGUCHI M, IKEGAMI S. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. **J Nutr Sci Vitaminol** (Tokyo), v.43(3), p.281-286, 1997.

PARKER RS. Carotenoids in human blood and tissues. **J Nutr,** v.119(1), p.101-104, 1989.

PARVIAINEN MT, YLITALO P. Immunonephelometric determination of retinol-binding protein in serum and urine. **Clin Chem**, v.29, p.853-856, 1983.

PEARSON ADJ, EASTHAM EJ, LAKER M, CRAFT AW, NELSON R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. **BMJ**, v.285, p.20-23, 1982.

PEPE IM. Rhodopsin and phototransduction. **J Photochem Photobiol B**, v.48, p.1-10, 1999.

PIRES ALG, DA SILVEIRA TR, SCHOLL JG. Relationship between nutritional status and histologic findings in small bowel mucosa of children presenting with diarrhea of more than 14 days' duration. **J Trop Pediatr,** v45, p.302-304, 1999.

PLATEROTI M, SAMBUY Y, NOBILI F, BISES G, PEROZZI G. Expression of epithelial markers and retinoid-binding proteins in retinol- or retinoic acid-treated intestinal cells in vitro. **Exp Cell Res,** v208, p.137-147, 1993.

QUADRO L, GAMBLE MV, VOGEL S, LIMA AAM, PIANTEDOSI R, MOORE SR, COLANTUONI V, GOTTESMAN ME, GUERRANT RL, BLANER WS. Retinol and retinol-binding protein: gut integrity and circulating immunoglobulins. **J Infect Dis,** v.182 (Suppl 1), p.97S -102S, 2000.

RAHAMAN MM, WAHED MA. **Direct nutrient loss and diarrhea**. Chen LC, Scrimshaw NS, eds. Diarrhea and Malnutrition. New York: Plenum Press, 1983.

RAMAKRISHNAN U, MARTORELL R. The role of Vitamin A in reducing child mortality and morbity and improving growth. **Salud Publica de Mexico,** v.40, p.189-198, 1998.

RAMALHO RA, FLORES H, SAUNDERS, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. **Rev Panam Salud Publica,** v.12, p.117-122, 2002.

RAMSDEN DB, PRINCE HP, BURR WA, BRADWELL AR, BLACK EG, EVANS AE, HOFFENBERG R. The inter-relationship of thyroid hormones, vitamin A and their binding proteins following acute stress. **Clin Endocrinol** (Oxf), v.8, p.109-122, 1978.

RAZ A, SHIRATORI T, GOODMAN DS. Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. **J Biol Chem,** v.245, p.1903-1912, 1970.

REDLICH CA, GRAUER JN, VAN BENNEKUM AM, CLEVER SL, PONN RB, BLANER WS. Characterization of carotenoid, vitamin A, and alpha-tocopherol levels in lung tissue and pulmonary macrophages. **Am J Respir Crit Care Medv,** v.154, p.1436-1443, 1996.

REXER BN, ZHENG WL, ONG DE. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. **Cancer Res,** v.61, p.7065-7070, 2001.

ROSALES FJ, CHAU KK, HASKELL MH, SHANKAR AH. Determination of a cut-off value for the molar ratio of retinol-binding protein to transthyretin (RBP:TTR) in Baangladeshi patients with low hepatic vitamin A stores. **J Nutr,** v.132 (12), p.3687-3692, 2002.

ROSALES FJ, RITTER SJ, ZOLFAGHARI R, SMITH JE, ROSS AC. Effects of acute inflammation on plasma retinol, retinol-binding protein, and its mRNA in the liver and kidneys of vitamin A-sufficient rats. **J Lipid Res,** v.37, p.962-971, 1996.

ROSALES FJ, ROSS AC. A low molar ratio of retinol binding protein to transthyretin indicates vitamin A deficiency during inflammation: Studies in rats and a posterior analysis of vitamin A-supplemented children with measles. **J Nutr,** v.128, p.1681-1687, 1998.

ROSS AC, GARDER EM. **The function of vitamin A in cellular growth and differentiation, and its roles during pregnancy and lactation.** In Nutrient Regulation during Pregnancy, Lactation, and Infant Growth (Allen L, King J, Lonnerdal B, editors). New York: Plenum Press, p.187-200, 1994.

ROSS AC, STEPHENSEN CB. Vitamin A and retinoids in antiviral responses. **FASEB J**, v.10, p.979-985, 1996.

ROSS AC. Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. **Proc Soc Exp Biol Med,** v.200, p.303-320, 1992.

ROSS SA, MCCAFFERY PJ, DRAGER U, DE LUCA LM. Retinoids in embryonal development. **Physiol Rev,** v.80, p.1021-1053, 2000.

RUIFROK AC, MASON KA, THAMES HD. Changes in clongen number and radiation sensitivity in mouse jejunal crypts after treatment with dimethylsulfoxide and retinoic acid. **Radiat Res,** v.145, p.740-745, 1996.

RUTTEN MJ, ITO S. Morphology and electrophysiology of guinea pig gastric mucosal repair in vitro. **Am J Physiol,** v.244, p.G171-G182, 1983.

