



Determinación del efecto de la deficiencia de vitamina A sobre la homeostasis del hierro y su estado en modelo murino

Mauricio Restrepo Gallego, MSc

Director:

Luis Eduardo Díaz Barrera, PhD

**Universidad de La Sabana
Doctorado en Biociencias
Facultad de Medicina / Facultad de Ingeniería
Julio de 2020**



Determinación del efecto de la deficiencia de vitamina A sobre la homeostasis del hierro y su estado en modelo murino

Mauricio Restrepo Gallego, MSc

Director:

Luis Eduardo Díaz Barrera, PhD

Trabajo de tesis, presentado como requisito para optar al título de Doctor en Biociencias

**Universidad de La Sabana
Doctorado en Biociencias
Facultad de Medicina / Facultad de Ingeniería
Julio de 2020**

A Gustavo y Estela, mis padres,
que siempre han creído en mí
y me han apoyado en todos mis proyectos
por más descabellados que parezcan.

AGRADECIMIENTOS

Si, otra vez a mis padres, ellos se merecen dedicatorias, agradecimientos y todo lo bueno que pueda existir, soy quien soy por ellos, por su dedicación, amor y entrega incondicional.

A Dios, por iluminarme y enviarme su Espíritu para infundirme sabiduría, entendimiento, inspiración y paciencia, mucha paciencia.

A toda mi familia, paterna y materna, por su compañía, su preocupación y su cercanía.

A mis amigos del alma por entender esta pasión por el estudio que, a veces, me tuvo un poco ausente de sus vidas.

A mis maestros, a todos, especialmente Ángela, Isabel y Laura que me hicieron enamorar más de la Química; Ana María y Miguel, mis “padrinos mágicos” durante mi camino por Chile y mi formación en Nutrición; *Patrícia por sua ajuda durante o meu estágio.*

A mis alumnos, actuales y antiguos, porque han sido, son y espero sigan siendo ese motor que me anima a mantenerme actualizado y vigente, y porque me siguen demostrando que nunca se pierde lo que se hace.

A María Consuelo Tarazona, por insistir hasta que me convenció de embarcarme en esta tarea de formarme como Doctor en Biociencias y por sembrar la semilla para el tema de investigación.

A mi director y amigo, Luis Eduardo Díaz por su paciencia y acompañamiento en todos los momentos, especialmente en los más complejos durante esta etapa de formación.

A mi jefe, John Jaime Restrepo, por brindarme el tiempo y espacio necesarios para cumplir con todos los objetivos de esta etapa de mi vida.

A mis compañeros de Ingredientes y Productos Funcionales, IPF, por su comprensión cuando mis obligaciones académicas no me permitían responder a tiempo con mis responsabilidades laborales.

A Colciencias y la Universidad de La Sabana por el apoyo financiero para la realización de este Doctorado.

CONTENIDO

RESUMEN	10
ABSTRACT	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. ESTADO DEL ARTE.....	16
1.1.1. Hierro.....	16
1.1.1.1. Generalidades.....	16
1.1.1.2. Digestión, absorción y eflujo	17
1.1.1.3. Proteínas asociadas al metabolismo del hierro.....	18
1.1.1.4. Regulación	21
1.1.1.5. Interacción con otros nutrientes.....	25
1.1.2. Vitamina A	25
1.1.2.1. Generalidades.....	25
1.1.2.2. Digestión, absorción y eflujo	26
1.1.3. Anemia.....	27
1.1.3.1. Definición.....	27
1.1.3.2. Epidemiología	28
1.1.3.3. Anemia por deficiencia de hierro	29
1.1.4. Vitamina A, hierro y anemia	30
1.1.4.1. Vitamina A y marcadores de homeostasis del hierro.....	34
1.1.5. El modelo animal en investigaciones sobre nutrición	35
1.2. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	36
1.3. OBJETIVOS	37
1.3.1. General	37
1.3.2. Específicos	37
1.4. METODOLOGÍA.....	37

1.4.1.	Materiales y métodos.....	37
1.4.1.1.	Animales y dietas.....	37
1.4.1.2.	Parámetros bioquímicos.....	39
1.4.1.3.	Parámetros hematológicos	39
1.4.1.4.	qRT-PCR	40
1.4.1.5.	Western-Blot	42
1.4.1.6.	Análisis estadístico	44
1.5.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA INVESTIGACIÓN	44
2.	INFLUENCIA DE LA VITAMINA DIETARIA Y LA DEFICIENCIA DE HIERRO SOBRE LA GANANCIA DE PESO Y ALGUNOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN RATAS WISTAR MACHO JÓVENES	46
2.1.	RESULTADOS.....	46
2.1.1.	Parámetros bioquímicos.....	46
2.1.2.	Parámetros hematológicos	47
2.1.3.	Ingesta de alimento y peso corporal.....	48
2.2.	DISCUSIÓN.....	49
2.2.1.	Parámetros bioquímicos.....	49
2.2.2.	Parámetros hematológicos	49
2.2.3.	Peso corporal.....	52
2.3.	CONCLUSIONES	53
3.	EFECTO DE LAS VARIACIONES DIETARIAS DE HIERRO Y VITAMINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE LA HORMONA HEPcidina Y OTROS MARCADORES DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RATAS WISTAR MACHO JÓVENES	55
3.1.	RESULTADOS.....	55
3.2.	DISCUSIÓN.....	58
3.3.	CONCLUSIÓN	62
4.	EXPRESIÓN DE FERRITINA Y RECEPTOR DE TRANSFERRINA EN RATAS WISTAR MACHO JÓVENES BAJO DIFERENTES NIVELES DIETARIOS DE HIERRO Y VITAMINA A	63
4.1.	RESULTADOS.....	63
4.2.	DISCUSIÓN.....	65
4.3.	CONCLUSIÓN	67
5.	DISCUSIÓN GENERAL.....	68
5.1.	RECOMENDACIONES	71
	REFERENCIAS.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de corte de los valores de hemoglobina y ferritina para definir anemia, ID e IDA.	27
Tabla 2. Prevalencia de anemia en 2011 por región	28
Tabla 3. Prevalencias de ID, anemia nutricional y VAD en niños en Colombia entre 2010 y 2015.....	29
Tabla 4. Clasificación de la ID y la IDA	29
Tabla 5. Composición y perfil nutricional de las dietas empleadas	39
Tabla 6. Genes analizados por tejido	41
Tabla 7. Primers empleados para la qRT-PCR	41
Tabla 8. Anticuerpos primarios	43
Tabla 9. Anticuerpos secundarios	43
Tabla 10. Resultados de los parámetros bioquímicos.....	47
Tabla 11. Resultados de los parámetros hematológicos.....	47
Tabla 12. Clasificación de ratas Wistar macho de nueve semanas según su peso corporal.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Absorción de hierro en el enterocito y su transporte al torrente sanguíneo.	18
Figura 2. Representación esquemática de la regulación del hierro (Fe) por hepcidina (Hep) y su efecto sobre ferroportina (FPN)	22
Figura 3. Regulación de la expresión de hepcidina	23
Figura 4. Representación de la regulación de la homeostasis del hierro por el sistema IRE/IRP	24
Figura 5. Estructuras de la vitamina A (retinol), sus principales derivados y betacaroteno	25
Figura 6. Absorción y transporte de la vitamina A	26
Figura 7. Protocolo de extracción de mRNA con reactivo TRIzol.	40
Figura 8. Condiciones de la qRT-PCR en el equipo CFX96 Touch™	42
Figura 9. Curvas de ganancia en peso de las ratas bajo las dietas experimentales comparadas con el grupo control.....	48
Figura 10. Expresión relativa de los niveles de Il6 en hígado.....	55
Figura 11. Expresión relativa de los niveles de Hamp en hígado.....	56
Figura 12. Expresión relativa de los niveles de Ireb2 en duodeno.....	56
Figura 13. Expresión relativa de los niveles de Ireb2 en bazo.....	57
Figura 14. Expresión relativa de los niveles de FTH1 en duodeno.....	57
Figura 15. Expresión relativa de los niveles de FTH1 en bazo.....	58
Figura 16. Expresión relativa de los niveles de Tfrc en bazo.....	58
Figura 17. Mapa de calor para la expresión relativa de todos los genes en los grupos experimentales....	61
Figura 18. Efecto combinado de un adecuado suministro de hierro y vitamina A sobre la expresión del RNAm de algunos marcadores de la homeostasis del hierro	61
Figura 19. Expresión relativa de interleukina-6 (IL6) (a), ferritina (Fn) (b), receptor de transferrina (TfR) (c) en hígado	64
Figura 20. Expresión relativa de ferritina (Fn) (a) y receptor de transferrina (TfR) (b) en bazo	65
Figura 21. Expresión relativa de ferritina (Fn) en duodeno	65
Figura 22. Representación del efecto de la VAD sobre la expresión de las principales proteínas asociadas al almacenamiento y transporte del hierro.	70

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Influence of Dietary Vitamin A and Iron Deficiency on Hematologic Parameters and Body Weight of Young Male Wistar Rats	78
ANEXO 2. Vitamin A does not influence mRNA expression of hormone hepcidin but other biomarkers of iron homeostasis in young male Wistar rats	85
ANEXO 3. Classic and emergent indicators for the assessment of human iron status	94
ANEXO 4. Vitamin A deficiency influences expression of ferritin in young male Wistar rats.....	109
ANEXO 5. Certificado de participación en el VII Congreso Internacional del Colegio Colombiano de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica.....	120

RESUMEN

La anemia por deficiencia de hierro (IDA) y la deficiencia de vitamina A (VAD) hacen parte del grupo de las deficiencias por micronutrientes definidas por la OMS como de interés mundial. En el caso de Colombia, la prevalencia de IDA en niños de 1 a 4 años es de 14.8% y la anemia está en 24.7% para niños entre 6 y 59 meses, algo paradójico si se tiene en cuenta que desde 1996 es obligatorio fortificar la harina de trigo con hierro. De otro lado, la prevalencia de VAD es de 27.3% para el mismo grupo poblacional, en este caso hasta el día de hoy no existe ningún tipo de fortificación obligatoria en el país.

Las interacciones entre nutrientes no son algo desconocido en el campo de la salud y la nutrición, la más reconocida es la existente entre calcio y vitamina D; además, existe evidencia desde el punto de vista epidemiológico de que la VAD y la ID tienen algún tipo de relación, hecho que ha sido soportado por algunos estudios en modelos celulares y animales.

Este estudio parte de la hipótesis de que la vitamina A regula de alguna forma la homeostasis del hierro y su rol metabólico, y aborda tres enfoques: ganancia de peso, parámetros bioquímicos y hematológicos y biomarcadores de la homeostasis del hierro.

Para abordar el problema, se diseñó un estudio con cuatro dietas experimentales con diferentes relaciones de hierro y vitamina A (suficiencia, insuficiencia y deficiencia) y una dieta control que brindaba un aporte suficiente a los animales. Estadísticamente se determinó el tamaño apropiado de grupos, resultando en siete animales por grupo para un total de 35 animales. Las ratas iniciaron el experimento al momento del destete (21 días) y recibieron alimentación y agua *ad libitum* durante seis semanas, durante este tiempo se registraron los consumos del alimento y el peso de los animales cada semana. Posteriormente fueron sacrificados y se tomaron muestras de sangre y de los tejidos de interés (hígado, bazo y duodeno) para los

análisis posteriores de: parámetros bioquímicos y hematológicos en sangre y pruebas de PCR y Western Blot en los tejidos con el fin de analizar las proteínas de interés (hepcidina, ferritina, receptores de transferrina, transferrina e interleucina-6).

Se encontró que, efectivamente, la VAD, aún con un adecuado suministro de hierro tiene un efecto deletéreo sobre la ganancia de peso, los niveles de hierro sérico, el recuento de reticulocitos, la proteína reguladora de hierro 2 (IRP2) y los receptores de transferrina en un nivel post-transcripcional y ferritina en un nivel post-traducciona.

Si bien no es suficiente evidencia para soportar un cambio de políticas públicas en fortificación con micronutrientes, se espera que estos resultados alienten más investigaciones y atraigan la mirada del sector público para diseñar nuevas estrategias que permitan la reducción de la IDA y la VAD en población infantil en los próximos años.

ABSTRACT

Iron deficiency anemia (IDA) and vitamin A deficiency (VAD) belong to the micronutrient deficiencies defined by the WHO as worldwide concern. In Colombia, IDA prevalence for children from 1 to 4 years old is 14.8% and anemia is 24.7% for children from 6 to 59 months old, it is remarkable in a country where is mandatory to fortify wheat flour with iron since 1996. On the other hand, VAD prevalence for children from 1 to 4 years old is 27.3% and, in this case, there is no mandatory fortification programs in the country.

Interactions between micronutrients are not unknown on health and nutrition field, the most recognized is that between calcium and vitamin D; besides, there is evidence from an epidemiological perspective that VAD and ID are linked in some way, fact supported for some studies using cellular and animal models.

This study has the hypothesis that vitamin A regulates in some way the iron homeostasis and its metabolic role, and has three approaches: weight gain, biochemical and hematological parameters and molecular markers of iron homeostasis.

We designed a study with four experimental diets with different ratios of iron and vitamin A (sufficient, insufficient and deficient) and a control diet with a sufficient supply of both micronutrients. The quantity of animals was calculated statistically giving seven animals per group for 35 animals. The rats started the experiment at weaning (21 days-old) and received food and water *at libitum* for six weeks, during this time food intake and weight were recorded each week. At sixth week the animals were euthanized and samples from blood and tissues of interest (liver, spleen and duodenum) were taken for analysis of biochemical and hematological indicators in blood and PCR and Western Blot test in tissues for the analysis of hepcidin, ferritin, transferrin receptors, transferrin and interleukin-6 as proteins of interest.

We found that, indeed, even with an adequate supply of iron, VAD has a deleterious effect on weight gain, serum iron levels, reticulocyte count, iron regulatory protein 2 and transferrin receptors at post-transcriptional level and ferritin at post-translational level.

Even is not enough evidence to support changes in public policies for micronutrient fortification programs, is expected that those results encourage more research and attract the attention of the public sector to design new strategies that allow to reduce IDA and VAD in children in the next years.

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	Adequate Intake (Ingesta Adecuada)
ARAT	Acil CoA Retinil Acil Transferasa
Cp	Ceruloplasmina
Dcytb	Citocromo B duodenal
DMT1	Divalent Metal Transporter-1 (Transportador de Metales Divalentes-1)
EAR	Estimated Average Requirement (Requerimiento Estimado Medio)
ENSIN	Encuesta Nacional de Situación Nutricional (Colombia)
Fn	Ferritina
FPN	Ferroportina
GDF15	Growth Differentiation Factor 15 (Factor de Diferenciación de Crecimiento 15)
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide
Hb	Hemoglobina
HCP1	Heam Carrier Protein 1 (Proteína Transportadora de Grupo Hemo 1)
HEMOX-1	Hemo-oxigenase 1 (Hemo-oxigenasa 1)
HEPH	Hephaestin (Hefestina)
ID	Deficiencia de hierro (por sus iniciales en inglés Iron Deficiency)
IDA	Anemia por deficiencia de hierro (por sus iniciales en inglés Iron Deficiency Anemia)
IRE	Iron Responsive Element (Elemento de Respuesta al Hierro)
IRP	Iron Regulatory Protein (Proteína Reguladora de Hierro)
LRAT	Lecitin Retinil Acil Transferasa
NTBI	Non transferrin bound iron (Hierro no ligado a transferrina)
OMS	Organización Mundial de la Salud
RALDH	Retinal Deshidrogenasa
RDA	Recommended Dietary Allowance (Ingesta Dietética Recomendada)
RDH	Retinol Deshidrogenasa
RE	Equivalente de Retinol
RIEN	Recomendaciones de Ingesta de Energía y Nutrientes
SPF	Specific Pathogen Free
Tf	Transferrina
TfR	Receptores de transferrina
UI	Unidades Internacionales
UL	Upper Limit (Límite Superior)
VAD	Deficiencia de Vitamina A (por sus iniciales en inglés Vitamin A Deficiency)

1. INTRODUCCIÓN

La principal motivación para estudiar debería estar siempre sustentada en dos pilares fundamentales: **compartir** lo aprendido y **aplicarlo** en experiencias reales para tratar de solucionar o, por lo menos, disminuir la incidencia de problemas que afecten a determinadas comunidades.

Después de varios años de ejercicio docente y profesional en áreas como Química Orgánica, Bioquímica, Nutrición y Desarrollo de Productos, el autor decidió profundizar aún más sus conocimientos para entrelazarlos y plantear posibles soluciones a un problema que las estadísticas nacionales siempre evidenciaban pero no parecían motivar la búsqueda de respuestas, al menos desde el ejercicio académico y científico: *la alta prevalencia de anemia infantil en un país donde es obligatorio fortificar la harina de trigo con hierro.*

Al ser una condición de origen multifactorial, el abordaje de las intervenciones para disminuir en alguna cifra los casos de IDA, especialmente entre niños hasta los 4 años, representa un campo inmensamente amplio como para pretender describirlo en un trabajo científico de algunos años; por tal razón se eligió un enfoque desde la interacción de micronutrientes tomando como referencia la relación existente entre vitamina D y calcio.

En el presente trabajo se aborda la importancia del suministro conjunto de hierro y vitamina A como estrategia para la reducción de la anemia infantil, partiendo de evidencias previas sobre el efecto que tiene la última sobre los mecanismos asociados a la homeostasis del primero. Si bien no se ha encontrado la solución definitiva a la patología, se ha logrado mover un poco esa barrera del conocimiento que, tal vez, permita motivar futuras profundizaciones sobre el tema y, por qué no, llegar en algún momento a elaborar políticas públicas de fortificación obligatoria con vitamina A, mejorando de alguna manera la calidad de vida de los niños y niñas de Colombia.

1.1. ESTADO DEL ARTE

1.1.1. Hierro

1.1.1.1. Generalidades

El hierro es un mineral esencial, perteneciente al grupo de los metales de transición que, gracias a sus propiedades químicas y físicas particulares, posee un rol determinante en el metabolismo de la mayoría de los seres vivos. Se encuentra presente en numerosas proteínas, especialmente aquellas asociadas al transporte de oxígeno, de ahí su importancia en el sostenimiento de la vida, prácticamente podría decirse que en ausencia de hierro la vida no sería posible (al menos para numerosos organismos) (1,2). El requerimiento medio estimado (ingesta diaria de un nutriente, considerada adecuada, para cubrir las necesidades de la mitad de los individuos sanos de un grupo etario definido, EAR por sus siglas en inglés) para niños entre 7 y 12 meses es de 6.9 (niños) y 6.3 mg/día (niñas), para niños y niñas de 1 a 3 años es de 3 mg/día y en niños y niñas de 4 a 8 años es de 4.1 mg/día. La ingesta dietética recomendada (cantidad recomendada del nutriente que permite cubrir las necesidades de la mayoría de la población de un grupo etario determinado, RDA por sus siglas en inglés) es de 11 mg/día para niños y niñas de 7 a 12 meses, 7 mg/día para niños y niñas de 1 a 3 años y 10 mg/día para niños y niñas de 4 a 8 años. Debido a la insuficiente evidencia científica para determinar EAR y RDA para niños de 0 a 6 meses se ha estimado la cantidad de hierro que aporta la leche materna como único alimento en este rango de edad y se ha fijado como valor de ingesta adecuada (AI), la cual es también un valor medio de ingesta del nutriente pero basado en los valores observados del mismo en un grupo que se considera recibe la cantidad adecuada, para el caso de hierro es de 0.27 mg/día (3). En cuanto a la posibilidad de presentar alguna clase de efecto adverso o riesgo por sobreingesta del mineral, se ha fijado el nivel de ingesta máxima tolerable (nivel más alto de ingesta que no representa un riesgo para la mayoría de la población de un grupo etario determinado, UL) en 40 mg/día para niños hasta 13 años de edad (4,5). La Resolución 3803 de 2016 estableció en Colombia las Recomendaciones de Ingesta de Energía y Nutrientes – RIEN para la población colombiana y fijó en 11 mg/día el EAR para niños y niñas entre siete meses y 3 años (6).

El contenido normal de hierro en el cuerpo es de 4-5 g, la mayoría se encuentra formando parte de las proteínas pigmentantes de la sangre (hemoglobina) y el músculo (mioglobina), también está presente en numerosas enzimas como catalasa, peroxidasa e hidroxilasas entre otras (7), adicionalmente los depósitos de hierro en forma de ferritina y hemosiderina representan alrededor del 25% del hierro total del cuerpo

(8). Sus funciones están asociadas al transporte de oxígeno en los glóbulos rojos, cofactor en reacciones enzimáticas y desempeña un rol activo en el transporte de electrones entre células (9).

1.1.1.2. Digestión, absorción y eflujo

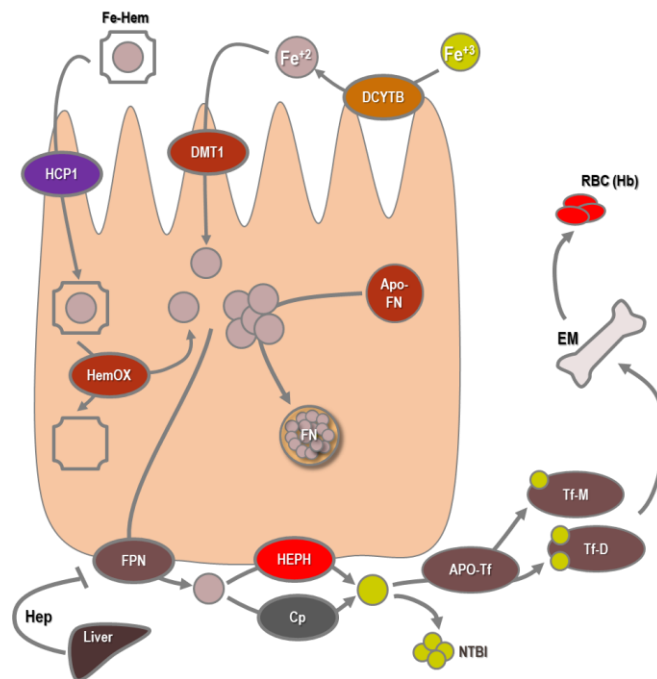
Las principales fuentes de hierro dietario son la carne (hierro hemínico) y vegetales y leguminosas (hierro no hemínico), el proceso de absorción del hierro dietario en la luz intestinal, es similar para ambos tipos (10). El hierro hemínico se encuentra fuertemente ligado a proteínas globulares, las cuales deben ser hidrolizadas mediante el pH del estómago y las proteasas gástricas e intestinales (9,11). De manera similar, el hierro no hemínico requiere también del pH ácido generado en el estómago para favorecer la solubilización y disociación de los componentes a los cuales se une covalentemente (12). Tanto el hierro hemínico como el no hemínico se absorben en el duodeno (1), sin embargo, los mecanismos de absorción del mineral por parte del enterocito, dependen del origen dietario del hierro (10).

El hierro no hemínico generalmente está en forma férrica (Fe^{3+}), debe ser reducido a su forma ferrosa (Fe^{2+}) por una proteína citocromo duodenal de membrana (DcytB), proceso favorecido por el ácido ascórbico (vitamina C), una vez reducido es llevado al interior del enterocito por una proteína ubicada en la membrana apical conocida como DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) (13). De otro lado el hierro hemínico es captado por una proteína anclada a la membrana apical denominada HCP1 (*Heam Carrier Protein 1*), que es específica para esta forma de hierro; luego, el hierro hemínico intacto pasa a un endosoma en donde es degradado por acción de la enzima hemo-oxigenasa (HEMOX-1), mecanismo que permite la liberación del hierro desde la protoporfirina. Finalmente, este es liberado al citosol del enterocito mediante una isoforma del DMT1, presente en el endosoma y se hace indistinguible del hierro no hemínico (14).

Una vez en el citosol del enterocito, el hierro tiene diferentes destinos: 1) formar parte de los citocromos de la membrana mitocondrial, donde es utilizado para favorecer los procesos de óxido-reducción necesarios en la cadena transportadora de electrones; 2) formar parte de un *pool* transitorio de hierro intracelular libre, que auto regula, agudamente, la captación del mineral; 3) puede ser almacenado en la proteína de reserva, la ferritina celular (1) y 4) ser exportado al torrente sanguíneo por medio de una proteína localizada en la membrana basolateral, denominada ferroportina (FPN), después de lo cual requiere de la actividad ferroxidasa (para ser convertido a hierro férrico) bien por una proteína de membrana denominada hefestina o por una plasmática denominada ceruloplasmina, luego es ligado a la

transferrina, que es la proteína que lo transporta hacia diferentes órganos y tejidos, aunque se ha encontrado también que puede circular de otra forma no unido a transferrina (*non transferrin bound iron-NTBI*) (15). La

Figura 1 representa esquemáticamente la absorción de hierro en el enterocito y su transporte al torrente sanguíneo (12,14).



DMT1: Transportador de metales divalentes 1. **Dcytb:** Citocromo B duodenal. **HCP1:** Proteína transportadora de grupo hemo 1. **HemOX:** Hemo-Oxigenasa. **FN:** Ferritina. **FPN:** Ferroportina. **HEPH:** Hefestina. **Cp:** Ceruloplasmina. **Tf:** Transferrina. **NTBI:** Hierro no ligado a transferrina. **Hep:** Hefcidina. **EM:** Médula eritroide. **RBC:** Glóbulos rojos. **Hb:** Hemoglobina

Figura 1. Absorción de hierro en el enterocito y su transporte al torrente sanguíneo.
Adaptada de Silva y Faustino, 2015 (16)

1.1.1.3. Proteínas asociadas al metabolismo del hierro

1.1.1.3.1. Transportador de metales divalentes 1 (DMT-1)

El transportador de metal divalentes 1 (DMT1) es una proteína de membrana celular, fue la primera proteína de este tipo asociada a la absorción del hierro identificada en mamíferos, en el enterocito se expresa a nivel apical para permitir la absorción de los metales desde el lumen; consta de doce dominios transmembrana y ambos extremos residen en el citoplasma (17,18).

Dada su naturaleza es un transportador no específico viable para cualquier metal divalente, sin embargo se ha encontrado que tiene mayor afinidad por hierro en comparación con otros metales como zinc, manganeso, níquel y cobalto (19), no se ha evidenciado que el cobre represente competencia para absorber el hierro (20), tampoco se ha encontrado que el consumo de calcio, uno de los metales divalentes dietarios de mayor abundancia e importancia, tenga un efecto negativo sobre la absorción del hierro (21). Es importante mencionar que DMT1 también participa en la absorción de metales pesados tóxicos como cadmio, plomo y mercurio (22).

1.1.1.3.2. Oxidorreductasas de membrana y plasmáticas

Para ser absorbido el hierro no-hemo debe estar en forma reducida, es decir Fe^{+2} , si el hierro dietario está en forma oxidada debe reducirse primero. La DcytB (*duodenal cytochrome B*) se expresa en la membrana apical del enterocito y tiene un alta actividad reductasa para permitir que el hierro no-hemo sea absorbido apropiadamente desde el lumen (12,23–25).

Una vez en el interior del enterocito el hierro puede permanecer en su forma reducida y emplearse para el metabolismo celular o almacenarse en forma de ferritina; sin embargo, para poderse transportar debe ser oxidado nuevamente, para ello se cuenta con dos proteínas, una de membrana y otra sérica (26). La ceruloplasmina (Cp) es una proteína sérica descubierta en 1948 mientras se investigaba el transporte de cobre, es una oxidasa dependiente de cobre. Se le atribuye la fuerte actividad ferroxidasa del suero y es, junto con la hefestina, responsable por la oxidación el hierro en su forma ferrosa a su forma férrica para que éste pueda ser incorporado posteriormente a la transferrina para su transporte (27). Se ha encontrado que mutaciones que afecten la expresión de Cp están asociadas con deficiencias de hierro y interrupciones en su homeostasis (28). La hefestina (HEPH) es una proteína de membrana expresada principalmente a nivel basolateral en el enterocito. Al igual que la Cp, su función consiste en oxidar de nuevo el hierro de su forma ferrosa a su forma férrica una vez sale del enterocito. Del mismo modo que con Cp, mutaciones asociadas a su expresión se relacionan con deficiencias de hierro (28,29).

1.1.1.3.3. Transportador de grupo hemo 1 (HCP1)

Es una proteína de la membrana apical del enterocito identificada en 2005 como transportador del grupo hemo, su expresión es principalmente a nivel de la mucosa duodenal de hecho, no se evidencia expresión de su mRNA a nivel ileal o yeyunal (30). La regulación de esta proteína ocurre post-transduccional en

función de los depósitos de hierro intracelulares y del nivel de oxígeno plasmático; el comportamiento es aparentemente lineal mostrando saturación a niveles muy altos del grupo hemo (14,31).

1.1.1.3.4. Hemooxigenasa (HEMOX-1)

Es una proteína citoplasmática cuya función es prevenir los posibles efectos tóxicos del grupo hemo mediante la ruptura del anillo de porfirina en biliverdina, monóxido de carbono y hierro, este último se integra con el hierro no-hemo al *pool* citosólico y sigue la ruta metabólica independiente de su origen (15).

1.1.1.3.5. Ferritina (Fn)

Es una proteína para el almacenamiento del hierro en la célula, la apo-ferritina (forma libre de hierro) está compuesta por 24 subunidades de peso molecular aproximado a 20 kDa, ensambladas forman una estructura hueca de aproximadamente 500 kDa y en su interior pueden almacenar hasta 4500 átomos de hierro (12). Su expresión es regulada por el estado de hierro en el individuo de forma directa, esto puede deberse a la necesidad de una respuesta inmediata de la célula para almacenar cualquier exceso de hierro que pueda tener actividad oxidante; del mismo modo una depleción de los niveles de hierro reduce la expresión de la proteína. En condiciones de exceso de hierro algunas moléculas de ferritina pueden degradarse a otra forma de almacenamiento de hierro, más pequeña, conocida como hemosiderina, presente en tejido hepático, bazo y médula ósea (15).

1.1.1.3.6. Ferroportina (FPN)

Es una proteína de la membrana basolateral del enterocito, es la única proteína de membrana conocida por ser responsable del eflujo unidireccional desde el interior de la célula hacia el torrente sanguíneo, sin embargo, su expresión no es exclusiva del enterocito, también se encuentra en otras células como los macrófagos y hepatocitos. Su expresión es regulada en función del estado de hierro del individuo, incrementándose cuando hay déficit y disminuyendo cuando hay exceso, comportamiento contrario al hepatocito en donde su expresión es directamente proporcional al nivel de hierro. También se ha encontrado que puede ser regulada por la hepcidina, una hormona hepática de la cual se hablará más adelante (15,32).

1.1.1.3.7. Transferrina (Tf)

Es la principal proteína plasmática involucrada en el transporte de hierro, es una glucoproteína sintetizada principalmente en el hígado, existen otras transferrinas de importancia en el metabolismo del hierro, pero

suelen llamarse por su nombre específico: lactoferrina, ovotransferrina y mielotransferrina, sin embargo, cuando se habla de transferrina suele tratarse siempre de la plasmática. Es una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 80 kDa que liga dos átomos de hierro férrico, puede encontrarse circulando en su forma libre (apo-Tf), en forma monoférrica o diférrica (holo-Tf) (15).

1.1.1.3.8. Receptores de transferrina (TfR)

Están directamente involucrados en la captación del hierro de la circulación, se han identificado dos tipos TfR1 presente en casi todas las células proliferativas para captar el hierro para el ciclo celular y el TfR2 expresado principalmente en el hígado, existe también una forma soluble (15). Para captar el hierro, el TfR se liga a Tf bien sea en forma monoférrica o diférrica, el complejo es luego endocitado y el hierro es liberado en el citoplasma para su utilización por la célula.

1.1.1.4. Regulación

Dado que no hay mecanismos aún conocidos que regulen la excreción de hierro del cuerpo, se considera que los procesos críticos a regular son su absorción, exportación, almacenamiento y transporte. A nivel local, la absorción y transporte del hierro puede ser regulada desde el enterocito mediante la participación del sistema IRE/IRP (*iron responsive element/iron regulatory protein*) el cual afecta la regulación post-transcripcional de las proteínas clave en el transporte del hierro; bajo condiciones de déficit, la IRP se liga al mRNA de DMT1 y del receptor de transferrina 1 (TfR1) estabilizándolo e incrementando la cantidad de proteína traducida; como efecto regulador negativo, bajo las mismas condiciones deficitarias, la IRP se une al mRNA de FPN y ferritina bloqueando su traducción (esto para garantizar disponibilidad de hierro para el metabolismo del enterocito), sin embargo en una de las isoformas de FPN no se da esa unión de la IRP y por lo tanto se puede mantener un nivel apropiado de hierro en el cuerpo aún en bajas concentraciones del mismo (12).

1.1.1.4.1. Sistémica

A nivel sistémico y en sujetos sanos, el metabolismo del hierro es regulado principalmente por la hepcidina, ésta es una hormona producida por el hígado, descubierto inicialmente como un péptido antimicrobiano (de ahí su nombre: *hep*= hígado, *cidin*= con actividad antimicrobiana), también se ha encontrado evidencia de expresión de la hormona en macrófagos, riñones, células beta pancreáticas y tejido adiposo, sin embargo no está directamente relacionada con hierro sino con su función antimicrobiana. Es codificada por el gen HAMP (*hepcidine anti microbial peptide*), el cual está localizado

en el brazo largo del cromosoma 19, es un gen de 2.5 kb que contiene dos intrones y tres exones y se transcribe en un RNAm de 0.4 Kb el cual se traduce inicialmente como pre-pro-hepcidina, un péptido de 84 aminoácidos que por acción enzimática es recortado a 64 aa (pro-hepcidina) y exportado del citoplasma al lumen del retículo endoplasmático para sufrir un nuevo clivaje que deja la hepcidina madura con una longitud de 25 aa (33–35) .

Es considerada la hormona maestra de la regulación del hierro (36), el mecanismo general opera mediante su unión a ferroportina para inducir su internalización y degradación lisosomal, de esta forma cuando hay sobrecarga de hierro se aumenta la expresión de hepcidina y se reduce el eflujo desde el enterocito; en el sentido opuesto, cuando hay deficiencia de hierro (bajos niveles de holo-Tf) se disminuye la expresión de hepcidina y se incrementa el eflujo hacia la circulación puesto que no hay internalización de FPN (1,37,38); este mecanismo no solo opera en el enterocito también se ha encontrado que la hepcidina cumple su rol regulador en otros tejidos como el cardíaco en el cual también modula la expresión de FPN (32). En la Figura 2 se representa la regulación en función del nivel de hierro plasmático a nivel del enterocito.

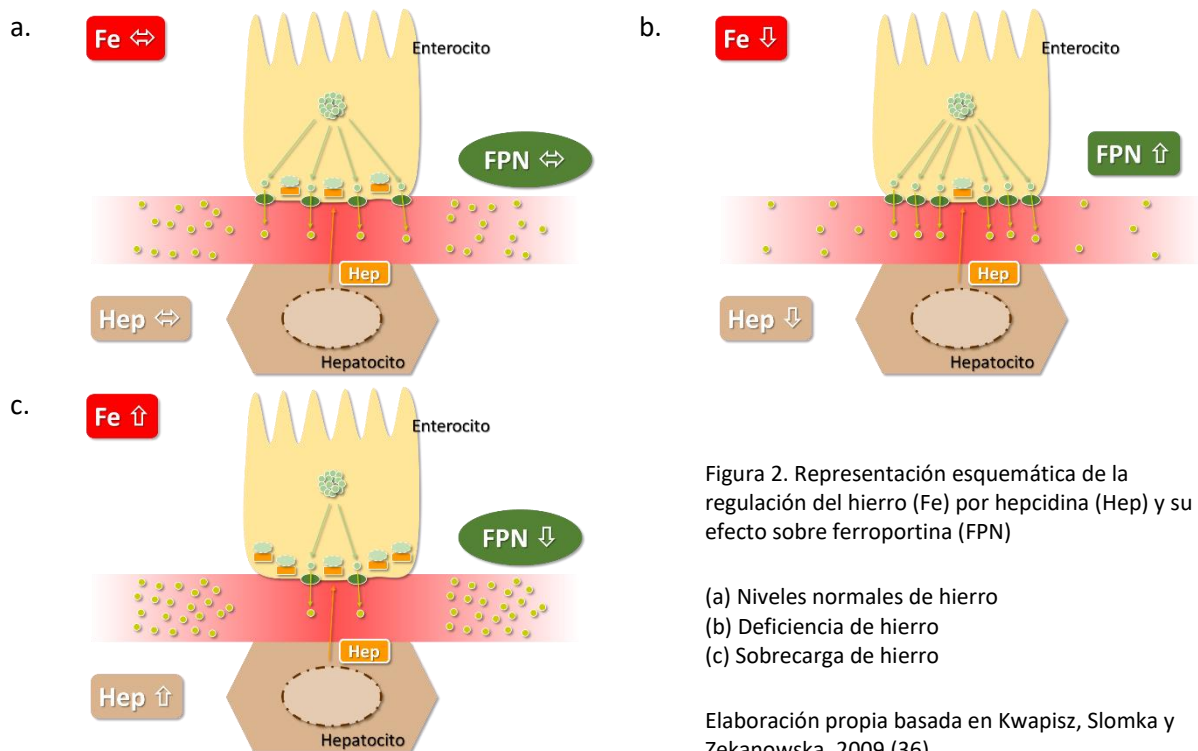


Figura 2. Representación esquemática de la regulación del hierro (Fe) por hepcidina (Hep) y su efecto sobre ferroportina (FPN)

- (a) Niveles normales de hierro
- (b) Deficiencia de hierro
- (c) Sobrecarga de hierro

Elaboración propia basada en Kwapisz, Slomka y Zekanowska, 2009 (36)

Dada su importancia como regulador de la homeostasis del hierro, es importante conocer mejor las vías de regulación de su transcripción tanto en condiciones de salud normales o en otros como inflamación y

anemia, estos mecanismos se representan en la Figura 3. La concentración plasmática del hierro es el principal regulador de la producción de hepcidina en condiciones normales y se combina con otros factores en patologías específicas como la inflamación y la anemia. Los receptores de transferrina (TfR1 y TfR2) censan la disponibilidad de hierro en función de la transferrina circulante y, vía MAPK/ERK (MAP kinase/extracelular regulated kinase) regulan la síntesis de hepcidina. (39)

En el caso de inflamación hay una fuerte regulación de la hormona por agentes asociados como la interleucina 6 (IL6) ya que esta incrementa su transcripción, especialmente en cuadros como la anemia por inflamación o anemia por enfermedad crónica, esto probablemente por el rol antimicrobiano de la hepcidina. El mecanismo por el cual IL6 actúa como regulador involucra las rutas SMADs¹ y JAK/STAT3 (JAK=Janus kinase, STAT=Signal Transducer and Activator of Transcription); la ruta SMADs es activada por el complejo BMPR (*bone morphogenetic protein receptor*) que fosforila las proteínas SMAD4 y R-SMAD las cuales forman un nuevo complejo que es traslocado al núcleo para unirse al respectivo factor de transcripción en el gen HAMP; de otro lado IL6 se une a la proteína JAK activando su autofosforilación y activación, esto resulta en la fosforilación del factor de transcripción STAT3, el cual es traslocado al núcleo donde se une al elemento de respuesta en el promotor de hepcidina activando su transcripción (39,40).