SATOH H, ZHONG Y, ISOMURA H, SAITOH M, NOMOTO K, SAWADA N, MORI M. Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. **Exp Cell Res,** v.222, p.269-274, 1996.

SCHORLING JB, GUERRANT RL. Diarrhoea and catch-up growth. (Letter). **Lancet,** v.335, p.599-600, 1990.

SCHORLING JB, MCAULIFFE JF, DESOUZA MA, GUERRANT RL. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. **In J Epidemiol,** v.19, p.728-735, 1990.

SEMBA RD, YUNIAR Y, GAMBLE MV, NATADISASTRA G, MUHILAL. Assessment of vitamin A status of preschool children in Indonesia using plasma retinol-binding protein. **J Trop Pediatr,** v.48, p.84-87, 2002.

SEMBA RD. **Impact of vitamin A onimmunity and infection in developing countries.** In: Bendich A, Deckelbaum RJ, eds. Preventive Nutrition: The comprehensive guide for health professionals. Totowa, NJ: Humana Press Inc., p.337-350, 1997.

SEMBA RD. The role of vitamin A and related retinoids in immune function. **Nutr Rev,** v.56, p.38S-48S, 1998.

SHORE EM, NELSON WJ. Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. **J Biol Chem**, v.266, p.19672-19680, 1991.

SILEN W, ITO S. Mechanisms for rapid re-epithelization of the gastric mucosal surface. **Ann Rev Physiol**, v.47, p.217-219, 1985.

SILICIANO JD, GOODENOUGH DA. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. J Cell Biol 1988; 107: 2389-2399.
Sivaprasadarao A, Findlay JBC. The mechanism of uptake of retinol by plasma-membrane vesicles. **Biochem J,** v.255, p.571-579, 1988.

SMITH FR, GOODMAN DS, ZAKLAMA MS, GABR MK, EL MARAGHY S, PATWARDHAN VN. Serum vitamin A, retinol-biding protein, and prealbumin concentrations in protein-calorie malnutrition. A functional defect in hepatic retinol release. **Am J Clin Nutr,** v.26, p.973-981, 1973 a.

SMITH JE, MILCH PO, MUTO Y, GOODMAN DS. The plasma transport and metabolism of retinoic acid in the rat. **Biochem J,** v.132, p.821-827, 1973 b.

SOMMER A, DAVIDSON FR. Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords. **J Nutr,** v.132 (Suppl 9), p.S2845- S2850, 2002.

SOMMER A, KATZ J, TARWOTJO I. Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. **Am J Clin Nutr,** v.40, p.1090-1095, 1984.

SOMMER A. Xerophthalmia and vitamin A status. **Prog Retinal Eye Res**, v.17, p.9-31, 1998.

SOPRANO DR, BLANER WS. **Plasma Retinol-binding protein**. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. Raven Press, New York, NY, p.257-282, 1994.

SOPRANO DR, HERBERT J, SOPRANO KJ, SCHON EA, GOODMAN DS. Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. **J Biol Chem**, v.260, p.11793-11798, 1985.

STEPHENSEN CB, ALVAREZ JO, KOHATSU J, HARDMEIER R, KENNEDY JR JI, GAMMON JR RB. Vitamin A is excreted in the urine during acute infection. **Am J Clin Nutr,** v.60, p.388-392, 1994.

STEPHENSEN CB. When does hyporetinolemia mean vitamin A deficiency? **Am J Clin Nutr,** v.72, p.1-2, 2000.

STEPHENSON CB. Vitamin A infection and immune function. **Annu Rev Nutr,** v.21, p.167-192, 2001.

STOLTZFUS RJ, HAKIMI M, MILLER KW, RASMUSSEN KM, DAWIESAH S, HABICHT JP, DIBLEY MJ. High-dose vitamin A supplementation of breast-feeding Indonesian mothers: effects on the vitamin A status of mother and infant. **J Nutr**, v.123, p.666-675, 1993.

STOLTZFUS RJ, UDERWOOD BA. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin status of women and infants. **Bull World Health Organ**, v.73(5), p.703-711, 1995.

STUART J, WHICHER JT. Tests for detecting nd monitoring the acute phase response. **Arch Dis Child**, v.63(2), p.115-117, 1988.

SWARTZ-BASILE DA, RUBIN DC, LEVIN MS. Vitamin A status modulates intestinal adaptation after partial small bowel resection. **J Parenter Enteral Nutr**, v.24, p.81-88, 2000.

SWARTZ-BASILE DA, WANG L, TANG Y, PITT HA, RUBIN DC, LEVIN MS. Vitamin A deficiency inhibits intestinal adaptation by modulating apoptosis, proliferation, and enterocyte migration. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v.285(2), p.424G-432G, 2003.

TABONE MD, MUANZA K, LYAGOUBI M, JARDEL C, PIED S, AMEDEE-MANESME O. The role of interleukin-6 in vitamin A deficiency during Plasmodium falciparum malaria and possible consequences for vitamin A supplementation. **Immunology,** v.75, p.553-554, 1992.

TAKEICHI M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Annu Rev Biochem**, v.59, p.237-252, 1990.

THOMAS S, PRABHU R, BALASUBRAMANIAN KA. Retinoid metabolism in the rat small intestine. **Br J Nutr,** v.93, p.59-63, 2005.

THOMPSON JN, HOWELL JM, PITT GA. Vitamin A and reproduction in rats. **Proc R Soc Lond B Biol Sci,** v.159, p.510-535, 1963.

THURNHAM DI, MCCABE GP, NORTHROP-CLEWES CA, NESTEL P. A meta-analysis of data from 15 studies to quatify the effects of sub-clinical infection on plasma retinol. **J Nutr,** v.132 (Suppl), p.S2979 (abstract), 2002.

THURNHAM DI, NORTHROP-CLEWES A, MCCULLOUGH FSW, DAS BS, LUNN PG. Innate immunity, gut integrity, and vitamin A in Gambiam and Indian infants. **The Journal of Infectious Diseases,** v.182 (Suppl 1), p.S23-28, 2000.

THURNHAM DI. Impact of disease on markers of micronutrient status. **Proc Nutr Soc,** v.56, p.421-431, 1997.

TOBIOKA H, SAWADA N, ZHONG Y, MORI M. Enhanced paracellular barrier function of rat mesothelial cells partially protects against cancer cell penetration**. Br J Cancer,** v.74, p.439-445, 1996.

TOMKINS A. Malnutrition, morbity and mortality in children and their mothers. **Proc Nutr Soc,** v.59, p.135-146, 2000.

TRAVIS S, MENZIES I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clin Sci,** v.82, p.471-488, 1992.

TROXELL ML, GOPALAKRISHNAN S, MCCORMACK J, POTEAT BA, PENNINGTON J, GARRINGER SM, SCHNEEBERGER EE, NELSON WJ, MARRS JA. Inhibiting cadherin function by dominant mutant E-cadherin expression increases the extent of tight junction assembly. **J Cell Sci**, v.113, p.985-996, 2000.

UNDERWOOD BA, ARTHUR P. The contribution of vitamin A to public health. **FASEB J**, v.10, p.1040-1048, 1996.

UNDERWOOD BA. Vitamin A deficiency. **Bull World Health Organ**, v.76 (Suppl 2), p.S124-S125, 1998.

UNDERWOOD BA. **Vitamin A in animal and human nutrition**. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The retinoids. First ed. Orlando: Academic Press, p.282-377, 1984.

UNDERWOOD BA. **Vitamin A in human nutrition, public health considerations**. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The

Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. 2nd ed. New York: Raven Press, p. 211-228, 1994.

VAN JAARSVELD PP, EDELHOCH H, GOODMAN DS, ROBBINS J. The interaction of human plasma retinol-binding protein and prealbumin. **J Biol Chem,** v.248, p.4698-4705, 1973.

VARLAMOV O, FRICKER LD, FURUKAWA H, STEINER DF, LANGLEY SH, LEITER EH. β-Cell lines derived from transgenic Cpefat/Cpefat mice are defective in carboxypeptidase E and pro-insulin processing. **Endrocrinology,** p.138, p.4883-4892, 1997.

VENKITESWARAN K, XIAO K, SUMMERS S, CALKINS CC, VINCENT PA, PUMIGLIA K, KOWALCZYK AP. Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin and β-catenin. **Am J Physiol Cell Physiol,** v.283, p.C811-C821, 2002.

VILLAMOR E, FAWZI WW. Vitamin A supplementation: implications for morbity and mortality in children. **J Inf Dis,** v.182, p.S122-33, 2000.

VITAMIN A FIELD SUPPORT PROJECT (VITAL). **Tercer taller regional sobre dediciencias de vitamina A y otros micronutrients en América Latina y el Caribe (Recife, Brasil).** Arlington, Virginia: VITAL/US Agency for International Development; 1993.

VOGEL S, GAMBLE MV, BLANER WS. **Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids**, Chapter 2. In: Nau H, Blaner WS, eds. The Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 139. The Retinoids. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, p.31-96, 1999.

WALD G. The molecular basis of visual excitation. **Nature**, v.219, p.800-807, 1968.

WANG J, SWARTZ-BASILE DA, RUBIN DC, LEVIN MS. Retinoic acid stimulates early cellular proliferation in the adapting remnant rat small intestine after partial resection. **J Nutr,** v.127, p.1297-1303, 1997.

WARDEN RA, NOLTORP RS, FRANCIS JL, DUNKLEY PR, O'LOUGHLIN EV. Vitamin A deficiency exacerbates methotrexate-induced jejunal injury in rats. **J Nutr**, v.127, p.770-776, 1997.

WEI S, EPISKOPOU V, PIANTEDOSI R, MAEDA S, SHIMADA K, GOTTESMAN ME, BLANER WS. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. **J Biol Chem**, v.270, p.866-870, 1995.

WEST JR KP. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age**. J Nutr,** v.132 (Suppl), p.S2857-S2866, 2002.