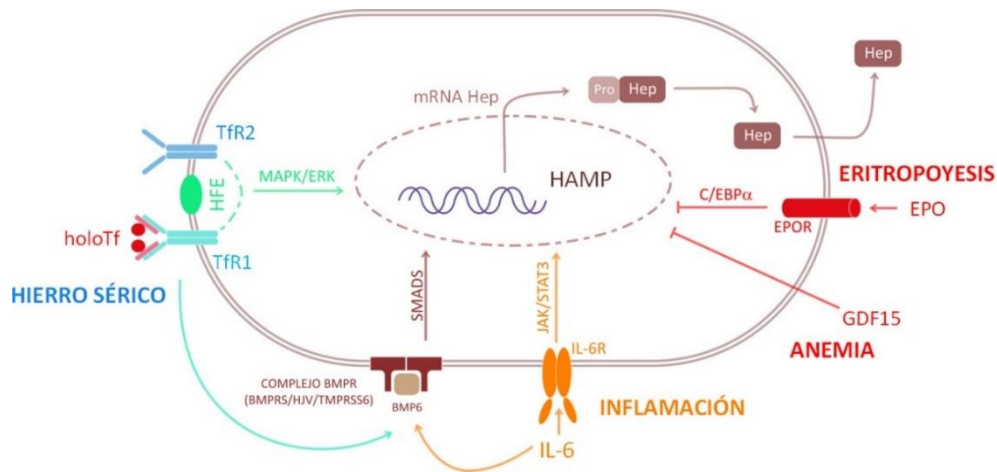


Figura 3. Regulación de la expresión de hepcidina
Adaptado de Porto, 2012: (41)

¹ El nombre SMAD se debe a que estas proteínas son homólogas de la proteína MAD de la mosca *Drosophila* (por su siglas en inglés Mothers Against Decantaplegic, donde "decantapléjico" se refiere a una proteína de la mosca homóloga a la proteína morfogénica ósea humana) y la proteína SMA de *Caenorhabditis elegans* (del gen "sma" de la palabra "small", cuerpo pequeño en vista de su capacidad de alterar el tamaño corporal) (127)

Durante la eritropoyesis y en cuadros de anemia, se requiere disponer de la mayor cantidad de hierro circulante, es de esperarse entonces que ambas situaciones regulen negativamente la expresión de Hep, la eritropoyetina (ERO) lo hace mediante el factor de transcripción $C/EBP\alpha$ (*CCAATT-enhancer protein binding alpha*) y en anemia ocurre mediante el factor de transcripción GDF15 (*growth differentiation factor 15*) (41).

Existen otras condiciones que regulan la expresión de hepcidina como la hipoxia y el estrés del retículo endoplasmático (42), sin embargo, no se detallan por no corresponder con el objetivo central de este proyecto.

1.1.1.4.2. Celular

A nivel celular la homeostasis del hierro es regulada por las proteínas reguladoras de hierro (IRP1 y IRP2) (2). IRP1 es ubicua y funciona bajo condiciones normales de concentración de oxígeno mientras que IRP2 se activa en hipoxia (43). Uno de los mecanismos más directos de regulación opera sobre la síntesis de ferritina y receptores de transferrina en un sistema opuesto dependiente de las concentraciones de hierro circulante (7). En ID, las IRP se unen al respectivo elemento de respuesta al hierro (IRE), para el caso de ferritina bloquean la traducción (menos depósitos de hierro) y para receptor de transferrina estabilizan el RNAm impidiendo que las endonucleasas lo degraden y permitiendo la traducción (mayor captación). En suficiencia de hierro ocurre el mecanismo opuesto (44). En la Figura 4 se representan estos mecanismos.

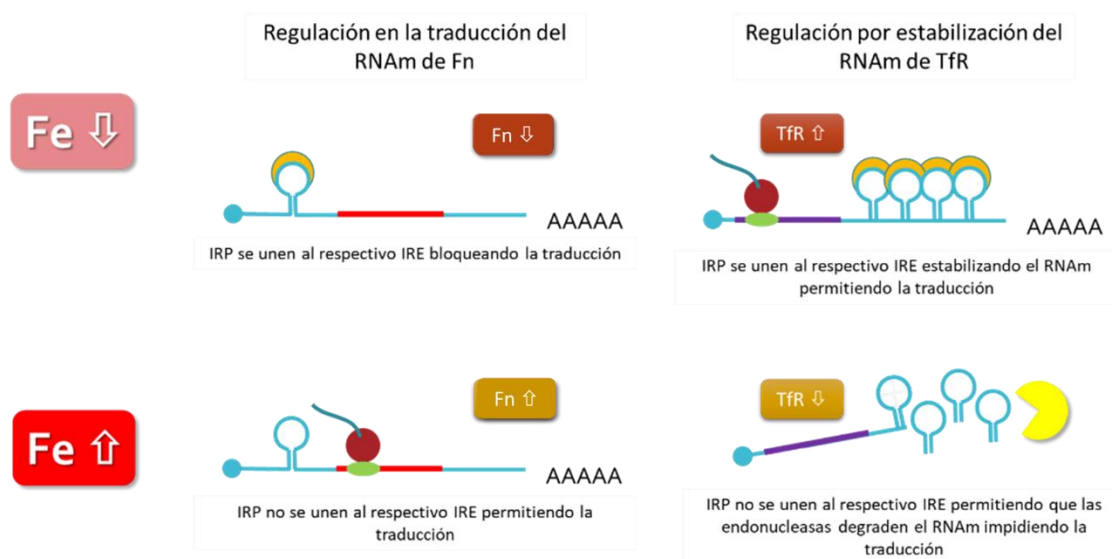


Figura 4. Representación de la regulación de la homeostasis del hierro por el sistema IRE/IRP
Adaptado de Wilkinson y Pantopoulos, 2014 (44)

1.1.1.5. Interacción con otros nutrientes

Los nutrientes usualmente no ejercen su función biológica de manera aislada, existen interacciones entre ellos que pueden potenciar su bioactividad (sinergias) o, por el contrario, reducirla e incluso inactivarla (antagonismos) (45). En el caso particular del hierro se ha identificado que su homeostasis se ve influenciada por la vitamina C (ácido ascórbico), el calcio, las proteínas, el zinc, la vitamina B12 y la vitamina A (46,47). Concretamente el estudio sobre la interacción con la Vitamina A ha tenido varias aproximaciones que se consideran en el siguiente apartado.

1.1.2. Vitamina A

1.1.2.1. Generalidades

La vitamina A es un nutriente esencial perteneciente al grupo de las vitaminas liposolubles, juega un rol fundamental en diversos procesos metabólicos como la visión, la hematopoyesis, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, las funciones del sistema inmune y la transcripción génica (48). El término vitamina A es usualmente asociado con el retinol o con compuestos con actividad biológica de retinol, todos ellos son carotenoides, si bien hay más de 600 carotenoides conocidos, aproximadamente 50 presentan algún tipo de actividad de vitamina A y son llamados provitaminas A (49), en la Figura 5 se representan las estructuras moleculares del betacaroteno, la vitamina A (retinol) y sus principales derivados.

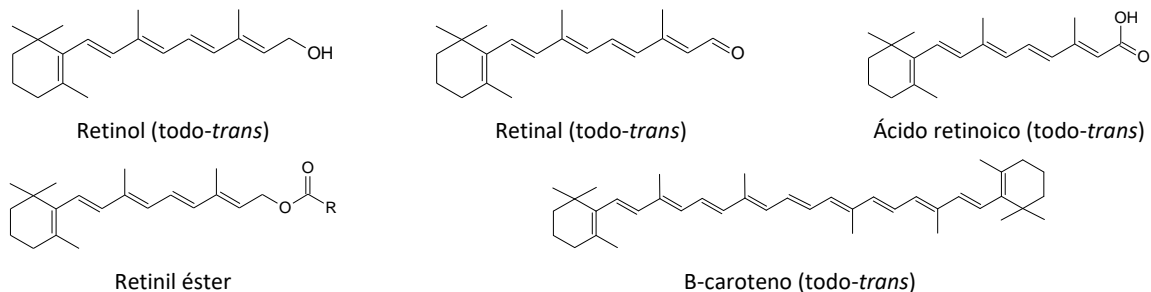
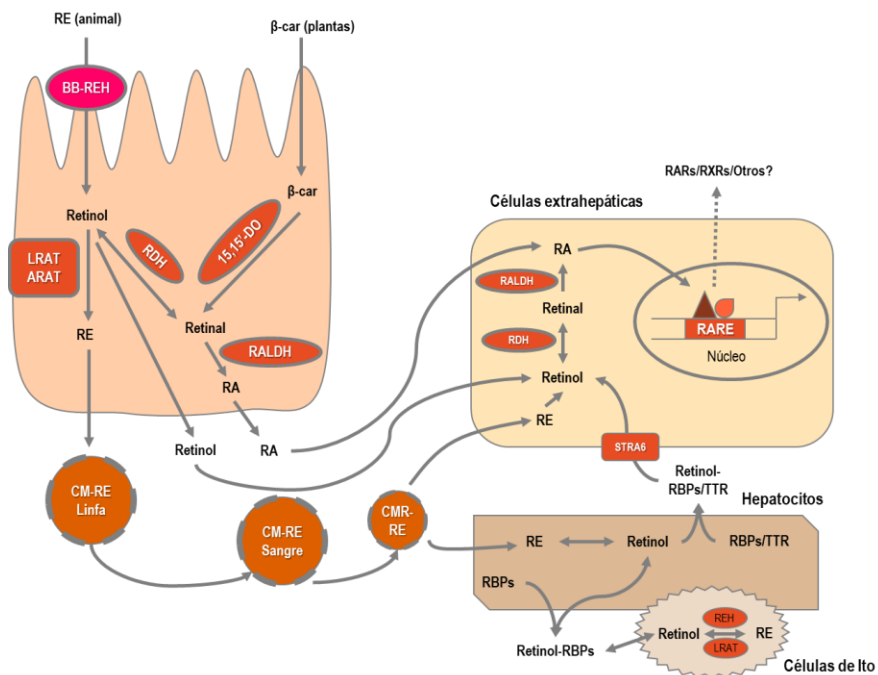


Figura 5. Estructuras de la vitamina A (retinol), sus principales derivados y betacaroteno
Adaptado de Ball, 2006 (49)

La vitamina A se encuentra principalmente en alimentos de origen animal en forma de ésteres de retinol (principalmente retinol palmitato), en alimentos de origen vegetal, se encuentra en forma de los mencionados carotenoides con actividad de provitamina A (betacaroteno, alfacaroteno, betacriptoxantina), éstos pueden ser hidrolizados y metabolizados a su forma de retinol luego de su absorción (49).

1.1.2.2. Digestión, absorción y eflujo

Las dos principales formas dietarias de la vitamina A (ésteres de retinol y carotenoides) tienen rutas de absorción diferentes en el enterocito. Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen intestinal por una retinol hidrolasa del borde en ribete de la célula intestinal (BB-REH), produciendo retinol libre y el respectivo ácido graso, luego de lo cual el retinol es absorbido. En el interior del enterocito, el retinol libre puede tener tres destinos diferentes: (a) ser reesterificado nuevamente a éster de retinol gracias a la acción de dos enzimas: Lecitin-retinol aciltransferasa (LRAT) y acilCoA-retinol aciltransferasa (ARAT) para ser exportado al torrente linfático en los quilomicrones, pasando luego a la sangre de donde puede dirigirse a los hepatocitos o a las células extrahepáticas; (b) ser oxidado a retinal (retinaldehído) mediante la enzima retinol deshidrogenasa (RDH) y nuevamente oxidado a ácido retinoico por la enzima retinal deshidrogenasa (RALDH) forma en la cual sale del enterocito a la circulación sanguínea hacia las células extrahepáticas; y (c) ser exportado en su forma de retinol al torrente sanguíneo igualmente hacia las células extrahepáticas (50). La Figura 6 representa los principales mecanismos de absorción y transporte de la vitamina A a través del enterocito y hacia los principales tejidos donde actúa.



RE: Éster de retinil. **BB-REH:** Retinil hidrolasa del borde en ribete. **LRAT:** Lecitin:retinol aciltransferasa. **ARAT:** acilCoA-retinol aciltransferasa. **CM:** Quilomicrón. **CMR:** Remanente de quilomicrón. **RDH:** Retinol deshidrogenasa. **15,15'-DO:** 15,15'-dioxigenasa. **RA:** Ácido retinoico. **RALDH:** Retinal deshidrogenasa. **RARE:** Elementos de respuesta al ácido retinoico. **RARs:** Receptores de ácido retinoico. **RXRs:** Receptores X para retinoides. **RBP:** Proteína ligante de retinol. **TTR:** Transtiretina. **STRA6:** Receptor de unión transmembrana (Stimulated by retinoic acid 6).

Figura 6. Absorción y transporte de la vitamina A
Adaptado de Reboul, 2013 (51) y Chen y Chen, 2014 (50)

1.1.3. Anemia

1.1.3.1. Definición

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la anemia como aquella condición en la cual el número de glóbulos rojos o su capacidad para transportar oxígeno es insuficiente para cubrir las necesidades fisiológicas. Particularmente, la anemia ferropénica impacta considerablemente a niños y adolescentes con deficiencias en su capacidad cognitiva (impacto en el aprendizaje), desarrollo y rendimiento físico y estado inmune (mayor propensión a infecciones) y en mujeres gestantes aumenta el riesgo de parto prematuro, mortalidad perinatal y neonatal (52). Adicionalmente en el sujeto con anemia puede incrementarse la captación de metales pesados elevando el riesgo de envenenamiento, especialmente en lugares donde haya una alta exposición a los mismos (53). Si bien hay un alto impacto en grupos en riesgo como niños menores de cinco años y mujeres en edad fértil, la anemia es una enfermedad que es crítica para todos los grupos etarios y para ambos sexos, lo cual la convierte en un problema de salud pública de alto impacto (54).

Desde un punto de vista fisiológico, la anemia es una enfermedad caracterizada por la presencia de bajos niveles de hemoglobina en la sangre, relacionada con una deficiente calidad o cantidad de glóbulos rojos, se suele asociar únicamente con deficiencia de hierro sin embargo aunque los bajos niveles de este mineral son los responsables aproximadamente del 50% de los cuadros de anemia existente (IDA), hay otras causas nutricionales (deficiencias de otros micronutrientes o factores antinutricionales) o no nutricionales (infecciones, hemorragias, condiciones genéticas, entre otras) que la generan (55).

Para determinar la existencia de anemia e IDA la OMS ha establecido puntos de corte basados en el nivel de hemoglobina y ferritina en la sangre de acuerdo con el grupo de edad; la anemia se clasifica en función de los niveles de hemoglobina, la ID según los niveles de ferritina y la IDA con la coexistencia de ambas condiciones (ver Tabla 1) (56).

Tabla 1. Puntos de corte de los valores de hemoglobina y ferritina para definir anemia, ID e IDA.

Población	Hemoglobina (g/dL)	Ferritina (µg/L)
Niños 6 – 59 meses	<11	<12
Niños 5 – 12 años	<12	<15
Adolescentes 13 – 17 año	<12*	<15
Mujeres en edad fértil no gestantes	<12	<15
Mujeres gestantes	<11	<15

*13 g/dL en varones, 12 g/dL en mujeres; (57)

1.1.3.2. Epidemiología

La anemia es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, específicamente la anemia ferropénica por el impacto previamente mencionado en la capacidad productiva de la población, el riesgo aumentado de la mortalidad en niños y madres gestantes e incremento en los cuadros infecciosos entre otros (58). Para clasificar el nivel de impacto en salud pública se han establecido los siguientes valores basados en la prevalencia de la enfermedad en una población específica: <5% no es un problema de salud pública; 5-19.9% es un problema leve; 20-39.9% es un problema moderado, >40% es un problema grave (59). Definir estrategias para intervenir en los casos donde se supera el 20% de la prevalencia en la población es de alta importancia independiente de que el abordaje sea social, económico, cultural o político, pues además de reducir la mortalidad infantil, se reducen los costos por atención en salud a madres gestantes, neonatos y niños, se incrementa la capacidad productiva de la población (cognitiva y físicamente) y se disminuyen los costos generales por atención a enfermedades críticas (55).

De acuerdo con el reporte sobre la Prevalencia Mundial de Anemia en 2011, el 42.6% de los niños en edad preescolar (0 a 5 años) estaba afectado, para el grupo de mujeres en edad fértil (15 a 50 años) el porcentaje correspondía a 29.4% y para mujeres embarazadas (sin rango de edad) era del 38.2%, en la Tabla 2 se detallan las prevalencias por regiones a nivel mundial (52).

Tabla 2. Prevalencia de anemia en 2011 por región

Región (52)	Niños menores de cinco años	Mujeres gestantes	Mujeres no gestantes (en edad fértil)
África	62.3%	46.3%	37.8%
Américas	22.3%	24.9%	16.5%
Sudeste asiático	53.8%	48.7%	41.5%
Europa	22.9%	25.8%	22.5%
Mediterráneo Oriental	48.6%	38.9%	37.7%
Pacífico Occidental	21.9%	24.3%	19.8%
Total	42.6%	38.2%	29.0%

Cruzando estos datos con los rangos establecidos por la OMS para clasificar el impacto en salud pública, resulta claro entonces que, a nivel mundial, la anemia en mujeres en edad fértil representa **un problema moderado**, mientras los niños en edad preescolar y las madres gestantes con anemia son **un problema severo** que requiere de máxima atención.

En Colombia, las dos últimas Encuestas Nacionales de Situación Nutricional (ENSIN) de los años 2010 y 2015 han mostrado datos preocupantes en cuanto a anemia, ID y VAD (60,61) (Tabla 3), especialmente si

se considera el potencial efecto que puede jugar la VAD sobre la homeostasis del hierro tal como se discutirá más adelante.

Tabla 3. Prevalencias de ID, anemia nutricional y VAD en niños en Colombia entre 2010 y 2015

Población	Deficiencia de hierro (IC=95%)		Anemia (IC=95%)		Deficiencia de vitamina A (IC=95%)	
	2010	2015	2010	2015	2010	2015
Niños de 6 a 59 meses	N.D.	N.D.	27.5% (26.1-28.9)	24.7% (23.2-26.2)	N.D.	N.D.
Niños de 1 a 4 años	10.6% (9.3-12.0)	14.8% (13.5-17.1)	N.D.		24.3% (22.5-26.1)	27.3% (25.4-29.2)

1.1.3.3. Anemia por deficiencia de hierro

La anemia por deficiencia de hierro se atribuye, fundamentalmente, a factores nutricionales y antinutricionales presentes en la dieta que impiden la absorción del hierro en el intestino o la utilización del mineral por el organismo (46,62). Si bien deficiencia de hierro (ID por sus siglas en inglés) y anemia por deficiencia de hierro (IDA) no son lo mismo, la segunda es uno de los signos más evidentes de la primera; sin embargo, la ID comprende un amplio rango de condiciones que, incluso, pueden no estar relacionadas con anemia en sí (63).

La deficiencia de hierro está asociada principalmente con factores dietarios, la malnutrición es el más relevante; también se considera el caso de prácticas dietarias como el veganismo y vegetarianismo donde no se cuenta con un adecuado suministro de hierro en los alimentos y, unido a ello, se tiene la presencia de factores antinutricionales presentes en alimentos de origen vegetal que disminuyen la biodisponibilidad del mismo como los fitatos y oxalatos (64).

Dependiendo de sus causas y del enfoque, la ID y la IDA pueden clasificarse en diferentes grupos tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de la ID y la IDA

Enfoque	Clasificación	Mecanismos
Fisiopatología	ID relativa	Depósitos de hierro reducidos
	ID absoluta	ID en tejidos específicos con depósitos de hierro normales o altos (p.e. ID en falla cardíaca, eritropoiesis con restricción de hierro)
Basado en datos clínicos	ID	Depósitos de hierro reducidos con ausencia de anemia
	IDA	ID + Hb baja Glóbulos rojos hipocrómicos y microcíticos
Herencia	Genética (rara): Anemia por deficiencia de hierro refractaria al hierro (IRIDA)	Excesiva producción de hepcidina por mutación en el gen que codifica matriptasa-2
	Adquirida (común)	Demandas aumentadas de hierro, ingesta disminuída, pérdidas sanguíneas, absorción reducida

Adaptado de Camaschella, 2017 (43)

1.1.4. Vitamina A, hierro y anemia

La vitamina A es uno de los factores nutricionales de la dieta que se cree modifica la utilización corporal del hierro dietario, sin embargo, el mecanismo mediante el cual ejerce este tipo de efecto aún no está claramente establecido aunque la poca evidencia con que se cuenta desde el punto de vista mecanístico, indica que la acción es más sobre el metabolismo del hierro que sobre su absorción (40,65).

La interacción que existe entre la vitamina A y el metabolismo del hierro ha sido propuesta desde inicios del siglo XX (66); la observación de la relación directa entre los niveles de retinol plasmático y hemoglobina y hierro sérico ha sido estudiada encontrando que la vitamina A regula la abundancia del receptor de transferrina y la ferritina modulando así la homeostasis del hierro; en 1979 se propuso el efecto de la vitamina A sobre la hematopoyesis a partir de un estudio en humanos (n=8) en el cual se partió de una dieta deficiente en vitamina A durante los primeros 500 días (en promedio) del estudio, de ellos los primeros 400 días fueron normales en hierro y desde el día 100 hasta el final del estudio tuvieron una suplementación con gluconato ferroso (310 mg/d), al finalizar el período de depleción se suministró una dieta suplementada con vitamina A o betacaroteno durante aproximadamente 200 días más comprobando que, si bien la suplementación con hierro incrementaba los niveles de hemoglobina, a mayores niveles de retinol plasmático ésta también aumentaba, esto se evidenció comparando tres grupos divididos en función del retinol, en el grupo bajo (RE < 10 µg/dL) la concentración de hemoglobina fue de 11.87 ± 0.72 g/dL, en el grupo adecuado (RE 20-30 µg/dL) fue de 12.92 ± 1.01 g/dL y en el grupo abundante (RE > 30 µg/dL) fue de 15.64 ± 0.55 , las diferencias entre los grupos fueron significativas (P < 0.01); el mismo estudio analizó más de 30 encuestas en diferentes países entre 1954 y 1968, de ellas tomaron 8 países o regiones (Vietnam, Chile, noreste de Brasil, Uruguay, Ecuador, Venezuela, Guatemala y Etiopía) y encontraron una correlación directa entre retinol plasmático hemoglobina (R = 0.777; P < 0.05; Hb = 10.81 + 0.07 RE); por último en el mismo estudio se empleó modelo animal en ratas Sprague-Dawley (n=45) divididas en tres grupos, dos de ellos (grupos control) recibían una dieta normal suplementada con vitamina A (retinil palmitato 6500 UI/kg de dieta) a voluntad o controlada y el grupo de estudio tuvo la dieta deficiente en vitamina A, al finalizar el estudio no se encontraron diferencias entre los grupos control pero si se evidenció significativamente que había diferencias respecto del grupo de estudio en los niveles de retinol hepático (µg/g en peso seco; 298 ± 70.5 y 307.9 ± 45.3 vs 7.3 ± 6.3 ; P < 0.01) y hemoglobina (g/dL; 15.1 ± 1.4 y 15.0 ± 1.5 vs 13.1 ± 1.6 ; P < 0,05) (67).

Un estudio realizado en 1996 propuso la relación entre vitamina A y eritropoyesis, en él trabajaron con once ratas Wistar macho deficientes en vitamina A (VAD), a la edad de 12 semanas 7 de ellas fueron sacrificadas y las 4 restantes recibieron una dosis intraperitoneal de 5 mg de retinil acetato y adicionalmente una dieta suplementada con vitamina A y a los tres días fueron sacrificadas, los resultados mostraron que la suplementación con vitamina A podría mejorar la eritropoyesis al incrementar la mielopoyesis pues encontraron una diferencia significativa entre el recuento de las células mielopoyéticas del grupo VAD ($44.3\% \pm 3.7\%$) y el grupo suplementado ($57.5\% \pm 0.5\%$), $P < 0.012$, sin embargo no hallaron un efecto claro directo sobre la eritropoyesis (68). El mismo grupo en otro estudio con ratas Wistar macho ($n = 72$) trabajó un grupo con dieta adecuada en vitamina A (1200 ER/kg) y hierro (35 mg/kg) y otro grupo sin vitamina A pero adecuado en hierro, al día 25 ambos grupos entraron en depleción de hierro, al día 60 se comenzó a suministrar hierro a ambos grupos aunque cada uno se dividió a la mitad recibiendo uno la dieta adecuada en vitamina A y otro la dieta deficiente, los animales se sacrificaron al día 72, se tomaron muestras de sangre a los días 25, 39 y 60, se conservaron riñones, hígado, bazo y patas traseras; los análisis reportaron que en animales con deficiencias de ambos micronutrientes, la suplementación conjunta incrementó los niveles de hierro mucho más que cuando se suministraba el mineral solo, se demostró esto al observar el incremento en la capacidad para ligar hierro ($\mu\text{mol/L}$, 72.39 vs 91.87, $P < 0.05$) y la disminución en bazo ($\mu\text{mol/g}$ peso seco, 23.4 vs 44.17, $P < 0.05$) y tibia (1.59 vs 1.07), señales de una adecuada homeostasis (69); sin embargo el grupo de Roodenburg y colaboradores plantearon en el año 2000 que la vitamina A no tenía tal efecto sobre la eritropoyesis (algo que habían propuesto en 1996) aunque sí sobre la regulación de transferrina y el depósito de hierro en el bazo y en los huesos, para ello trabajaron con ratas Wistar macho y compararon tres dietas (normal, deficiente de vitamina A [-VA] y deficiente de hierro [-Fe]), a los doce días del experimento se observaron disminuciones significativas de retinol plasmático de la dieta deficiente de vitamina A en comparación con el control ($P < 0.05$) y de la dieta deficiente en hierro en comparación con la dieta control ($P < 0.001$), a los setenta días ambas dietas presentaron diferencias significativas con el control al mismo nivel ($P < 0.001$); respecto de los niveles de retinol hepático sólo se presentaron diferencias de la dieta deficiente en vitamina A con el control en el día doce y en el día 70 no se detectó vitamina A ($P < 0.001$), únicamente se encontró aumento en el peso del hígado (g) tanto en la dieta deficiente de vitamina A al día setenta (9.23 ± 0.29 vs 10.05 ± 0.20 , $P < 0.001$) y en la dieta deficiente de hierro (8.51 ± 0.26 vs 11.34 ± 0.22 , $P < 0.05$), uno de los hallazgos más considerables se relacionó con el aumento de los depósitos de hierro ($\mu\text{mol/g}$, peso seco) cuando había

déficit de vitamina A al día setenta tanto en bazo (29.75 ± 1.77 vs 44.61 ± 6.35 , $P < 0.001$) como en tibia (1.28 ± 0.04 vs 1.55 ± 0.08 , $P < 0.01$) (70).

El estudio realizado por Jiang y colaboradores demostró mediante el uso de modelo animal y cultivos celulares de hepatocitos de rata, que la vitamina A está involucrada en la regulación de la proteína reguladora de hierro 2 (IRP-2 por sus siglas en inglés) y de esta manera afecta subsecuentemente la expresión de los genes de transferrina y ferritina, para ello emplearon 48 ratas Sprague-Dawley machos, divididas en cuatro grupos para cuatro dietas diferentes: Control = 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vA y 45 mg/kg Fe, +Fe0vA = 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vA y 45 mg/kg Fe, +Fe-vA = 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vA y 45 mg/kg Fe, -Fe-vA = 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vA y 15 mg/kg Fe, un quinto grupo de 20 ratas recibieron una dieta deficiente de ambos micronutrientes para obtener de ellas los hepatocitos para el cultivo celular. Los resultados reportaron diferencias significativas ($P < 0,05$) frente al control en las tres dietas para los niveles de hierro sérico, ferritina sérica y receptor de transferrina sérico, al evaluar el efecto de ácido retinoico todo-*trans* (ARtt) sobre IRP-2 se encontró que era inverso, es decir a mayores niveles de ARtt menores niveles de IRP-2 (65).

A nivel de estudios en humanos, se ha determinado la interacción entre vitamina A y hierro mediante mediciones en plasma, tal como se hizo en las Islas Marshall entre noviembre de 1994 y marzo de 1995, 919 niños entre 1 y 5 años fueron seleccionados y se tomaron muestras de sangre venosa a las cuales se les determinaron los niveles de hemoglobina, retinol y ferritina; se encontró que un 33.2% de los niños presentaban simultáneamente deficiencia de hierro y de vitamina A (edad promedio 3.09 ± 1.30 años) y un 23% de los niños tenía anemia y era deficiente de vitamina A ($P = 0.0095$), se trató de describir la correlación existente entre retinol sérico y hemoglobina empleando el coeficiente de correlación de Spearman, encontrando una leve asociación entre ambos marcadores ($r = 0.159$, $P < 0.0001$) (71).

Dado que las mujeres gestantes también son población vulnerable para anemia y deficiencia de vitamina A, se ha evaluado el efecto que la combinación de ambos puede tener sobre la salud de la madre, particularmente sobre su sistema inmune se llevó a cabo un estudio en China durante dos meses con 186 mujeres gestantes anémicas, divididas en cuatro grupos, uno recibió 60 mg de hierro diariamente como sulfato ferroso, un segundo grupo recibió adicionalmente 0.4 mg de ácido fólico, un tercero tuvo adición de 2.0 mg de retinol y un cuarto grupo se tomó como placebo; el grupo que recibió los tres micronutrientes presentó incrementos significativos en hemoglobina y ferritina en comparación con el placebo (18.4 g/L, 95% CI: 15.5, 21.4) y se encontró un incremento significativo también en los niveles de IL-2 igualmente en

comparación con el placebo (206 ng/L, 95% CI: 160-253). En Egipto se hizo un estudio con 200 mujeres gestantes sanas, se encontró que el 23.5% presentaban deficiencia de vitamina A ($0.56 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$ retinol) y para ellas los valores de hemoglobina fueron significativamente más bajos en comparación con las madres que no eran deficientes en vitamina A, el estudio reportó una positiva correlación entre el retinol sérico y los niveles de hemoglobina ($r = 0.487$, $P < 0.001$) y un riesgo relativo para anemia de 2.7 (CI = 2.12–3.3) cuando las pacientes presentaban déficit de vitamina A en relación con aquellas que no lo presentaban (72).

Esta interacción ha sido validada en ensayos clínicos con poblaciones vulnerables, como se hizo en China con 226 niños en edad preescolar (2-6 años) en un estudio doble ciego aleatorizado entre diciembre de 2005 y junio de 2006, a los niños divididos en tres grupos diferentes, se les suministró durante seis meses una dieta fortificada con vitamina A, vitamina A con hierro y vitamina A, hierro y otros micronutrientes, se empleó la forma de adición directa o *sprinkles*; se encontró que la fortificación conjunta con hierro mejoró notablemente los marcadores nutricionales y disminuyó las incidencias en cuadros infecciosos (73). Un estudio realizado en Irán entre febrero de 2008 y mayo de 2009, seleccionó un grupo de 1242 mujeres en edad fértil no gestantes para realizar mediciones de marcadores bioquímicos que dieran indicios de la asociación entre vitamina A y hierro, se hicieron mediciones de ferritina sérica, receptores de transferrina séricos, retinol sérico y α -tocoferol; se encontró una prevalencia de anemia de 8.7% ($P=0.934$), deficiencia de hierro de 25.4% ($P=0.728$), anemia por deficiencia de hierro 4.6% ($P=0.487$) y deficiencia de vitamina A de 1.2% ($P=0.208$), aunque en términos generales la población no mostró datos para considerar una prevalencia de deficiencia de ambos nutrientes, se encontró que el grupo anémico presentó valores de retinol inferiores a los del grupo sano ($2.13 \pm 0.66 \mu\text{mol/L}$ vs $2.41 \pm 0.64 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.0001$); adicionalmente el análisis de regresión múltiple ajustado para la edad encontró una correlación positiva entre retinol sérico y hemoglobina ($\beta=0.18$, $P < 0.0001$) que respalda la importancia de contar con niveles adecuados de ambos micronutrientes (74).

La participación de un nuevo marcador bioquímico ha sido hallada en un estudio reciente realizado sobre muestras de sangre de mujeres gestantes de Nepal, las muestras habían sido tomadas entre 1994 y 1997 e hicieron parte del Proyecto de Intervención Nutricional en Nepal (NNIPS), de las muestras conservadas se seleccionaron 589 para medir los niveles de IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina-1), betacaroteno, retinol y ferritina sérica; el estudio propuso las vías mediante las cuales el IGF-1 podía ser un indicador para la disminución del riesgo de anemia por deficiencia de hierro luego de la administración

de vitamina A, efectivamente se encontró que, clasificando por cuartiles según los niveles de IGF-1, a medida que éste aumentaba también lo hacían los niveles de hemoglobina y estaba directamente relacionado con los niveles de retinol, por cada 0.1 mol/L de retinol sérico había un incremento de 2.6 g/L de IGF-1 ($R^2=0.18$, $P<0.0001$) (75).

En Colombia no se han realizado estudios que correlacionen las deficiencias de ambos nutrientes, aunque hay datos estadísticos de las Encuestas Nacionales de Situación Nutricional (ENSIN) y hay dos estudios sobre el estado de micronutrientes en niños donde se abordan hierro y vitamina A, uno de ellos realizado por Poveda *et al* en 2007 hizo una valoración de estado de hierro y vitamina A en niños preescolares del municipio de Funza pero no se realizó ningún tipo de relación entre ellos para validar un posible efecto del uno sobre el otro (76). El otro fue realizado por Villamor *et al* en 2017 y analizó, entre otros marcadores, hemoglobina, ferritina y vitamina A, pero sin abordar análisis de interacciones entre ellos (77).

1.1.4.1. Vitamina A y marcadores de homeostasis del hierro

La acumulación de hierro en un tejido puede desencadenar un efecto altamente oxidativo, para evitar esto se almacena el mineral en forma de ferritina, usualmente se ha encontrado que bajo niveles adecuados de vitamina A y sobrecarga de hierro se estimula la síntesis de ferritina validando de esta forma la capacidad antioxidante del retinol; sin embargo es posible que exista otro mecanismo molecular para controlar los excesos de hierro por causas nutricionales, un estudio con modelo animal demostró que la deficiencia de vitamina A, bajo concentraciones normales de hierro, parece incrementar la producción de hepcidina y no tiene ningún efecto en la expresión de ferroportina, HEPH y DMT1 (78,79).

Estudios posteriores empleando modelos *in vitro* (Caco-2) e *in vivo* (ratones BALB/c macho y ratas Wistar macho), encontró que la deficiencia de vitamina A regula indirectamente la acción de la ferroportina mediante la regulación de la expresión de hepcidina, aunque el mecanismo no es completamente claro, adicionalmente se encontró que los niveles de ferritina y la expresión de DMT1, Dctyb y TfR no se veían afectados, por lo tanto el efecto de vitamina A sobre los niveles de hierro se relaciona directamente con su metabolismo y no con su absorción o transporte (80).

El estudio realizado por da Cunha *et al* en 2014, encontró igualmente un efecto de regulación negativa de vitamina A sobre hepcidina pero como un efecto indirecto de una completa cascada de señalización y

regulación que parte de una elevada eritrofagocitosis lo que ocasiona un incremento del hierro en el tejido esplénico y una deficiencia del reciclaje del mineral en el cuerpo por acumulación de grupo hemo (40).

De acuerdo con los hallazgos de la búsqueda realizada, aún son pocos los trabajos realizados para describir el rol que tiene la vitamina sobre la anemia aún en condiciones de suplementación normal de hierro y su relación con los marcadores de su homeostasis, por lo tanto, se requiere profundizar más en este tema para tratar de identificar el mecanismo exacto mediante el cual la vitamina A es un micronutriente fundamental para una adecuada utilización del hierro y la reducción de anemia.

1.1.5. El modelo animal en investigaciones sobre nutrición

Si bien ya se ha hecho alusión a varios estudios sobre el metabolismo del hierro y vitamina A en los cuales se empleó el modelo murino, es importante finalizar esta sección resaltando la validez de éste, especialmente cuando la experimentación en humanos reviste dificultades de índole ético, metodológico y financiero.

En los estudios previamente mencionados se habla con frecuencia del uso del modelo *in vitro* en células Caco-2, este modelo resulta bastante útil cuando se desean estudiar algunos elementos del metabolismo del hierro en relación únicamente con el comportamiento del enterocito, sin embargo cuando se requiere evaluar la interacción con otro tipo de tejidos, como el hepático, el uso de co-cultivos, aunque parece ser una buena herramienta, aún no está totalmente estandarizado y no permite describir el comportamiento global en términos de interacciones con otros metabolitos como, por ejemplo, algunas hormonas (81).

El empleo del modelo murino frente al *in vitro* presenta entonces la gran ventaja de la disponibilidad de diferentes tejidos para estudiar la expresión de numerosas proteínas asociadas al nutriente de interés, particularmente en relación a la homeostasis del hierro la rata es un animal que presenta un mecanismo de absorción similar al humano, aunque es importante destacar que hay diferencias entre la forma como se emplea el hierro hemínico y el no-hemínico (82) para efectos de comparación en este estudio se enfocará específicamente en hierro no-hemínico.

1.2. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El suministro conjunto de ambos micronutrientes, hierro y vitamina A, podría ser una estrategia para abordar la problemática de la IDA desde un punto de vista de salud pública. En Colombia, desde 1996 gracias al decreto 1944, es obligatoria la fortificación de harina de trigo con vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido fólico y hierro (83). De otro lado en 1998 mediante el decreto 1324 se estableció la fortificación de azúcar con vitamina A (84) y se le otorgó a los fabricantes un plazo de ocho meses para dar cumplimiento al mismo, al cabo de los cuales se dió una prórroga de otros ocho meses para, finalmente, sancionar un nuevo decreto que establecía la necesidad de *“adelantar otros estudios de factibilidad que reporten nuevas opciones de fortificación, en cuanto a varias alternativas de alimentos de consumo básico, para fortificarlos con vitamina A, a menores costos de producción”* y derogaba completamente el decreto 1324 de 1998 dejando al país sin una estrategia de suministro de vitamina A para la población, especialmente la más vulnerable (85).

Debido a las limitaciones propias de la experimentación en humanos, particularmente en niños, el modelo murino se convierte en una alternativa válida para evaluar el metabolismo del hierro y los efectos de otros nutrientes sobre éste. En el presente proyecto, se propuso utilizar el modelo murino (ratas Wistar SPF) como aproximación al estudio del efecto de la deficiencia de vitamina A sobre la homeostasis del hierro. Los resultados de este estudio brindaron argumentos científicos que respalden el diseño de estudios en humanos que permitan evaluar las mismas variables y a largo plazo permitir el diseño de alimentos fortificados o suplementos que contribuyan, en parte, a mejorar el problema de anemia nutricional en el país.

Basados en la evidencia teórica sobre la relación existente entre la vitamina A y el metabolismo del hierro y partiendo del hecho de que la fortificación de harina de trigo con hierro no parece tener un impacto sensible en la disminución de anemia en Colombia unido a una ausencia de planes de fortificación con vitamina A, la pregunta que nos planteamos fue: ***¿Tiene la deficiencia de vitamina A (VAD) algún efecto sobre la homeostasis del hierro en un modelo murino, evidenciado en variaciones en sus biomarcadores y, debido a esto, alguna relación con la anemia por deficiencia de hierro (IDA)?***

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

Determinar el efecto de la vitamina A sobre la homeostasis del hierro en ratas Wistar macho recién destetados.

1.3.2. Específicos

- Determinar el efecto de las deficiencias simples y combinadas de hierro y vitamina sobre la ganancia de peso en ratas Wistar macho recién destetadas.
- Determinar el efecto de la deficiencia de vitamina A sobre los principales parámetros hematológicos en ratas Wistar macho recién destetadas.
- Determinar el efecto de la deficiencia de vitamina A sobre algunos de los principales marcadores del metabolismo del hierro, a nivel post-transcripcional y post-traducciona l en ratas Wistar macho recién destetadas.

1.4. METODOLOGÍA

1.4.1. Materiales y métodos

1.4.1.1. Animales y dietas

La primera parte del experimento se desarrolló en el Bioterio de la Sede de Investigación Universitaria – SIU de la Universidad de Antioquia en Medellín. Para determinar tamaño muestral que garantizara el máximo de información con el mínimo de animales, se realizó una prueba de potencia que arrojó, para cinco grupos, un número de 7 animales por grupo, con una potencia del 80% y un nivel de confianza del 95%; se empleó información previa donde se obtuvo una diferencia de 4 g/dL de hemoglobina con una desviación estándar de 2.39 g/dL (86). En total la muestra comprendió 35 ratas Wistar SPF macho recién destetados (21 días de nacidos).

Al comenzar el estudio el peso promedio de los animales fue de 62.5 ± 6.1 g y fueron alojados en jaulas de policarbonato con cubiertas tipo malla en acero inoxidable. Las condiciones ambientales comprendieron un ciclo de luz de 12 horas, a una temperatura ambiente controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa, controlada también entre 55% y 65%, el aire se renovaba cada 4 minutos.

Los animales tuvieron libre acceso al alimento y a agua desmineralizada de dispensadores de policarbonato y fueron pesados cada dos semanas empleando una balanza digital con resolución de 0.1 g (Precisa BJ2100D). Todo el procedimiento fue aprobado por los Comités de Ética de la Universidad de Antioquia (#108.090217) y de la Universidad de La Sabana ((#55.170516).

Los animales fueron asignados aleatoriamente a cinco grupos con dietas diferentes, siete animales por grupo cada grupo en una jaula. El grupo **control** fue alimentado con una dieta estándar AIN-93G para roedores en crecimiento, la cual fue modificada para proveer suficiente hierro (como citrato férrico, 45 mg/kg) y suficiente vitamina A (como retinol acetato, 1200 µg /kg). Los cuatro grupos experimentales fueron alimentados con dietas AIN-93G modificadas de la siguiente forma: **grupo FesvAd** (45 mg/kg de hierro; sin vitamina A), **grupo FesvAi** (45 mg/kg de hierro; 120 µg/kg de vitamina A), **grupo FeivAs** (15 mg/kg de hierro, 1200 µg/kg de vitamina A), y **grupo FeivAi** (15 mg/kg de hierro, 120 µg/kg de vitamina A). En la Tabla 5 se detalla la composición y el perfil nutricional de las dietas. La ingesta de alimento fue medida semanalmente para cada grupo durante el período experimental, pesando la comida remanente en las jaulas, dividiendo luego la ingesta total por el número de animales por jaula para obtener un estimado por animal. Todas las dietas fueron producidas por Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ) – (<https://www.researchdiets.com/>)

Después de seis semanas de alimentación con las dietas correspondientes, los animales fueron anestesiados con isoflurano por inhalación (Piramal Critical Care, Inc.) y se obtuvo una muestra de 500 µL de sangre completa por punción cardíaca en tubos MicroTainer con EDTA-K2 (Impromini, Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd.), esta muestra se conservó para los análisis de parámetros hematológicos. También se recolectaron 2 mL de sangre completa en tubos de suero (Vacutest gel con activador de coagulación, Vacutest Kima S.r.l.) para analizar los niveles de hierro y retinol sérico. Luego del muestreo de la sangre, los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂ (70%) asegurando la muerte por dislocación cervical. El hígado, bazo y duodeno fueron conservados en nitrógeno líquido para posteriores análisis.

Tabla 5. Composición y perfil nutricional de las dietas empleadas

Ingrediente	Control	FesVad	FesVai	FeiVas	FeiVai
Almidón de maíz	397.5	397.5	397.5	397.5	397.5
Caseína	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Maltodextrina 10-12	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0
Sacarosa	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Aceite de soya	70.0	0	0	0	0
Aceite de semilla de algodón	0	70.0	70.0	70.0	70.0
Celulosa	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mezcla de minerales ^a	35.0	35.0	35.0	0	0
Mezcla de minerales ^b	0	0	0	35	35
Mezcla de vitaminas ^c	10.0	0	0	10.0	0
Mezcla de vitaminas ^d	0	10	10	0	10
L-Cisteína	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Colina bitartrato	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Citrato férrico [17.4% Fe]	0.03	0.03	0.03	0.07	0.07
TBHQ (antioxidante)	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Retinol palmitato [500.000 IU/g]	0	0	0.0008	0	0.0008
Perfil nutricional					
Proteínas [%]	20	20	20	20	20
Grasa [%]	7	7	7	7	7
Fibra [%]	5	5	5	5	5
Carbohidratos [%]	64	64	64	64	64
Hierro [mg/kg]	45	45	45	15	15
Vitamina A [µg/kg] como retinol acetato	1200	0	120	1200	120

Los ingredientes están listados en g/kg excepto cuando se especifica otra unidad. s, suficiente; d, deficiente; i, insuficiente.

^aAIN-93G-MX. ^bAIN-93G-MX insuficiente en hierro. ^cAIN-93G-VX. ^dAIN-93G-VX sin vitamina A.

1.4.1.2. Parámetros bioquímicos

Los tubos de suero fueron centrifugados a 448-700 g/min por 15-20 minutos, el sobrenadante se dividió en dos fracciones para la determinación de los niveles de hierro y retinol sérico. Hierro y retinol, ambos en suero, fueron determinados de acuerdo con el protocolo descrito por Jiang *et al* (2012) (65); brevemente, el hierro se determinó mediante espectrometría de absorción atómica en un equipo Analyst 3100 Analyzer (Perkin Elmer Life Sciences, Wellesley, MA) y la medición del retinol sérico empleando un equipo de HPLC/UV con detector ultravioleta (PU-2080 con bomba cromatográfica, detector ultravioleta UV-2075 e integrador 807-IT; Jasco, Tokio, Japón).

1.4.1.3. Parámetros hematológicos

Se determinaron los siguientes parámetros hematológicos de acuerdo con el protocolo descrito por Mullier *et al* (2011) (87): hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM), recuento de glóbulos rojos (RBC), recuento de reticulocitos (RC), hematocritos (Hct), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) empleando un analizador hematológico URIT-2900 (Urit Medical, Guangxi, China).

1.4.1.4. qRT-PCR

1.4.1.4.1. Extracción de mRNA

Se extrajo el mRNA de los tejidos conservados a -80°C mediante el método de extracción total con TRIzol.

En la Figura 7 se detalla el protocolo empleado.

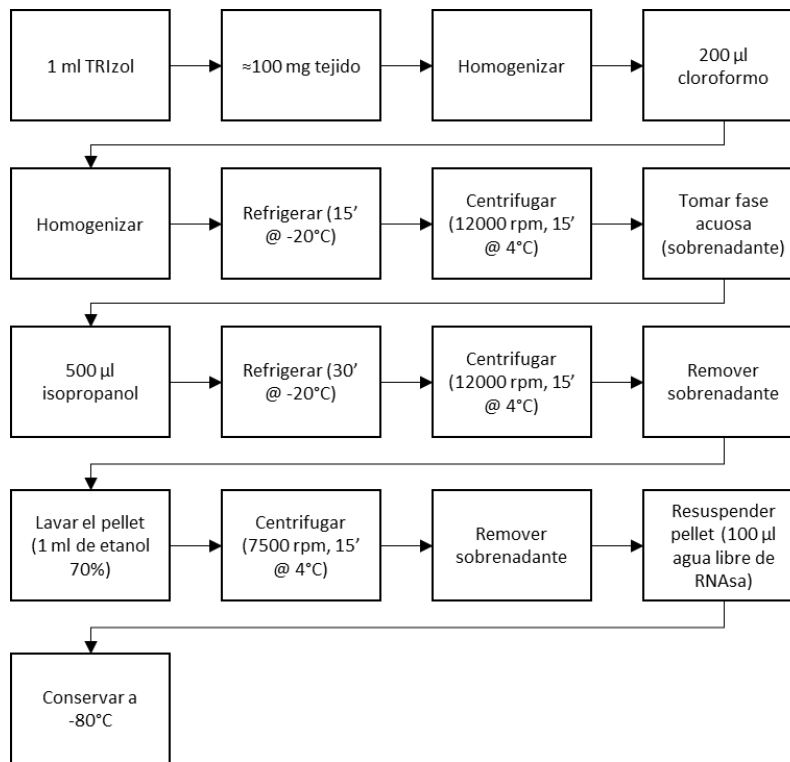


Figura 7. Protocolo de extracción de mRNA con reactivo TRIzol.

Adaptado de da Cunha *et al* (2014) (40)

1.4.1.4.2. Cuantificación de mRNA

Para determinar si se contaba con suficiente cantidad de RNAm para las pruebas de qRT-PCR se realizó una cuantificación en un equipo NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific). Se tomaron 2 μl de cada muestra, el resultado de la relación A260/A280 para las 105 muestras fue de 2.01 ± 0.02 lo que indica un RNA con baja cantidad de impurezas para proceder con la siguiente etapa del experimento (88).

1.4.1.4.3. qRT-PCR

Se corrió una qRT-PCR en un equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System con el kit *iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step* (Bio Rad Laboratories). Por cada tejido se analizaron los genes de interés

tal como se indica en la *Tabla 6* y los *primers* empleados se detallan en la *Tabla 7*, los cuales previamente fueron resuspendidos siguiendo las instrucciones del fabricante y conservados a -20°C para su uso. De cada muestra de RNAm se tomó una alícuota en función del contenido cuantificado en el equipo NanoDrop y se prepararon soluciones de trabajo estandarizadas a 100 ng/μl.

Tabla 6. Genes analizados por tejido

Gen	Bazo	Duodeno	Hígado
Hamp (Hepcidina)			+
FTH1 (Ferritina)	+	+	
Ireb2 (IRP2)	+	+	
Il6 (IL-6)			+
TFRC (Receptor de transferrina 1)	+		
Actb (β-Actina)	+	+	+

Tabla 7. *Primers* empleados para la qRT-PCR

Gen (proteína)	Forward primer	Reverse primer	Referencia
Hamp (Hepcidina)	5'-GAAGGCAAGATGGCACTAAGCA-3'	5'-TCTCGTCTGTTGCCGGAGATAG-3'	(89)
FTH1 (Ferritina)	5'-GCCCTGAAGAATTTGCCAAAT-3'	5'-TGCAGGAAGATTCGTCCACCT-3'	(90)
Ireb2 (IRP2)	5'-CTGCATCCCAGCCTATTGAAAA-3'	5'-GCACTGCTCCTAGCAATGCTTC-5'	(90)
Il6 (IL-6)	5'-GTCAACTCCATCTGCCCTTCCAG-3'	5'-GGCAGTGGCTGTCAACAACAT-3'	(90)
TFRC (Receptor de transferrina 1)	5'-ATACGTTCCCGTTGTTGAGG-3'	5'-GGCGGAACTGAGTATGGTTGA-3'	(90)
Actb (β-Actina)	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'	5'-AACACAGCCTGGATGGCTAC-3'	(91)

Se preparó una MasterMix con el kit SYBR® Green y los *primers* considerando el número de reacciones para cada gen por tejido de tal modo que cada pozo contuviera: 5 μl de SYBR® Green, 0.125 μl de transcriptasa reversa, 1 μl de *primer Forward*, 1 μl de *primer Reverse* y 1.775 μl de agua libre de nucleasas. Luego en cada pozo se depositaron 1 μl de muestra de RNAm y 9 μl de MasterMix.

Las condiciones de la qRT-PCR fueron: 50°C por 1 minuto, posteriormente 95°C por 1 minuto para activación de la polimerasa y denaturación de DNA, luego desnaturalización a 95°C por 10 segundos, alineamiento a 60°C por 10 segundos, extensión a 60°C por 30 segundos, se emplearon 40 ciclos para cada gen. La *Figura 8* resume las condiciones de operación en el equipo CFX96 Touch™. Todas las expresiones fueron normalizadas empleando beta actina como gen de referencia. Toda la información fue analizada empleando el módulo de Estudio de Genes del software Bio-Rad CFX Maestro v.1.1.

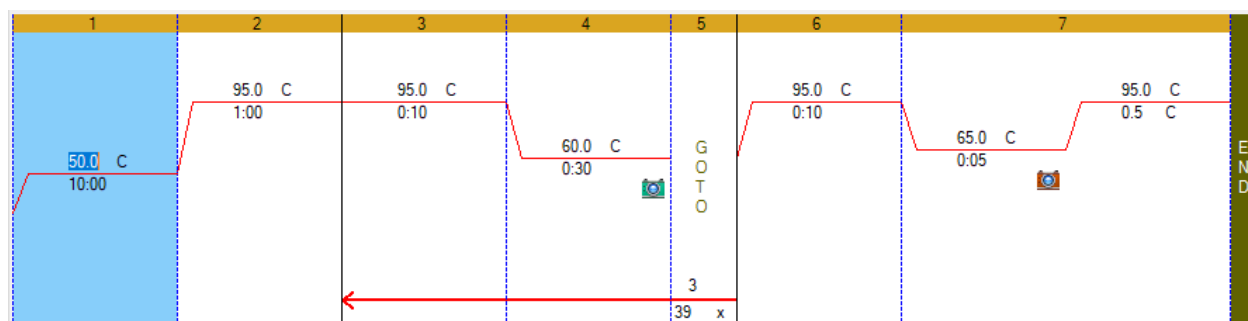


Figura 8. Condiciones de la qRT-PCR en el equipo CFX96 Touch™

1.4.1.5. Western-Blot

1.4.1.5.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la obtención de proteínas totales de los diferentes tejidos (hígados, bazos y duodenos) se preparó buffer de lisis (NaCl 150mM, PMSF 1mM, Triton X-100 1%, Tris-HCL 50mM, DTT 200mM, EDTA 1mM). Posteriormente se pesaron aproximadamente 200 mg de tejido que se introdujo en tubos con perlas de vidrio de 1 mm de diámetro. previamente preparados. Se adicionaron 500 μ l de Buffer de lisis y 50 μ l de inhibidores de proteasas (cComplete™ ULTRA Tablets – Roche, número de catálogo 05892970001). Luego se homogenizó a 4000 rpm por 90 sg en el homogenizador BeadBug (Benchmark Scientific). Posteriormente se dejaron las muestras en agitación constante a 4°C por 2 horas en un agitador orbital IKA KS260 (Fisher Scientific SL). Luego se centrifugaron a 12000 rpm por 20 min en una microcentrífuga MiniSpin® Plus (Eppendorf) y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas totales obtenidas fueron cuantificadas en el equipo Qiaxpert 200630 (Qiagen). Luego fueron fraccionadas y almacenadas a -20°C.

1.4.1.5.2. Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a membranas

Las proteínas totales obtenidas previamente fueron separadas de acuerdo con su peso molecular por medio de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, excepto las muestras destinadas a la detección de hepcidina que fueron separadas en geles SDS-PAGE al 20% debido a su bajo peso molecular (2.7 kDa).

Se usaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilion-P, Millipore) que fueron previamente activadas en metanol al 100% por 1 min. Luego se procedió a realizar la electrotransferencia

usando el método de transferencia húmeda por 2 horas a 100mA. El buffer de transferencia usado contiene; Tris base 25mM, glicina 190mM, metanol al 20%, pH 8.3, preparado al momento de usar.

1.4.1.5.3. Inmunoblotting

Una vez transferidas las proteínas a la membrana se procedió a bloquearla con leche en polvo descremada al 5% en TBST (mezcla de solución salina tamponada con Tris y polisorbato 20) de pH 7.4 por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron 4 lavados con TBST pH 7.4 de 5 minutos cada uno y se procedió a incubar con el anticuerpo primario 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las membranas 4 veces con TBST pH 7.4 y se añadió el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 4 lavados con TBST pH 7.4. En la Tabla 8 se relacionan los anticuerpos primarios y en la Tabla 9 los anticuerpos secundarios.

Tabla 8. Anticuerpos primarios

Proteína	Anticuerpo primario	Dilución	Procedencia o huésped	Proveedor
β-actina	beta-Actin Antibody (AC-15) NB600-501	1:2000	Ratón	Novus Biologicals
Ferritina	Ferritin Antibody NBP1-31944	1:100	Conejo	Novus Biologicals
Receptor de transferrina	TfR (Transferrin R) Antibody NB100-92243	1:100	Ratón	Novus Biologicals
IL6	IL-6 Antibody NB600-1131	1:500	Conejo	Novus Biologicals

Tabla 9. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Dilución	Procedencia o huésped	Proveedor
anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody [HRP] NB7511	1:2000	Cabra	Novus Biologicals
anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] NB7160	1:500	Cabra	Novus Biologicals

Las membranas fueron reveladas por medio de un método colorimétrico utilizando 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) así: Se añadió 250 µl de DAB 1% y 250 µl de H₂O₂ al 0.3% a 10 ml de TBS 1X, la membrana se sumergió en esta solución de trabajo y se agitó en un agitador orbital IKA KS260 (Fisher Scientific SL) a temperatura ambiente durante 3 minutos. La reacción se detiene añadiendo agua destilada. Las membranas se dejan secar sobre una toalla a temperatura ambiente y después fueron escaneadas en un equipo C-DiGit™ (Bonsai Lab) para su posterior análisis. Se utilizó un marcador de peso molecular como referencia del tamaño de las bandas en cada una de las membranas (FastGene® BlueEasy Protein Ladder – Nippon genetics).

1.4.1.5.4. Cuantificación relativa de las proteínas

Las membranas escaneadas fueron luego analizadas utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health), donde se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Cabe resaltar que los resultados se expresan en términos relativos, usando el grupo control como estándar para comparar los demás grupos.

1.4.1.6. Análisis estadístico

La Información se analizó empleando el software SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY) y se examinaron los datos para distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar y luego se realizó el análisis de medias entre los grupos experimentales mediante la prueba de la mínima diferencia significativa. La ganancia de peso se analizó mediante análisis de varianza de medidas repetidas. Se consideraron significativos valores P menores a 0.05.

Para el Western Blot se calculó la media, desviación estándar, el intervalo de confianza y análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando el software GraphPad Prism 7.04 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Se realizaron por lo menos 3 réplicas biológicas para cada experimento. Seguido del ANOVA de una vía se realizaron comparaciones múltiples con el método de Tukey entre el grupo control y los grupos experimentales para buscar diferencias significativas ($P < 0.05$). Los resultados fueron graficados como valores de expresión relativa a β -actina donde el grupo control siempre es igual a 1.

1.5. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA INVESTIGACIÓN

Como resultado de esta investigación se tienen tres artículos originales, dos de ellos publicados y uno sometido actualmente, adicional un artículo de revisión, publicado también, resultado de la pasantía en la Universidad de São Paulo. Los documentos completos se anexan al final y esta es la relación de las publicaciones:

- *Influence of Dietary Vitamin A and Iron Deficiency on Hematologic Parameters and Body Weight of Young Male Wistar Rats.* Mauricio Restrepo-Gallego and Luis E Díaz. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. Vol 59, No 1. January 2020. Pages 1–7.

- *Vitamin A does not influence mRNA expression of hormone hepcidin but other biomarkers of iron homeostasis in young male Wistar rats.* Mauricio Restrepo-Gallego, and Luis E. Díaz. *Int J Vitam Nutr Res* (2020), 1–9.
- *Vitamin A deficiency influences the expression of ferritin in young male Wistar rats.* Mauricio Restrepo-Gallego, Luis Eduardo Díaz, Juan David Ospina-Villa and Danny Chinchilla-Cárdenas. {SOMETIDO} *Nutrients Special Issue "Dietary Iron for Human Health"*
- *Classic and emergent indicators for the assessment of human iron status.* Mauricio Restrepo-Gallego, Luis E. Díaz & Patricia H.C Rondó. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Published online: 03 Jul 2020.

También se participó en el VII Congreso Internacional del Colegio Colombiano de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, con la ponencia: *“Anemia: El modelo animal como herramienta para estudiar el efecto de la vitamina A sobre algunos parámetros hematológicos y marcadores del estado nutricional del hierro”*.

2. INFLUENCIA DE LA VITAMINA DIETARIA Y LA DEFICIENCIA DE HIERRO SOBRE LA GANANCIA DE PESO Y ALGUNOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN RATAS WISTAR MACHO JÓVENES²

2.1. RESULTADOS

2.1.1. Parámetros bioquímicos

Todas las comparaciones entre grupos indicaron diferencias significativas en el contenido de hierro sérico. Ambos grupos con bajos niveles dietarios de hierro (FeivAs y FeivAi) tuvieron diferencias significativas respecto del grupo control ($P < 0.001$ para ambos grupos). Los grupos con algún déficit de vitamina A y suficiente hierro (FesvAi y FesvAd) también mostraron un impacto sobre el contenido total de hierro sérico ($P = 0.024$ y 0.001 respectivamente), el grupo con carencia total de vitamina A (FesvAd) mostró los valores más bajos.

En términos de retinol sérico los grupos con alguna carencia o privación de vitamina A (FesvAi, FeivAi y FesvAd) presentaron valores significativamente inferiores a los del grupo control ($P < 0.001$ para todos los grupos). En la comparación múltiple los grupos insuficientes, más no deficientes, en vitamina A (FesvAi y FeivAi) no mostraron diferencias significativas entre ellos ($P = 0,980$). En la *Tabla 10* se resumen los resultados de ambos parámetros bioquímicos.

² Esta sección corresponde al artículo "Influence of Dietary Vitamin A and Iron Deficiency on Hematologic Parameters and Body Weight of Young Male Wistar Rats" publicado en el *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science – JAALAS* (Vol 59, No 1, Enero 2020) DOI: 10.30802/JAALAS-JAALA-19-000020

Tabla 10. Resultados de los parámetros bioquímicos

Parámetro	Control	FesvAd	FesvAi	FeivAs	FeivAi
Hierro sérico [µg/dL]	255.86 ± 43.83 a	181.30 ± 14.53 b	219.81 ± 15.58 c	131.01 ± 43.83 d	74.74 ± 18.27 e
Retinol sérico [µmol/L]	1.60 ± 0.16 a	0.24 ± 0.04 b	0.55 ± 0.10 c	1.26 ± 0.12 d	0.55 ± 0.08 c

Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n = 7, ANOVA). Grupos compartiendo la misma letra no presentan diferencias significativas entre ellos (P<0.05).

2.1.2. Parámetros hematológicos

La *Tabla 11* resume los resultados de los parámetros hematológicos para los cinco grupos. Aquellos con bajo contenido de hierro dietario (FeivAs y FeivAi) tuvieron niveles significativamente más bajos que el grupo control para hemoglobina (P<0.001 para ambos grupos), eVCM (P=0.002 y 0.041 respectivamente) y hematocrito (P=0.007 y 0.002 respectivamente). Todos los grupos experimentales mostraron diferencias significativas en el recuento de reticulocitos en comparación con el grupo control (FeivAi, P<0.001; FeivAs, P=0.010; FesvAi, P=0.001; FesvAd, P<0.001). Para HCM solo el grupo insuficiente en ambos micronutrientes (FeivAi) mostró diferencias significativas respecto del grupo control (P=0.006). No hubo diferencias al hacer las comparaciones múltiples para RBC o CHCM.

Tabla 11. Resultados de los parámetros hematológicos

Parámetro	Valor de referencia †	Control	FesvAd	FesvAi	FeivAs	FeivAi
Hemoglobina [g/dL]	15.24 ± 1.32	15.93 ± 0.69 a	16.22 ± 2.39 a	15.60 ± 0.41 a	13.16 ± 1.56 b	12.94 ± 1.04 b
MCV [fL]	62.38 ± 1.42	56.81 ± 9.89 a	59.86 ± 2.33 a	58.26 ± 6.86 a	48.31 ± 9.64 b	43.64 ± 3.27 b
RBC [million/µL]	8.23 ± 0.29	9.49 ± 1.27 a	8.85 ± 0.85 a	8.96 ± 1.61 a	8.88 ± 1.96 a	10.01 ± 0.86 a
Recuento de reticulocitos [%]	2.0 ± 1.0	2.7 ± 2.2 a	0.6 ± 0.2 b	0.3 ± 0.1 b	1.2 ± 0.2 b	0.6 ± 0.5 b
Hct [%]	51.3 ± 1.4	52.9 ± 2.1 a	52.9 ± 4.3 a	51.4 ± 6.3 a	43.7 ± 4.7 b	42.2 ± 8.1 b
CHM [pg]	18.52 ± 1.49	17.18 ± 3.51 a	18.28 ± 1.76 a	17.87 ± 2.87 a	15.24 ± 2.88 a	12.97 ± 1.14 b
CHCM [g/dL]	29.69 ± 2.22	30.15 ± 1.59 a	30.53 ± 2.49 a	30.69 ± 3.46 a	29.75 ± 1.95 a	31.73 ± 3.50 a

† Todos los valores de referencia están tomados Arcila-Quiceno *et al.* (92) excepto para el recuento de reticulocitos el cual se tomó de Jacob *et al.* (93) Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (n = 7, ANOVA). Diferentes letras entre grupos indican diferencias significativas (P<0.05).

2.1.3. Ingesta de alimento y peso corporal

El peso corporal de los cinco grupos fue comparable en la línea de base. A la semana 5 el peso promedio del grupo suficiente en hierro dietario e insuficiente en vitamina A (FesvAi) fue significativamente inferior que el del grupo control. Luego de la semana 7, todos los grupos experimentales mostraron pesos promedio significativamente menores que los del grupo control. Las comparaciones entre los grupos experimentales luego de la semana siete no mostraron diferencias significativas entre ellos. Al final del experimento la diferencia media en peso respecto del grupo control fue de 29.8 ± 10.0 g. El efecto de las dietas en el peso corporal de los animales se muestra en la *Figura 9*. Los cinco grupos no mostraron diferencias significativas entre ellos al comparar la ingesta de alimento ($P=0.126$), y la ingesta media por animal fue de 15.5 g/día, lo cual es consistente con la ingesta esperada para ratas Wistar macho en crecimiento (94).

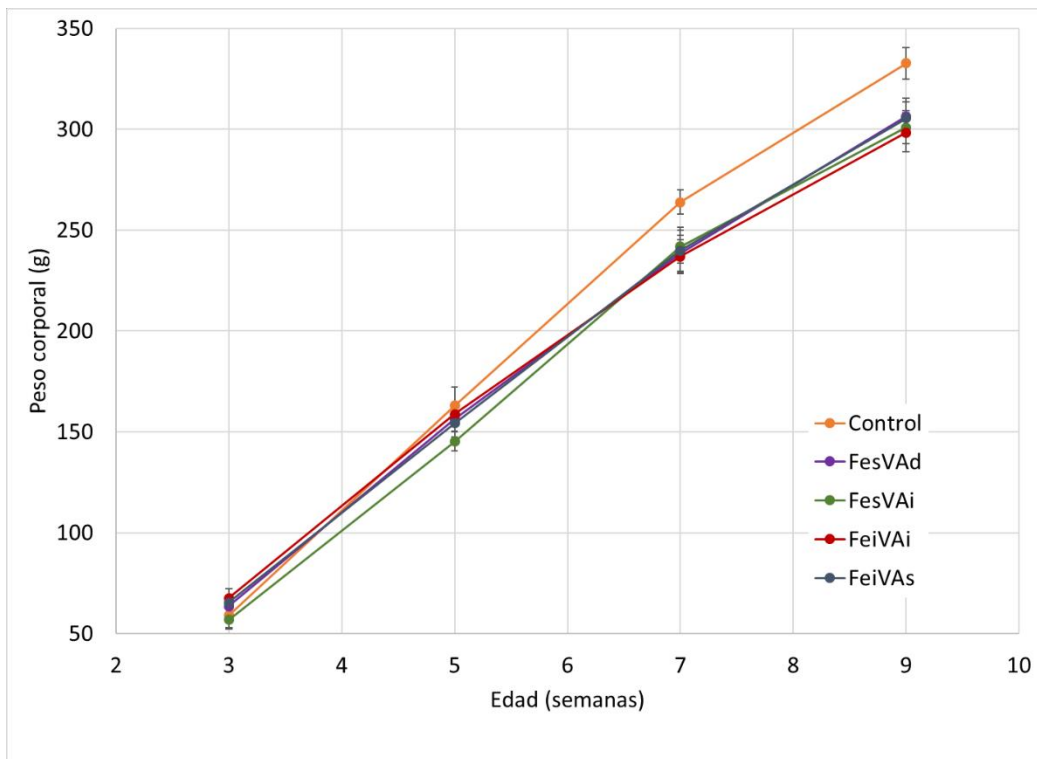


Figura 9. Curvas de ganancia en peso de las ratas bajo las dietas experimentales comparadas con el grupo control. Las gráficas se construyeron con el promedio y las barras de error indican la desviación estándar ($n = 7$, ANOVA de medidas repetidas).

2.2. DISCUSIÓN

2.2.1. Parámetros bioquímicos

Todas las diferencias entre los grupos para hierro sérico fueron significativas, esto permitió ordenarlos de mayor a menor según esta variable de respuesta así: Control > FesvAi > FesvAd > FeivAs > FeivAi. Los tres primeros grupos tuvieron suficiente hierro dietario, pero el nivel de vitamina A decrece del primero (Control, vAs) al tercero (vAd); esto sugiere que, aún con un adecuado suministro de hierro dietario, insuficiencia o deficiencia de vitamina A puede causar un decrecimiento proporcional en los niveles de hierro sérico. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de Saraiva et al. (95), quienes encontraron una asociación positiva entre la deficiencia de retinol sérico y la deficiencia de hierro sérico en una muestra de la ciudad de Vitoria (Brasil). Otros autores también han encontrado vínculos entre la VAD y la ID a través de numerosos estudios epidemiológicos. Por ejemplo, Alfaro-Calvo and Carvajal-Fernandez (96) encontraron que las probabilidades de anemia entre niños con VAD eran 2.5 veces mayores (OR = 2.5; 95% IC, 0.027-0.049; $P < 0.001$) que aquellas para niños con niveles adecuados de vitamina A. Sales et al. (97) encontraron que la VAD está relacionada con bajos niveles de hierro sérico aunque esto no implicaba cambios en los niveles de ferritina sérica, situación característica de la anemia por VAD. (98)

La mayoría de las diferencias entre grupos para retinol sérico fueron también significativas y, al igual que con el hierro sérico, permiten hacer una ordenación de los grupos de mayor a menor así: Control > FeivAs > (FesvAi = FeivAi) > FesvAd. Se nota que la única variable que parece influenciar el contenido de retinol sérico es el contenido dietario de vitamina A independientemente del contenido de hierro, por lo tanto, bajo las condiciones de este experimento, el hierro no tiene influencia sobre los niveles de retinol sérico.

2.2.2. Parámetros hematológicos

Las investigaciones previas sobre el efecto de la vitamina A en el metabolismo del hierro no han producido resultados en relación con el efecto específico de dietas con restricción de vitamina A sobre la concentración de hemoglobina. Arruda *et al.*(78) encontraron que la VAD puede incrementar la concentración de Hb pero no hallaron evidencia si era por causa de alguna carencia de hemoconcentración. De otro lado, Ameny *et al.*(99) encontraron casos de anemia leve tanto en animales como en humanos cuando la vitamina A era deficiente en la dieta. Los resultados obtenidos en este estudio son más consistentes con los hallazgos de Jiang et al.,(65) quien encontró que no hay relación entre el estado de la vitamina A y la concentración de Hb cuando los niveles de hierro son normales. Basados en

estas situaciones, las condiciones del experimento sugieren que no hay relación directa entre la concentración de Hb y los niveles de vitamina A dietaria a menos que los niveles de hierro dietario tengan algún tipo de deficiencia.

El volumen corpuscular medio (MCV) permite la clasificación de la anemia basados en una aproximación morfológica: microcítica (por debajo de lo normal), normocítica (dentro del rango normal), y macrocítica (por encima de lo normal) (100). En comparación con el grupo control, únicamente los grupos que fueron bajos en hierro dietario tuvieron valores significativamente diferentes para MCV; una comparación múltiple mostró que los grupos con suficiente hierro dietario (FesvAs, FesvAi, y FesvAd) tuvieron valores significativamente más altos que los grupos con deficiencia de hierro (FeivAs, FeivAi). Adicionalmente cuando fueron comparados con los valores de referencia (62.38 ± 1.42 fL), los grupos sin deficiencia de hierro fueron normocíticos pero aquellos con deficiencia de hierro fueron clasificados como microcíticos (87). Los resultados también mostraron que únicamente la deficiencia de hierro influencia el MCV, mientras que la VAD parece no tener efecto alguno.

Todos los grupos experimentales estuvieron dentro del rango normal para recuento de glóbulos rojos (RBC) o ligeramente por encima del mismo, lo cual indica que, en las condiciones de nuestro estudio, el RBC puede ser normal independientemente de la concentración de Hb, aún en casos de deficiencia de hierro. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el simple valor de RBC no puede interpretarse sin hacer referencia a otros parámetros hematológicos para poder hacer un diagnóstico completo.

En el año 2000, el estudio de Roodenburg *et al* propuso que no hay evidencia entre VAD y una eritropoiesis inefectiva, aunque en su estudio el análisis de la dinámica de la homeostasis del hierro fue indirecto y cualitativo, reconociendo que un estudio enfocado cinética y cuantitativamente podría arrojar más información, de hecho reconocen que algunos niveles de acumulación de hierro en médula ósea y bazo podrían deberse a la VAD (70). Esto parece haber sido considerado en los estudios posteriores en 2014 y 2016 realizados por da Cunha *et al* (40), Dewamitta *et al* (101) y Honda *et al* (102) quienes propusieron un modelo en el cual la eritropoyesis inefectiva en VAD se debe a un mecanismo de regulación negativa de la hepcidina y disminución de la expresión de eritropoyetina a nivel renal, lo que desencadena una acumulación del grupo hemo en hígado y bazo, disminuyendo su disponibilidad y, por lo tanto, su reutilización en la síntesis de hemoglobina. Los resultados de nuestro estudio son consistentes con estos

últimos resultados corroborando que tanto hierro como vitamina A son necesarios para una adecuada eritropoiesis.

El hematocrito (Hct) es el porcentaje de RBC (por volumen) en la sangre. Se determina multiplicando RBC por MCV. Dado que los resultados de RBC fueron similares para todos los grupos y únicamente los grupos con deficiencia de hierro mostraron valores bajos de MCV, era de esperarse que el Hct fuera bajo ($51.3\% \pm 1.4\%$) solamente en los grupos deficientes de hierro. Bajos valores de Hct son indicadores de anemia (103). Al igual que para Hb y MCV, los valores de Hct estuvieron por debajo del rango de referencia en los grupos deficientes de hierro, algo que también se esperaba.

La hemoglobina corpuscular media (MCH) es una medida de la masa media de Hb por RBC, y se calcula como $Hb \times 10 / RBC$ (100). El estado en el cual las células individuales contienen menos Hb de la que usualmente contienen en condiciones óptimas se conoce como anemia hipocrómica (104). Los resultados de MCH indicaron la presencia de anemia hipocrómica para el grupo insuficiente en ambos micronutrientes (FeivAi) pero no para el grupo insuficiente en hierro y suficiente en vitamina A (FeivAs), esto corrobora la importancia de la vitamina A para una adecuada incorporación de hierro en los glóbulos rojos aún bajo un estado de deficiencia marginal de hierro, lo cual corrobora con lo descrito por Amine *et al* (1970) en cuanto a que la deficiencia combinada de ambos micronutrientes genera anemia hipocrómica (105).

La concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) es un indicador de la concentración media de Hb en un volumen dado de glóbulos rojos, y se calcula dividiendo el contenido de Hb (g/100 ml) por el hematocrito (%) (100). Como se trata de una fracción, la MCHC disminuye o aumenta erróneamente cuando se altera una medición precisa de Hb y hematocrito, y los valores aumentados siempre son una mala interpretación porque los glóbulos rojos no pueden contener más hemoglobina de lo normal. El MCHC verdaderamente aumentado generalmente ocurre en la esferocitosis hereditaria y el MCHC reducido es un representante confiable de la deficiencia funcional de hierro, incluso en ausencia de anemia (106,107). De acuerdo con los resultados del estudio, ni la VAD ni la ID tienen algún efecto sobre la MCHC, pero esta conclusión no es consistente con los resultados para Hb y Hct, por lo tanto, es necesario considerar múltiples parámetros para un adecuado diagnóstico del estado nutricional del hierro.

Los resultados obtenidos en cuanto a parámetros hematológicos nos permiten una aproximación sistémica de alta relevancia al momento de interpretar los efectos de las deficiencias conjuntas de hierro y vitamina A, se demostró que el modelo fue efectivo al inducir anemia en los animales de estudio y valida la importancia de realizar un abordaje con mirada global de varios parámetros al momento de establecer un diagnóstico del estado nutricional del hierro. En nuestro artículo de revisión “*Classic and Emergent Indicators for the Assessment of Human Iron Status*” aceptado para publicación en *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, hacemos un recorrido por los principales parámetros hematológicos y corroboramos nuevamente que la combinación de indicadores bioquímicos y hematológicos es siempre necesaria y recomendada para la realización de un diagnóstico acertado.

2.2.3. Peso corporal

Para la evaluación del peso corporal, se usaron las curvas de referencias creadas por Cossio-Bolaños et al. para clasificar los animales en cinco grupos de acuerdo con su estado nutricional: malnutridos, delgados, eutróficos, con sobrepeso y obesos, los puntos de corte se muestran en la Tabla 12 (108).

Tabla 12. Clasificación de ratas Wistar macho de nueve semanas según su peso corporal

Clasificación	Rango de peso corporal (g)
Malnutridas	<241.0
Delgadas	241.0–259.8
Eutróficas	259.8–330.4
Con sobrepeso	330.4–347.1
Obesas	>347.1

Los grupos cuyas dietas tuvieron alguna restricción nutricional presentaron pesos corporales inferiores a aquellos del grupo control. Al finalizar el experimento, todos los animales de los grupos experimentales fueron clasificados como eutróficos, en el grupo control cuatro animales fueron clasificados como eutróficos y tres con sobrepeso.

La ganancia de peso es un proceso complejo que involucra la interacción de numerosos nutrientes y reacciones metabólicas. Los resultados del estudio son consistentes con da Cunha et al.,(40) al soportar la hipótesis de que tanto hierro como vitamina A son necesarios para garantizar un adecuado crecimiento y ganancia de peso. Respecto de la clasificación según su estado nutricional, es posible que la alimentación *ad libitum* pueda causar una mayor ganancia de peso que la esperada, a este respecto Moraal et al.(109)

sugirieron que la cantidad de la alimentación puede ser reducida hasta un 25% o ser controlada sin afectar la fisiología de los animales, reduciendo así su morbilidad e incrementando su esperanza de vida.

El estudio sugiere que la carencia total o marginal de vitamina A o hierro, o ambas, puede influir sobre el desarrollo de los animales independiente de su estado como eutrófico o con sobrepeso. Dado que el hierro es necesario para un adecuado metabolismo y para adquirir la energía de los alimentos (110), tiene sentido que las dietas insuficientes en hierro reflejen un crecimiento inadecuado. Respecto de la VAD, se ha encontrado que puede afectar la función mitocondrial causando daño oxidativo (111), el cual puede tener efectos posteriores sobre el metabolismo de las grasas y la ganancia de peso. Arreguín(112) sugirió que la vitamina A impacta los patrones de metilación de los genes relacionados con la adipogénesis, lo cual puede también explicar la diferencia en ganancia de peso en aquellos grupos con deficiencias marginales o totales de vitamina A en comparación con aquellos con suficiencia del micronutriente.

Considerando la interacción de la vitamina A con el hierro, estos resultados son consistentes con la evidencia previa sobre el efecto de la VAD en el metabolismo del hierro. Por ejemplo, Jiang et al.(65) sugieren que la VAD afecta la expresión de la proteína reguladora de hierro 2 (IRP2) incrementando la deficiencia de hierro; da Cunha et al.(40) sugieren que la VAD afecta la eritropoiesis y el metabolismo del hierro y, de esta forma, tiene un efecto indirecto sobre la ganancia de peso al regular la homeostasis del mineral.