WHO. **Chemical and physical characteristics**. In: The IARC Working Group on Vitamin A. The IARC handbooks of cancer prevention. Vol 3. Lyon, France: World Health Organization International Agency for Research on Cancer 1988.

WOLBACH SB, HOWE PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. **J Exp Med**, v.42, 753-777, 1925.

WOLF G, PHIL D. A historical note on the mode of administration of vitamin A for the cure of night blidness. **Am J Clin Nutr,** v.31, p.290-292, 1978.

WYATT J, VOGELSANG H, HUBL W, WALDHOER T, LOCHS H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. **Lancet,** v.341, p.1437-1439, 1993.

YAMAGUCHI M, NAKATOMO M, HONDA H, NAKAGAWA T, FUJITA H, NAKAMURA T, HIRAI H, NARUMIYA S, KAKISUKA A. Retardation of skeletal development and cervical abnormalities in transgenic mice expressing a dominant-negative retinoic acid receptor in chondrogenic cells. **Proc Natl Acad Sci USA,** v.95, p.7491-7496, 1998.

YAP A, BRIEHER WM, GUMBINER BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. **Annu Rev Cell Dev Biol,** v.13, p.119-146, 1997.

ZACHMAN RD. Role of vitamin A in lung development. **J Nutr**, v.125, p.1634S-1638S, 1995.

ZAIGER G, NUR T, BARSHACK I, BERKOVICH Z, GOLDBERG I, REIFEN R. Vitamin A exerts its activity at the transcriptional level in the small intestine. **Eur J Nutr,** v.43(5), p.259-266, 2004.

ZIEGLER TR, EVAN ME, FERNANDEZ-ESTIVARIZ C, JONES DP. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annu Rev Nutr**, v.23, p.229-231, 2003.

ZILE MH, CULLUM ME. The function of vitamin A: current concepts. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.172, p.139-152, 1983.

ZOVICH DC, OROLOGA A, OKUNO M, WONG YEN KONG L, TALMAGE DA, PIANTEDOSI R, GOODMAN DS, BLANER WS. Differentiation-

dependent expression of retinoid-binding proteins in BFC-1b adipocytes. **J Biol Chem,** v.267, p.13884-13889, 1992.

7. ANEXOS

7.1. LISTAGEM DOS RESULTADOS

7.1.1. ANEXO 1 - Concentração sanguínea de retinol (μM) para cada amostra das crianças da comunidade Parque Universitário

Amostra das crianças	Retinol (μM)	Amostra das crianças	Retinol (μM)	Amostra das crianças	Retinol (μM)
303/1	1,07	**112/1**	0,7	**330/2**	1,19
408/1	1,74	**222/1**	1,2	**322/2**	1,33
213/1	1,23	**102/1**	1,12	**120/3**	0,94
209/1	1,05	**227/2**	1,08	**354/1**	1,35
406/1	1,32	**116/1**	1,2	**354/2**	1,53
110/1	1,03	**138/1**	1,17	**276/1**	1,1
221/1	1,11	**207/1**	1,63	**409/2**	1,08
204/1	0,97	**104/1**	1,45	**154/1**	1,51
311/1	1,68	**142/2**	1,63	**139/2**	0,63
503/1	1,46	**211/1**	1,03	**423/1**	1,63
313/1	1,54	**144/1**	1,12	**513/2**	1,1
226/1	1,5	**229/1**	1,15	**526/2**	1,29
507/1	1,37	**216/1**	1,48	**526/3**	0,72
109/1	1,53	**227/1**	1,87	**157/1**	1,35
225/1	1,23	**336/2**	1,24	**155/1**	0,96
502/1	1,3	**336/3**	1,18	**424/1**	0,99
212/1	1,4	**110/3**	1,04	**425/1**	1,18
301/1	0,87	**102/2**	1,78	**339/2**	0,84
409/1	0,71	**229/2**	0,87	**347/1**	1,55
217/1	1,65	**250/2**	1,21	**347/2**	1,19
115/1	1,59	**250/3**	1,08	**353/1**	1,48
120/1	1,07	**236/2**	1,24	**358/1**	1,24
125/1	1,15	**236/3**	0,95	**342/1**	1,23
518/1	1,04	**268/1**	0,55	**342/2**	1,5
206/1	1,58	**269/1**	1,49	**356/1**	1,37
215/1	1,08	**120/2**	1,41	**422/1**	1,27

106/1	0,98	**232/2**	1,2	**422/2**	0,89
517/1	1,32	**232/3**	1,08	**422/3**	1,01
504/1	1,36	**335/2**	1,1	**534/1**	1,88
123/1	1,06	**355/1**	1,13	**353/2**	1,35
515/1	1,48	**355/2**	1,51	**530/1**	0,73
101/1	1,41	**327/2**	0,79	**530/2**	1,34
101/2	1,68	**408/3**	1,6	**530/3**	1,2
108/1	1,42	**409/3**	1,05	**347/3**	1,37