2.3. CONCLUSIONES

Semba et al.(98) enfatizaron en 2002 que la anemia no puede ser caracterizada como una entidad clínica diferente, aislada y enfocada únicamente en las deficiencias de hierro. Diecisiete años después de ello, pocas explicaciones se han encontrado para explicar los mecanismos por los cuales la VAD puede estar involucrada en la patogénesis de algunos tipos de anemia. Los resultados de este estudio indican que la VAD no influye sobre todos los parámetros hematológicos, mientras que ambas deficiencias parecen afectar únicamente el recuento de reticulocitos en ratas Wistar macho jóvenes. Por lo tanto, el estado nutricional de la vitamina A debe ser considerado en la evaluación del estado nutricional del hierro y en la identificación y clasificación de algunos tipos de anemia.

Este estudio también sugiere que, en relación con el peso corporal, tanto hierro como vitamina A son esenciales para un adecuado crecimiento y ganancia de peso y, por lo tanto, deben ser considerados conjuntamente en programas de recuperación nutricional. También destacamos que, bajo condiciones experimentales, ratas Wistar macho con carencias en uno o los dos micronutrientes pueden tener una ganancia de peso por debajo de los parámetros regulares bajo alimentación *ad libitum*.

Finalmente, es necesario profundizar aún más sobre cómo la patogénesis de la anemia está vinculada a deficiencias de otros nutrientes diferentes al hierro, en este caso particular a la vitamina A. Las técnicas analíticas moleculares como PCR y Western Blot pueden proveer información adicional sobre los mecanismos a través de los cuales la vitamina A regula el metabolismo del hierro causando algún tipo de anemia no deficiente de hierro a nivel celular.

3. EFECTO DE LAS VARIACIONES DIETARIAS DE HIERRO Y VITAMINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE LA HORMONA HEPCIDINA Y OTROS MARCADORES DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN RATAS WISTAR MACHO JÓVENES³

3.1. RESULTADOS

La *Figura 10* muestra que, bajo las condiciones de este experimento, no se evidenciaron diferencias significativas en la expresión relativa a nivel hepático del gen de interleucina-6 (*IL6*) normalizado a *Actb* cuando fueron comparados con el grupo control.

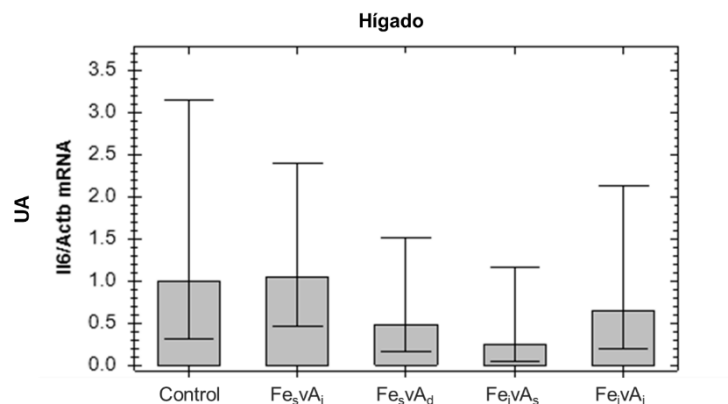


Figura 10. Expresión relativa de los niveles de *IL6* en hígado.

La expresión fue normalizada a *Actb* (beta actina). Los datos representan la media ± DE. (n=7). *Diferencias significativas (P<0.05, ANOVA de una vía) en comparación con el grupo control. Las barras de error representan un IC del 95%. UA: Unidades Arbitrarias

La *Figura 11* muestra los niveles de transcripción relativa del gen *Hamp* (hepcidina) normalizados a la expresión del gen beta actina (*Actb*), el cual se utilizó como gen casero. En comparación con el grupo

³ Esta sección corresponde al artículo "Vitamin A does not influence mRNA expression of hormone hepcidin but other biomarkers of iron homeostasis in young male Wistar rats" aceptado para publicación en el *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*.

control, aquellos con variaciones en los niveles dietarios de vitamina A no mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$) en la expresión respecto del grupo control (FesvAi: 1.37 veces, $P = 0.32$; FesvAd: 1.22-veces, $P = 0.63$). Los grupos con bajos niveles de hierro dietario mostraron una expresión relativa significativamente inferior que la del grupo control. (FeivAi: 16.1 veces, $P = 0.0008$; FeivAs: 71.4 veces, $P = 0.0004$).

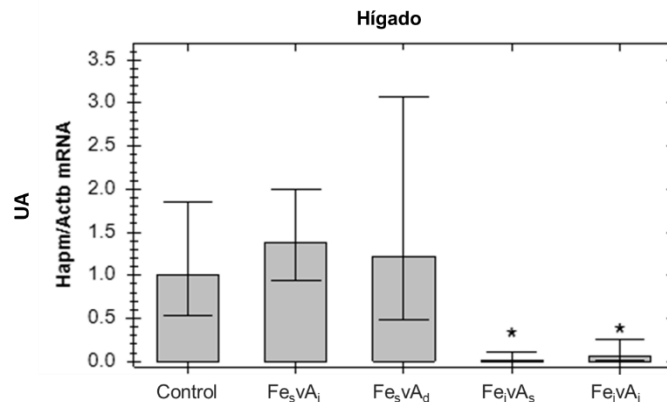


Figura 11. Expresión relativa de los niveles de *Hamp* en hígado.

La expresión fue normalizada a Actb (beta actina). Los datos representan la media \pm DE. ($n = 7$). *Diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA de una vía) en comparación con el grupo control. Las barras de error representan un IC del 95%. UA: Unidades Arbitrarias

Cuando se comparan con el grupo control, la expresión relativa del RNAm de la proteína reguladora de hierro 2 (*Ireb2*) en duodeno y bazo mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) pero en sentidos opuestos para aquellos grupos bajos en hierro independiente del suministro de vitamina A (FeivAi y FeivAs). Esto se puede evidenciar en la *Figura 12* para duodeno, donde se observa que los valores fueron mayores que en el grupo control; para el caso de FeivAi fue 2.6 veces mayor ($P = 0.0136$) y para FeivAs fue 2.7 veces mayor ($P = 0.0118$).

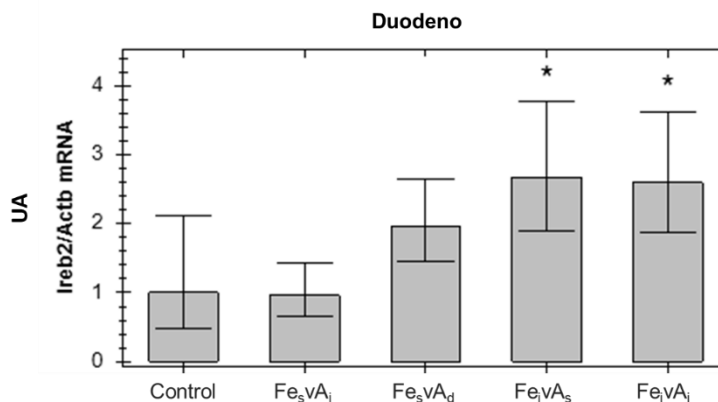


Figura 12. Expresión relativa de los niveles de *Ireb2* en duodeno.

La expresión fue normalizada a Actb (beta actina). Los datos representan la media \pm DE ($n = 7$). *Diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA de una vía) en comparación con el grupo control. Las barras de error representan un IC del 95%. UA: Unidades Arbitrarias

En la *Figura 13* se observa que, en bazo, los mismos grupos muestran diferencias significativas pero menores que el grupo control. En el grupo FeivAi fue 2.9 veces menor ($P < 0.001$) y en el grupo FeivAs fue 3.7 veces menor ($P < 0.001$).

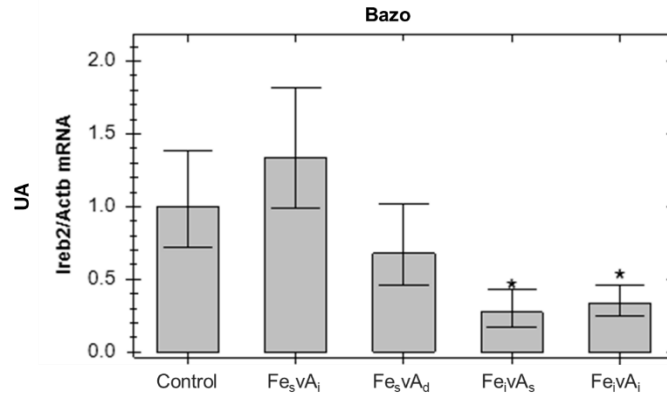


Figura 13. Expresión relativa de los niveles de *Ireb2* en bazo.

La expresión fue normalizada a Actb (beta actina). Los datos representan la media \pm DE (n=7). *Diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA de una vía) en comparación con el grupo control. Las barras de error representan un IC del 95%. UA: Unidades Arbitrarias

Sobre la expresión del RNAm de ferritina (*FTH1*) en el duodeno (*Figura 14*), el grupo suficiente en hierro y carente de vitamina A (FesvAd) mostró diferencias significativas al compararse con el grupo control, los valores normalizados fueron 5.1 veces mayores ($P = 0.0017$). Por el contrario, la expresión del mismo gen en bazo fue significativamente menor respecto del grupo control únicamente para el mismo grupo, con 3.5 veces menos expresión relativa ($P = 0.0018$) tal como se observa en la *Figura 15*.

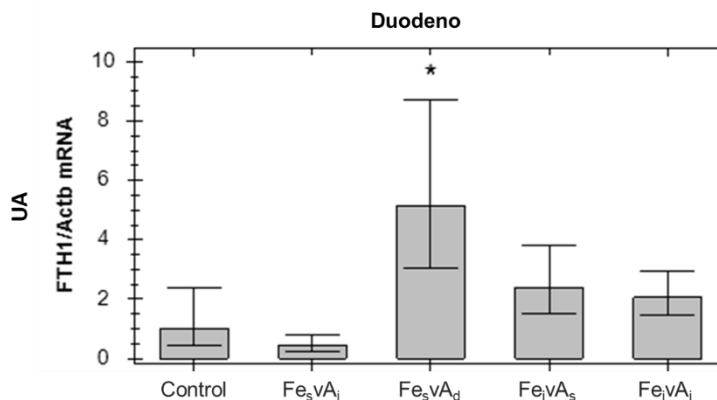


Figura 14. Expresión relativa de los niveles de *FTH1* en duodeno.

La expresión fue normalizada a Actb (beta actina). Los datos representan la media \pm DE (n=7). *Diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA de una vía) en comparación con el grupo control. Las barras de error representan un IC del 95%. UA: Unidades Arbitrarias

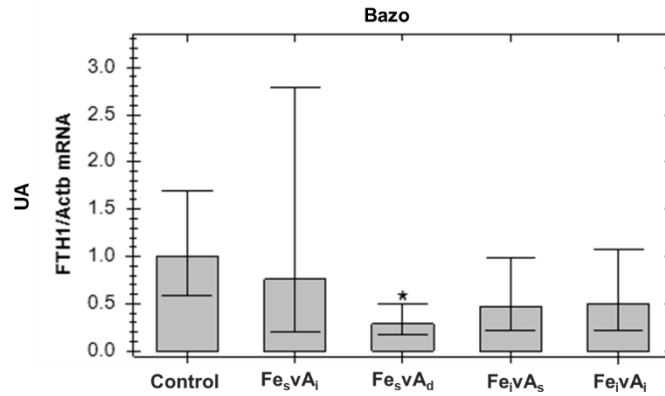


Figura 15. Expresión relativa de los niveles de *FTH1* en bazo.

La expresión fue normalizada a Actb (beta actina). Los datos representan la media \pm DE (n=7). *Diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA de una vía) en comparación con el grupo control. Las barras de error representan un IC del 95%. UA: Unidades Arbitrarias

La expresión normalizada de receptor de transferrina (*Tfrc*) en bazo mostró diferencias significativas para los grupos bajos en hierro dietario y para el grupo sin vitamina A cuando fueron comparados con el grupo control. Todos tuvieron una expresión relativa menor: FeivAi, 2.4 veces ($P=0.0142$); FeivAs, 4.2 veces ($P < 0.0001$) y FesvAd, 5.6 veces ($P=0.0104$). (Figura 16)

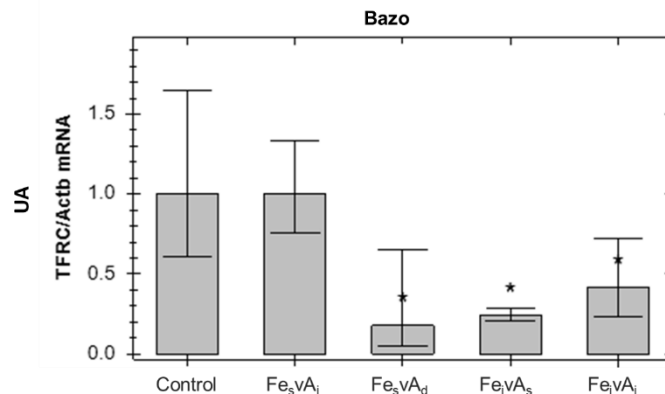


Figura 16. Expresión relativa de los niveles de *Tfrc* en bazo.

La expresión fue normalizada a Actb (beta actina). Los datos representan la media \pm DE (n=7, ANOVA de una vía). *Diferencias significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control. Las barras de error representan un IC del 95%. UA: Unidades Arbitrarias

3.2. DISCUSIÓN

Esta parte del estudio se enfocó en la expresión de los genes que codifican algunos de los principales biomarcadores del estado nutricional del hierro y su relación con carencias marginales o totales de vitamina A en ratas Wistar macho jóvenes.

Además de lo mencionado en la parte teórica sobre el efecto del estado de inflamación sobre los marcadores del estado nutricional de hierro dado su carácter de proteínas de fase aguda (APP), se tiene también evidencia de estudios previos que revelan que las deficiencias de hierro o vitamina A, o ambas, potencian el estado inflamatorio incrementando la expresión de IL6 (40). Más aún, se ha establecido que la interleucina-6 regula la transcripción de la hepcidina como una forma de controlar la circulación en estados de inflamación (113,114). Sin embargo, los hallazgos de este estudio no evidenciaron diferencias significativas en la expresión del mRNA de *IL6* como indicador de inflamación en los animales, aún con VAD, ID o ambas. Esto no significa que no hay relación entre inflamación, ID y VAD, pero bajo las condiciones del experimento, no hay suficiente evidencia que lo soporte. Hecha esta precisión, la ausencia de diferencias significativas en la expresión del mRNA de *IL6* permite una comparación de los otros marcadores del estado nutricional del hierro sin complicaciones debido a su condición de proteínas de fase aguda (APP).

Como regulador a nivel sistémico de la homeostasis, la expresión de RNAm de hepcidina (*Hamp*) fue significativamente menor en los grupos deficientes de hierro, lo cual es coherente dado que la hormona opera como regulador negativo de ferroportina en la membrana basolateral del enterocito (115) como una forma de regular el eflujo de hierro y de esta manera prevenir daño oxidativo. Los resultados no mostraron un impacto del estado nutricional de la vitamina A sobre la expresión de *Hamp*, lo cual es diferente de los hallazgos previos donde la deficiencia de vitamina A incrementa la expresión de hepcidina (78).

Sobre la regulación a nivel molecular de la homeostasis del hierro, es claro que la proteína reguladora de hierro 2 (IRP2) es un elemento clave. Los resultados mostraron que los grupos que recibieron una dieta baja en hierro (FeivAs y FeivAi) tuvieron diferencias significativas comparados con el grupo control. En duodeno, la expresión relativa de *Ireb2* fue mayor que en el grupo control, pero en bazo fue menor. El estudio de Jiang (65) reveló que la deficiencia de vitamina A podría agravar la deficiencia de hierro mediante una regulación positiva de la expresión de IRP2; sin embargo, los hallazgos de nuestro estudio sugieren que la expresión de *Ireb2* está relacionada no solo con el suministro de hierro o vitamina A como factores independientes sino que debe ser interpretada como un efecto combinado.

IRP2 también se relaciona con la regulación de la expresión de ferritina y del receptor de transferrina. Cuando IRP2 es baja, *Tfrc* es reducida y ferritina es potenciada, de esta forma se favorece el almacenamiento y movilización del hierro en el organismo (44). Los resultados mostraron que la vitamina A fue el único factor que tuvo algún efecto sobre la expresión de ferritina; en el duodeno solo el grupo con carencia total de vitamina A fue significativamente mayor en ferritina que los demás mientras que lo contrario ocurrió en el bazo. Estos resultados indican que la vitamina A es necesaria para estimular la movilización de hierro desde el enterocito, reduciendo su almacenamiento en la ferritina. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos donde la VAD puede afectar la movilización del hierro llegando a un estrés oxidativo a nivel duodenal (80). Respecto del bazo la reducción de la expresión de ferritina también se mostró en el trabajo de Jiang y la relación entre VAD e IRP2.

Sobre la expresión del RNAm del receptor de transferrina (*Tfrc*) en bazo, los resultados son consistentes con lo esperado a partir de los resultados de IRP2 (65). Al hacer las comparaciones entre los grupos con suficiente suministro de hierro dietario, solo el grupo sin vitamina A mostró diferencias significativamente inferiores, esto indica que, aún con un adecuado suministro de hierro, la vitamina A es necesaria para potenciar la expresión de *Tfrc* en el bazo. Cuando los grupos bajos en hierro dietario fueron comparados con el grupo control, ambos fueron significativamente inferiores, independiente del suministro de vitamina A. Estos resultados indican un efecto combinado de ambos nutrientes sobre la expresión de *Tfrc* en el bazo.

Para presentar una imagen completa de los resultados de la expresión génica, se construyó un mapa de calor (116), donde el aumento o la disminución de la regulación como efecto combinado de hierro y vitamina A puede ser visualizado (*Figura 17*). Y al considerar todos los resultados como un conjunto, los datos muestran un efecto simple de la vitamina A en la expresión de ferritina en duodeno y bazo, de hierro en la expresión de hepcidina en hígado y un efecto combinado de ambos nutrientes sobre receptor de transferrina 1 y proteína reguladora de hierro 2 en bazo y duodeno, lo que nos permite construir el diagrama que se presenta en la *Figura 18*.

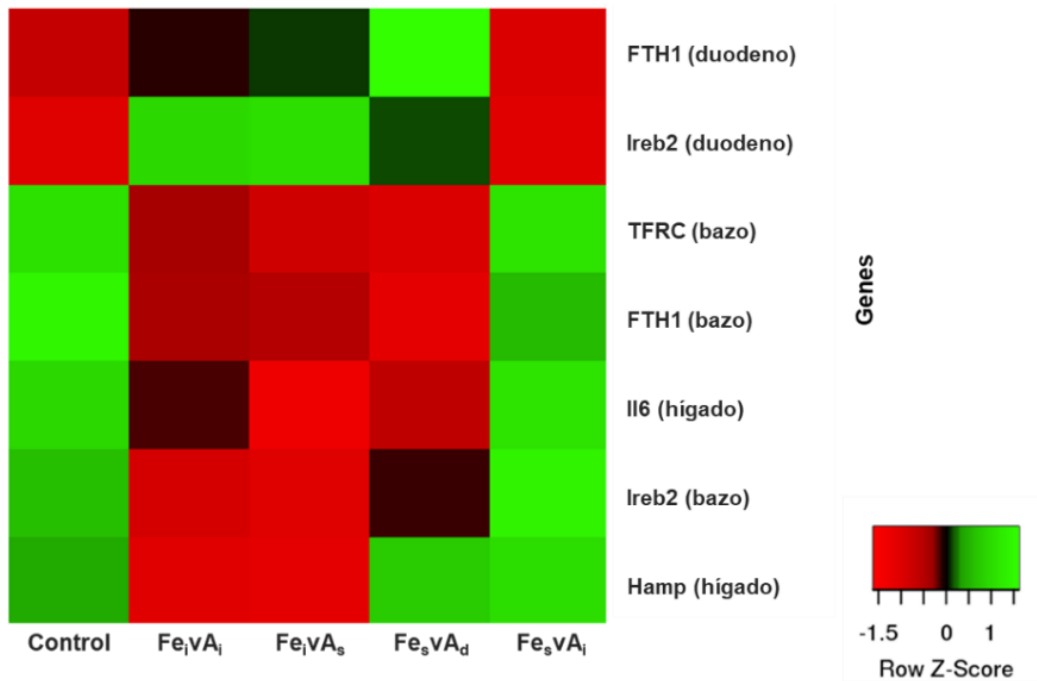


Figura 17. Mapa de calor para la expresión relativa de todos los genes en los grupos experimentales.

Los bloques verdes representan sobreexpresión y los rojos disminución en la expresión, ambos casos al comparar con el grupo control. *Fth1* (ferritina), *Tfrc* (receptor de transferrina), *Ireb2* (proteína reguladora de hierro 2), *Hamp* (hepcidina) *Il6* (interleucina 6).

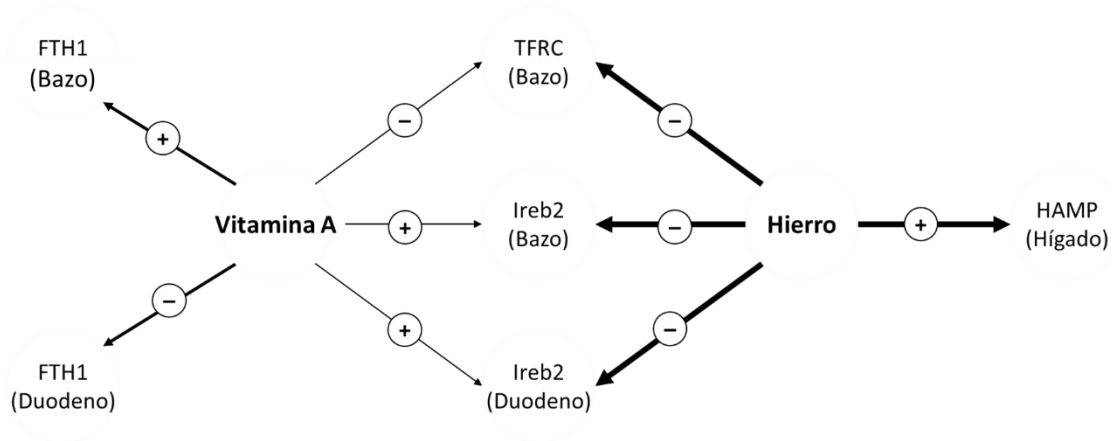


Figura 18. Efecto combinado de un adecuado suministro de hierro y vitamina A sobre la expresión del RNAm de algunos marcadores de la homeostasis del hierro

El grosor de las flechas representa la potencia del efecto. (+) representa sobre-regulación. (-) representa sub-regulación. *FTH1* (ferritina), *TFRC* (receptor de transferrina), *Ireb2* (proteína reguladora de hierro 2), *HAMP* (hepcidina).

3.3. CONCLUSIÓN

Continuando con los hallazgos de la primera parte del estudio, se sigue validando la importancia del suministro conjunto de hierro con vitamina A como una estrategia para la reducción de la prevalencia de deficiencia de hierro y anemia por deficiencia de hierro. Si bien, la mayoría de estudios previos se han enfocado en hepcidina, es interesante encontrar otras posibles rutas que describan el mecanismo mediante el cual la vitamina A puede tener un efecto regulador indirecto sobre la homeostasis del hierro, especialmente en lo relacionado con sus depósitos como se evidencia en el efecto sobre la expresión del gen de ferritina en bazo y duodeno; y sobre los fenómenos de captación y transporte a nivel celular regulando la expresión del gen de receptor de transferrina en bazo.

Los resultados encontrados en el análisis de expresión del ARNm de TFRC en bazo, regulada por la deficiencia combinada de ambos nutrientes, permiten establecer una nueva vía de regulación de la homeostasis del hierro por la vitamina A que podría indicar un efecto deletéreo sobre los mecanismos de reciclaje de los eritrocitos por los macrófagos del bazo. Además, debe considerarse el efecto adicional de la VAD sobre la expresión de FTH1 en bazo, independiente del estado de hierro, y esto unido a que en el bazo se encuentran los mayores depósitos de hierro después del hígado.

4. EXPRESIÓN DE FERRITINA Y RECEPTOR DE TRANSFERRINA EN RATAS WISTAR MACHO JÓVENES BAJO DIFERENTES NIVELES DIETARIOS DE HIERRO Y VITAMINA A⁴

Una vez analizados los resultados del análisis de expresión del RNAm de algunos marcadores de la homeostasis del hierro se seleccionaron aquellos asociados con su transporte y almacenamiento, específicamente ferritina y receptor de transferrina.

4.1. RESULTADOS

Se realizaron ensayos de Western Blot de las muestras obtenidas (proteínas totales) de los hígados de cada uno de los grupos para determinar la expresión relativa de las siguientes proteínas: ferritina, receptor de transferrina, e IL-6. Los resultados se muestran en la *Figura 19*. Al igual que lo encontrado en las pruebas de PCR, se observa que, bajo las condiciones del estudio, no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control para IL6. Adicionalmente se observa que tampoco hay diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control para TfR, mientras que para Fn se observan diferencias significativas entre el grupo deficiente de vitamina A y el control (mayor expresión) y entre los grupos insuficientes en hierro y el grupo insuficiente en vitamina A y suficiente hierro y el control (menor expresión).

⁴ Esta sección corresponde al artículo “Vitamin A deficiency influences expression of ferritin in young male Wistar rats” sometido en el *Journal of Nutrition and Metabolism*

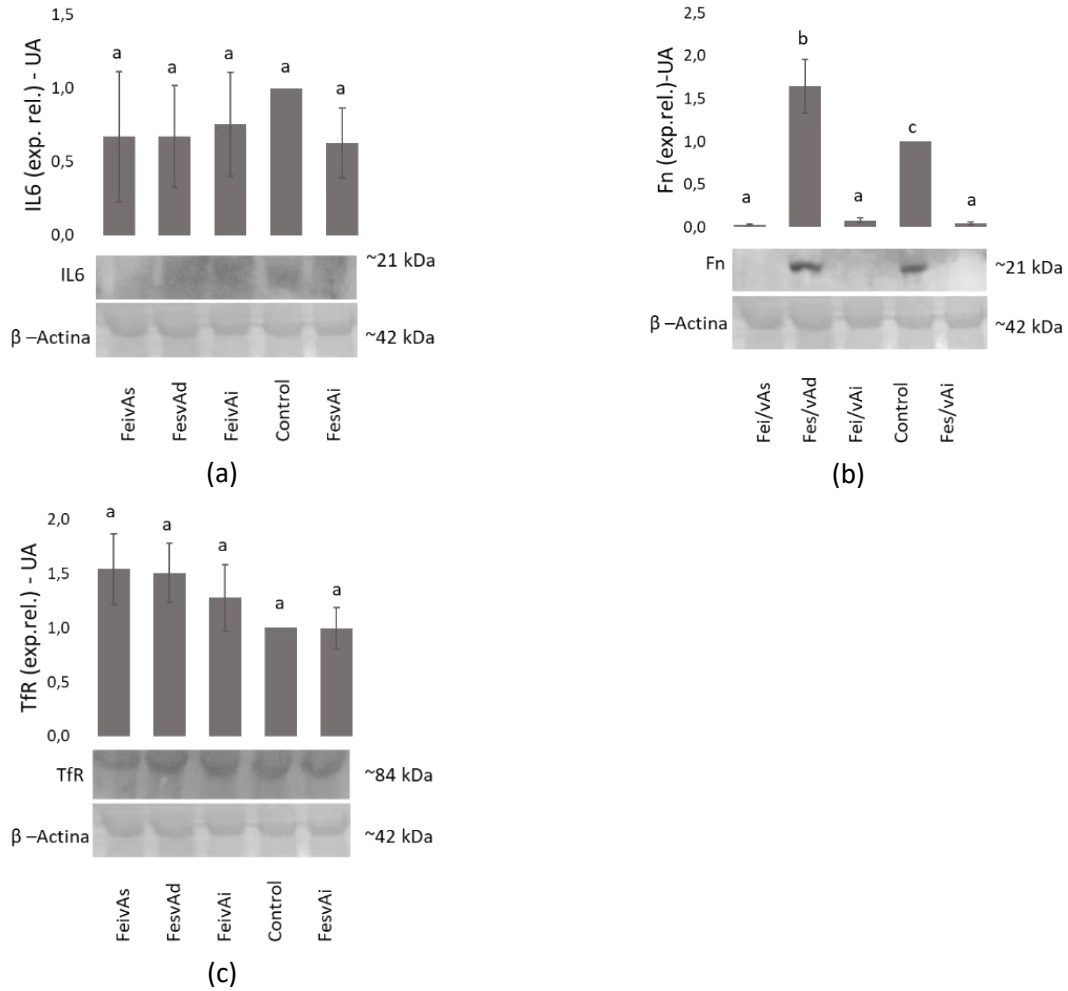


Figura 19. Expresión relativa de interleukina-6 (IL6) (a), ferritina (Fn) (b), receptor de transferrina (TfR) (c) en hígado. Grupos con letras diferentes presentan diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$, ANOVA de una vía). UA: Unidades Arbitrarias

Para los bazo se realizaron análisis de Western Blot para determinar la expresión relativa de las siguientes proteínas: ferritina y receptor de transferrina. Los resultados se muestran en la *Figura 20*. Al igual que ocurrió con TfR en hígado no se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control; y hay diferencias significativas para Fn entre todos los grupos experimentales y el grupo control (menor expresión).

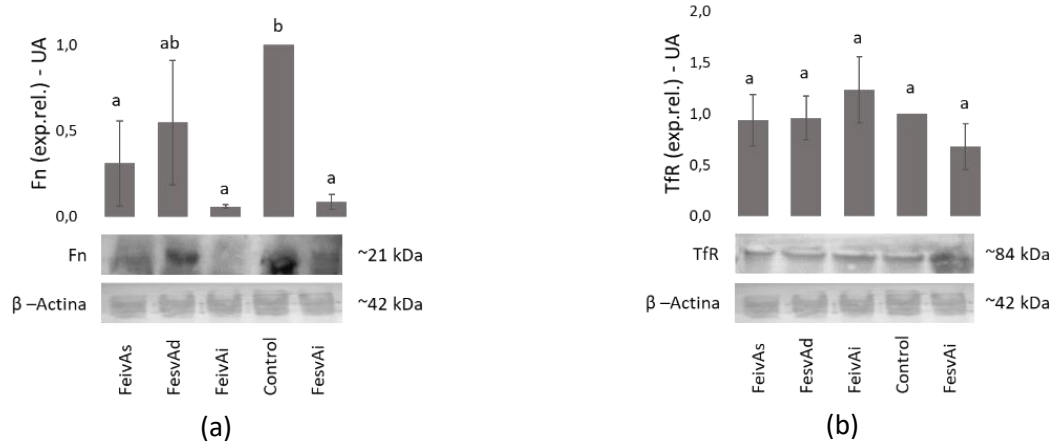


Figura 20. Expresión relativa de ferritina (Fn) (a) y receptor de transferrina (TfR) (b) en bazo. Grupos con letras diferentes presentan diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$, ANOVA de una vía). UA: Unidades Arbitrarias

Para los duodenos se realizaron Western Blot para determinar la expresión relativa de ferritina. Los resultados se muestran en la *Figura 21*. Se observan diferencias significativas entre los grupos insuficientes en hierro y el grupo suficiente en hierro, pero insuficiente en vitamina A.

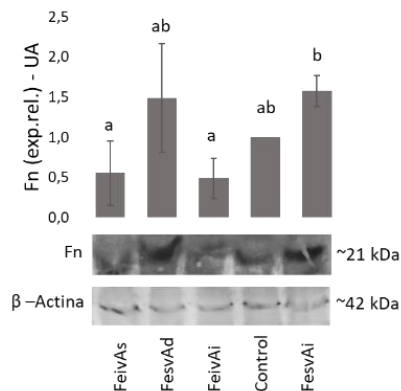


Figura 21. Expresión relativa de ferritina (Fn) en duodeno. Grupos con letras diferentes presentan diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$, ANOVA de una vía). UA: Unidades Arbitrarias

4.2. DISCUSIÓN

Al igual que en la PCR se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales para la proteína IL-6 en hígado (*Figura 19a*), se concluye de la misma manera que, bajo las condiciones del experimento, no hay suficiente evidencia para detectar cuadros de inflamación en alguno de los grupos y, para nuestro análisis, se considera que no hay interferencia de este factor en los marcadores por su

condición de proteínas de fase aguda (APP) y la necesidad de realizar algún tipo de ajuste a los resultados de los mismos (117). Es importante recordar que hay una estrecha relación entre el estado inflamatorio y la homeostasis del hierro, la mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo de este mineral son proteínas de fase aguda, tal es el caso de hepcidina, ferritina, ferroportina, hemojuvelina, receptores de transferrina, y su expresión debe analizarse siempre teniendo en cuenta si hay cuadros de inflamación para realizar ajustes pertinentes tal como lo indicamos en nuestro artículo de revisión “Classic and emergent indicators for the assessment of human iron status” (118).

Los resultados de Western Blot para ferritina en hígado (*Figura 19b*) muestran que todos los grupos experimentales difieren del grupo control. En el caso del grupo deficiente en vitamina A (FesvAd) hay sobreexpresión, lo cual indica que la carencia total de vitamina A, aún con un adecuado suministro de hierro induce algún tipo de daño o efecto a nivel del hepatocito, ocasionando una retención o reabsorción del hierro en forma de ferritina, impidiendo su movilización hacia otros tejidos de interés (90). Respecto de los grupos con carencia marginal de hierro (FeivAs y FeivAi) y el grupo con carencia marginal de vitamina A (FesvAi) se observa una subexpresión de ferritina hepática; para el caso de carencia de hierro es de esperar, pues se privilegia la circulación de hierro sérico en lugar de retenerlo en el hepatocito, pero la carencia marginal de vitamina A aún con cantidades adecuadas de hierro parece estar estimulando una baja expresión de ferritina lo que podría inducir algún tipo de stress oxidativo por sobrecarga de hierro sérico (65,119).

Los resultados de ferritina en bazo (*Figura 20a*) mostraron que solo el grupo sin vitamina A (FesvAd) no tuvo diferencias significativas con respecto del grupo control ($P=0.1076$); este es un hallazgo interesante que demuestra una relación entre la ausencia total de vitamina A y algún tipo de cuadro inflamatorio que puede incrementar la expresión de ferritina como proteína de fase aguda y marcador de inflamación (120), independiente del estado nutricional del hierro.

Sobre ferritina en duodeno (*Figura 21*) se encontró que no hay diferencias significativas ($P<0.05$) entre los grupos experimentales y el grupo control. Al realizar las comparaciones entre grupos, se encontró que el grupo suficiente en hierro y con deficiencia marginal de vitamina A (FesvAi) fue significativamente superior en expresión de ferritina que el grupo FeivAi ($P=0.0351$) y el grupo FeivAs ($P=0.0487$) esto sugiere que, a nivel duodenal, solamente el hierro dietario parece influenciar la expresión de ferritina como un mecanismo para regular el hierro circulante y prevenir estrés oxidativo, estos resultados son consistentes

con los hallazgos de Vanoica *et al* (121) que demostraron que no solo la hepcidina, también la ferritina actúan como reguladores del eflujo de hierro hacia el torrente sanguíneo.

Finalmente, sobre el efecto de la VAD en la expresión del receptor de transferrina en el hígado (*Figura 19c*) y en bazo (*Figura 20b*), este estudio no mostró ninguna diferencia entre el grupo control y los grupos experimentales para ambos tejidos. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Citelli *et al* (40,80,95) que indican que la VAD puede afectar el metabolismo del hierro pero no su absorción o transporte.

4.3. CONCLUSIÓN

Nuevamente, y como respaldo final a los hallazgos de las secciones previas, se sigue resaltando la importancia del suministro conjunto de vitamina A y hierro como una estrategia para reducir la prevalencia de anemia por deficiencia de hierro. En esta sección hay hallazgos interesantes respecto del efecto de las deficiencias combinadas sobre la homeostasis del hierro, especialmente en lo relacionado con su almacenamiento, situación que se evidencia en las alteraciones encontradas en los depósitos de ferritina tanto a nivel hepático como en bazo, algo que se había identificado en la sección anterior también para duodeno.

5. DISCUSIÓN GENERAL

El estudio se abordó con dos aproximaciones diferentes, una enfocada en lo sistémico que se centró en el efecto de las variaciones en el estatus de ambos micronutrientes sobre la ganancia de peso y los parámetros hematológicos de los animales; la segunda aproximación se enfocó en el efecto de las mismas variaciones a un nivel post-transcripcional (RNAm) y post-traducciona (proteínas) de algunos de los principales marcadores de la homeostasis del hierro en los animales de experimentación.

Los hallazgos previos se habían enfocado principalmente en las alteraciones de la hormona hepcidina, en este estudio se encontraron otras posibles vías de explicación para los casos de anemia por deficiencia de hierro y su relación con la deficiencia de vitamina A.

Lo más relevante para destacar es la necesidad de una aproximación multifactorial al problema y un modelo de explicación que no aborde un único efecto o biomarcador para explicar los mecanismos de regulación del metabolismo del hierro en carencia de vitamina A. Los estudios que se han hecho al respecto comenzaron su recorrido desde análisis epidemiológicos que, como en el estudio de Hodges en 1978 (67) proponían que al menos un porcentaje de los niveles de hemoglobina podían estar explicados por los niveles de retinol sérico, hasta estudios más recientes como los de Jiang *et al* y el efecto sobre la proteína reguladora de hierro 2 (65), da Cunha *et al* y la relación de la VAD con la eritropoiesis (40), Citelli *et al* y el completo análisis sobre diferentes genes implicados en la biodisponibilidad del hierro (80), Arruda *et al* y la relación VAD y hepcidina (78) y finalmente Han *et al* quienes también abordaron los efectos de la VAD con hepcidina y ferroportina (122). Puede verse entonces que hay suficiente evidencia, tal vez no basada en los mismos marcadores, pero si enfocada hacia un mismo efecto final, de la necesidad del suministro de vitamina A para reducir la prevalencia de anemia por deficiencia de hierro.

Los resultados son contundentes respecto del efecto combinado de ambos micronutrientes sobre la ganancia de peso en ratas Wistar macho jóvenes en cuanto a que son necesarios para garantizar un adecuado desarrollo de los animales. Este estudio valida entonces la importancia de la vitamina A y el hierro en un nivel más general, es claro que en un estado nutricional saludable, evidenciado entre otros por un adecuado crecimiento, es requisito para la disminución de otras prevalencias como la abordada en este estudio: anemia por deficiencia de hierro (123).

Otros estudios se han realizado al respecto, pero en animales con propósitos productivos como aves de corral, ganado lechero, cerdos y peces. Es el caso del estudio de Feng *et al* (124) quienes demostraron que la deficiencia de vitamina A puede llevar a una reducción de la tasa de crecimiento en patos pekineses, asociada a baja retención de retinol sérico o hepático como marcadores del estado nutricional de la vitamina A. En el caso de peces, el grupo de Koch *et al* (125) encontraron que un suministro de 8.800 UI/kg de vitamina A era el óptimo para garantizar una adecuada ganancia de peso en dorado (*Salminus brasiliensis*), destacando que dosis superiores, si bien no tenían impacto sobre la salud o desempeño de los animales, no eran recomendadas para evitar algún cuadro de hipervitaminosis.

En cuanto a parámetros hematológicos, definitivamente la deficiencia de vitamina A tiene un efecto negativo sobre la eritropoiesis independiente del estado nutricional de hierro. Esto refuerza nuestro planteamiento de que los programas de fortificación de harina de trigo con hierro como estrategia para disminuir la prevalencia de anemia no son completamente efectivos, cosa que ya había sido discutida por Hurrell *et al* (126), aunque sus conclusiones no abordaron interacciones con otros micronutrientes sino posibles deficiencias de las formas químicas empleadas.

Finalmente, tanto el análisis por PCR como el Western Blot, mostraron que la deficiencia de vitamina A tiene un efecto de regulación negativa sobre algunos de los principales marcadores de la homeostasis del hierro, concretamente se observaron alteraciones en aquellos relacionados con el almacenamiento (ferritina) y transporte (receptores de transferrina). Uno de los aspectos más interesantes del estudio fue que no se encontraron evidencias significativas que respaldaran los estudios previos sobre el impacto de la VAD sobre la hormona hepcidina, esto no quiere decir que tal relación no exista, sino que, en las condiciones en que se realizó nuestro experimento, no hay evidencia suficiente que la respalde.

Como hallazgo novedoso, se encontró mayor evidencia sobre el efecto de la VAD sobre la expresión de ferritina tanto a nivel post-transcripcional como a nivel post-traducciona, indicando que una forma en la cual la vitamina A puede afectar el metabolismo del hierro es regulando positivamente la expresión de los depósitos de éste, representados en ferritina, esto aporta una nueva vía de estudio que entra a complementar los hallazgos previos sobre el efecto en el transporte (vía ferroportina, transferrina y receptores de transferrina) y utilización final representada en las alteraciones de la eritropoiesis. Combinando estos conceptos quisimos integrarlos en un esquema donde se integren las principales proteínas asociadas al almacenamiento y transporte del hierro indicando el efecto que produce en ellas la VAD, destacando aquellos que han sido soportados por estudios previos y los que encontramos en nuestro estudio (Figura 22).

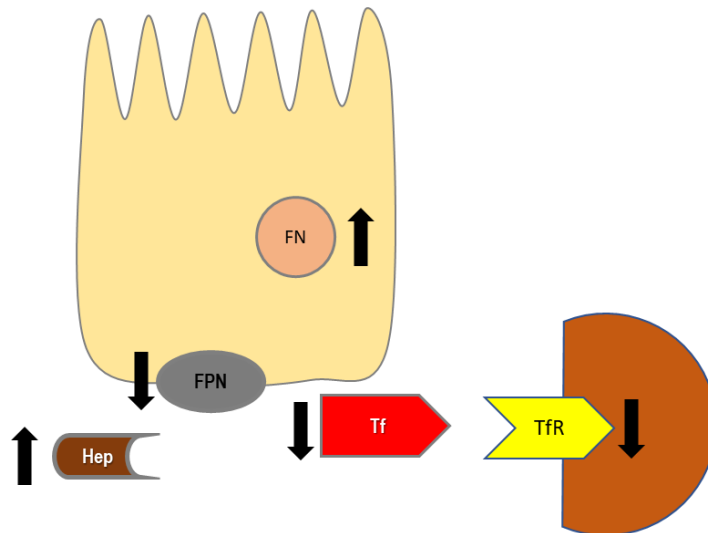


Figura 22. Representación del efecto de la VAD sobre la expresión de las principales proteínas asociadas al almacenamiento y transporte del hierro.
 FN: Ferritina; FPN: Ferroportina; Tf: Transferrina; TfR: Receptores de transferrina; Hep: Hepcidina. El sentido de las flechas indica aumento (↑) o disminución (↓) en su expresión.

En síntesis, este estudio soporta que una adecuada ingesta de vitamina A es necesaria para que el hierro sea empleado adecuadamente, tanto en la síntesis de nuevos glóbulos rojos, un adecuado desarrollo de los animales y un almacenamiento y transporte del mineral hacia los tejidos de interés.

5.1. RECOMENDACIONES

Para destacar del estudio su principal fortaleza consistió en la comparación de cinco diferentes relaciones de hierro y vitamina A y su efecto sobre la homeostasis del hierro. Otra gran fortaleza residió en su diseño estadístico que permitió obtener resultados de calidad con un número apropiado de animales, estando así conforme con los principios centrales de la ética del trabajo con animales de laboratorio.

Sin embargo, se reconocen también limitaciones importantes como la falta de análisis de marcadores adicionales como médula ósea, ferroportina desde la PCR, DMT-1 y marcadores adicionales de inflamación que podrían haber brindado información adicional para soportar los principales hallazgos. También se evidenció una limitación de índole metodológico que fue la ausencia de medición de pérdidas de hierro y retinol que podrían haberse detectado analizando heces fecales y orina.

Finalmente, a modo de recomendaciones para futuros estudios es importante considerar la implementación de:

- Estudios de localización de proteínas por inmunohistoquímica en los mismos tejidos: hígado, bazo y duodeno que permitan identificar la efectiva utilización de estas por sus tejidos diana.
- Nuevos enfoques de la anemia por deficiencia de vitamina A que aborden efectos a nivel molecular de los diferentes marcadores del metabolismo de la vitamina A y su posible interacción con la homeostasis del hierro.
- Estudios con marcadores e indicadores del estado de hierro adicionales como eritropoyetina, DMT1, eritroferrona, ferritina sérica, zinc protoporfirina, que aporten elementos adicionales a una mirada de conjunto del impacto de la VAD sobre la IDA.
- Otros tejidos de interés como médula ósea (por ser considerado el *gold standard* en el análisis del estado nutricional del hierro) y riñón (para profundizar en la relación con eritropoyetina).
- Estudios clínicos en población infantil que validen el suministro conjunto de vitamina A y hierro en recuperación de pacientes con IDA.
- Evaluación de matrices alimentarias fortificadas con ambos micronutrientes (p.e. leche).

REFERENCIAS

1. Ganz T. Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab.* 2008;7(4):288–90.
2. Waldvogel-Abramowski S, Waeber G, Gassner C, Buser A, Frey BM, Favrat B, et al. Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemotherapy.* 2014;41(3):213–21.
3. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. In: *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.* Washington DC: The National Academies Press; 2001. p. 290–393.
4. Mesías M, Seiquer I, Navarro MP. Iron nutrition in adolescence. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(11):1226–37.
5. Ke C, Lan Z, Hua L, Ying Z, Humina X, Jia S, et al. Iron metabolism in infants: Influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula. *Nutrition.* 2015;31(2):304–9.
6. Ministerio de Salud Pública (Colombia). Recomendaciones de ingesta de energía y nutrientes – RIEN para la población colombiana. Resolución 3803 de 2016. Vol. 2016. 2016.
7. Grotto HZW. Fisiología e metabolismo do ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32:08–17.
8. Saito H. Metabolism of iron stores. *Nagoya J Med Sci.* 2014;76(3–4):235–54.
9. Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol.* 2009;15(37):4617–26.
10. Gaitán D, Olivares M, Arredondo M, Pizarro F. Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev Chil Nutr.* 2006;33(2).
11. Cediel G, Olivares M, Gaitán D, Flores S, Brito A, Pizarro F. Effect of trypsin and mucin on heme iron bioavailability in humans. *Biol Trace Elem Res.* 2012;150(1–3):37–41.
12. Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26:115–9.
13. Brasselagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology.* 2011;140(4):1261–71.
14. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 2005;122(5):789–801.
15. Leong W-I, Lönnerdal B. Iron nutrition. In: *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans.* New York: Humana Press; 2012. p. 81–99.
16. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet].* 2015;1852(7):1347–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.011>
17. Andrews NC. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(10):991–4.

18. Garrick MD, Dolan KG, Horbinski C, Ghio AJ, Higgins D, Porubcin M, et al. DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. *BioMetals*. 2003;16(1):41–54.
19. Illing AC, Shawki A, Cunningham CL, Mackenzie B. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J Biol Chem*. 2012;287(36):30485–96.
20. Wiedeman A, Olivares G. M, Pizarro A. F, Araya Q. M. Suplementación con cobre entre comidas no tiene efecto sobre la nutrición de hierro en hombres. *Rev Chil Nutr*. 2009;36(4):1114–9.
21. Ríos-Castillo I, Olivares M, Brito A, de Romaña DL, Pizarro F. One-month of calcium supplementation does not affect iron bioavailability: a randomized controlled trial. *Nutrition*. 2014;30(1):44–8.
22. Vázquez M, Vélez D, Devesa V, Puig S. Participation of divalent cation transporter DMT1 in the uptake of inorganic mercury. *Toxicology*. 2015;331:119–24.
23. Latunde-Dada GO, Van der Westhuizen J, Vulpe CD, Anderson GJ, Simpson RJ, McKie AT. Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood Cells, Mol Dis*. 2002;29(3):356–60.
24. Oakhill JS, Marritt SJ, Gareta EG, Cammack R, McKie AT. Functional characterization of human duodenal cytochrome b (Cybrd1): Redox properties in relation to iron and ascorbate metabolism. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2008;1777(3):260–8.
25. Luo X, Hill M, Johnson A, Latunde-Dada GO. Modulation of Dcytb (Cybrd 1) expression and function by iron, dehydroascorbate and Hif-2 α in cultured cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2014;1840(1):106–12.
26. Lane DJR, Merlot AM, Huang MLH, Bae DH, Jansson PJ, Sahni S, et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]*. 2015;1853(5):1130–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.021>
27. White KN, Conesa C, Sánchez L, Amini M, Farnaud S, Lorzoralak C, et al. The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2012;1820(3):411–6.
28. Xu E, Chen M, Zheng J, Maimaitiming Z, Zhong T, Chen H. Deletion of hephaestin and ceruloplasmin induces a serious systemic iron deficiency and disrupts iron homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(3):1905–10.
29. Chen M, Zheng J, Liu G, Xu E, Wang J, Fuqua BK, et al. Ceruloplasmin and hephaestin jointly protect the exocrine pancreas against oxidative damage by facilitating iron efflux. *Redox Biol*. 2018;17(May):432–9.
30. Mendiburo MJ, Le Blanc S, Espinoza A, Pizarro F, Arredondo M. Transepithelial heme-iron transport: Effect of heme oxygenase overexpression. *Eur J Nutr*. 2011;50(5):363–71.
31. Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz JD. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2007;114(3):345–58.
32. Ge XH, Wang Q, Qian ZM, Zhu L, Du F, Yung WH, et al. The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *J Nutr Biochem*. 2009;20(11):860–5.
33. Viatte L, Vaulont S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie*. 2009;91:1223–8.
34. Singh B, Arora S, Agrawal P, Gupta SK. Hepcidin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta*. 2011;412:823–30.
35. Vyoral D. Hepcidin : A direct link between iron metabolism and immunity. 2005;37:1768–73.
36. Kwapisz J, Slomka A, Zekanowska E. Hepcidin and its role in iron homeostasis. *J Int Fed Clin Chem Lab Med*. 2009;20(2):124–8.
37. Tussing-Humphreys L, Pustacioglu C, Nemeth E, Braunschweig C. Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: introducing hepcidin. *J Acad Nutr Diet*. 2012;112(3):391–400.

38. Przybyszewska J, Żekanowska E. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract. *Gastroenterol Rev.* 2014;4(4):208–13.
39. Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):500–10.
40. da Cunha MSB, Siqueira EMA, Trindade LA, Arruda SF. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. *J Nutr Biochem.* 2014;25(10):1035–44.
41. Porto G, Oliveira S, Pinto JP. Hepcidina: a molécula-chave na regulação do metabolismo do ferro. *J Port Gastreterologia.* 2012;18:26–32.
42. Raha-Chowdhury R, Raha AA, Forostyak S, Zhao JW, Stott SRW, Bomford A. Expression and cellular localization of hepcidin mRNA and protein in normal rat brain. *BMC Neurosci [Internet].* 2015;16(1):1–12. Available from: ???
43. Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev.* 2017;31(4):225–33.
44. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: Insights from mouse models. *Front Pharmacol.* 2014;5 JUL(July):1–15.
45. Bhutta ZA, Salam RA, Das JK. Meeting the challenges of micronutrient malnutrition in the developing world. *Br Med Bull.* 2013;106(1):7–17.
46. Lynch SR. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr Rev.* 1997;55(4):102–10.
47. Lynch S, Pfeiffer CM, Georgieff MK, Brittenham G, Fairweather-Tait S, Hurrell RF, et al. Biomarkers of nutrition for development (BOND)-iron review. *J Nutr.* 2018;148:1001S-1067S.
48. WHO/ FAO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2004;139.
49. Ball GFM. Vitamin A: retinoids and the provitamin A carotenoids. In: *Vitamins in Food Analysis, Bioavailability, and Stability.* CRC Press - Taylor & Francis; 2006. p. 39–92.
50. Chen W, Chen G. The Roles of Vitamin A in the Regulation of Carbohydrate, Lipid, and Protein Metabolism. *J Clin Med.* 2014;3(2):453–79.
51. Reboul E. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: Focus on transport proteins. *Nutrients.* 2013;5(9):3563–81.
52. WHO. The global prevalence of anaemia in 2011. Geneva: World Health Organization; 2015.
53. Lozoff B, Georgieff MK. Iron Deficiency and Brain Development. *Semin Pediatr Neurol.* 2006;13(3):158–65.
54. Stoltzfus RJ. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Summary: implications for research and programs. *J Nutr.* 2001;131(2S-2):697S-700S; discussion 700S-701S.
55. WHO. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. 2001.
56. WHO. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. 2011.
57. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva, Switz World Heal Organ. 2011;1–6.
58. Grantham-Mcgregor S, Baker-Henningham H. Iron deficiency in childhood: Causes and consequences for child development. *Ann Nestle.* 2010;68(3):105–19.
59. WHO. Worldwide prevalence of anaemia. [Internet]. 2008 [cited 2018 Mar 28]. Available from: whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf
60. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, Profamilia, Instituto Nacional de Salud, Ministerio de la Protección Social. Encuesta nacional de la situación nutricional en Colombia 2010. Ensi. Bogotá: ICBF; 2011.
61. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta nacional de la situación nutricional ENSIN 2015: nota de política. Bogotá D.C.; 2018.
62. Sandström B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr.*

- 2001;85 Suppl 2:S181–5.
63. Camaschella C. Iron deficiency. *Blood*. 2019;133(1):30–9.
 64. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet*. 2016;387:907–16.
 65. Jiang S, Wang C, Lan L, Zhao D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition*. 2012;28(3):281–7.
 66. Koessler KK, Maurer S, Loughlin R. The relation of anemia, primary and secondary, to vitamin A deficiency. *JAMA*. 1926;87(7):476–82.
 67. Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JE, Wallace DL, Rucker RB, Mejia LA, et al. Hematopoietic studies in Vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr*. 1978;(May):876–85.
 68. Roodenburg AJC, Van Pelt AMM, West CE, Beynen AC. Effect of vitamin A supplementation for 3 days on iron metabolism, liver function indicator enzymes and differential cell counts in bone marrow of rats with severe vitamin A deficiency. *Nutr Res*. 1996;16(11–12):1933–41.
 69. Roodenburg AJC, West CE, Beynen AC. Vitamin A status affects the efficacy of iron repletion in rats with mild iron deficiency. *J Nutr Biochem*. 1996;7(2):99–105.
 70. Roodenburg AJC, West CE, Beguin Y, Van Dijk JE, Van Eijk HG, Marx JJM, et al. Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency. *J Nutr Biochem*. 2000;11(4):223–30.
 71. Palafox NA, Gamble M V., Dancheck B, Ricks MO, Briand K, Semba RD. Vitamin A deficiency, iron deficiency, and anemia among preschool children in the Republic of the Marshall Islands. *Nutrition*. 2003;19(5):405–8.
 72. Hamdy a M, Abdel Aleem MM, El-Shazly a a. Maternal vitamin A deficiency during pregnancy and its relation with maternal and neonatal hemoglobin concentrations among poor Egyptian families. *ISRN Pediatr*. 2013;2013:652148.
 73. Chen K, Zhang X, Li T yu, Chen L, Wei X ping, Qu P, et al. Effect of vitamin A, vitamin A plus iron and multiple micronutrient-fortified seasoning powder on infectious morbidity of preschool children. *Nutrition*. 2011;27(4):428–34.
 74. Jafari SM, Heidari G, Nabipour I, Amirinejad R, Assadi M, Bargahi A, et al. Serum retinol levels are positively correlated with hemoglobin concentrations, independent of iron homeostasis: A population-based study. *Nutr Res*. 2013;33(4):279–85.
 75. Arguello MA, Schulze KJ, Wu LSF, Dreyfuss ML, Khatry SK, Christian P, et al. Circulating IGF-1 may mediate improvements in haemoglobin associated with vitamin A status during pregnancy in rural Nepalese women. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2015;24(1):128–37.
 76. Poveda E, Cuartas A, Guarín S, Forero Y, Villarreal E. Estado de los micronutrientes hierro y vitamina A, factores de riesgo para las deficiencias y valoración antropométrica en niños preescolares del municipio de Funza, Colombia. *Biomédica*. 2007;27:76–93.
 77. Villamor E, Marín C, Mora-Plazas M, Oliveros H. Micronutrient status in middle childhood and age at menarche: Results from the Bogotá School Children Cohort. *Br J Nutr*. 2017;118(12):1097–105.
 78. Arruda SF, Siqueira EM de A, de Valência FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition*. 2009;25(4):472–8.
 79. Rodrigues FL. Deficiência de vitamina A leva ao aumento de transcritos de hepcidina no fígado e acúmulo de ferro no baço de ratos machos recém-desmamados. Universidade de Brasília; 2012.
 80. Citelli M, Bittencourt LL, Da Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C. Vitamin a modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res*. 2012;149(1):64–70.
 81. García Y, Díaz-Castro J. Advantages and disadvantages of the animal models v. in vitro studies in iron metabolism: a review. *Animal*. 2013;7(10):1651–8.
 82. Cao C, Thomas CE, Insogna KL, Brien KOO. Duodenal absorption and tissue utilization of dietary heme and non-heme iron differ in rats. *J Nutr*. 2014;144(C):1710–7.

83. Ministerio de Salud Pública (Colombia). Fortificación de harina de trigo. Decreto 1944 de 1996. 1996.
84. Ministerio de Salud Pública (Colombia). Fortificación de azúcar con vitamina A. Decreto 1324 de 1998. 1998.
85. Ministerio de Salud Pública (Colombia). Derogación de la fortificación de vitamina A con azúcar. Decreto 1615 de 2000. 2018 p. 1–2.
86. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):303.
87. Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, da Costa L, Schillinger F, Bailly N, et al. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: Results of a multicentre study. *Ann Hematol.* 2011;90:759–68.
88. Thermo Scientific. NanoDrop Nucleic Acid Technical Guide. 2010;Revised 11:1–30. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf>
89. Kong WN, Niu QM, Ge L, Zhang N, Yan SF, Chen W Bin, et al. Sex differences in iron status and hepcidin expression in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2014;160(2):258–67.
90. Malik IA, Wilting J, Ramadori G, Naz N. Reabsorption of iron into acutely damaged rat liver: A role for ferritins. *World J Gastroenterol.* 2017;23(41):7347–58.
91. Sheikh N, Batusic DS, Dudas J, Tron K, Neubauer K, Saile B, et al. Hepcidin and hemojuvelin gene expression in rat liver damage: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2006;291(3):G482–90.
92. Arcila-Quinceno VH, Conde-Cotes CA, Nieto-Pico JE, García-Prada FH. Comparación de los valores de referencia hematológicos en ratas wistar / UIS (*Rattus norvegicus*) con parámetros establecidos en laboratorios de altos estándares. *Rev Spei Domus.* 2009;6(12):45–51.
93. Jacob Filho W, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhão MS, Caldeira M, et al. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Aging Male.* 2018;21(2):145–8.
94. National Research Council. Nutrient requirements of laboratory animals,. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals,*. 2015.
95. Saraiva BC, Soares MC, dos Santos LC, Pereira SCL, Horta PM. Iron deficiency and anemia are associated with low retinol levels in children aged 1 to 5 years. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(6):593–9.
96. Alfaro-Calvo T, Carvajal-Fernández D. Influencia de la deficiencia de vitamina A sobre la anemia en niños(as) preescolares de Costa Rica. *Acta Pediátr Costarric.* 2001;15(2):9–12.
97. Sales MC, de Azevedo Paiva A, de Queiroz D, França Costa RA, Lins da Cunha MA, Pedraza DF. Nutritional status of iron in children from 6 to 59 months of age and its relation to vitamin A deficiency. *Nutr Hosp.* 2013;28(3):734–40.
98. Semba RD, Bloem MW. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(4):271–81.
99. Ameny MA, Raila J, Walzel E, Schweigert FJ. Effect of iron and/or vitamin A re-supplementation on vitamin A and iron status of rats after a dietary deficiency of both components. *J Trace Elem Med Biol.* 2002;16(3):175–8.
100. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol.* 2016;38(Suppl 1):123–32.
101. Dewamitta SR, Joseph C, Purton LE, Walkley CR. Erythroid-extrinsic regulation of normal erythropoiesis by retinoic acid receptors. *Br J Haematol.* 2014;164(2):280–5.
102. Honda H, Kobayashi Y, Onuma S, Shibagaki K, Yuza T, Hirao K, et al. Associations among erythroferrone and biomarkers of erythropoiesis and iron metabolism, and treatment with long-term erythropoiesis-stimulating agents in patients on hemodialysis. *PLoS One.* 2016;11(3):1–10.
103. Hoofnagle AN. Harmonization of blood-based indicators of iron status: making the hard work

- matter. *Am J Clin Nutr.* 2017;106(1d):1615S-1619S.
104. Aulakh R, Sohi I, Singh T, Kakkar N. Red cell distribution width (RDW) in the diagnosis of iron deficiency with microcytic hypochromic anemia. *Indian J Pediatr.* 2009;76(3):265–8.
 105. Amine EK, Corey J, Hegsted DM, Hayes KC. Comparative Hematology during Deficiencies of Iron and Vitamin A in the Rat. *J Nutr.* 1970;100(9):1033–40.
 106. Okonko DO, Mandal AKJ, Missouriis CG, Poole-Wilson PA. Disordered iron homeostasis in chronic heart failure: Prevalence, predictors, and relation to anemia, exercise capacity, and survival. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(12):1241–51.
 107. Berda-Haddad Y, Faure C, Boubaya M, Arpin M, Cointe S, Frankel D, et al. Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? *Int J Lab Hematol.* 2017;39(1):32–41.
 108. Cossio-Bolaños M, Campos RG, Vitoria RV, Hochmuller Fogaça RT, de Arruda M. Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats. *Nutr Hosp.* 2013;28(6):2151–6.
 109. Moraal M, Leenaars PPAM, Arnts H, Smeets K, Savenije BS, Curfs JHAJ, et al. The influence of food restriction versus ad libitum feeding of chow and purified diets on variation in body weight, growth and physiology of female wistar rats. *Lab Anim.* 2012;46(2):101–7.
 110. Petranovic D, Batinac T, Petranovic D, Ruzic A, Ruzic T. Iron deficiency anaemia influences cognitive functions. *Med Hypotheses.* 2008;70(1):70–2.
 111. Barber T, Borrás E, Torres L, García C, Cabezuelo F, Lloret A, et al. Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(1):1–7.
 112. Arreguín A, Ribot J, Mušinović H, von Lintig J, Palou A, Bonet ML. Dietary vitamin A impacts DNA methylation patterns of adipogenesis-related genes in suckling rats. *Arch Biochem Biophys.* 2018;650:75–84.
 113. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(6):1906–10.
 114. Babitt JL, Lin HY. Molecular Mechanisms of Hepcidin Regulation: Implications for the Anemia of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2010;55(4):726–41.
 115. Schmidt PJ, Fleming MD. Modulation of hepcidin as therapy for primary and secondary iron overload disorders: Preclinical models and approaches. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(2):387–401.
 116. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W147–53.
 117. Namaste SML, Rohner F, Huang J, Bhushan NL, Flores-Ayala R, Kupka R, et al. Adjusting ferritin concentrations for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. *Am J Clin Nutr.* 2017;106:359S-71S.
 118. Restrepo-Gallego M, Díaz LE, Rondó PHC. Classic and emergent indicators for the assessment of human iron status. *Crit Rev Food Sci Nutr [Internet].* 2020;0(0):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1787326>
 119. Chiou YL, Chen YH, Ke T, Ko WS. The effect of increased oxidative stress and ferritin in reducing the effectiveness of therapy in chronic hepatitis C patients. *Clin Biochem.* 2012;45(16–17):1389–93.
 120. Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics.* 2014;6(4):748–73.
 121. Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schümann K, Kühn LC. Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metab.* 2010;12(3):273–82.
 122. Han L, Liu Y, Lu M, Wang H, Tang F. Retinoic acid modulates iron metabolism imbalance in anemia of inflammation induced by LPS via reversely regulating hepcidin and ferroportin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;507(1–4):280–5.

123. Vuralli D, Tumer L, Hasanoglu A, Biberoglu G, Pasaoglu H. Vitamin A status and factors associated in healthy school-age children. *Clin Nutr*. 2014;33(3):509–12.
124. Feng YL, Xie M, Tang J, Huang W, Zhang Q, Hou SS. Effects of vitamin A on growth performance and tissue retinol of starter White Pekin ducks. *Poult Sci*. 2019;98(5):2189–92.
125. Koch JFA, Sabioni RE, Aguilar Aguilar FA, Lorenz EK, Cyrino JEP. Vitamin A requirements of dourado (*Salminus brasiliensis*): Growth performance and immunological parameters. *Aquaculture* [Internet]. 2018;491(September 2017):86–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.017>
126. Hurrell R, Ranum P, De Pee S, Biebinger R, Hulthen L, Johnson Q, et al. Revised recommendations for iron fortification of wheat flour and an evaluation of the expected impact of Current national wheat flour fortification programs. *Food Nutr Bull*. 2010;31(1 SUPPL.):7–21.
127. Malhotra N, Kang J. SMAD regulatory networks construct a balanced immune system. *Immunology*. 2013;139(1):1–10.

Influence of Dietary Vitamin A and Iron Deficiency on Hematologic Parameters and Body Weight of Young Male Wistar Rats

Mauricio Restrepo-Gallego and Luis E Díaz*

Micronutrient deficiency is one of the most prominent public health concerns; in particular, vitamin A and iron are determinants of appropriate development, and vitamin A influences iron homeostasis and metabolism. Here we compared the effects of diets that were sufficient and insufficient in vitamin A and iron on the hematologic parameters and body weight of rats. Male Wistar rats were randomly divided into 5 dietary groups ($n = 7$ per group): adequate in iron and vitamin A (control); adequate in iron but low in vitamin A (FesvAi); adequate in iron but lacking vitamin A (FesvAd); low in iron but adequate in vitamin A (FeivAs); and low in both iron and vitamin A (FeivAi). After 6 wk, rats showed significant differences in serum iron relative to the control diet (control, $256 \pm 44 \mu\text{g/dL}$; FesvAi, $220 \pm 16 \mu\text{g/dL}$; FesvAd, $181 \pm 15 \mu\text{g/dL}$; FeivAs, $131 \pm 44 \mu\text{g/dL}$; FeivAi, $75 \pm 19 \mu\text{g/dL}$). Rats on iron-deficient diets showed reduced Hgb values relative to the control diet (control, $15.9 \pm 0.7 \text{ g/dL}$; FeivAs, $13.2 \pm 1.6 \text{ g/dL}$; FeivAi, $12.9 \pm 1.0 \text{ g/dL}$), MCV (control: $57 \pm 10 \text{ fL}$; FeivAs, $48 \pm 10 \text{ fL}$; FeivAi, $44 \pm 3 \text{ fL}$), and Hct (control, $53\% \pm 2\%$; FeivAs, $44\% \pm 5\%$; FeivAi, $42\% \pm 8\%$). All of the experimental dietary groups showed significant differences in reticulocyte count when compared with the control group (control, $2.7\% \pm 2.2\%$; FesvAd, $0.6\% \pm 0.2\%$; FesvAi, $0.3\% \pm 0.1\%$; FeivAs, $1.2\% \pm 0.2\%$; FeivAi, $0.6\% \pm 0.5\%$). The mean difference in body weight for the experimental groups, relative to the control group, was $30 \pm 10 \text{ g}$. These results suggested that, in young male Wistar rats, both iron and vitamin A are essential to cause increases in body weight and various hematologic parameters.

Abbreviations: ID, iron deficiency; VAD, vitamin A deficiency

DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000020

Micronutrient deficiency is a major public health concern in developing countries.⁹ Vitamin A deficiency (VAD) and iron deficiency (ID) anemia are determinants for the cognitive, physical, and behavioral development of children.^{40,43} Iron is an essential mineral that belongs to the group of transition metals; because of its chemical and physical properties, iron plays a major role in the metabolisms of most living beings. Iron is found in numerous proteins, particularly those associated with oxygen transport. Therefore, in practical terms, for many organisms, life would not be possible without iron.³²

Anemia is a health condition that is linked to an inadequate supply of oxygen to the tissues. In children and young adults, anemia is expressed as reduced cognitive performance,³⁵ inadequate physical development, and immune system problems;²⁵ therefore, anemia is a high-impact public health matter in developing countries. Approximately 42.6% of preschool-age children are anemic, as are 38.2% of pregnant women and 29.0% of nonpregnant women. Thus, overall, 496.3 million people are anemic.⁴⁵

Often anemia is linked only to ID; however, although ID is responsible for 35% of anemia cases, there are other causes—both nutritional and otherwise. The nutritional causes include other micronutrient deficiencies and antinutritional factors, and other common causes are bleeding, infection, and genetic conditions.²⁷ ID anemia occurs when ferritin levels are below 12

$\mu\text{g/L}$ and when Hgb levels are below established cutoff points (11 g/dL for children younger than 5 y and pregnant women; 12 g/dL for children 5 to 12 y old, nonpregnant women, and teenage males; and 13 g/dL for teenage females).¹⁷ The main causes of ID anemia are nutritional and antinutritional dietary factors that block the body's absorption or use of iron.^{29,39}

Sources of dietary iron include meat (which provides heme iron), vegetables, and legumes (both of which provide nonheme iron). The absorption of most dietary iron occurs in the duodenum and proximal jejunum; the exact location depends on the physical state of the iron atom. Heme iron is strongly bound to globular proteins that must be hydrolyzed through gastric pH and both gastric and intestinal proteases.¹⁸

Nonheme iron requires gastric pH to promote its solubilization and release from natural components.¹⁸ Both heme and nonheme iron are absorbed in the duodenum;⁴² however, the enterocyte's absorption mechanisms depend on the dietary source. Nonheme iron mainly starts in the ferric form (Fe^{3+}) and must be reduced to the ferrous form (Fe^{2+}). The duodenal cytochrome B mediates this process, and ascorbic acid (vitamin C) enhances it; once reduced, the iron is taken into the enterocyte through apical-side membrane proteins, divalent metal transporter 1 and heme carrier protein 1, which is specific to that form of iron.¹⁰ In addition, heme carrier protein 1 takes in heme iron on the other side. Then, the intact heme iron nucleus is sent to an endosome, where a heme-oxygenase enzyme degrades it by releasing iron from the protoporphyrin. Finally, in the endosome, an isoform of divalent metal transporter 1 releases the iron into the cytosol.

Received: 07 Feb 2019. Revision requested: 17 Apr 2019. Accepted: 26 Jun 2019.
Doctoral Program in Bioscience, La Sabana University, Chía, Cundinamarca, Colombia
*Corresponding author. Email: luisdiaz1@unisabana.edu.co

Once in the cytosol, heme and nonheme iron are indistinguishable.³ However, in the enterocyte, dietary iron can be (1) included in the membrane mitochondrial cytochromes, where it contributes to the oxide-reduction processes that are necessary for the electron-transport chain; (2) sent to a transitory pool of free intracellular iron that heavily autoregulates iron intake; (3) stored in cellular ferritin protein; or (4) exported to the bloodstream through ferroportin, a membrane protein on the basolateral side of the enterocyte. Once outside of the enterocyte, a ferroxidase is needed to oxidize the iron back into the ferric form; this process can involve a membrane protein called hephaestin or a plasmatic protein called ceruloplasmin. After this process, the iron is bound to transferrin—the protein that transports iron to the various tissues that recognize it (through the membrane's transferrin receptors); nontransferrin-bound iron has also been identified in the bloodstream.²⁸

VAD is the other critically important micronutrient deficiency declared by the WHO; vitamin A is a determinant of many metabolic processes, including sight, hematopoiesis, embryonic development, cell differentiation, various immune-system functions, and genic transcription.⁴⁴ Vitamin A is necessary to the production of rhodopsin, which is required for low-light vision, normal growth and development, reproduction, and maintenance of skeletal and epithelial tissues. Vitamin A includes retinol and other molecules that mimic retinol's biologic activity; all of these molecules are from the provitamin A carotenoid group.³⁶

Some researchers have suggested that vitamin A plays a role in the metabolism of iron; for this reason, many countries have developed supplementation strategies for both iron and vitamin A to reduce the prevalence of anemia.⁴¹ Although the exact interaction of iron and vitamin A is not well known,^{23,40} several mechanisms have been suggested, including the regulation of either hematopoiesis^{19,24} or various proteins related to iron homeostasis (for example, transferrin,²⁶ iron regulatory protein 2,²³ and hepcidin).^{6,13,15}

We conducted this study based on the hypothesis that both vitamin A and iron must be taken together to ensure adequate weight gain and hematologic parameters. The objective of this study was, by using on 5 combinations of iron and vitamin A concentrations, to determinate the influences of vitamin A and iron on body weight and various hematologic parameters in young male Wistar rats (*Rattus norvegicus*).

Materials and Methods

Animals and diets. We conducted this study at the Bioterium of the Research Laboratories of Antioquia University (Medellín, Colombia). The sample comprised 35 male, SPF, Wistar rats (age, 21 d; weight, 62.5 ± 6.1 g; Neurosciences Laboratory, Antioquia University). We housed the rats, which had a mean body weight, in polycarbonate cages with stainless-steel wire covers. The environmental conditions involved a 12:12-h light:dark cycle, room temperature of 22 ± 2 °C, and relative humidity between 55% and 65%; the air was renewed every 4 min. The rats had free access to food and demineralized water from polycarbonate dispensers, and we weighed them every 2 wk by using a digital balance (resolution, 0.1 g; model BJ2100D, (Precisa, Dietikon, Switzerland)). The Ethical Committees of Antioquia University (protocol no. 108.090217) and La Sabana University (protocol no. 55.170516) approved this study's procedures.

We randomly assigned the rats to 5 diets, with 7 animals per group; in these diets, iron was in the form of ferric citrate, and vitamin A was in the form of retinol acetate. We fed the control group an AIN-93G diet for growing rodents, which we modified

to provide sufficient iron (45 mg/kg) and vitamin A (1200 µg/kg). We fed the experimental groups AIN-93G diets, which we modified as follows: FesVAd, 45 mg/kg iron and no vitamin A; FesVAi, 45 mg/kg iron and 120 µg/kg vitamin A; FeiVAs, 15 mg/kg iron and 1200 µg/kg vitamin A; and FeiVAi, 15 mg/kg iron and 120 µg/kg vitamin A. For each group's cage, we measured food intake weekly during the experimental period by weighing the remaining food in the cages, then divided that total intake by the number of rats in the cage to get the food intake per animal. Table 1 shows the composition and nutritional profile of each diet; all diets were produced by Research Diets (New Brunswick, NJ).

After 6 wk of feeding, we anesthetized the rats by using isoflurane (Piramal Critical Care, Mumbai, India) and used cardiac punctures to collect 500 µL of whole blood in microtainer tubes with EDTA-K2 (Impromini, Improve Medical Instruments, Guangzhou, China) for later analysis of the hematologic parameters. We also collected 2 mL in serum tubes (Vacutest gel with a cloth activator, Vacutest Kima, Arzegrande, Italy) to analyze the iron and retinol levels. After extracting their blood, we euthanized the animals with 70% CO₂. We preserved the liver, spleen, and small intestine of each rat for further analysis.

Biochemical parameters. Using centrifugation (448 to 700 × g/min for 15 to 20 min), we separated the fraction of blood that we had kept for iron and retinol analysis after complete clotting. We divided the supernatant into 2 fractions to determine serum iron and serum retinol levels. We analyzed the serum iron concentrations by using atomic absorption spectrometry (Analyst 3100 Analyzer, Perkin Elmer Life Sciences, Wellesley, MA) and measured the serum retinol concentrations by using a HPLC-UV apparatus (model PU-2080 plus chromatography pump, UV-2075 UV detector, and 807-IT integrator; Jasco, Tokyo, Japan).

Hematologic parameters. We measured the hematologic parameters—including Hgb, MCV, RBC count, reticulocyte count, Hct, MCH, and MCHC—by using an automated hematology analyzer (model URIT-2900, Urit Medical, Guangxi, China).

Statistical analysis. We analyzed the data by using SPSS software (SPSS Statistics for Windows, version 25.0, IBM, Armonk, NY) and examined the data for normal distribution by using the Kolmogorov-Smirnov test. We expressed the data as mean \pm 1 SD and then analyzed the mean differences between the control and experimental groups using the Least Significant Difference test. We analyzed weight gain by using repeated-measures ANOVA. We considered *P* values of less than 0.05 to be significant. According to a power analysis, using 7 rats in each group achieves 80% power at a confidence level of 95%; previous researchers obtained a difference of 4 g/dL of Hgb content according to a SD of 2.39 g/dL.¹²

Results

Biochemical parameters. All of the intergroup comparisons indicated significant differences in serum iron content among male rats. Both groups with low amounts of dietary iron (FeiVAs and FeiVAi) had significant differences from the control group (*P* < 0.001 for both groups). VAD (FesVAi and FesVAd) altered the total serum iron content (*P* = 0.024 and 0.001, respectively), and the FesVAd group exhibited the lowest values.

In terms of serum retinol levels, the groups with insufficient or no dietary vitamin A all had significantly lower levels of serum retinol than the control group (*P* < 0.001 for both groups). Among the multiple comparisons, only the rats given diets with low vitamin A (FesVAi and FeiVAi) showed no significant intergroup difference (*P* = 0.980; Table 2)

Table 1. Ingredient composition and nutritional profile for each diet

Ingredient	Control	FesvAd	FesvAi	FeivAs	FeivAi
Corn starch	397.5	397.5	397.5	397.5	397.5
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Maltodextrin 10	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	0	0	0	0
Cotton Seed Oil	0	70.0	70.0	70.0	70.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mix ^a	35.0	35.0	35.0	0	0
Mineral mix ^b	0	0	0	35	35
Vitamin mix ^c	10.0	0	0	10.0	0
Vitamin mix ^d	0	10	10	0	10
L-Cysteine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Ferric citrate [17.4% Fe]	0.03	0.03	0.03	0.07	0.07
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Vitamin A palmitate [500.000 IU/g]	0	0	0.0008	0	0.0008
Protein [%]	20	20	20	20	20
Fat [%]	7	7	7	7	7
Fiber [%]	5	5	5	5	5
Carbohydrate [%]	64	64	64	64	64
Iron [mg/kg]	45	45	45	15	15
Vitamin A [μ g/kg] as retinol acetate	1200	0	120	1200	120

d, deficient; i, insufficient; s, sufficient

Ingredients are listed as g/kg except when noted.

^aAIN-93G-MX.

^bAIN-93G-MX deficient in iron.

^cAIN-93G-VX.

^dAIN-93G-VX without vitamin A

Table 2. Biochemical parameters.

Parameter	Control	FesvAd	FesvAi	FeivAs	FeivAi
Serum iron [μ g/dL]	256 \pm 44 ^a	181 \pm 15 ^b	220 \pm 16 ^c	131 \pm 44 ^d	75 \pm 18 ^e
Serum retinol [μ mol/L]	1.60 \pm 0.16 ^a	0.24 \pm 0.04 ^b	0.55 \pm 0.10 ^c	1.26 \pm 0.12 ^d	0.65 \pm 0.08 ^c

n = 7 rats per group; values with different superscripted letters differ significantly (*P* < 0.05).

Hematologic parameters. Table 3 summarizes the results regarding hematologic parameters for the 5 groups. The groups with low dietary iron (FeivAs and FeivAi) had decreased levels of Hgb (*P* < 0.001 for both groups), MCV (*P* = 0.002 and 0.041 respectively), and Hct (*P* = 0.007 and 0.002 respectively) than the control group had. All of the experimental groups showed significant differences in reticulocyte count when compared with the control group (FeivAi, *P* < 0.001; FeivAs, *P* = 0.010; FesvAi, *P* = 0.001; FesvAd, *P* < 0.001). For MCH, only the FeivAi group was significantly (*P* = 0.006) different from the control group. There were no significant intergroup differences in RBC count or MCHC.