7.1.2. ANEXO 2 - Concentração sanguínea dos carotenóides (μM) em cada amostra das crianças da comunidade Parque Universitário

Amostra das crianças	Luteína/Zeaxantina (μM)	β-criptoxantina (μM)	Licopeno (μM)	β-caroteno (μM)
303/1	-0,05	0,01	0,00	0,00
408/1	-0,05	0,02	0,00	-0,01
213/1	-0,03	0,03	0,00	0,00
209/1	-0,03	0,00	0,00	0,00
406/1	-0,05	0,01	0,00	0,00
110/1	0,00	0,02	-0,08	0,00
221/1	-0,04	0,00	0,00	0,00
204/1	-0,06	0,01	0,00	0,00
311/1	-0,04	0,04	0,00	-0,01
503/1	-0,03	0,01	-0,02	0,00
313/1	-0,01	0,02	-0,06	0,00
226/1	-0,06	0,00	0,00	0,00
507/1	-0,06	0,01	0,00	0,00
109/1	-0,05	0,02	0,00	0,00
225/1	0,09	0,03	-0,07	0,00
502/1	-0,02	0,01	0,00	0,00
212/1	0,01	0,16	-0,06	0,02
301/1	-0,05	0,03	-0,09	0,01
409/1	0,00	0,02	0,00	0,00
217/1	0,11	0,02	-0,02	0,00
115/1	0,09	0,38	-0,03	0,02
120/1	-0,03	0,02	-0,07	0,00
125/1	-0,05	0,04	0,00	0,00
518/1	-0,01	0,02	-0,07	0,01
206/1	0,09	0,16	0,00	0,00
215/1	0,00	0,02	0,00	0,00

106/1	0,06	0,09	0,00	-0,01
517/1	0,46	0,25	-0,06	0,05
504/1	-0,02	0,27	-0,03	0,02
123/1	-0,10	0,03	0,00	-0,02
515/1	-0,13	0,00	0,00	0,00
101/1	0,12	0,46	0,03	0,12
101/2	-0,02	0,15	-0,07	0,02
108/1	0,14	0,34	-0,03	0,04
112/1	0,15	0,05	-0,01	0,00
222/1	0,13	0,01	-0,03	0,03
102/1	0,06	0,06	0,00	0,00
227/2	0,00	0,06	0,00	0,00
116/1	0,03	0,03	0,00	0,02
138/1	-0,02	0,03	0,00	0,00
207/1	0,04	0,06	-0,01	0,04
104/1	-0,07	0,00	0,00	0,00
142/2	-0,01	0,01	0,00	0,01
211/1	0,28	0,09	-0,01	0,05
144/1	0,09	0,07	0,00	0,00
229/1	0,00	0,00	0,00	0,00
216/1	0,00	0,00	0,00	0,00
227/1	0,24	0,14	0,00	0,00
336/2	0,12	0,03	0,00	0,00
336/3	-0,01	0,01	-0,03	0,00
110/3	0,11	0,15	-0,03	0,06
102/2	0,00	0,00	0,00	0,00
229/2	0,06	0,03	0,00	0,00
250/2	0,04	0,01	0,00	0,00
250/3	0,14	0,05	0,00	0,00
236/2	0,13	0,11	0,00	0,03
236/3	0,10	0,07	-0,03	0,00
268/1	-0,11	0,03	0,00	0,00

269/1	0,26	0,21	-0,03	0,01
120/2	0,48	0,11	-0,02	0,01
232/2	0,16	0,06	-0,01	0,01
232/3	0,21	0,12	0,00	0,08
335/2	0,16	0,11	0,04	0,05
355/1	0,23	0,10	-0,03	0,02
355/2	0,23	0,10	0,00	0,03
327/2	0,01	0,00	0,00	0,00
408/3	0,14	0,03	0,00	0,00
409/3	0,08	0,04	-0,02	0,00
330/2	0,08	0,14	-0,04	0,02
322/2	0,09	0,06	0,00	0,00
120/3	0,36	0,09	0,00	0,00
354/1	0,16	0,11	-0,01	0,03
354/2	0,33	0,14	-0,03	0,00
267/1	0,16	0,07	-0,03	0,01
409/2	0,04	0,03	-0,03	0,00
154/1	-0,03	0,00	0,00	0,00
139/2	-0,02	0,00	0,00	0,00
423/1	0,27	0,11	0,00	0,00
513/2	-0,03	0,01	0,00	0,00
526/2	0,14	0,07	0,00	0,00
526/3	-0,01	0,01	0,00	0,00
157/1	0,27	0,16	0,00	0,01
155/1	0,32	0,26	0,07	0,01
424/1	0,08	0,10	-0,02	0,02
425/1	0,21	0,12	0,00	0,01
339/2	0,13	0,05	0,00	0,00
347/1	-0,01	0,01	0,00	0,04
347/2	0,11	0,09	-0,03	0,02
353/1	0,38	0,15	0,00	0,02
358/1	0,15	0,14	0,11	0,13