Body weight and food intake. Body weight at baseline was comparable among the 5 groups of rats (Figure 1) By week 5, rats fed the FesvAi diet weighed significantly less than the control group (*P* = 0.005). After week 7, all experimental groups showed significantly less weight gain than the control group (FeivAi, *P* < 0.001; FeivAs, *P* = 0.030; FesvAi, *P* < 0.001; FesvAd, *P* = 0.006). The comparisons among the experimental groups after week 7 revealed no significant differences between them. At the end of the experiment, the mean difference in body weight for the

experimental groups, relative to the control group, was 29.8 \pm 10.0 g. The groups showed no significant differences in food intake (*P* = 0.126); the average daily food intake per rat was 15.5 g/d, which is consistent with the expected food intake for growing animals of this type.³³

Discussion

Among the groups of rats fed diets containing differing amounts of iron and vitamin D, all of the intergroup differences in serum iron were significant, running from highest to lowest as: Control > FesvAi > FesvAd > FeivAs > FeivAi. The first 3 groups in this list had sufficient iron, with decreasing vitamin A from the first through the third groups; our finding suggests that, even with an adequate amount of iron in the diet, insufficient vitamin A can cause serum iron levels to decrease proportionally. These results are consistent with previous findings⁴⁰ regarding a positive association between serum retinol deficiency and serum ID in people from Vitoria, Brazil. Other authors have similarly linked VAD with ID across many epidemiologic studies. For example, the odds anemia in children

Table 3. Hematologic parameters

Parameter	Reference value	Group				
		Control	FesvAd	FesvAi	FeivAs	FeivAi
Hgb [g/dL]	15.2 ± 1.3	15.9 ± 0.7 ^a	16.2 ± 2.4 ^a	15.6 ± 0.4 ^a	13.2 ± 1.6 ^b	12.9 ± 1.0 ^b
MCV [fL]	62.4 ± 1.4	56.8 ± 9.9 ^a	59.9 ± 2.3 ^a	58.2 ± 6.9 ^a	48.3 ± 9.6 ^b	43.6 ± 3.3 ^b
RBC count [$\times 10^6/\mu\text{L}$]	8.2 ± 0.3	9.5 ± 1.3 ^a	8.9 ± 0.9 ^a	9.0 ± 1.6 ^a	8.9 ± 2.0 ^a	10.0 ± 0.9 ^a
Reticulocyte count [%]	2.0 ± 1.0	2.7 ± 2.2 ^a	0.6 ± 0.2 ^b	0.3 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.2 ^b	0.6 ± 0.5 ^b
Hct [%]	51.3 ± 1.4	52.9 ± 2.1 ^a	52.9 ± 4.3 ^a	51.4 ± 6.3 ^a	43.7 ± 4.7 ^b	42.2 ± 8.1 ^b
MCH [pg]	18.5 ± 1.5	17.2 ± 3.5 ^a	18.3 ± 1.8 ^a	17.9 ± 2.9 ^a	15.2 ± 2.9 ^a	13.0 ± 1.1 ^b
MCHC [g/dL]	29.7 ± 2.2	30.2 ± 1.6 ^a	30.5 ± 2.5 ^a	30.7 ± 3.5 ^a	29.8 ± 2.0 ^a	31.7 ± 3.5 ^a

n = 7 rats per group. Reference values are according to reference 4 except for reticulocyte count, which is according to reference 22. Data are given as mean ± 1 SD; values with different superscripted letters differ significantly (*P* < 0.05).

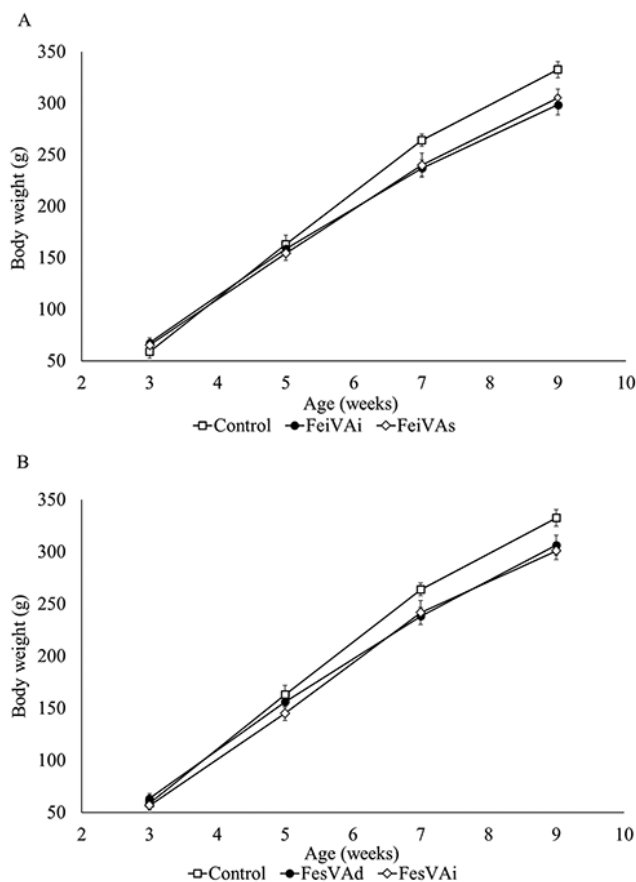


Figure 1. Growth curves of the (A) iron-sufficient and (B) iron-insufficient diets, as compared with the control diet. Data are given as means ± 1 SD (error bars).

with VAD are 2.5 times higher (odds ratio = 2.5; 95% CI, 0.027 to 0.049; *P* < 0.001) than those for children with adequate vitamin A levels. Furthermore, VAD is related to low serum iron levels³⁸ but does not lead to changes in serum ferritin levels; that situation is characteristic of VAD anemia.⁴¹

In addition, most of the intergroup differences in serum retinol were significant; from highest to lowest as follows: control > FeivAs > FesvAi = FeivAi > FesvAd. Dietary vitamin A content decreased in that order regardless of the dietary iron content. Therefore, under the conditions of this experiment, iron content does not influence serum retinol levels.

Previous research on the effect of vitamin A on iron metabolism has not produced consistent results with regard to the specific effect that vitamin-A-restricted diets have on Hgb

concentration. In one study,⁶ VAD increased Hgb concentration, but there was no evidence that this change was because of a lack of hemoconcentration. In contrast, another study² found mild anemia in both animals and humans when vitamin A was deficient. The current study's results are more consistent with those of still other authors,²³ who found no relationship between vitamin A status and Hgb concentration when iron status is normal. Given these 3 situations, one suggestion is that there is no direct relationship between Hgb concentration and vitamin A unless iron is deficient.

MCV allows for the classification of anemia into 3 groups based on the morphologic approach: microcytic (below normal), normocytic (within the normal range), and macrocytic (above normal).¹¹ In comparison to the control group, only the groups that were low in dietary iron had significantly different MCV values; multiple comparisons showed that the groups with sufficient dietary iron (FesvAs, FesvAi, and FesvAd) had significantly higher MCV values than did the groups with ID (FeivAs, FeivAi). In addition, when compared with the reference value of 62.38 ± 1.42 fL, the groups without dietary ID were normocytic, but those with dietary ID were microcytic.³¹ In addition, the results showed that only ID (not VAD) influences MCV.

All the groups were within or slightly above the normal range for RBC count, which means that the RBC count can be normal, regardless of the Hgb concentration in the blood, even in ID.

Reticulocyte count is an indicator of erythropoiesis. The current study's results suggested that both iron and vitamin A are necessary for adequate erythropoiesis, as da Cunha and colleagues¹⁵ suggested. Researchers recently have found that vitamin A has a negative effect on hepcidin and an indirect negative effect on erythropoiesis.^{16,20} These results are the opposite of the findings of other authors,³⁷ who suggested that there was no evidence of a relationship between VAD and ineffective erythropoiesis.

Hct is the percentage of RBC (by volume) in the blood. It is determined by multiplying the RBC count by the MCV. Because the RBC counts were similar for all groups and because only the ID groups showed low MCV values, Hct was low (51.3% ± 1.4%) only for the ID groups, as expected. Low Hct values are an indicator of anemia.²¹ As with Hgb and MCV, Hct was below the reference range for the iron-deficient groups, again as expected.

MCH is a measure of the average mass of Hgb per RBC, and it is calculated as Hgb × 10 / RBC count.^{1,11} Our study's results indicated the presence of hypochromic anemia for the FeivAi group but not for the FeivAs group. Hypochromic anemia occurs when individual cells contain less Hgb than they would have under optimal conditions. Therefore, the results for the iron-insufficient groups showed no direct relationship between Hgb and dietary vitamin A; only the group with insufficiencies

in both vitamin A and iron was hypochromic. Therefore, the results demonstrated vitamin A's effect on the Hgb content of individual cells.

MCHC is an indicator of the average concentration of Hgb in a given volume of packed red blood cells, and it is calculated by dividing Hgb content (in g/100 mL) by Hct (as %). As a fraction, MCHC is spuriously decreased or increased when an accurate measurement of Hgb and hematocrit is disturbed, and increased values are always an artifact because RBC cannot contain more Hgb than normal. Truly increased MCHC usually occurs in hereditary spherocytosis, and reduced MCHC is a reliable representative of functional iron deficiency, even in the absence of anemia.^{8,34}

According to our study's results, neither VAD nor ID influences MCHC, but this conclusion is inconsistent with the results for Hgb and Hct, so it is necessary to consider multiple parameters to ensure an adequate assessment of iron's nutritional status. One group of researchers³² proposed a complete algorithm for diagnosing and classifying anemia by using varying biochemical and erythrocytic parameters, stating that a combination of indicators is necessary for such an assessment.

To assess body weight, we used previously established reference curves¹⁴ that were created to classify the animals into 5 groups according to their nutritional status: malnourished, thin, eutrophic, overweight, and obese (Figure 2) The rats whose diets had any type of nutritional restriction had lower body weights than did those in the control group. At the end of the experiment, we classified all the animals in the experimental groups as eutrophic; in the control group, 4 animals were eutrophic, and the remaining 3 animals were overweight.

Weight gain is a complex process that involves the interaction of many nutrients and metabolic reactions. This study's results are consistent with previous findings,¹⁵ in support of the hypothesis that both iron and vitamin A are required to ensure adequate growth and weight gain. Regarding the classification of nutritional status, the unrestricted use of feeding caused the potential for weight gain, as expected. As one group of researchers³⁰ suggested, the amount of feed could be reduced by 25% without affecting the animals' physiology; this would reduce their morbidity and increase their life span.

Our current study's results suggested that the lack of either vitamin A or iron can influence animals' growth, regardless of their status as eutrophic or overweight. Because iron is necessary for adequate metabolism and for acquiring energy from foods,³⁵ it makes sense that iron-insufficient diets reflect inadequate growth. Regarding VAD, researchers have shown that it can affect the function of the mitochondria by causing oxidative damage,⁷ which causes further effects in terms of fat metabolism and weight gain. One author⁵ suggested that vitamin A influences the methylation patterns of adipogenesis-related genes, thus also potentially explaining the difference in weight gain between the groups with deficient or insufficient vitamin A (FesVAd, FesVAi, FeiVAi) and those with sufficient vitamin A.

Considering the interaction of vitamin A and iron, our results are consistent with the previous evidence regarding the effect of VAD on iron metabolism. For example, some colleagues²³ have suggested that VAD affects the expression of iron regulatory protein 2 and increases ID. In addition, others¹⁵ suggested that VAD affects erythropoiesis and iron metabolism; thus, VAD has an indirect effect on weight gain by regulating iron metabolism.

In conclusion, VAD anemia was not characterized as a distinct clinical entity in 2002.⁴¹ In the 17 y since then, scholars have provided little explanation regarding the mechanisms by which VAD could be involved in the pathogenesis of this kind

Classification	Body weight (g)
Malnourished	<241.0
Thin	241.0–259.8
Eutrophic	259.8–330.4
Overweight	330.4–347.1
Obese	>347.1

Figure 2. Classification of 9-wk-old male Wistar rats by body weight.¹⁴

of anemia. The results of our current study indicate that VAD does not influence all hematologic parameters, because both deficiencies seem to affect only reticulocyte count in young male Wistar rats. Therefore, vitamin A must be considered in the assessment of iron-related nutritional status and in the identification of some types of anemia.

Our current results also suggest that, with regard to body weight, both iron and vitamin A are essential to adequate growth and weight gain; therefore these nutrients must be considered together in nutritional recovery programs. We also remark that, under experimental conditions, Wistar male rats with a regular supply of iron and vitamin A can gain body weight under regular conditions with free-choice feeding.

Finally, formulating a more detailed explanation of the pathogenesis of anemia that is linked to deficiencies in nutrients other than iron (specifically, VAD anemia) might be possible by using analytical techniques such as PCR analysis, Western blotting, and immunohistochemistry. Such techniques might be used to provide additional information about the mechanism through which vitamin A regulates iron metabolism, as well as the cause of nonID anemia at the cellular level.

Acknowledgments

This work was funded by grants from La Sabana University's Grant System and the Colombian Department of Science, Technology, and Innovation (Colciencias) through a National Doctoral Grant (no. 567-2012).

References

1. **Alfaro-Calvo T, Carvajal-Fernández D.** 2001. Influence of the deficiency of A vitamin on the anemia in preschool children in Costa Rica. *Acta pediátrica costarricense*. **15**:9–12 [[Influencia de la deficiencia de vitamina A sobre la anemia en niños(as) preescolares de Costa Rica]].
2. **Ameny MA, Raila J, Walzel E, Schweigert FJ.** 2002. Effect of iron and/or vitamin A re-supplementation on vitamin A and iron status of rats after a dietary deficiency of both components. *J Trace Elem Med Biol* **16**:175–178. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(02\)80021-9](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(02)80021-9).
3. **Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD, Smith A.** 2005. Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biomaterials* **18**:339–348. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3708-8>.
4. **Arcila-Quinceno VH, Conde-Cotes CA, Nieto-Pico JE, García-Prada FH.** 2009. Comparison of hematology reference values of strain wistar/UIS (*Rattus norvegicus*) with parameters established in standards laboratories. *Revista Spei Domus* **6**:45–51 [[Comparación de los valores de referencia hematológicos en ratas wistar/UIS (*Rattus norvegicus*) con parámetros establecidos en laboratorios de altos estándares]].
5. **Arreguín A, Ribot J, Mušinić H, von Lintig J, Palou A, Bonet ML.** 2018. Dietary vitamin A impacts DNA methylation patterns of adipogenesis-related genes in suckling rats. *Arch Biochem Biophys* **650**:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.05.009>.
6. **Arruda SF, Siqueira EM, de Valência FF.** 2009. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition* **25**:472–478. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.11.030>.
7. **Barber T, Borrás E, Torres L, García C, Cabezuelo F, Lloret A, Pallardó FV, Viña JR.** 2000. Vitamin A deficiency causes oxidative

- damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med* **29**:1–7. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00283-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00283-5).
8. **Berda-Haddad Y, Faure C, Boubaya M, Arpin M, Cointe S, Frankel D, Lacroix R, Dignat-George F.** 2017. Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? *Int J Lab Hematol* **39**:32–41. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12565>.
 9. **Bhutta ZA, Salam RA, Das JK.** 2013. Meeting the challenges of micronutrient malnutrition in the developing world. *Br Med Bull* **106**:7–17. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt015>.
 10. **Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C.** 2011. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology* **140**:1261–1271.e.1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.12.037>.
 11. **Buttarelli M.** 2016. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol* **38 Suppl 1**:123–132. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12500>.
 12. **Charan J, Kantharia N.** 2013. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother* **4**:303–306. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>.
 13. **Citelli M, Bittencourt LL, Da Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C.** 2012. Vitamin a modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res* **149**:64–70. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9397-6>.
 14. **Cossio-Bolaños M, Campos RG, Vitoria RV, Hochmuller Fogaça RT, de Arruda M.** 2013. [Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats.] *Nutr Hosp* **28**:2151–2156. [Article in Spanish].
 15. **da Cunha MSB, Siqueira EMA, Trindade LS, Arruda SF.** 2014. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. *J Nutr Biochem* **25**:1035–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.005>.
 16. **Dewamitta SR, Joseph C, Purton LE, Walkley CR.** 2014. Erythroid-extrinsic regulation of normal erythropoiesis by retinoic acid receptors. *Br J Haematol* **164**:280–285. <https://doi.org/10.1111/bjh.12578>.
 17. **Fonseca Centeno Z, Heredia Vargas AP, Ocampo Téllez PR.** [Internet]. 2010. [Encuesta Nacional de Situación Nutricional 2010]. [Cited 13 February 2019]. Available at: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/GCFI/Base%20de%20datos%20ENSIN%20-%20Protocolo%20Ensin%202010.pdf>
 18. **Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ.** 2012. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol* **26**:115–119. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.03.015>.
 19. **Garg A, Abrol P, Tewari AD, Sen R, Lal H.** 2005. Effect of vitamin A supplementation on hematopoiesis in children with anemia. *Indian J Clin Biochem* **20**:85–86. <https://doi.org/10.1007/BF02893048>.
 20. **Honda H, Kobayashi Y, Onuma S, Shibagaki K, Yuza T, Hirao K, Yamamoto T, Tomosugi N, Shibata T.** 2016. Associations among erythroferone and biomarkers of erythropoiesis and iron metabolism, and treatment with long-term erythropoiesis-stimulating agents in patients on hemodialysis. *PLoS One* **11**:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151601>.
 21. **Hoofnagle AN.** 2017. Harmonization of blood-based indicators of iron status: making the hard work matter. *Am J Clin Nutr* **106 Suppl 6**:1615S–1619S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155895>.
 22. **Jacob Filho W, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhão MS, Caldeira M, Bocalini D, de Souza RR.** 2018. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Aging Male* **21**:145–148. <https://doi.org/10.1080/13685538.2017.1350156>.
 23. **Jiang S, Wang CX, Lan L, Zhao D.** 2012. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition* **28**:281–287. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.015>.
 24. **Karafin MS, Koch KL, Rankin AB, Nischik D, Rahhal G, Simpson P, Field JJ.** 2015. Erythropoietic drive is the strongest predictor of hepcidin level in adults with sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* **55**:304–307. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.07.010>.
 25. **Kassebaum NJ, GBD 2013 Anemia Collaborators.** 2016. The global burden of anemia. *Hematol Oncol Clin North Am* **30**:247–308. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.002>.
 26. **Knutson MD.** 2019. Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radic Biol Med* **133**:101–111. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.413>.
 27. **Kraemer K, Zimmermann MB.** 2007. Nutritional anemia. Basel (Switzerland): Sigh and Life press.
 28. **Leong W-I, Lönnnerdal B.** 2012. Iron nutrition. p 81–99. In: Anderson GJ, McLarnen GD, editors. *Iron physiology and pathophysiology in humans*. New York (NY): Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-485-2_5
 29. **Lynch SR.** 1997. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr Rev* **55**:102–110. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1997.tb06461.x>.
 30. **Moraal M, Leenaars PP, Arnts H, Smeets K, Savenije BS, Curfs JHAJ, Ritskes-Hoitinga M.** 2012. The influence of food restriction versus ad libitum feeding of chow and purified diets on variation in body weight, growth and physiology of female wistar rats. *Lab Anim* **46**:101–107. <https://doi.org/10.1258/la.2011.011011>.
 31. **Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, Da Costa L, Schillinger F, Bailly N, Cornet Y, Chatelain C, Dogne JM, Chatelain B.** 2011. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: Results of a multicentre study. *Ann Hematol* **90**:759–768. <https://doi.org/10.1007/s00277-010-1138-3>.
 32. **Muñoz M, Villar I, García-Erce JA.** 2009. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* **15**:4617–4626. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.4617>.
 33. **National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition.** 1995. Nutrient requirements of laboratory animals. Washington (DC): National Academies Press.
 34. **Okonko DO, Mandal AKJ, Missouris CG, Poole-Wilson PA.** 2011. Disordered iron homeostasis in chronic heart failure: prevalence, predictors, and relation to anemia, exercise capacity, and survival. *J Am Coll Cardiol* **58**:1241–1251. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.04.040>.
 35. **Petranovic D, Batinac T, Petranovic D, Ruzic A, Ruzic T.** 2008. Iron deficiency anaemia influences cognitive functions. *Med Hypotheses* **70**:70–72. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.04.029>.
 36. **Reboul E.** 2013. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients* **5**:3563–3581. <https://doi.org/10.3390/nu5093563>.
 37. **Roodenburg AJ, West CE, Beguin Y, Van Dijk JE, Van Eijk HG, Marx JJ, Beynen AC.** 2000. Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency. *J Nutr Biochem* **11**:223–230. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(00\)00070-X](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(00)00070-X).
 38. **Sales MC, Paiva Ade A, de Queiroz D, Araújo França Costa R, Lins da Cunha MA, Figueroa Pedraza D.** 2013. Nutritional status of iron in children from 6 to 59 months of age and its relation to vitamin A deficiency. *Nutr Hosp* **28**:734–740.
 39. **Sandström B.** 2001. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr* **85 Suppl 2**:S181–S185. <https://doi.org/10.1079/BJN2000312>.
 40. **Saraiva BC, Soares MC, Santos LC, Pereira SCL, Horta PM.** 2014. Iron deficiency and anemia are associated with low retinol levels in children aged 1 to 5 years. *J Pediatr (Rio J)* **90**:593–599. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2014.03.003>.
 41. **Semba RD, Bloem MW.** 2002. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *Eur J Clin Nutr* **56**:271–281. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601320>.
 42. **Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT.** 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**:789–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.025>.

43. **Stevens GA, Finucane MM, De-Regil LM, Paciorek CJ, Flaxman SR, Branca F, Peña-Rosas JP, Bhutta ZA, Ezzati M, Nutrition Impact Model Study Group (Anaemia).** 2013. Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995-2011: A systematic analysis of population-representative data. *Lancet Glob Health* **1**:e16–e25. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70001-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70001-9).
44. **Tan L, Green MH, Ross AC.** 2015. Vitamin A kinetics in neonatal rats vs. adult rats : comparisons from model-based compartmental analysis. *J Nutr* **145**:403–410. <https://doi.org/10.3945/jn.114.204065>.
45. **World Health Organization.** [Internet]. 2015. The global prevalence of anaemia in 2011. [Cited 8 April 2018]. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/177094/1/9789241564960_eng.pdf



Vitamin A does not influence mRNA expression of hormone hepcidin but other biomarkers of iron homeostasis in young male Wistar rats

Mauricio Restrepo-Gallego, and Luis E. Díaz

Doctorate Program in Bioscience, La Sabana University, Campus del Puente del Común, Km. 7, Autopista Norte de Bogotá, Chía, Cundinamarca, Colombia

Abstract: The effects of an adequate supply of vitamin A and iron, in comparison with diets low or absent in vitamin A and low in iron, on the mRNA expression of some biomarkers of iron homeostasis as hepcidin (*Hamp*), transferrin receptor-1 (*Tfrc*), iron regulatory protein-2 (*Ireb2*) and ferritin (*Fth1*) in rats were investigated. 35 male Wistar rats were randomly divided into 5 dietary groups: control, sufficient in iron and insufficient in vitamin A (FesvAi), sufficient in iron and depleted in vitamin A (FesvAd), insufficient in iron and sufficient in vitamin A (FeivAs) and insufficient in both iron and vitamin A (FeivAi). After 6 weeks rats showed no significant effects of variations in vitamin A on the expression of *Hamp* relative to the control group (FesvAi: 1.37-fold; FesvAd: 1.22-fold); however, iron deficiency showed significant reduction on it relative to the control group (FeivAs: 71.4-fold, $P = 0.0004$; FeivAi: 16.1-fold, $P = 0.0008$). Vitamin A deficiency (FesvAd) affects expression of *Fth1* independent of low dietary iron in spleen (0.29-fold, $P = 0.002$) and duodenum (5.15-fold, $P = 0.02$). Variations of dietary iron and vitamin A showed significant effects relative to the control group for expression of *Tfrc* in spleen (FesvAd: 0.18-fold, $P = 0.01$; FeivAs: 0.24-fold, $P < 0.0001$; FeivAi: 0.42-fold, $P = 0.014$), *Ireb2* in spleen (FeivAs: 3.7-fold, $P < 0.0001$; FeivAi: 2.9-fold, $P < 0.0001$) and *Ireb2* in duodenum (FeivAs: 2.68-fold, $P = 0.012$; FeivAi: 2.60-fold, $P = 0.014$). These results show that vitamin A and iron must be supplied together to regulate some of the main biomarkers of iron metabolism as a strategy to reduce prevalence of iron deficiency anemia.

Keywords: retinol, anemia, hepcidin, vitamin A deficiency

Introduction

Micronutrient malnutrition (MNM), or hidden hunger, occurs when the intake of micronutrients and vitamins is below the amount required. It is a common problem in developing and developed countries, and it entails lack or deficiency of iron, vitamin A, iodine, zinc and folate, which are all critical micronutrients related to adequate development [1]. Indeed, MNM is believed to cause a more detrimental impact on cognitive and physical development than calorie restriction. Regarding their importance, iron and vitamin A play a fundamental role in children's development, and health authorities worldwide remain vigilant for iron deficiency anemia (IDA) and vitamin A deficiency (VAD) [2].

According to the World Health Organization (WHO) in its report titled *Global Prevalence of Anemia in 2011*, the most recent official data source, 42.6% of preschool-age children are anemic; among pregnant women, the prevalence is

38.2%. The largest single group in terms of affected individuals is nonpregnant women; based on this group's 29.0% rate of anemia, it includes 496.3 million affected individuals [3]. VAD is the main cause of preventable blindness in children and increases the risk of disease and death from severe infections. In pregnant women, VAD causes night blindness and may increase the risk of maternal mortality [4]. VAD is a public health problem, and it has a major impact on young children and pregnant women in low-income countries [5].

Physiologically, anemia is a condition characterized by low levels of hemoglobin in blood. It is also associated with a deficient quality or quantity of red blood cells. There are a lot of factors that could influence iron absorption as its status, bioavailability, interactions with other minerals, chemical form, enhancers and inhibitors of absorption [6] as plant-derived phytates and tannins [7] and other micronutrient deficiencies. Bleeding, infections and genetic conditions are considered non-nutritional causes

for anemia [8]. Iron deficiency is considered the main nutritional cause [9], it occurs when hemoglobin levels are below the established cutoff points (11 g/dL for children under 5 years old and pregnant women; 12 g/dL for children from 5–12 years old, non-pregnant women and teenage males and 13 g/dL for teenage females) and ferritin levels are below 12 µg/L [10].

At systemic levels and in healthy subjects, iron metabolism is regulated mainly by hepcidin, which is a peptide that the liver produces. It is encoded by the HAMP (hepcidin antimicrobial peptide) gene and considered the master regulator of iron homeostasis. It works by binding to ferroportin and inducing its internalization and lysosomal degradation. Therefore, when an iron overload occurs, hepcidin expression is increased and reduces iron efflux from the enterocyte and macrophages; conversely, in iron deficiency, hepcidin expression is reduced and iron efflux to the blood stream is increased [11–13].

Vitamin A is another nutritional factor that can affect iron use; however, the mechanism of that effect is not well-established. The little evidence available from a mechanistic point of view suggests it affects iron metabolism and not iron absorption or transport [14, 15]. In the case of iron overload and adequate vitamin A levels, retinol stimulates ferritin synthesis, which could be an indirect way to trigger vitamin A's antioxidant activity [16]. However, it is possible that another mechanism exists in which vitamin A regulates excess iron due to nutritional causes [17]. It was demonstrated that in VAD with normal levels of iron, hepcidin expression could be increased [15, 18]. Latter studies employing in vitro (Caco-2) and in vivo (BALB/c male mice and Wistar male rats) models revealed that vitamin A indirectly regulates the presence of ferroportin by regulating hepcidin expression; however, the mechanism is not clear. The same studies revealed that the expression of other proteins related to iron metabolism, such as DMT1 (divalent metal transporter-1), DcytB (duodenal cytochrome B) and TfR (transferrin receptor), was not affected [19].

Based on previous evidence, the present research was conducted to give a better understanding of the role of vitamin A on iron metabolism and go deeper on the different mechanisms related. Our study was an analysis of the mRNA expression of hepcidin and other main biomarkers of iron metabolism under various ratios of iron to vitamin A supply to understand how retinol is related to iron homeostasis in young male Wistar rats.

Materials and methods

Animals, diets and biochemical analysis

The study was conducted at the Bioterium of Antioquia's University in Medellín, Colombia. Thirty-five 21-day-old

male Wistar rats (Specific-Pathogen-Free, Neurosciences Laboratory, Antioquia's University, Medellín, Colombia) with a mean body weight of 62.5 ± 6.1 g were housed in polycarbonate cages with stainless steel wire covers and polycarbonate water dispensers. Environmental conditions included a 12-h light cycle, room temperature of 22 ± 2 °C and relative humidity of 55–65%; the air was renewed 15 times per hour. The animals had free access to demineralized water and food and were weighed every two weeks on a digital scale with a resolution of 0.1 g (Precisa BJ2100D, Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Switzerland). The Ethical Committees of Antioquia's University (#108.090217) and La Sabana University (#55.170516) approved the entire procedure.

The animals were randomly assigned five diets, with seven animals in each group. The control group received an AIN-93G growing-rodent diet [20] modified to supply a sufficient amount of iron as ferric citrate (45 mg/kg) and vitamin A as retinol acetate (1200 µg/kg); the experimental groups received modified AIN-93G diets: FesvAd (45 mg/kg iron, no vitamin A), FesvAi (45 mg/kg iron, 120 µg/kg vitamin A), FeivAs (15 mg/kg iron, 1200 µg/kg vitamin A) and FeivAi (15 mg/kg iron, 120 µg/kg vitamin A). Table 1 shows the composition and nutritional profile of the diets. All diets were produced by Research Diets Inc., New Brunswick, NJ.

After six weeks of feeding, animals were anesthetized by inhalation with USP isoflurane (Piramal Critical Care, Inc., Bethlehem, PA), and whole blood was collected by cardiac puncture. 2 mL were collected in serum tubes (Vacutest® gel + cloth activator, Vacutest Kima S.r.l., Arzergrande, Padua, Italy) for iron and retinol analysis. After blood extraction, the animals were euthanized with CO₂ (70%), and death was ensured by cervical dislocation. Their livers, spleens and small bowels were kept at -80 °C for further qRT-PCR analysis. Serum iron concentrations were analyzed by atomic absorption spectrometry on an Analyst 3100 Analyzer (Perkin Elmer Life Sciences, Wellesley, MA). Serum retinol concentrations were measured by HPLC.

Reverse transcription polymerase chain reaction

The extraction of total mRNA from the tissues was performed using Invitrogen TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific Life Sciences Solutions, Carlsbad, CA). mRNA content was assessed in a NanoDrop54 One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Life Sciences Solutions, Carlsbad, CA). 100 nanograms total mRNA was used for qRT-PCR, using an iTaq54 Universal SYBR® Green One-Step Kit from Bio Rad (Bio Rad

Table 1. Ingredient composition (g/kg) and nutritional profile of the diets

Ingredient	Control	FesvAi	FesvAd	FeivAs	FeivAi
Corn Starch	397.5	397.5	397.5	397.5	397.5
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Maltodextrin 10	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Soybean Oil	70.0	0	0	0	0
Cotton Seed Oil	0	70.0	70.0	70.0	70.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral Mix ^a	35.0	35.0	35.0	0	0
Mineral Mix ^b	0	0	0	35	35
Vitamin Mix ^c	10.0	0	0	10.0	0
Vitamin Mix ^d	0	10	10	0	10
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline Bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Ferric Citrate (17.4% Fe)	0.03	0.03	0.03	0.07	0.07
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Vitamin A palmitate (500.000 IU/g)	0	0.0008	0	0	0.0008
Nutritional profile					
Protein %	20	20	20	20	20
Fat %	7	7	7	7	7
Fiber %	5	5	5	5	5
Carbohydrate %	64	64	64	64	64
Iron (mg/kg)	45	45	45	15	15
Vitamin A (µg/kg as retinol acetate)	1200	120	0	1200	120

^a AIN-93G-MX; ^b AIN-93G-MX deficient in iron; ^c AIN-93G-VX; ^d AIN-93G-VX without vitamin A (vA); s: sufficient; d: depleted; i: insufficient.

Laboratories, Hercules, CA, USA). Briefly, 5 µL of SYBR[®] Green reaction mix was mixed with 0.125 µL of iScript[™] reverse transcriptase, 1 µL of forward primer and 1 µL of reverse primer at 300 nM each, 1 µL of mRNA (100 ng/µl) and 1.875 µL of nuclease-free water for a final reaction volume of 10 µL. Hamp (hepcidin antimicrobial peptide) in liver, Ireb2 (iron regulatory protein-2) in duodenum and spleen, Fth1 (ferritin heavy chain) in duodenum and spleen, Il6 (interleukin-6) in liver and Tfrc (transferrin receptor 1) in spleen mRNA expressions were obtained by the reverse transcription polymerase chain reaction method. A CFX96 Touch54 Real-Time PCR Detection System (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used. The reverse transcription reaction was carried out at 50 °C for 1 min, followed by polymerase activation and DNA denaturation at 95 °C for 1 min, then denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 10 s, and extension at 60 °C for 30 s, with 40 cycles for all genes. Forward and reverse primers for each gene are summarized in Table 2. The mRNA expression was normalized to the housekeeping gene Actb (β-actin) mRNA expression and is presented by its relative density to β-actin. All the data was processed using the Gene Study module of the Bio-Rad CFX Maestro v.1.1 software (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Statistical analysis

Data were presented as mean ± standard deviation. Continuous variables were compared between groups by one-way analysis of variance with a post hoc Tukey's test. The normality of data distribution was tested by the Kolmogorov-Smirnov test; equality of variance was measured using Levene's test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. The number of rats was estimated by a power analysis to obtain 80% power at a confidence level of 95% [21].

Results

Biochemical parameters: serum iron and serum retinol

When intergroup comparisons were made both groups insufficient in iron (FeivAs and FeivAi) had significant differences from the control group ($P < 0.05$ for both groups). The group depleted in vitamin A but sufficient in iron

Table 2. qRT-PCR Primers

Gene	Forward primer	Reverse primer	Reference
<i>Hamp</i>	5'-GAAGGCAAGATGGCACTAAGCA-3'	5'-TCTCGTCTGTTGCCGGAGATAG-3'	[35]
<i>Fth1</i>	5'-GCCCTGAAGAAGCTTTGCCAAAT-3'	5'-TGCAGGAAGATTCGTCCACCT-3'	[36]
<i>Ireb2</i>	5'-CTGCATCCCAGCCTATTGAAAA-3'	5'-GCACTGCTCCTAGCAATGCTTC-5'	[37]
<i>Il6</i>	5'-GTCAACTCCATCTGCCCTTCAG-3'	5'-GGCAGTGGCTGTCAACAACAT-3'	[36]
<i>Tfrc</i>	5'-ATACGTTCCCGTTGTTGAGG-3'	5'-GGCGGAAACTGAGTATGGTTGA-3'	[37]
<i>Actb</i>	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'	5'-AACACAGCCTGGATGGCTAC-3'	[38]

Hamp, hepcidin antimicrobial peptide; *Fth1*, ferritin heavy chain 1; *Ireb2*, iron regulatory protein 2; *Tfrc*, transferrin receptor 1; *Actb*, beta actin.

(FesvAd) showed significant differences when compared when control group ($P < 0.05$) while the group insufficient in vitamin A but sufficient in iron (FesvAi) showed not significant differences when compared with the control group; however, when both grupos with any deficiency of vitamin A (FesvAi and FesvAd) were compared, showed not significant differences between them in terms of serum iron.

In terms of serum retinol levels all experimental groups were significant lower than control group ($P < 0.05$ for all of them). When both groups sufficient in dietary vitamin A were compared, that one with marginal deficiency of dietary iron (FeivAs) was significant lower than control group. When groups insufficient in dietary vitamin A (FesvAi and FeivAi) were compared, they exhibit the lowest value for serum retinol ($0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) and no significant differences between them. The results are summarized in Table 3.

Effect of vitamin A status on the mRNA expression of genes related to iron homeostasis in the liver, spleen and duodenum

When compared with the control group, mRNA expression of iron regulatory protein 2 (*Ireb2*) to *Actb* values in the duodenum and spleen showed significant but opposite differences ($P < 0.05$) for groups insufficient in iron regardless of vitamin A supply (FeivAi and FeivAs). Figure 1C shows the results in the duodenum, in which values were higher than those of the control group. The amount of FeivAi was 2.6 times the amount in the control group ($P = 0.0136$), and the amount of FeivAs was 2.7 times the amount in the control group ($P = 0.0118$). In the spleen, as Figure 1D shows, values were lower than in the control group. The

amount of FeivAi was 2.9 times the amount in the control group ($P < 0.0001$), and the amount of FeivAs was 3.7 times that in the control group ($P < 0.0001$).

Regarding duodenal ferritin heavy chain 1 (*Fth1*) mRNA relative expression normalized to *Actb* in the duodenum (Figure 1E), the group insufficient in iron but sufficient in vitamin A (FeivAs) showed significant differences when compared with the control group, exhibiting higher values of *Fth1* mRNA relative expression (5.1-fold, $P = 0.0017$). *Fth1* mRNA relative expression in the spleen showed significantly lower values ($P < 0.05$) in comparison with the control group only for the group with sufficient iron and depleted in vitamin A (FesvAd), (3.5-fold, $P = 0.0018$) (Figure 1F).

Transferrin receptor 1 (*Tfrc*) mRNA expression normalized to *Actb* in the spleen showed significant differences ($P < 0.05$) for groups insufficient in dietary iron and for group depleted in vitamin A when compared with the control group (Figure 1G). These groups had lower values than the control group and the group with sufficient iron and insufficient vitamin A: FeivAi, 2.4-fold ($P = 0.0142$); FeivAs, 4.2-fold ($P < 0.0001$) and FesvAd, 5.6-fold ($P = 0.0104$).

Discussion

To explore how vitamin A deficiency alters some of the main biomarkers of iron-homeostasis expression, the present research was focused on the expression of the genes associated with them in young male Wistar rats that received diets with various doses of vitamin A and/or iron. The control group received sufficient amounts of both nutrients according to the reference diets for laboratory animals,

Table 3. Biochemical parameters

Parameter	Control	FesvAi	FesvAd	FeivAs	FeivAi
Serum iron [$\mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$]	255.86 \pm 43.83 a	219.81 \pm 15.58 ab	181.30 \pm 14.53 b	131.01 \pm 43.83 c	74.74 \pm 18.27 d
Serum retinol [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	1.60 \pm 0.16 a	0.55 \pm 0.10 b	0.24 \pm 0.04 c	1.26 \pm 0.12 d	0.55 \pm 0.08 b

$n = 7$; different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$). s: sufficient; d: depleted; i: insufficient.