342/1	0,20	0,14	0,00	0,03
342/2	0,19	0,29	0,12	0,16
356/1	0,16	0,06	-0,03	0,00
422/1	0,13	0,07	0,00	0,00
422/2	0,01	0,00	0,00	0,00
422/3	0,11	0,05	0,00	0,00
534/1	0,00	0,01	0,00	0,00
353/2	0,42	0,33	0,06	0,09
530/1	0,04	0,03	0,00	0,00
530/2	0,13	0,06	0,00	0,00
530/3	0,00	0,02	0,00	0,00
347/3	0,03	0,01	-0,01	0,01

7.1.3. ANEXO 3 - Etapas do procedimento experimental de radioimunoensaio

Tubos	**Tampão RIA (μL)**	**Padrão da RBP ou Padrão da TTR ou amostra de sangue (μL)**	**^{125}I-RBP ou ^{125}I-TTR (μL)**	**Anti-RBP ou Anti-TTR (μL)**
1,2	300	0	200	0
3,4	100	0	200	200
5,6,7,8	100	0	200	200
9,10	0	100	200	200
11,12	0	100	200	200
13,14	0	100	200	200
15,16	0	100	200	200
17,18	0	100	200	200
19,20	0	100	200	200
21,22	0	100	200	200
23,24	0	100	200	200
25,26	0	100	200	200
27,28	0	100	200	200
29,30	0	100	200	200
31,32	0	100	200	200
33,34	0	100	200	200
35,36	0	100	200	200
37,38	0	100	200	200
39,40	0	100	200	200
41,42	0	100	200	200
43,44	0	100	200	200

Os tubos de número 1 e 2 correspondem ao “backgroud” ou seja, o que se liga a proteína não-específica; os tubos 3 e 4 correspondem ao total da contagem; já os tubos 5, 6, 7 e 8 correspondem à referência do teste, ou seja, 100% de ligação, enquanto os de 9 a 32 correspondem à curva padrão

com as seguintes concentrações da RBP padrão: 0,25 ng de RBP/100 μL de tampão RIA (tubos 9,10); 0,8 ng/100 μL (tubos 11,12); 1,6 ng/100 μL (tubos13,14); 3,2 ng/100 μL (tubos 15,16); 6,3 ng/100 μL (tubos 17,18); 12,6 ng/100 μL (tubos 19,20); 25,2 ng/100 μL (tubos 21,22); 50,5 ng/100 μL (tubos 23,24); 101 ng/100 μL (tubos 25,26); 202 ng/100 μL (tubos 27,28); 404 ng/100 μL (tubos 29,30); 808 ng/100 μL (tubos 31,32), ou os tubos de 9 a 32 correspondem à curva padrão com as seguintes concentrações da TTR padrão: 1,25 ng de TTR/100 μL de tampão RIA (tubos 9,10); 2,5 ng/100 μL (tubos 11,12); 5 ng/100 μL (tubos 13,14); 10 ng/100 μL (tubos 15,16); 20 ng/100 μL (tubos 17,18); 40 ng/100 μL (tubos 19,20); 79 ng/100 μL (tubos 21,22); 158 ng/100 μL (tubos 23,24), 316 ng/100 μL (tubos 25,26); 632 ng/100 μL (tubos 27,28); 1264 ng/100 μL (tubos 29,30); 2528 ng/100 μL (tubos 31,32), e os tubos 33 em diante correspondem às amostras de sangue das crianças da comunidade Parque Universitário.

Foram feitas três diluições nas amostras de sangue das crianças para a determinação da RBP (1:20; 1:140 e 1:80) e para a determinação da TTR (1:40; 1:80 e 1:160). Todas as determinações foram feitas em duplicatas.

7.1.4. ANEXO 4 - Concentrações sanguíneas da Proteína Ligadora de Retinol (RBP) e da Transtiretina (TTR) (μM) em cada amostra das crianças da comunidade Parque Universitário

Amostra das crianças	RBP (μM)	TTR (μM)
303/1	1,344	-------
408/1	1,864	2,725
213/1	1,124	2,916
209/1	1,547	1,514
406/1	1,042	1,068
110/1	1,500	1,962
221/1	1,706	1,905
204/1	1,305	1,683
311/1	1,641	2,111
503/1	1,763	2,176
313/1	1,871	1,192
226/1	1,873	2,000
507/1	1,819	1,810
109/1	1,944	1,840
225/1	1,640	1,304
502/1	1,712	1,869
212/1	1,702	1,716
301/1	0,938	1,323
409/1	1,346	1,460
217/1	1,843	1,885
115/1	1,759	1,784
120/1	1,365	1,659
125/1	1,636	1,398
518/1	1,390	1,162
206/1	1,801	2,234
215/1	1,616	1,438
106/1	0,931	0,962