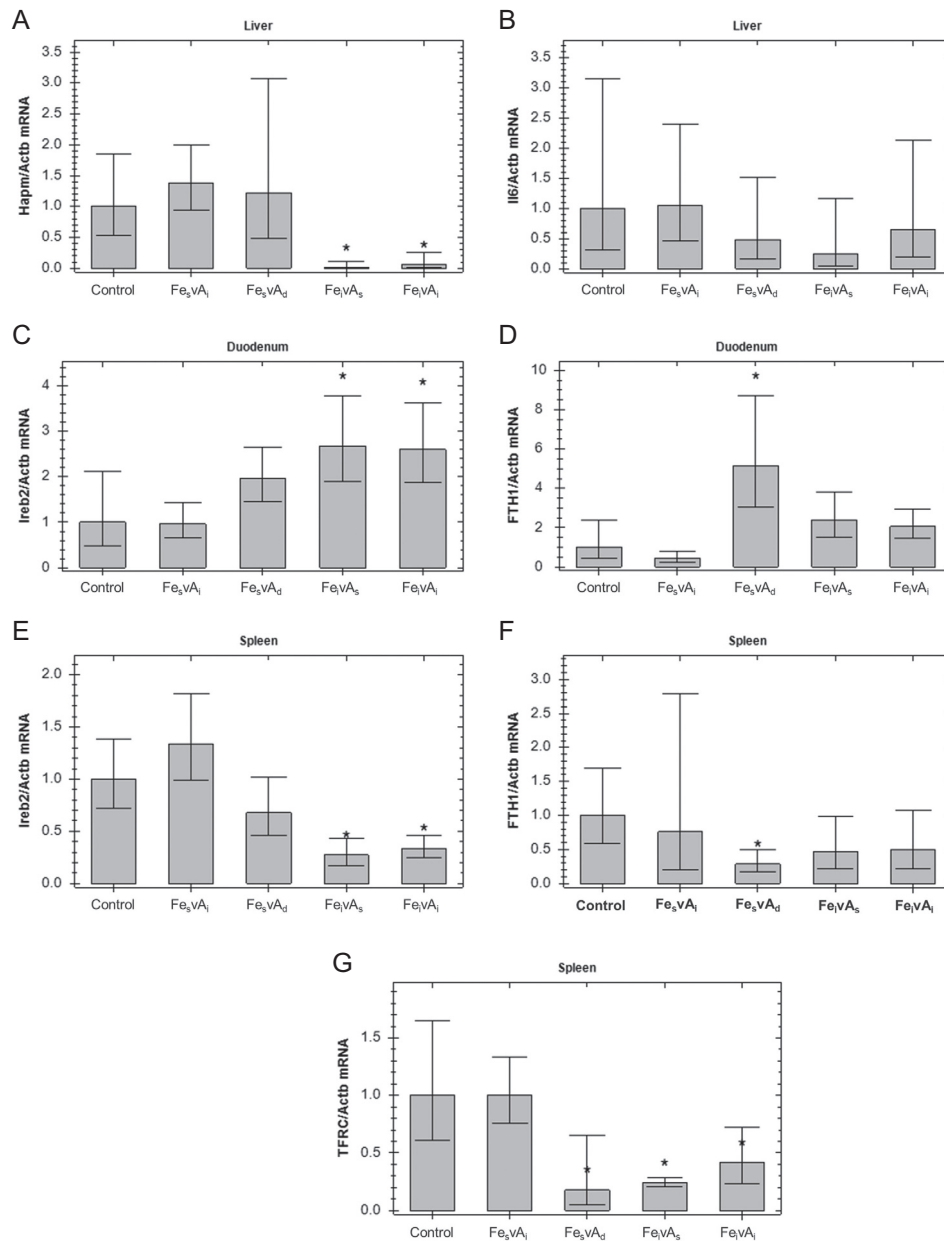


Figure 1. Relative expression of mRNA levels of (A) hepatic *Hamp* (hepcidin antimicrobial peptide); (B) hepatic *Il6* (interleukin 6); (C) duodenal *Ireb2* (iron regulatory protein 2); (D) splenic *Ireb2*; (E) duodenal *Fth1* (ferritin heavy chain 1); (F) splenic *Fth1* and (G) splenic *Tfrc* (transferrin receptor 1). Expression were normalized to *Actb* (beta actin). Data are the means \pm S.D. (n = 7). *significant differences (P < 0.05) in comparison with the control group. Error bar = 95% C.I. (A) shows the relative transcript levels of hepatic hepcidin antimicrobial peptide (*Hamp*) in rat livers normalized to beta actin (*Actb*) values. In comparison with the control group, those insufficient and depleted in vitamin A and sufficient dietary iron showed no significant differences (P < 0.001) in *Hamp* mRNA expression (FesvAi: 1.37-fold; FesvAd: 1.22-fold). The groups with low levels of dietary iron showed a significantly lower relative expression than the control group (FeivAi: 16.1-fold, P = 0.0008; FeivAs: 71.4-fold, P = 0.0004). (B) shows that not all the experimental groups displayed significant differences (P < 0.001) in the mRNA expression of hepatic interleukin 6 (*Il6*) normalized to *Actb* values when compared with the control group.

and the four experimental groups received various combinations of iron (Fe) and vitamin A (vA) at sufficient (s), insufficient (i) or depleted (d) levels. No group was fully depleted in iron because it is necessary for development, and a complete lack of it would result in no viable experimental subjects. Given the relationship between vitamin

A deficiency and iron homeostasis, biomarkers are important, as they indicate the needed supply of both micronutrients together to prevent iron deficiency anemia in such risk groups as children and women [22].

When results for serum iron in the three groups with sufficient amounts of iron (Control, FesvAi and FesvAd) were

compared, one may expect that no significant differences emerged between them; however, the group without vitamin A (FesvAd) had less iron than the other (Control and FesvAi), which suggests that a small amount of vitamin A is enough to maintain an adequate level of serum iron; that result is consistent with previous studies that revealed that iron deficiency anemia are related to low levels of serum retinol in children between 1 and 5 years of age [15] and low intake of vitamin A in children between 5 and 12 years of age [23]. The efficacy of multinutrient supply has been validated in multiple countries; in South India, researchers found that the supply of a multiple-micronutrient-fortified salt reduced anemia, iron deficiency and serum retinol deficiency and improved the iron status and retinol status [24]. In Benin, researchers found a high prevalence of IDA and VAD among rural women and their children [25], and a strong recommendation was made to further examine stronger strategies of micronutrient supplementation for at-risk populations.

Regarding serum retinol results, this study revealed that dietary iron status has an effect on it even with an adequate supply of vitamin A, but there is no effect when dietary vitamin A levels are low or absent. Although the focus of this research was not to evaluate the effect of iron on vitamin A, previous findings showed a lack of consensus about the unidirectional effect of iron supplementation on the nutritional status of vitamin A as well as differences between results in animal models and humans [26].

About inflammation status, previous studies revealed that vitamin A deficiency and/or iron deficiency enhances the inflammatory state by increasing *Il6* mRNA expression in the liver [14]. Moreover, it has been established that interleukin-6 regulates hepcidin transcription as a way to control the circulation of iron in inflammation [27, 28]. However, the findings of this study showed no evidence of significant differences in *Il6* mRNA expression as an indicator of inflammation in animals, even with vitamin A deficiency, iron deficiency or both. This finding does not mean, however, that no relationship exists between VAD or ID and inflammation, but under the experimental research conditions, not enough evidence supported it. On the other hand, the lack of significant differences in mRNA *Il6* as a biomarker of inflammation allows for comparison with the other biomarkers or iron status without problems due to their acute-phase-protein properties.

As a systemic regulator of iron homeostasis, *Hamp* mRNA expression in the liver was significantly lower in iron-deficient groups, which makes sense given that hepcidin down-regulates ferritin on the enterocyte's basolateral side [29] as a way to regulate iron exports and thereby prevent oxidative damage. The results showed impact of vitamin A deficiency on *Hamp* mRNA expression only when iron was deficient too, consistent with the findings of Xiaolei *et al* [30] when differences between groups

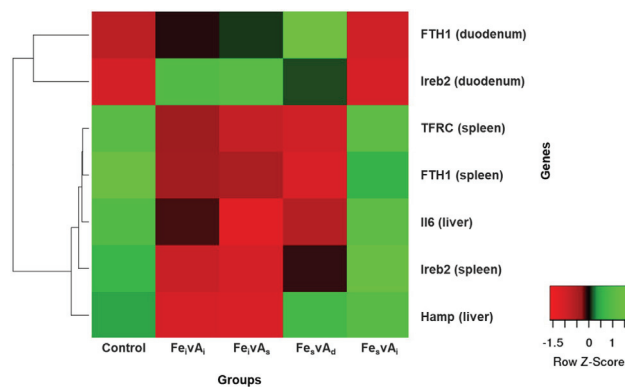


Figure 2. Heat map showing the relative expression of all the genes and experimental groups. Green blocks represent high expression, and red blocks represent low expression. *Fth1*, ferritin heavy chain 1; *Tfrc*, transferrin receptor protein 1; *Ireb2*, iron regulatory protein 2; *Hamp*, hepcidin antimicrobial peptide; *Il6*, interleukin 6.

with fully or partial deficiency of vitamin A and control group were not significant, but when **bot** nutrients were deficient, *Hamp* mRNA expression was significantly lower than control group. The work of Arruda *et al* [18] concluded that *Hamp* mRNA increased expression could be a direct effect of vitamin A metabolites or indirect effect mediated by cytokines due to the inflammatory process; as the results of this study showed no inflammation, it is possible that the absence of effect of VAD (at any level) on *Hamp* mRNA expression was due to the absence of cytokines.

Regarding molecular regulation of iron homeostasis, IRP2 is a key regulator of iron metabolism. The results showed that the groups that received a diet low in iron (FeivAs and FeivAi) had significant differences compared to the control group. In the duodenum, the relative mRNA expression of *Ireb2* was higher than that of the control group, but in the spleen, it was lower. Jiang *et al* [31] revealed that vitamin A deficiency could aggravate iron deficiency by upregulating the expression of IRP2; however, the findings of this study suggest that mRNA *Ireb2* expression is not related only to iron or vitamin A supply as independent factors but to both combined.

IRP2 is also related to the regulation of ferritin and transferrin receptor expression. When IRP2 is low, TfR1 expression is reduced and Fn expression is enhanced. Iron storage and mobilization is thus regulated [32]. The results showed that vitamin A was the only factor that impacts ferritin's expression; in the duodenum, only the group that received the diet without vitamin A was significantly higher in ferritin than the others, and in the spleen, the opposite occurred. Those results indicate that vitamin A is necessary to mobilize iron from the enterocyte, reducing its storage in ferritin.

At the duodenal level, these findings were consistent with the study of Citelli *et al* [19] where VAD affected iron mobilization and could lead to oxidative stress. The results

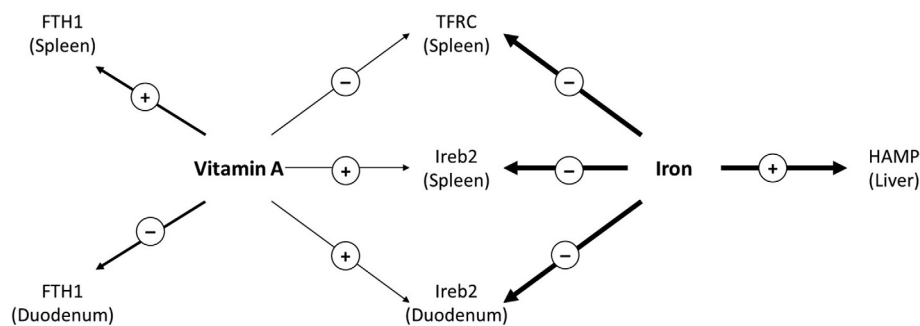


Figure 3. Combined effect of sufficient supply of iron and vitamin A on the mRNA expression of selected biomarkers of iron homeostasis. The arrows' thickness represents the strength of the impact. (+) represents up-regulation. (-) represents down-regulation. Fth1, ferritin heavy chain 1; Tfrc, transferrin receptor protein 1; Ireb2, iron regulatory protein 2; Hamp, hepcidin antimicrobial peptide; Il6, interleukin 6.

regarding the spleen showed a reduction in iron stores represented by relative mRNA ferritin expression for the vitamin A deficient group. That reduction was also demonstrated in findings of Jiang *et al* [31] of the previously discussed study on IRP2 and VAD.

Regarding *Tfrc* mRNA expression in the spleen, the results were consistent with expectations in relation to the results for IRP2 [31]. When comparisons between the dietary-iron sufficient groups were made, only the group without dietary vitamin A showed significant smaller differences, which indicates that, even with an adequate supply of iron, vitamin A is necessary to enhance the *Tfrc* mRNA expression in the spleen. When the low dietary-iron groups were compared to the control group, both iron insufficient groups showed significant smaller differences independent of the vitamin A supply. Those results indicate a combined effect of iron and vitamin A on the *Tfrc* mRNA expression in the spleen.

To give a full picture of the gene expression results, we built a heat map (Figure 2) [33], with which the up-regulation or down-regulation combined effect of iron and vitamin A could be visualized.

When all the results are considered together, the data show a single effect of vitamin A on the mRNA expression of ferritin in the duodenum and spleen, of iron on the mRNA expression of hepcidin in the liver and a combined effect of both on mRNA expression of transferrin receptor 1 and iron regulatory protein 2 in the spleen and duodenum, as seen in Figure 3.

Strengths and limitations

Overall, the main strength of the study is the comparison of five different ratios of iron and vitamin A and the effect of them on the iron homeostasis. Additionally, the study has a strong statistical design adequate to give results of quality without an excessive number of animals according to the

main principles of ethics for research with laboratory animals. However, we recognize that the analysis of additional tissues as bone marrow and biomarkers as ferroportin, divalent metal transporter 1 (DMT1) and C-reactive protein (CRP) would give complementary information to support the main findings. A direct measurement of IL6 and CRP as inflammation markers using an ELISA kit would be better to identify the inflammation status. Another limitation, from the methodological approach, was the absence of information of losses of iron and retinol in feces and urine.

Conclusion

The results of the study reinforce the existent relation between vitamin A and iron as demonstrated by different authors as Jiang *et al* [31], da Cunha *et al* [14], Arruda *et al* [18], Mendes *et al* [34] and Xialoei *et al* [30]. This study demonstrated that an adequate supply of dietary vitamin A could enhance the status of serum iron and, as consequence, helps to reduce the prevalence of iron deficiency anemia and make the strategies of nutritional intervention more effective, especially for at-risk populations, such as children and women of reproductive age. In addition, further and deeper research on anemia caused by VAD must be conducted to give a wider explanation of the phenomena related to iron and vitamin A deficiencies.

References

1. Muthayya S, Rah JH, Sugimoto JD, Roos FF, Kraemer K, Black RE. The global hidden hunger indices and maps: An advocacy tool for action. *PLoS One*. 2013;8(6):1–12.
2. World Health Organization.. Health in 2015: From MDGs, Millennium Development Goals to SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: WHO; 2015.
3. World Health Organization.. The global prevalence of anaemia in 2011. Geneva: WHO; 2015.

4. West KP. Vitamin A deficiency disorders in children and women. *Food Nutr Bull.* 2003;24(Suppl 4):78–90.
5. World Health Organization. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005: WHO global database on vitamin A deficiency. Geneva: WHO; 2009.
6. Hunt JR. Dietary and physiological factors that affect the absorption and bioavailability of iron. *Int J Vitam Nutr Res.* 2005;75(6):375–84.
7. Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26:115–9.
8. Vieth JT, Lane DR. Anemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(6):1045–60.
9. Wong C. Iron deficiency anaemia. *Paediatr Child Health (Oxford).* 2017;27(11):527–9.
10. Cascio MJ, DeLoughery TG. Anemia: Evaluation and diagnostic tests. *Med Clin North Am.* 2017;101(2):263–84.
11. Ganz T. Iron homeostasis: Fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab.* 2008;7(4):288–90.
12. Singh B, Arora S, Agrawal P, Gupta SK. Heparin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta.* 2011;412:823–30.
13. Theurl I, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Theurl M, Sonnweber T, et al. Pathways for the regulation of hepcidin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in vivo. *Haematologica.* 2011;96(12):1761–9.
14. Da Cunha MSB, Siqueira EMA, Trindade LA, Arruda SF. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. *J Nutr Biochem.* 2014;25(10):1035–44.
15. Saraiva BC, Soares MC, dos Santos LC, Pereira SCL, Horta PM. Iron deficiency and anemia are associated with low retinol levels in children aged 1 to 5 years. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(6):593–9.
16. Imam MU, Zhang S, Ma J, Wang H, Wang F. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress. *Nutrients.* 2017;9(7):1–19.
17. Da Cunha MSB, Aboudib N, Arruda SF. Effect of vitamin A supplementation on iron status in humans: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(11):1767–81.
18. Arruda SF, Siqueira EMA, De Valência FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition.* 2009;25(4):472–8.
19. Citelli M, Bittencourt LL, Da Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149(1):64–70.
20. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;127:838S–841S.
21. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):303.
22. Pereira RC, Caroso Ferreira LO, Da Silda Diniz A, Batista Filho M, Natal Figueirôa J. Eficácia da suplementação de ferro associado ou não à vitamina A no controle da anemia em escolares. *Cad Saúde Pública.* 2007;23(6):1415–21.
23. Visser M, Van Zyl T, Hanekom SM, Baumgartner J, Van der Hoeven M, Taljaard JG, et al. Nutrient patterns and its relation to anaemia and iron status in 5–12-year-old children in South Africa. *Nutrition.* 2019;62:194–200.
24. Kumar MV, Nirmalan PK, Erhardt JG, Rahmathullah L, Rajagopalan S. An efficacy study on alleviating micronutrient deficiencies through a multiple micronutrient fortified salt in children in South India. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2014;23(3):413–22.
25. Alaofê H, Burney J, Naylor R, Taren D. Prevalence of anaemia, deficiencies of iron and vitamin A and their determinants in rural women and young children: A cross-sectional study in Kalalé district of northern Benin. *Public Health Nutr.* 2017;20(7):1203–13.
26. Oliveira JM, Michelazzo FB, Stefanello J, Rondó PHC. Influence of iron on vitamin a nutritional status. *Nutr Rev.* 2008;66(3):141–7.
27. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(6):1906–10.
28. Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: Implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2010;55(4):726–41.
29. Schmidt PJ, Fleming MD. Modulation of hepcidin as therapy for primary and secondary iron overload disorders: Preclinical models and approaches. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(2):387–401.
30. Xiaolei X, Zhenting Q. Effect of vitamin A deficiency on iron metabolism and hepcidin mRNA expression in rat. In *Proceedings 2011 International Conference on Human Health and Biomedical Engineering.* 2011;140–2.
31. Jiang S, Wang C, Lan L, Zhao D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition.* 2012;28(3):281–7.
32. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: Insights from mouse models. *Front Pharmacol.* 2014;5:1–15.
33. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, et al. Heatmapper: Web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W147–53.
34. Mendes JFR, De Almeida Siqueira EM, De Brito e Silva JGM, Arruda SF. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism independent of hemojuvelin (Hfe2) and bone morphogenetic protein 6 (Bmp6) transcript levels. *Genes Nutr.* 2016;11(1):1–7. <https://doi.org/10.1186/s12263-016-0519-4>.
35. Kong WN, Niu QM, Ge L, Zhang N, Yan SF, Bin ChenW, et al. Sex differences in iron status and hepcidin expression in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2014;160(2):258–67.
36. Malik IA, Wilting J, Ramadori G, Naz N. Reabsorption of iron into acutely damaged rat liver: A role for ferritins. *World J Gastroenterol.* 2017;23(41):7347–58.
37. Malik IA, Naz N, Sheikh N, Khan S, Moriconi F, Blaschke M, et al. Comparison of changes in gene expression of transferrin receptor-1 and other iron-regulatory proteins in rat liver and brain during acute-phase response. *Cell Tissue Res.* 2011;344(2):299–312.
38. Sheikh N, Batusic DS, Dudas J, Tron K, Neubauer K, Saile B, et al. Heparin and hemojuvelin gene expression in rat liver damage: In vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2006;291(3):G482–90.

History

Received June 28, 2019

Accepted May 29, 2020

Published online XX, 2020

Acknowledgement

M.R.G. collected and analyzed the data and wrote the manuscript. L.D.B. read and made valuable comments about the text. All authors read and approved the final manuscript. This work was funded by grants from La Sabana University's Grant System and the Colombian Department of Science, Technology and Innovation (Colciencias) through a National Doctoral Grant in call 567-2012.

Conflict of interest

The authors declare that no known conflicts of interest are associated with this publication.

Luis E. Díaz

Campus del Puente del Común
Km. 7, Autopista Norte de Bogotá
Chía, Cundinamarca
Colombia
luisdiaz1@unisabana.edu.co

1 Article

2 Vitamin A Deficiency Influences the Expression of 3 Ferritin in Young Male Wistar Rats

4 Mauricio Restrepo-Gallego, MSc¹, Luis Eduardo Díaz, PhD ^{2*}, Juan David Ospina-Villa, PhD³
5 and Danny Chinchilla-Cárdenas, MSc⁴

6 ¹ Student at Doctorate Program in Bioscience, La Sabana University, Chía, 140007, Cundinamarca, Colombia.
7 ORCID ID: 0000-0002-8631-3547

8 ² Associate Professor at Doctorate Program in Bioscience, La Sabana University, Chía, 140007, Cundinamarca,
9 Colombia. ORCID ID: 0000-0002-9588-9935

10 ³ Independent Researcher, Medellín, 055421, Colombia. ORCID ID: 0000-0003-1679-3036

11 ⁴ Scientific Director, Mascolab SAS, Medellín, 050021, Colombia. ORCID ID: 0000-0002-8439-9244

12 * Correspondence: luis.diaz1@unisabana.edu.co

13 Received: date; Accepted: date; Published: date

14 **Abstract:** Iron deficiency anemia (IDA) and vitamin A deficiency (VAD) are two of the main
15 micronutrient deficiencies. Both micronutrients are essential for human life and children's
16 development, so authorities around the world are vigilant about IDA and VAD. IDA and VAD. The
17 aim of this study was to investigate the effect of VAD on the expression of ferritin and transferrin
18 receptor. Five diets with different ratios of vitamin A to iron were given to thirty-five 21-day-old
19 male Wistar rats (seven animals per group). The animals received the diet for six weeks before they
20 were euthanized. Serum iron and retinol levels were measured as biochemical parameters.
21 Duodenum, spleen, and liver were analysed for expression of ferritin and transferrin receptor by
22 Western Blotting. Regarding biochemical parameters, the results show that vitamin A is required to
23 enhance the serum iron content even with a sufficient iron supply. The results also show that VAD
24 does not influence the expression of transferrin receptor but ferritin. In conclusion, the study
25 demonstrates that VAD modifies the expression of ferritin which suggests that vitamin A could be
26 determinant in fortification programs joint with iron to reduce the prevalence of IDA.

27 **Keywords:** iron deficiency anemia; iron homeostasis; ferritin; transferrin receptor; vitamin A
28 deficiency
29

30 1. Introduction

31 Hidden hunger, also known as micronutrient malnutrition (MNM) occurs when the intake of
32 micronutrients is below the required quantity. MNM is common in developing and developed
33 countries and is specific for deficiencies of iron, iodine, folate, zinc and vitamin A, all considered as
34 critical nutrient for an adequate development ¹. It is considered that MNM has a greater effect on
35 cognitive and physical development than calorie restriction ². Regarding iron and vitamin A, both
36 are essential for human life and children's development, so authorities around the world are vigilant
37 about iron deficiency anemia (IDA) and vitamin A deficiency (VAD) ³.

38 Regarding anemia and according to the most recent official data from the report *Global*
39 *Prevalence of Anemia in 2011* (World Health Organization) the prevalence for risk groups were: 42.6%
40 (95% CI: 37-47) for children which represents 273.2 million individuals (95% CI: 241.8-303.7) and
41 29.4% (95% CI: 24.5-35.0) for women in reproductive age covering a total of 528.7 million individuals
42 (95% CI: 440.3-629.4) ⁴.

43 About the consequences of VAD, it is considered as the main cause of blindness in children and
44 a risk factor of disease and death from serious infections ⁵. VAD also causes night blindness in

45 pregnant women and may increase the risk of maternal mortality. According to the report *Global*
 46 *prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005* (WHO), VAD is a severe public health
 47 problem in children in preschool-age children (prevalence of 33.3%, 95% CI [31.1-35.4] and a
 48 moderate public health problem in pregnant women (prevalence of 15.3%, 95% CI [7.4-23.2] ⁶

49 Anemia is a condition presented when the blood is deficient in healthy red blood cells or
 50 hemoglobin ⁷. Anemia could be a consequence of nutritional causes as micronutrient deficiencies
 51 and anti-nutritional factors that affect iron absorption; there are also non-nutritional causes leading
 52 to anemia like bleeding, infections and genetic conditions ⁸.

53 Among the nutritional causes for anemia, iron deficiency is considered the main one ^{9,10}; the
 54 WHO has established cut-off values for hemoglobin (<11 g/dL for children under 5 years old and
 55 pregnant women; <12 g/dL for children from 5-12 years old, non-pregnant women and teenage
 56 males and <13 g/dL for teenage females) and ferritin (<12 µg/L) to diagnose IDA ⁷. There are different
 57 studies and reviews that explored the relationship between other micronutrient deficiencies and
 58 anemia like vitamin D ¹¹, vitamin B12 and folate ¹² and vitamin A that is the main focus of the present
 59 study.

60 VAD is diagnosed based on serum retinol levels (SLR) and the following values has been
 61 established to classify it, SRL between 0.36 and 0.70 mmol/L is considered as subclinical deficiency,
 62 below 0.35 mmol/L is considered clinical deficiency, from 0.71 to 1.04 mmol/L is considered
 63 suboptimal and above 1.05 mmol/L is considered as normal level of vitamin A ¹³.

64 The relationship between iron and vitamin A has been proposed since the early 20th century ¹⁴
 65 and is considered that vitamin A is a nutrient that could regulate iron use ¹⁵, iron metabolism and
 66 erythropoiesis and its deficiency should be considered as a risk factor for ID ¹⁶ even it is well known
 67 that the precise relationship depends on many factors ¹⁷ but the mechanism of that effect is not
 68 well-established. The few evidence available suggests that VAD affects iron metabolism and not its
 69 absorption or transport ^{18,19}. In cases of iron overload and normal vitamin A levels, retinol has an
 70 antioxidant activity stimulating ferritin synthesis thus reducing circulating iron to avoid oxidative
 71 stress ²⁰.

72 The studies of Saraiva *et al* ¹⁹ and Arruda *et al* ²¹ proposed the effect of VAD upregulating the
 73 expression of hepcidin and reducing the efflux of iron from the enterocyte as consequence of the
 74 internalisation of ferroportin induced by hepcidin. That effect of the axis VAD:hepcidin:ferroportin
 75 were validated by the work of and Citelli *et al* ²² employing *in vitro* (Caco-2) and *in vivo* (BALB/c male
 76 mice and Wistar male rats) models, however, the mechanism is not clear; the same study revealed
 77 that the expression of other proteins related to iron metabolism, such as DMT1, DcytB and TfR, was
 78 not affected ²².

79 The present research was conducted with the hypothesis that vitamin A somehow regulates
 80 iron metabolism, so both must be taken together. Our study was an analysis of the expression of
 81 ferritin and transferrin receptor by Western Blotting under five diets with different ratios of iron to
 82 vitamin A to identify how VAD is related to iron homeostasis in young male Wistar rats.

83 2. Materials and Methods

84 We followed the methods previously described (Restrepo-Gallego and Díaz) for animal
 85 housing, diets and procedures ²³. Briefly, thirty-five 21-day-old male Wistar rats were housed in
 86 polycarbonate cages with polycarbonate water dispensers. Five groups of seven animals each were
 87 randomly assigned to the different diets. Table 1 shows the composition and nutritional profile of
 88 the diets. After six weeks of feeding, animals were anesthetized for whole blood extraction and
 89 further biochemical analysis. Then the animals were euthanized, and their livers, spleens and small
 90 bowels were kept at -80°C for further Western Blot analysis. The Ethical Committees of Antioquia's
 91 University (#108.090217) and La Sabana University (#55.170516) approved the entire procedure.

92 **Table 1.** Ingredient composition and nutritional profile for each diet.

Ingredient	Control	Fes/vAd	Fes/vAi	Fei/vAs	Fei/vAi
Corn starch	397.5	397.5	397.5	397.5	397.5

Casein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Maltodextrin 10	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Vegetable oil	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mix ^a	35.0	35.0	35.0	0	0
Mineral mix ^b	0	0	0	35	35
Vitamin mix ^c	10.0	0	0	10.0	0
Vitamin mix ^d	0	10	10	0	10
L-Cysteine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Ferric citrate [17.4% Fe]	0.03	0.03	0.03	0.07	0.07
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Vitamin A palmitate [500.000 IU/g]	0	0	0.0008	0	0.0008
Protein [%]	20	20	20	20	20
Fat [%]	7	7	7	7	7
Fiber [%]	5	5	5	5	5
Carbohydrate [%]	64	64	64	64	64
Iron [mg/kg]	45	45	45	15	15
Vitamin A [μ g/kg] as retinol acetate	1200	0	120	1200	120

93 d, deficient; i, insufficient; s, sufficient; Ingredients are listed as g/kg except when noted;
 94 ^aAIN-93G-MX; ^bAIN-93G-MX deficient in iron; ^cAIN-93G-VX; ^dAIN-93G-VX without vitamin A.

95 Cell lysates were obtained from the tissues using a lysis buffer (NaCl 150mM, PMSF 1mM,
 96 Triton X-100 1%, Tris-HCl 50mM, DTT 200mM, EDTA 1mM) and protease inhibitor (cOmplete™
 97 ULTRA Tablets, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The extraction was carried in a
 98 BeadBug homogenizer (Benchmark Scientific, Edison, NJ, USA) at 4000 rpm with 1 mm glass beads.
 99 The total protein content in the cell extracts was quantified in an equipment Qiaxpert 200,630
 100 (Qiagen, Hilden, Germany).

101 Samples (50 μ g of total protein) were subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to
 102 polyvinylidene membranes (PVDF Immobilion-P, Millipore, Burlington, MA, USA) and blocked with
 103 skimmed milk powder at 5% in with skimmed milk powder at 5% in tris-buffered saline and
 104 polysorbate 20 (TBST). Primary and secondary anti-bodies used were obtained from Novus
 105 Biologicals (Centennial, CO, USA) and are detailed in Table 2. Secondary antibodies used were
 106 anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody [HRP] NB7511 (1:2000) and anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary
 107 Antibody [HRP] NB7160 (1:500) both with goat as host and were obtained also from Novus
 108 Biologicals. Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine staining (Sigma, St.
 109 Louis, MO, USA).

110 **Table 2.** Primary antibodies used for Western Blotting tests.

Protein	Primary antibody	Dilution	Host
β -actin	beta-Actin Antibody (AC-15) NB600-501	1:2000	Mouse
Ferritin	Ferritin Antibody NBP1-31944	1:100	Rabbit
Transferrin receptor	TfR (Transferrin R) Antibody NB100-92243	1:100	Mouse
Il6	IL-6 Antibody NB600-1131	1:500	Rabbit

111 Data from biochemical parameters were presented as mean \pm standard deviation. Continuous
 112 variables were compared between groups by one-way analysis of variance with a post hoc
 113 least-significant-difference t test ($p < 0.05$). The normality of data distribution was tested by the
 114 Kolmogorov-Smirnov test; equality of variance was measured using Levene's test. SPSS 13.0 for
 115 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. The number of rats was estimated by a power
 116 analysis to obtain 80% power at a confidence level of 95% ²⁴. Western blot procedure was carried out
 117 in triplicate for each sample.

118 Western Blots information was analyzed with the software Prism 7.04 (GraphPad, San Diego,
 119 CA, USA). The results were presented as relative expression of the respective protein to β -actin
 120 giving a value of 1 to the control group and analyzed with Tukey method for multiple comparisons.
 121 $p < 0.05$ was considered statistically significant.

122 3. Results

123 To explore how VAD alters the some of the main biomarkers associated to storage and iron
 124 transport, the present research analyzed the expression of ferritin and transferrin receptor in five
 125 groups of young male Wistar rats fed with diets with different ratios of vitamin A to iron. The
 126 control group received a standard diet according to the reference diets for laboratory animals, and
 127 the four experimental groups received different combinations of iron (Fe) and vitamin A (vA) at
 128 sufficient (s), insufficient (i) or deficient (d) levels. No group was deficient in iron because it is
 129 necessary for life sustain, thus a complete lack of it would result in no viable experimental subjects²⁵.
 130 Given the known relationship between VAD and iron homeostasis, biomarkers are important, as
 131 they indicate the needed supply of both micronutrients together to prevent IDA in children and
 132 women at reproductive age²⁶.

133 3.1. Biochemical parameters: serum iron and serum retinol

134 All the intergroup comparisons indicated significant differences in serum iron content. Both
 135 groups with low amounts of iron (Fei/vAs and Fei/vAi) had significant differences from the control
 136 group ($p < 0.001$ for both groups). VAD (Fes/vAi and Fes/vAd) impacted the total serum iron content
 137 ($p = 0.024$ and 0.001 , respectively), as the Fes/vAd group exhibited the lowest values of both VAD
 138 groups.

139 In terms of serum retinol levels, the groups with insufficient or deficient dietary vitamin A all
 140 had significantly lower levels of serum retinol than the control group ($p < 0.001$ for both groups). In
 141 the multiple comparison, only the groups with low dietary vitamin A (Fes/vAi and Fei/vAi) showed
 142 no significant differences between them ($p = 0.980$). The results are summarized in Table 3.
 143 Regarding the relationship about weight gain, food intake, hematological parameters and
 144 nutritional status of vitamin A and iron, our previous findings suggested that, in young male Wistar
 145 rats, both iron and vitamin A are essential to cause increases in body weight and various
 146 hematologic parameters²³.

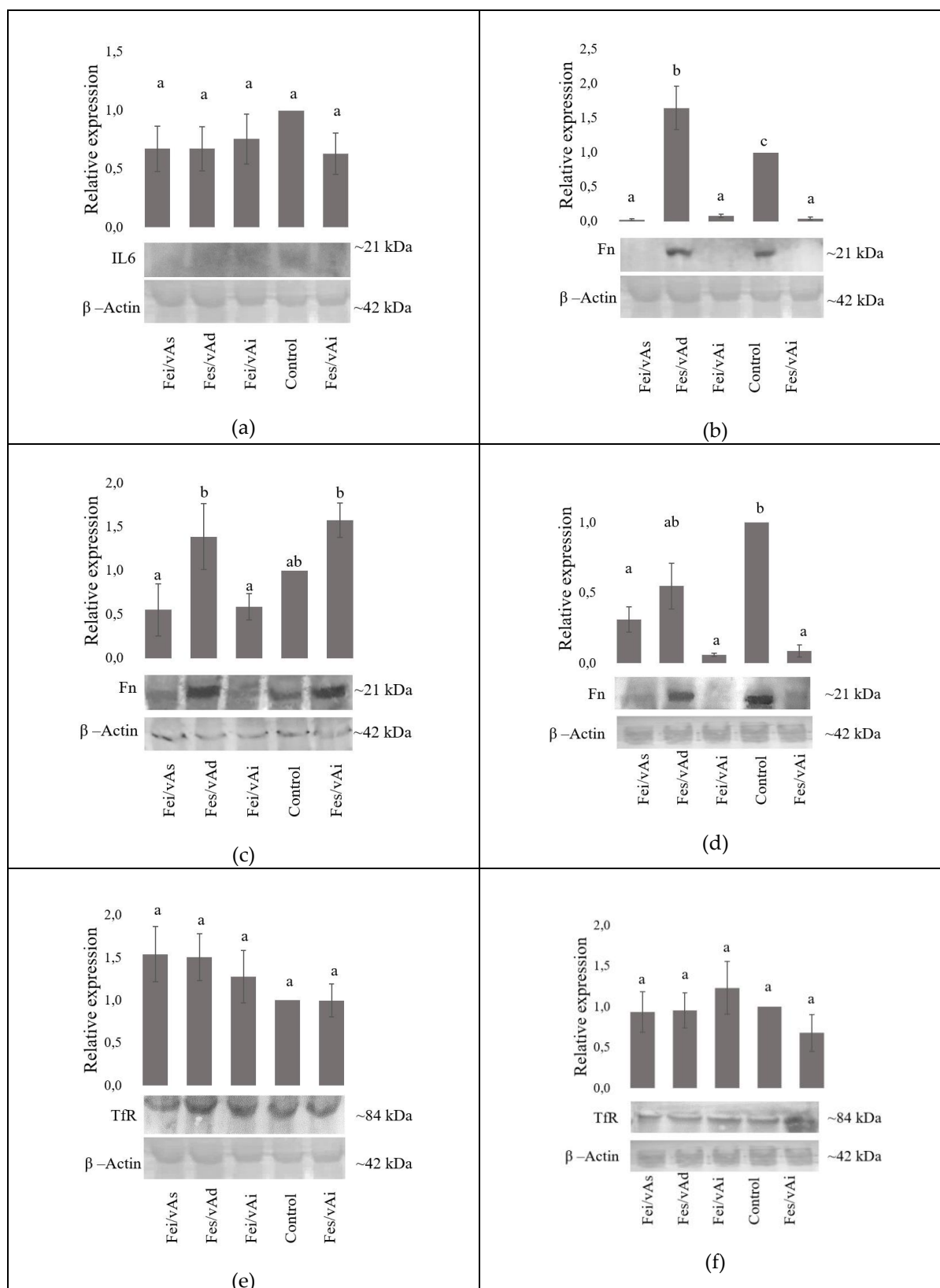
147 **Table 3.** Biochemical parameters of the different groups.

Parameter	Control	Fes/vAd	Fes/vAi	Fei/vAs	Fei/vAi
Serum iron [$\mu\text{g/dL}$]	255.86 \pm 43.83 a	181.30 \pm 14.53 b	219.81 \pm 15.58 c	131.01 \pm 43.83 d	74.74 \pm 18.27 e
Serum retinol [$\mu\text{mol/L}$]	1.60 \pm 0.16 a	0.24 \pm 0.04 b	0.55 \pm 0.10 c	1.26 \pm 0.12 d	0.55 \pm 0.08 c

148 Data are given as mean \pm 1 SD; $n = 7$; different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

149 3.2. Western Blot results

150 Ferritin is an acute-phase protein and inflammation status of the animals must be consider to
 151 avoid misinterpretations and introduce adjustments, if necessary^{27–29}. Figure 1a shows that there
 152 were no significant differences ($p < 0.05$) in the expression of hepatic interleukin 6 (IL6) values when
 153 the experimental groups were compared with the control group and also when the intergroup
 154 comparisons were made; so, inflammation was not a critical factor for the study.



155 **Figure 1.** Relative expression to β -actin of (a) interleukin-6 in liver; (b) ferritin in liver; (c) ferritin in
 156 duodenum; (d) ferritin in spleen; (e) transferrin receptor in liver and (f) transferrin receptor in spleen.
 157 Data are given as mean \pm 1 SD; groups with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

158 The results for ferritin in liver (Figure 1b) showed that fully lack of vitamin A with enough
 159 amount of iron (Fes/vAd), seems to induce some level of holding or reabsorption of iron as ferritin,
 160 reducing its mobilization to other tissues, maybe due to a damage at the hepatocyte ³⁰, this is

161 demonstrated by the significant higher expression of Fn in Fes/vAd group in comparison with the
162 control group ($p = 0.0017$). Those results are consistent with previous findings about the
163 relationship between VAD and oxidative stress by overload of serum iron related to an increase of
164 ferritin and IRP2^{31,32}.

165 Regarding ferritin in duodenum (Figure 1c) we found that there were no significant differences
166 between the experimental groups and the control group. Ferritin in spleen (Figure 1d) showed that
167 only the group without vitamin A (Fes/vAd) does not have significant differences in comparison
168 with the control group ($p = 0.1076$).

169 About the effect of VAD on the expression of transferrin receptor in liver (Figure 1e) and spleen
170 (Figure 1f), our study does not show any differences between the experimental groups and the
171 control group for both tissues.

172 4. Discussion

173 When results in the three groups with enough iron (Control, Fes/vAi and Fes/vAd) are
174 compared for serum iron, the group without vitamin A (Fes/vAd) showed lower results for serum
175 iron, that suggests that at least a small amount of vitamin A is required to support an adequate level
176 of serum iron; that results agrees with previous studies that demonstrated that IDA are related to
177 low intake of vitamin A in children between 5 and 12 years of age³³. The use of multinutrients as
178 strategy to improve the iron status and retinol status has been successful in regions and countries
179 as South India³⁴, Tanzania³⁵, Brazil³⁶ and Benin³⁷.

180 The focus of this research was not to evaluate the effect of iron deficiency on vitamin A status,
181 however it is important to remark that dietary iron changes have no effect on serum retinol amounts
182 when dietary vitamin A levels are low or absent; previous findings showed a lack of consensus
183 about the unidirectional effect of iron supplementation on the nutritional status of vitamin A as well
184 as differences between results in animal models and humans³⁸.