517/1	1,649	1,135
504/1	1,378	2,060
123/1	1,284	2,016
515/1	--------	--------
101/1	1,597	2,192
101/2	1,466	2,529
108/1	1,692	2,136
112/1	0,908	1,998
222/1	1,714	2,083
102/1	--------	--------
227/2	2,555	1,499
116/1	1,106	2,764
138/1	1,673	2,288
207/1	1,174	3,574
104/1	1,130	1,685
142/2	1,575	2,324
211/1	0,900	2,070
144/1	1,523	2,125
229/1	0,992	2,487
216/1	0,796	-------
227/1	1,231	4,372
336/2	1,009	2,283
336/3	0,942	2,057
110/3	0,841	2,116
102/2	0,745	2,388
229/2	0,452	1,853
250/2	1,016	2,450
250/3	0,820	2,239
236/2	0,967	2,446
236/3	0,595	1,650
268/1	0,699	1,609
269/1	1,086	2,146

120/2	1,114	2,275
232/2	0,945	1,954
232/3	0,841	1,861
335/2	0,941	2,667
355/1	0,967	2,512
355/2	1,228	2,646
327/2	0,625	1,857
408/3	1,059	2,306
409/3	0,922	2,491
330/2	0,897	2,378
322/2	1,040	2,642
120/3	0,667	2,229
354/1	1,216	2,097
354/2	1,504	3,187
267/1	1,143	2,529
409/2	1,069	2,107
154/1	1,053	-------
139/2	0,559	1,757
423/1	1,291	2,709
513/2	-------	--------
526/2	1,055	2,132
526/3	0,525	1,720
157/1	1,303	2,516
155/1	1,260	1,837
424/1	1,153	2,304
425/1	1,276	2,077
339/2	0,986	1,597
347/1	1,183	2,223
347/2	1,000	2,112
353/1	1,108	2,188
358/1	1,116	2,372
342/1	1,071	1,838

342/2	1,108	2,092
356/1	1,175	2,050
422/1	1,104	2,296
422/2	0,517	--------
422/3	0,957	1,795
534/1	0,788	2,264
353/2	0,964	1,825
530/1	1,000	1,254
530/2	1,067	2,200
530/3	0,929	2,121
347/3	1,155	2,269

7.1.5. ANEXO 5 - Concentrações da proteína C-reativa (CRP) e da glicoproteína α_1-ácida (AGP) no sangue das crianças da comunidade Parque Universitário

Amostra das crianças	CRP (mg/L)	AGP (mg/L)
303/1	----------	----------
408/1	----------	----------
213/1	2,44	661
209/1	----------	----------
406/1	0,57	513
110/1	----------	----------
221/1	4,48	633
204/1	8,50	1040
311/1	0,49	428
503/1	1,48	728
313/1	1,01	633
226/1	0,57	513
507/1	1,01	542
109/1	----------	----------
225/1	----------	----------
502/1	0,18	428
212/1	1,79	695
301/1	----------	----------
409/1	----------	----------
217/1	0,57	456
115/1	----------	----------
120/1	2,56	969
125/1	0,57	485
518/1	----------	----------
206/1	----------	----------
215/1	----------	----------
106/1	----------	----------

517/1	----------	----------
504/1	0,74	633
123/1	1,89	401
515/1	----------	----------
101/1	----------	----------
101/2	1,01	1040
108/1	----------	----------
112/1	----------	----------
222/1	----------	----------
102/1	5,65	1670
227/2	1,01	695
116/1	3,80	695
138/1	----------	----------
207/1	----------	----------
104/1	8,50	863
142/2	1,48	456
211/1	4,48	969
144/1	----------	----------
229/1	1,48	899
216/1	----------	----------
227/1	----------	----------
336/2	0,57	602
336/3	1,48	695
110/3	0,57	661
102/2	5,20	863
229/2	1,48	828
250/2	0,49	542
250/3	----------	----------
236/2	0,49	542
236/3	1,68	899
268/1	----------	----------
269/1	0,49	513

120/2	0,49	863
232/2	0,74	695
232/3	0,49	695
335/2	----------	----------
355/1	2,00	401
355/2	1,38	205
327/2	8,50	1670
408/3	----------	----------
409/3	0,18	542
330/2	-------	401
322/2	0,57	513
120/3	----------	----------
354/1	----------	----------
354/2	----------	----------
267/1	----------	----------
409/2	1,01	828
154/1	----------	401
139/2	----------	661
423/1	----------	----------
513/2	----------	----------
526/2	0,57	661
526/3	8,5	1240
157/1	----------	----------
155/1	8,32	1040
424/1	----------	----------
425/1	----------	----------
339/2	----------	----------
347/1	1,68	695
347/2	1,68	828
353/1	2,91	695
358/1	----------	----------
342/1	1,48	695

342/2	----------	794
356/1	----------	----------
422/1	1,38	401
422/2	----------	1530
422/3	----------	2360
534/1	1,38	661
353/2	1,29	485
530/1	----------	----------
530/2	2,44	401
530/3	1,38	401
347/3	1,38	695

7.1.6. ANEXO 6 - Resultados da excreção de lactulose e manitol para cada criança da comunidade Parque Universitário.

Amostra das crianças	Lactulose (%)	Manitol (%)	Lactulose/Manitol
303/1	3,34434	5,40834	0,61837
408/1	1,15222	0,89871	1,28209
213/1	3,46600	11,09340	0,31244
209/1	8,57984	25,34755	0,33849
406/1	0,33362	3,59022	0,9292
110/1	0,02779	1,75900	0,01580
221/1	13,83525	44,54821	0,31057
204/1	1,73134	4,99971	0,34629
311/1	56,67389	230,44298	0,24593
503/1	4,58817	10,57157	0,43401
313/1	5,53044	25,99902	0,21272
226/1	1,90398	1,95480	0,97400
507/1	3,72058	4,42227	0,84133
109/1	0,92599	1,12687	0,82174
225/1	0,36399	1,49031	0,24424
502/1	2,27502	5,74100	0,39628
212/1	5,19203	3,73587	1,38978
301/1	9,48853	19,08540	0,49716
409/1	2,17233	9,47850	0,22918
217/1	11,48404	47,87585	0,23987
115/1	0,38808	5,38245	0,07210
120/1	0,00749	1,05735	0,00708
125/1	0,13659	0,63120	0,21639
518/1	0,34001	3,36264	0,10111
206/1	0,11378	3,49730	0,03253
215/1	0,09222	0,94733	0,09735
106/1	0,01507	0,10824	0,13919

517/1	0,54230	6,50758	0,08333
504/1	0,35417	7,96481	0,04447
123/1	0,01768	1,26851	0,01394
515/1	0,78106	2,21055	0,35333
101/1	0,70581	13,61457	0,05184
101/2	0,06867	1,27747	0,05375
108/1	0,04747	0,33127	0,14329
112/1	---------	---------	----------
222/1	0,37932	3,83709	0,09885
102/1	0,00000	1,36996	0,00000
227/2	0,12829	0,44832	0,28616
116/1	0,00000	2,37690	0,00000
138/1	0,11272	1,94468	0,05796
207/1	0,56812	8,96700	0,06336
104/1	0,21220	1,11308	0,19064
142/2	0,74660	5,40592	0,13811
211/1	0,12924	2,35300	0,05493
144/1	0,26388	1,21288	0,21756
229/1	0,10013	0,84708	0,11820
216/1	0,50220	3,29811	0,15227
227/1	0,00000	0,09894	0,00000
336/2	0,00000	0,18406	0,00000
336/3	0,00000	0,06473	0,00000
110/3	0,00000	0,78169	0,00000
102/2	0,58015	9,10597	0,06371
229/2	0,28872	0,35589	0,81128
250/2	2,82610	22,94116	0,12319
250/3	0,31659	1,92766	0,16424
236/2	0,37538	8,22866	0,04562
236/3	0,00000	5,48020	0,00000
268/1	0,00000	0,22392	0,00000
269/1	0,14493	2,93046	0,04945

120/2	0,07033	3,79100	0,01855
232/2	0,48029	5,08994	0,09436
232/3	0,13420	2,57730	0,05207
335/2	0,14641	14,86219	0,00985
355/1	0,11185	0,00000	0,00000
355/2	1,29015	34,51646	0,03738
327/2	0,06417	1,68792	0,03802
408/3	0,55112	13,55841	0,04065
409/3	----------	----------	----------
330/2	0,00000	1,18035	0,00000
322/2	----------	----------	----------
120/3	0,71868	11,40508	0,06301
354/1	0,22756	1,95951	0,11613
354/2	0,31229	7,90730	0,03949
267/1	0,63286	4,62974	0,13669
409/2	1,04732	9,24605	0,11327
154/1	0,07483	1,56021	0,04796
139/2	0,20595	4,55334	0,04523
423/1	0,30897	5,15850	0,05990
513/2	0,13382	0,15763	0,84900
526/2	2,73295	5,70912	0,47870
526/3	0,23409	1,23157	0,19007
157/1	0,86226	8,97594	0,09606
155/1	0,96483	17,05502	0,05657
424/1	0,15706	5,19470	0,03023
425/1	0,79681	7,94340	0,10031
339/2	0,01968	0,32841	0,05993
347/1	0,34622	7,86036	0,04405
347/2	0,03197	0,43643	0,07326
353/1	1,02250	12,00675	0,08516
358/1	0,37735	8,68509	0,04345
342/1	0,21619	3,94044	0,05486

342/2	0,00000	1,55302	0,00000
356/1	0,41331	5,77958	0,07151
422/1	0,09081	0,08067	1,12570
422/2	0,06922	0,11212	0,61733
422/3	0,04472	0,05754	0,77723
534/1	0,44108	7,38094	0,05976
353/2	0,32605	3,30059	0,09879
530/1	0,34859	8,96655	0,03888
530/2	0,62093	12,80744	0,04848
530/3	0,30540	5,94783	0,05135
347/3	0,00000	0,16872	0,00000

7.2. TERMO DE CONSENTIMENTO

7.3. QUESTIONÁRIOS

7.4.COMISSÃO DE ÉTICA

7.5. RESUMO EM CONGRESSO

7.6. TRABALHOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO E PUBLICADOS

7.7. PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA E DECLARAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA ABORDADA NA TESE DE DOUTORAMENTO NA COLUMBIA UNIVERSITY