185 The findings of this study showed no significant differences in IL6 expression as an indicator of
186 inflammation in the animals, even with VAD, ID or both. Previous works showed that VAD and/or
187 IDA enhances the inflammatory state by increasing IL6 expression in the liver¹⁸, regarding hepcidin
188 it has been established that IL6 regulates its transcription thus regulating circulation of iron in
189 inflammation^{39,40}. So, our findings do not mean that no relationship exists between VAD or ID and
190 inflammation, but under the experimental research conditions, there is not enough evidence to
191 support it.

192 When groups insufficient in iron (Fei/vAs and Fei/vAi) were compared there is a subexpression
193 of ferritin in comparison with control group ($p < 0.001$ for both groups) due to the marginal deficiency
194 of iron, however, is interesting find that the group with sufficient iron but marginal deficiency of
195 vitamin A also showed subexpression of hepatic ferritin in comparison with control group ($p < 0.001$)
196 due to the fact that vitamin A induces the expression of ferroportin (*Fpn1*) gene to promote the
197 export of iron to the bloodstream^{22,41} which means that both nutrients must be in adequate quantities
198 to maintain the appropriate levels of iron storage in liver.

199 When intergroup comparisons were made, we found that the group with enough iron and a
200 marginal deficiency of vitamin A (Fes/vAi) was significantly higher than Fei/vAi ($p = 0.0351$) and
201 Fei/vAs ($p = 0.0487$). That suggests that at duodenal level, only dietary iron seems to influence the
202 expression of ferritin as a mechanism to regulate the circulating iron and prevent oxidative stress,
203 our results are consistent with the findings of Vanoaica et al⁴² that demonstrated that not only
204 hepcidin but ferritin are necessary to regulate iron efflux to the bloodstream.

205 Ferritin in spleen results showed an interesting finding that denotes a relationship between the
206 fully absence of vitamin A and some kind of inflammatory disease which increases the expression of
207 splenic ferritin as marker of inflammation⁴³, in this case it seems that there is no relationship with
208 the iron status on the body.

209 Our results for transferrin receptor in liver and spleen agree with the findings of Citelli et al
210^{18,19,22} that indicates that VAD impairs iron metabolism and may not affect iron absorption or
211 transport.

212 The results of this study give a new approach to the relationship between VAD and IDA on the
213 expression of ferritin, previous findings had been focused on the effect on the expression of hepcidin
214 ^{19,21}, iron regulatory protein 2 ³¹, ferroportin ⁴⁴. Our findings do not indicate that the previous ones are
215 wrong but give a new approach based on ferritin supported by the review and meta-analysis made
216 by da Cunha *et al* ⁴⁵ where suggests that supplementation with vitamin A alone may reduce the risk
217 of anemia, by improving ferritin levels in individuals with low serum retinol levels; our study also
218 reinforce the concept that the vitamin A acts in different ways as a regulator of the iron homeostasis
219 and metabolism and must be studied in deeper to understand all the mechanisms that are related
220 with IDA or anemia by VAD.

221 Finally, the development of improved technologies for the diagnosis of VAD and ID could lead
222 to a better understanding of the relationship between them and a better interpretations of the results
223 considering variables as inflammation status, interaction with other micronutrients and general
224 health status of the individuals ⁴⁶.

225 5. Conclusions

226 The results of the study allow to propose that VAD influences the expression of the proteins
227 associated to iron storage and could be another mechanism to explain anemia by VAD even with
228 adequate levels of dietary iron. Based on our findings we consider that the joint supply of iron and
229 vitamin A must be considered as a strategy to reduce the prevalence of IDA, especially for women at
230 reproductive age and children. Further and deeper research at clinical level will give more
231 information about the relationship of both nutrients in a more realistic scenario and could explain
232 somehow the mechanism behind that interaction.

233

234 **Author Contributions:** Conceptualization, M.R. and L.D.; methodology, M.R., J.O. and D.C.; formal analysis,
235 M.R.; investigation, M.R.; writing original draft preparation, M.R. and J.O. All authors agree with the
236 manuscript and declare that the content has not been published elsewhere.

237 **Funding:** This work was funded by grants from La Sabana University's Grant System (# ING-174-2016) and the
238 Colombian Ministry of Science, Technology, and Innovation (Colciencias) through a National Doctoral Grant (#
239 567-2012).

240 **Conflicts of Interest:** The authors declare that no known conflicts of interest are associated with this
241 publication.

242 References

- 243 1. Muthayya S, Rah JH, Sugimoto JD, Roos FF, Kraemer K, Black RE. The global hidden hunger indices
244 and maps: an advocacy tool for action. *PLoS One*. 2013;8(6):1-12.
- 245 2. Arcanjo FPN, Arcanjo CPC, Santos PR. Schoolchildren with Learning Difficulties Have Low Iron Status
246 and High Anemia Prevalence. *J Nutr Metab*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/7357136
- 247 3. WHO. *Health in 2015: From MDGs, Millennium Development Goals to SDGs, Sustainable Development Goals*.
248 Geneva: World Health Organization; 2015.
- 249 4. WHO. *The Global Prevalence of Anaemia in 2011*. Geneva: World Health Organization; 2015.
- 250 5. Rubino P, Mora P, Ungaro N, Gandolfi SA, Orsoni JG. Anterior Segment Findings in Vitamin A
251 Deficiency: A Case Series. *Case Rep Ophthalmol Med*. 2015;2015:1-6. doi:10.1155/2015/181267
- 252 6. WHO. *Global Prevalence of Vitamin A Deficiency in Populations at Risk 1995-2005 : WHO Global Database on*
253 *Vitamin A Deficiency*. Geneva: World Health Organization; 2009.
- 254 7. Cascio MJ, DeLoughery TG. Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *Med Clin North Am*.
255 2017;101(2):263-284.
- 256 8. Vieth JT, Lane DR. Anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(6):1045-1060.
- 257 9. Wong C. Iron deficiency anaemia. *Paediatr Child Health (Oxford)*. 2017;27(11):527-529.

- 258 10. Rasul I, Kandel GP. An approach to iron-deficiency anemia. *Can J Gastroenterol Hepatol.*
259 2001;15(11):739-748.
- 260 11. De La Cruz-Góngora V, Salinas-Rodríguez A, Villalpando S, Flores-Aldana M. Serum retinol but not
261 25(OH)D status is associated with serum hepcidin levels in older Mexican adults. *Nutrients.*
262 2019;11(5):1-15.
- 263 12. Green R, Datta Mitra A. Megaloblastic Anemias: Nutritional and Other Causes. *Med Clin North Am.*
264 2017;101(2):297-317.
- 265 13. Vuralli D, Tumer L, Hasanoglu A, Biberoglu G, Pasaoglu H. Vitamin A status and factors associated in
266 healthy school-age children. *Clin Nutr.* 2014;33(3):509-512.
- 267 14. Koessler KK, Maurer S, Loughlin R. The relation of anemia, primary and secondary, to vitamin A
268 deficiency. *JAMA.* 1926;87(7):476-482.
- 269 15. Sun YY, Ma AG, Yang F, et al. A combination of iron and retinol supplementation benefits iron status,
270 IL-2 level and lymphocyte proliferation in anemic pregnant women. *Asia Pac J Clin Nutr.*
271 2010;19(4):513-519.
- 272 16. Villalpando S, de la Cruz V, Shamah-Levy T, Rebollar R, Contreras-Manzano A. Nutritional status of
273 iron, vitamin B12, folate, retinol and anemia in children to 11 years old. Results of the Ensanut 2012.
274 *Salud Publica Mex.* 2015;57(5):372-384.
- 275 17. Michelazzo FB, Oliveira JM, Stefanello J, Luzia LA, Rondó PHC. The influence of vitamin A
276 supplementation on iron status. *Nutrients.* 2013;5(11):4399-4413.
- 277 18. da Cunha MSB, Siqueira EMA, Trindade LA, Arruda SF. Vitamin A deficiency modulates iron
278 metabolism via ineffective erythropoiesis. *J Nutr Biochem.* 2014;25(10):1035-1044.
- 279 19. Saraiva BC, Soares MC, dos Santos LC, Pereira SCL, Horta PM. Iron deficiency and anemia are
280 associated with low retinol levels in children aged 1 to 5 years. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(6):593-599.
- 281 20. Imam MU, Zhang S, Ma J, Wang H, Wang F. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative
282 stress. *Nutrients.* 2017;9(7):1-19.
- 283 21. Arruda SF, Siqueira EM de A, de Valência FF. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and
284 oxidative stress in rat. *Nutrition.* 2009;25(4):472-478.
- 285 22. Citelli M, Bittencourt LL, Da Silva SV, Pierucci APT, Pedrosa C. Vitamin a modulates the expression of
286 genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149(1):64-70.
- 287 23. Restrepo-Gallego M, Díaz LE. Influence of Dietary Vitamin A and Iron Deficiency on Hematologic
288 Parameters and Body Weight of Young Male Wistar Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020;59(1):17-23.
289 doi:10.30802/AALAS-JAALAS-19-000020
- 290 24. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.*
291 2013;4(4):303.
- 292 25. Mesías M, Seiquer I, Navarro MP. Iron Nutrition in Adolescence. *Crit Rev Food Sci Nutr.*
293 2013;53(11):1226-1237.
- 294 26. Pereira RC, Caroso Ferreirra LO, da Silda Diniz A, Batista Filho M, Natal Figueirôa J. Eficácia da
295 suplementação de ferro associado ou não à vitamina A no controle da anemia em escolares. *Cad Saúde*
296 *Pública.* 2007;23(6):1415-1421.
- 297 27. Namaste SML, Rohner F, Huang J, et al. Adjusting ferritin concentrations for inflammation: Biomarkers
298 Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. *Am J Clin Nutr.*
299 2017;106:359S-71S.
- 300 28. Rohner F, Namaste SML, Larson LM, et al. Adjusting soluble transferrin receptor concentrations for

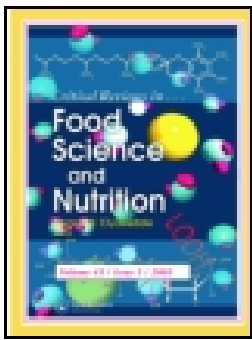
- 301 inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia
302 (BRINDA) project. *Am J Clin Nutr.* 2017;106:372S-82S.
- 303 29. Cichon B, Ritz C, Fabiansen C, et al. Assessment of Regression Models for Adjustment of Iron Status
304 Biomarkers for Inflammation in Children with Moderate Acute Malnutrition in Burkina Faso. *J Nutr.*
305 2016:126-132.
- 306 30. Malik IA, Wilting J, Ramadori G, Naz N. Reabsorption of iron into acutely damaged rat liver: A role for
307 ferritins. *World J Gastroenterol.* 2017;23(41):7347-7358.
- 308 31. Jiang S, Wang C, Lan L, Zhao D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the
309 expression of iron regulatory protein-2. *Nutrition.* 2012;28(3):281-287.
- 310 32. Chiou YL, Chen YH, Ke T, Ko WS. The effect of increased oxidative stress and ferritin in reducing the
311 effectiveness of therapy in chronic hepatitis C patients. *Clin Biochem.* 2012;45(16-17):1389-1393.
- 312 33. Visser M, Van Zyl T, Hanekom SM, et al. Nutrient patterns and its relation to anaemia and iron status in
313 5-12-year-old children in South Africa. *Nutrition.* 2019;62:194-200.
- 314 34. Kumar MV, Nirmalan PK, Erhardt JG, Rahmathullah L, Rajagopalan S. An efficacy study on alleviating
315 micronutrient deficiencies through a multiple micronutrient fortified salt in children in South India.
316 *Asia Pac J Clin Nutr.* 2014;23(3):413-422.
- 317 35. Makola D, Ash DM, Tatala SR, Latham MC, Ndossi G, Mehansho H. A micronutrient-fortified beverage
318 prevents iron deficiency, reduces anemia and improves the hemoglobin concentration of pregnant
319 Tanzanian women. *J Nutr.* 2003;133(5):1339-1346. doi:10.1093/jn/133.5.1339
- 320 36. Castro LCV, Costa NMB, Sant'Anna HMP, Ferreira CLDLF, Franceschini SDCDC. Improvement the
321 nutritional status of pre-school children following intervention with a supplement containing iron, zinc,
322 copper, vitamin A, vitamin C and prebiotic. *Cienc e Saude Coletiva.* 2017;22(2):359-368.
323 doi:10.1590/1413-81232017222.15902015
- 324 37. Alaofè H, Burney J, Naylor R, Taren D. Prevalence of anaemia, deficiencies of iron and Vitamin A and
325 their determinants in rural women and young children: A cross-sectional study in Kalalé district of
326 northern Benin. *Public Health Nutr.* 2017;20(7):1203-1213.
- 327 38. Oliveira JM, Michelazzo FB, Stefanello J, Rondó PHC. Influence of iron on vitamin a nutritional status.
328 *Nutr Rev.* 2008;66(3):141-147.
- 329 39. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and
330 interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(6):1906-1910.
- 331 40. Babitt JL, Lin HY. Molecular Mechanisms of Hepcidin Regulation: Implications for the Anemia of CKD.
332 *Am J Kidney Dis.* 2010;55(4):726-741.
- 333 41. Katz O, Reifen R, Lerner A. β -Carotene can reverse dysregulation of iron protein in an in vitro model of
334 inflammation. *Immunol Res.* 2014;61(1-2):70-78.
- 335 42. Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schümann K, Kühn LC. Intestinal ferritin H is required for an
336 accurate control of iron absorption. *Cell Metab.* 2010;12(3):273-282.
- 337 43. Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a
338 leakage product from damaged cells. *Metallomics.* 2014;6(4):748-773.
- 339 44. Han L, Liu Y, Lu M, Wang H, Tang F. Retinoic acid modulates iron metabolism imbalance in anemia of
340 inflammation induced by LPS via reversely regulating hepcidin and ferroportin expression. *Biochem*
341 *Biophys Res Commun.* 2018;507(1-4):280-285.
- 342 45. da Cunha MSB, Aboudib N, Arruda SF. Effect of vitamin A supplementation on iron status in humans:
343 A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(11):1767-1781.

- 344 46. Lu Z, O'Dell D, Srinivasan B, et al. Rapid diagnostic testing platform for iron and Vitamin A deficiency.
345 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(51):13513-13518.
346



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

347



Classic and emergent indicators for the assessment of human iron status

Mauricio Restrepo-Gallego, Luis E. Díaz & Patricia H.C Rondó

To cite this article: Mauricio Restrepo-Gallego, Luis E. Díaz & Patricia H.C Rondó (2020): Classic and emergent indicators for the assessment of human iron status, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: [10.1080/10408398.2020.1787326](https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1787326)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1787326>



Published online: 03 Jul 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 7






View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Classic and emergent indicators for the assessment of human iron status

Mauricio Restrepo-Gallego^a , Luis E. Díaz^a , and Patrícia H.C Rondó^b 

^aDoctorate Program in Bioscience, La Sabana University, Chía, Colombia; ^bDepartment of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Iron deficiency is the leading cause of anemia, a significant global public health problem. Different methods exist for assessing iron nutritional status, including laboratory tests that focus on storage, transportation, and iron functional compartment parameters. Classical markers such as bone marrow, serum iron, ferritin, hemoglobin, erythrocyte parameters, transferrin, transferrin receptors, and zinc protoporphyrin are discussed in this review. Additional parameters calculated from these indicators, including transferrin saturation, ferritin index and Thomas plot, and some emergent parameters such as hepcidin, erythroferrone, and low hemoglobin density are also discussed. There is no a single indicator for assessing iron nutritional status. Therefore, the use of more than one indicator may be the best practice to obtain the correct diagnosis, also considering the influence of inflammation/infection on many of these indicators. The constant validation of the current parameters, the improvement of assessment methods, and the identification of new indicators will be the key to refine the assessment of iron nutritional status and the right choice of treatment for its improvement.

KEYWORDS

Anemia; hepcidin; iron deficiency; iron replacement therapy; iron status

Introduction

Iron is an essential mineral that belongs to the group of transition metals. It is found in numerous proteins, especially those associated with the transport of oxygen; hence its importance for the sustenance of multiple living organisms (Kim and Nemeth 2015).

Iron is an essential micronutrient for all ages but is critical for the growth and development of children. The Estimated Average Requirement (EAR) for children aged between 7 and 12 months is 6.9 mg/day for boys and 6.3 mg/day for girls. The EAR for boys and girls aged between 1–3 years and 4–8 years is 3 mg/day and 4.1 mg/day, respectively. Recommended Dietary Allowances (RDA) are 11 mg/day for boys and girls aged between 7 and 12 months, 7 mg/day for boys and girls aged between 1–3 years, and 10 mg/day for boys and girls aged between 4 and 8 years. Since overeating this mineral can cause adverse effects or bear some risk, the tolerable upper intake level (UL) has been established at 40 mg/day for children up to 13 years of age (Lönnerdal 2017).

The average iron content in the body is 4–5 g, and most of it is found in the pigment proteins of blood (hemoglobin) and muscle (myoglobin). Iron is also present in numerous enzymes such as catalase, peroxidase, and hydroxylase. Its main functions are the transportation of oxygen in red blood cells and cofactor in enzymatic reactions and the electron transport chain (Lamy, Durigova, and Jacot 2014).

Physiologically, anemia is a condition characterized by low levels of hemoglobin in the blood. It is also associated

with a deficient quality or quantity of red blood cells. Micronutrient deficiencies and anti-nutritional factors are among the nutritional causes leading to anemia. Bleeding, infections and genetic conditions are non-nutritional causes (Vieth and Lane 2017). Iron deficiency (ID) is considered the leading nutritional cause of anemia worldwide (Wong 2017). Anemia occurs when hemoglobin levels are below the established cutoff points (11 g/dL for children under 5 years of age and pregnant women; 12 g/dL for children aged 5–12 years, non-pregnant women and adolescent males, and 13 g/dL for adolescent females) and ferritin levels are below 12 µg/L (Cascio and DeLoughery 2017). The World Health Organization (WHO) defines a prevalence of anemia less than 5% not to be a public health problem, 5% to 19.9% as a mild public health problem, 20% to 39.9% as a moderate public health problem, and over 40% as a severe public health problem (WHO 2001). According to the latest official WHO data, the prevalence among risk groups was 42.6% for children (95% CI: 37–47, severe public health problem), corresponding to 273.2 million children, and 29.4% for all women of reproductive age (95% CI: 24.5–35.0, moderate public health problem), corresponding to 528.7 million individuals (WHO 2015).

Iron nutritional status can be determined by clinical evaluation, dietary intake, or laboratory tests. Laboratory tests focus on the storage status, transport, and functional iron compartments. However, the sensitivity and specificity of these tests is affected by inflammatory or infectious states (Urrechaga et al. 2012). In 2018, the Biomarkers of

Nutrition for Development (BOND) project published its fifth review focused on iron. The BOND Iron Expert Panel (I-EP) reviewed the data on iron biology, public health implications, and the currently available biomarkers of iron status (Raiten et al. 2011; Lynch et al. 2018).

This article reviews the classical and emergent indicators used to assess iron nutritional status in individuals and populations.

Inflammatory markers

Before discussing the parameters for the assessment of iron status, it is important to mention those related to states of inflammation and infection since, as follows, they strongly affect the interpretation of the results. Any inflammatory condition, chronic or acute, can interfere with iron transport in part through their effects on the regulation and synthesis of hepatic acute-phase proteins (APPs) such as hepcidin, ferritin, and transferrin, affecting the distribution of iron (Suchdev et al. 2016, 2017). Impaired absorption is another effect of inflammation. The latter can influence the intestinal absorptive area, epithelial cells, and barrier function through the release of inflammatory mediators and products from activated immune cells (Peuhkuri, Vapaatalo, and Korpela 2010). As a result, not only iron but also other micronutrients are conditioned by the inflammation status.

The most important APP inflammatory markers associated with iron status are interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), and alpha-1-acid glycoprotein (AGP) (Thurnham, Northrop-Clewes, and Knowles 2015). The reference value for IL-6 is less than 1.8 pg/mL and higher values are associated with inflammation. There is a strong relationship between IL-6 and iron status since IL-6 induces the synthesis of the master iron regulatory hormone hepcidin during inflammation and, consequently, the export of iron from the enterocyte (Nemeth et al. 2004; Nakagawa et al. 2014). The importance of IL-6 for iron status has been studied not only in anemia but also in other related diseases such as chronic kidney disease (CKD) (Akchurin et al. 2019), pediatric *Helicobacter pylori* gastritis (Emiralioglu et al. 2015), cardiovascular disease (CVD) (Hoppe et al. 2009), malaria (de Mast et al. 2009), and Parkinson's disease (Zhou et al. 2017). CRP has an average concentration of 0.001 g/L; however, during inflammation, it increases by 20 to 1000-fold within a maximum period of 48 hours. CRP is positively correlated with ferritin and negatively with hemoglobin (Urrechaga, Borque, and Escanero 2013; Brindle et al. 2014; Suchdev et al. 2017). The average concentration of AGP is 0.6–1.0 g/L, which can increase by 2–5-fold during inflammation within 4–5 days. This protein also shows a positive correlation with ferritin and a negative

correlation with hemoglobin. AGP exerts a more significant effect on the indicators of iron nutritional status (Thurnham et al. 2010; Suchdev et al. 2016) than the other APPs.

To avoid misclassification of iron status under inflammatory conditions, it is possible to calculate correction factors according to the concentrations of AGP and CRP (Thurnham et al. 2010; Brindle et al. 2014). The regression-correlation approach is a reliable tool to reduce inflammation-confounded estimations of ID in populations (Suchdev et al. 2017).

Classic parameters

Bone marrow iron and serum iron

Bone marrow iron is considered the gold standard for iron status assessment, establishing absence or depletion of iron deposits. The evaluation is made in marrow fragments by measuring the compound hemosiderin, an insoluble form of iron. The technique measures bone marrow iron content in potassium ferrocyanide (Prussian blue)-stained aspirate. Gale, Torrance, and Bothwell (1963) developed a histological grading system for bone marrow, correlating the concentration of iron stores in the marrow and marrow fragments, as shown in Table 1. Based on Gales's gradind system, Phiri et al. (2009) proposed an intensive grading method to classify human iron status, as shown in Table 2.

Despite its reliability, the assessment of human iron status in bone marrow smears is only used for research purposes since it is invasive and painful (van den Broek et al. 1998; Coad and Conlon 2011; Pfeiffer and Looker 2017).

Serum iron measures the amount of circulating iron that is bound to transferrin and serum ferritin. Serum iron itself does not provide information about the iron status and must always be analyzed in combination with other indicators, for example, transferrin to calculate transferrin saturation (TS) (de Lima and Grotto 2002; Coad and Conlon 2011). The serum iron reference range is 50 to 175 µg/dL (Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba, and Halwachs-Baumann 2015). When absorption and release from stores are insufficient to meet functional requirements, the serum iron level falls (von Drygalski and Adamson 2013).

Hematological parameters

Hemoglobin

Hemoglobin is a blood hemoprotein that is responsible for the transport of oxygen from the lungs to the tissues. The protein contains a heme group in its structure and is the main indicator of anemia.

The WHO has established cutoff points of hemoglobin to determine the presence of anemia at sea level: < 11 g/dL for

Table 1. Gale's method of bone marrow iron grading (Gale, Torrance, and Bothwell 1963).

Grade 0	None	No visible iron under high power magnification ($\times 1000$)
Grade 1	Very slight	Small iron particles just visible in few reticulum cells under high power magnification ($\times 1000$)
Grade 2	Slight	Small sparsely distributed iron particles just visible under low power magnification ($\times 100$)
Grade 3	Moderate	Numerous small iron particles present in reticulum cells throughout the marrow fragment ($\times 100$)
Grade 4	Moderate heavy	Larger iron particles throughout the fragment with tendency to aggregate into clumps ($\times 100$)
Grade 5	Heavy	Dense large clumps of iron throughout the fragment ($\times 100$)
Grade 6	Very heavy	Very large deposits of iron, both intra- and extracellular, obscuring cellular details in the fragment ($\times 100$)

Table 2. Classification of iron status using the intensive grading method (Phiri et al. 2009).

Iron detected in			Iron status category
Fragment ¹	Macrophage ²	Erythroblast ³	
Present	Present	Present	Normal
Present	Absent	Present	Functional iron deficiency
Present	Present	Absent	
Present	Absent	Absent	Iron stores deficiency
Absent	Present	Present	
Absent	Absent	Present	Functional and iron stores deficiency
Absent	Present	Absent	
Absent	Absent	Absent	

¹Positive fragment iron: fragment grade ≥ 2 .

²Positive macrophage iron: iron present in reticular cells.

³Positive erythroblast iron: iron present in 30% of erythroblasts

children between 6 months and 5 years old and pregnant women; < 11.5 g/dL for children aged 5 to 11 years; < 12 g/dL for children aged 12 to 14 years and women of child-bearing age; < 13 g/dL for adult men. Hemoglobin is affected by altitude and smoking. Therefore, the WHO has established correction factors for hemoglobin according to these variables, as shown in Tables 3 and 4 (WHO 2011a).

Other hematological parameters

In addition to hemoglobin, the determination of erythrocyte count, reticulocyte count, reticulocyte hemoglobin content (CHr), mean cell volume (MCV), and red blood cell distribution width (RDW) is essential to accurately evaluate nutritional iron status (Mullier et al. 2011). Malczewska-Lenczowska et al. (2017) showed that, in subjects with latent ID (ferritin < 20 ng/mL), the most significant changes were associated with reticulocyte count.

CHr is a good indicator of ID in individuals with inflammation. The CHr reference values range from 28 to 35 pg and lower concentrations are considered to indicate functional ID, a state in which there is insufficient iron incorporation into erythroid precursors in the presence of apparently adequate body iron stores (Hashemi et al. 2017). Vázquez-López et al. (2016) studied a group of 902 healthy children between 1 and 11 years old from Almería (Spain) and found CHr levels of 30.9 ± 1.8 pg (95%CI 30.8–31.1), consistent with the current reference values. Another study conducted on the Dutch population showed that CHr is a useful parameter for iron status assessment when used in conjunction with conventional parameters such as hemoglobin and ferritin (Baart et al. 2018). Regarding some diseases like CKD (Nalado et al. 2018), inflammatory bowel disease (Syed et al. 2017), and vitamin B12 deficiency (Balci et al. 2016), more studies are needed to validate the use of reticulocyte parameters as indicators of anemia.

MCV is used to classify anemia as normocytic (MCV 80–100 fL), macrocytic (MCV > 100 fL), and microcytic (MCV < 80 fL) (Urrechaga, Borque, and Escanero 2013; Buttarello 2016). In combination with RDW, MCV can also classify anemia as homogeneous (normal RDW) and heterogeneous (increased RDW) (Aslan et al. 2002; Aulakh et al. 2009; Buttarello 2016; Carlos et al. 2018). RDW is commonly reported as a coefficient of variation (RDW-CV), with a mean of 12.8% (SD: 0.9%) in healthy subjects and

Table 3. Altitude adjustments of hemoglobin concentrations (WHO 2011a).

Altitude (meters above sea level)	Adjusted hemoglobin (g/L)
$< 1,000$	0
1,000	-2
1,500	-5
2,000	-8
2,500	-13
3,000	-19
3,500	-27
4,000	-35
4,500	-45

Table 4. Hemoglobin adjustments for smokers (WHO. 2011a).

Smoking status	Adjusted hemoglobin (g/L)
Non-smoker	0
Smoker (all)	-0.3
$\frac{1}{2}$ – 1 pack/day	-0.3
1–2 packs/day	-0.5
≥ 2 packs/day	-0.7

14.7% (SD: 2.0%) in patients with CKD (Scherer et al. 2015). In places where serum ferritin test is not available, RDW as a tool for the diagnosis of iron deficiency anemia has demonstrated be more sensitive than other blood indices and peripheral smear examination (Sultana et al. 2011; Naidu et al. 2014)

In the review by Salvagno et al. (2015), RDW was used not only as an indicator of iron status but also as an indicator of numerous clinical conditions such as CVD) venous thromboembolism, cancer, diabetes, kidney disease, liver disease, chronic obstructive pulmonary disease, community-acquired pneumonia, migraine and inflammatory bowel disease. However, the authors emphasized the necessity to consider other parameters for assessment of those diseases.

Ferritin

Ferritin is a protein that reflects iron stores in the cell. Apoferritin (iron-free form) is composed of 24 subunits with an approximate molecular weight of 20 kDa, which assemble into a hollow structure of about 500 kDa. The inner part can store up to 4,500 iron atoms (Fuqua, Vulpe, and Anderson 2012).

The expression of ferritin is regulated directly by the iron status of the subject (Coad and Conlon 2011) because of the necessity of an immediate response of the cell to store any excess iron, which has oxidizing activity. Likewise, a decrease in iron concentrations minimizes the expression of the protein. Under conditions of iron excess, some ferritin molecules can degrade into another smaller form of iron storage, known as hemosiderin, which is found in liver tissue, spleen, and bone marrow (Brissot et al. 2012).

Ferritin is one of the most used iron parameters since it is not affected by altitude or smoking. According to the WHO, iron stores less than $12 \mu\text{g/L}$ in children under 5 years of age and less than $15 \mu\text{g/L}$ in children older than 5 years are defined as ID (WHO 2011b). Ferritin is an APP and is therefore affected by inflammatory and infectious

states. In these cases, the WHO has established a higher cut-off of 30 µg/L for children under 5 years of age as an indicator of ID (Brindle et al. 2014). Due to its role as an APP, ferritin loses strength as an indicator of ID. In the study carried out by Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba, and Halwachs-Baumann (2015) involving 455 subjects, different iron status indicators were compared. Ferritin levels < 30 µg/L classified 105 patients (23.6%) with ID, whereas the Thomas-Plot indicator (discussed below) classified 153 patients (34.38%) with ID.

It is important to note that elevated ferritin levels are not always linked to iron overload. Hyperferritinemia, besides inflammation and infection, is related to critical conditions such as liver disease, renal failure, metabolic syndrome, acute myocardial infarction, and thyrotoxicosis (Koperdanova and Cullis 2015).

To control for the effect of inflammation and to correctly classify a subject, the Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) Project proposes different methods to measure ferritin in the presence of inflammation, always taking into account the concentrations of CRP and AGP (Namaste et al. 2017). The most striking method consists of stratification of the subjects into four groups to define internal correction factors (ICF). A first group called “without inflammation” or reference includes subjects with CRP ≤ 5 µg/dL and AGP ≤ 1 g/L. The second group, “incubation period”, considers CRP > 5 µg/dL and AGP ≤ 1 g/L. The third group, “early convalescence”, includes subjects with CRP ≤ 5 µg/dL and AGP > 1 g/L. The fourth group, “late convalescence”, includes subjects with CRP ≤ 5 µg/dL and AGP > 1 (Thurnham, Northrop-Clewes, and Knowles 2015). The ICF of each group with inflammation is generated by dividing the corresponding ferritin geometric mean by the geometric mean of the group without inflammation. Each ferritin concentration of the groups with inflammation is then multiplied by the corresponding ICF and is compared to reference values to classify the subject (Suchdev et al. 2016).

Transferrin

Transferrin is the specific serum iron transport protein, a glycoprotein synthesized mainly in the liver. There are other kinds of transferrin in the human body, including lactoferrin, and melanotransferrin. Transferrin is a simple polypeptide chain of approximately 80 kDa that binds two ferric iron atoms. It can be found in its iron-free form (apo-transferrin) or in the monoferric or diferric form (holo-transferrin) (Brissot et al. 2012). Lactoferrin is present mainly in colostrum, milk and other biological fluids such as tears, saliva, vaginal secretion, seminal fluid, plasma, and joint fluid (Rosa et al. 2017). The main functions of lactoferrin are the regulation of intestinal iron homeostasis and host protection against microbial infection (Ward and Conneely 2004). Some applications of lactoferrin are related to its use as an iron carrier in nutritional supplements (Paesano et al. 2009). Melanotransferrin is more associated with tumoral processes and different studies have shown that it is not essential for iron metabolism (Baker et al.

1992; Sekyere and Richardson 2000; Sekyere et al. 2006; Lambert 2012).

Transferrin is important as a marker of ID since its concentrations increase proportionally to the iron requirements (Podmore et al. 2016). However, it is a negative APP and its levels decrease during inflammation, affecting its reliability as an indicator of iron status. The reference range is 200–400 mg/dL (Guerra et al. 2009).

Transferrin saturation

Transferrin saturation (TS) is an indicator of functional iron for erythropoiesis (Urrechaga, Borque, and Escanero 2013) and is calculated by the following equation:

$$\% TS = \frac{\text{serum iron} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{dL}} \right) \times 70,9}{\text{transferrin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)}$$

A cutoff point < 20% has been established as an indicator of ID (Urrechaga et al. 2012; Thomas et al. 2013). However, based on the reference values of serum iron (50–175 µg/dL) and transferrin (200–360 mg/dL), a reference range of TS of 18–35% might be established and a more comprehensive range of 20–50% should be considered as a reference for healthy adults (Gropper and Smith 2013).

In the study of Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba, and Halwachs-Baumann (2015), this indicator was able to classify correctly 215 out of 445 patients (48.31%). However, it is not expected to be reliable in inflammatory states since its denominator contains transferrin, an APP. High levels of non-transferrin bound iron and high %TS have been described to be associated with iron overload (Coad and Conlon 2011) and possible oxidative damage (Brissot et al. 2012).

Soluble transferrin receptor

The transferrin receptors (TfR) are directly involved in the acquisition of iron from the circulation. Two types of TfR have been identified: TfR1 is present in almost all proliferative cells and mediates the uptake of iron for the cell cycle, while TfR2 is mainly expressed in the liver (Marijn M Speeckaert, Speeckaert, and Delanghe 2010). For iron acquisition, TfR bind transferrin in the monoferric or diferric form, the complex is endocytosed, and iron is released into the cytoplasm to be utilized by the cell. Another form of the receptor found in plasma is soluble or serum transferrin receptor (sTfR). It is a cleaved form of the tissue receptor that is present as a transferrin-receptor complex (Punnonen, Irjala, and Rajamäki 1997).

The use of sTfR as an indicator of iron status has gained relevance because it shows the functional iron status and erythropoietin activity (Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba, and Halwachs-Baumann 2015). Increased concentrations indicate early ID and the onset of store emptying (Suchdev et al. 2016). sTfR is not affected by inflammation or is less affected by high exposure to it than ferritin (Northrop-Clewes and Thurnham 2013; Rohner et al. 2017). Only in specific cases of high infection or inflammation

CHR (pg) 0.28 pg	1 Normal iron status	2 Latent ID
	4 Functional ID combined with ACD	3 Storage ID
0.8 (CRP > 0.5 mg/dL) 1.50 (CRP ≤ 0.5 mg/dL)		
Ferritin Index		

Figure 1. Thomas plot (Thomas and Thomas 2002; Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba, and Halwachs-Baumann 2015). CHR, reticulocyte hemoglobin content; ACD, anemia of chronic disease; CRP, C-reactive protein; ID, iron deficiency.

must some adjustments be made for the correct interpretation of sTfR (Righetti et al. 2013; Thurnham, Northrop-Clewes, and Knowles 2015; Turgeon O'Brien et al. 2016).

Despite the small number of studies that established reference and cutoff points for sTfR, a reference range can be set at 0.76–1.76 mg/L for the healthy population (Büyükkaragöz et al. 2017). Vázquez-López et al. (2016) established a mean value of 1.22 ± 0.28 mg/L (95%CI 1.2–1.23) for healthy children. However, measurement techniques of sTfR have not been standardized and its values will always depend on the method applied (Uijterschout et al. 2014). In addition, sTfR lacks specificity to determine ID since its levels increase in the presence of symptoms of hemolytic and sickle-cell anemia (Drakesmith 2016).

Ferritin index

The ferritin index is a mathematical indicator proposed by Punnonen, Irjala, and Rajamäki (1997) that provides information about functional iron and its stores. It also covers the full range of iron status from normality to ID. The ferritin index is calculated by dividing the value of sTfR by the decimal logarithm of ferritin: ferritin index = sTfR/log ferritin.

This index is a good marker that shows high sensitivity and specificity, but its utility is affected by the lack of a standardized method for the determination of sTfR (Drakesmith 2016). Few studies have established reference values and cutoff points. Since the concentration of ferritin is affected by inflammation, Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba, and Halwachs-Baumann (2015) proposed the following cutoff points: 0.8 (CRP > 0.5 mg/dL) and 1.5 (CRP ≤ 0.5 mg/dL). Vázquez-López et al. (2016) proposed 0.87 ± 0.25 (95% CI 0.85–0.88) as a cutoff point.

Zinc protoporphyrin

In ID, protoporphyrin is bound to zinc during the synthesis of the heme group. Zinc protoporphyrin (ZPP) is considered a sensitive indicator of iron status (Chung et al. 2012). However, it is generally used in conjunction with other biomarkers such

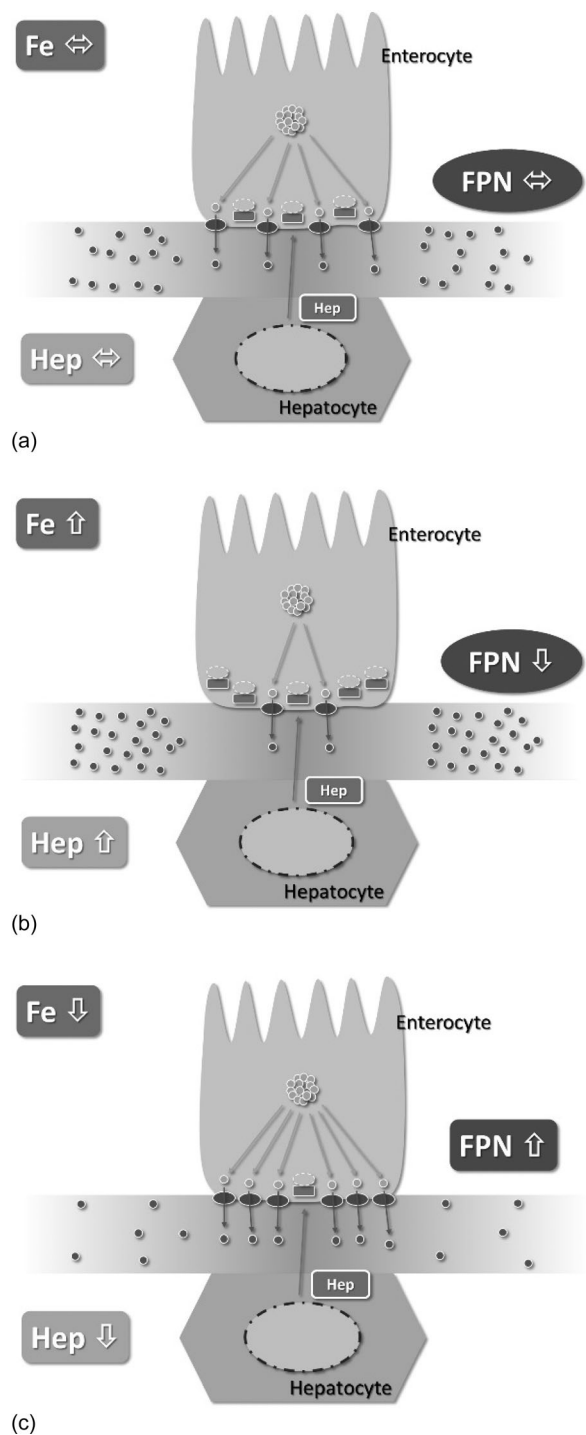


Figure 2. Schematic representation of the regulation of iron efflux by hepcidin. (A) Normal iron status. (B) Iron overload. (C) Iron deficiency. Fe, iron; FPN, ferroportin; Hep, hepcidin.

as reticulocyte count or hematocrit (Syed et al. 2017). It has been established that amounts higher than 80 $\mu\text{g}/\text{dL}$ indicate ID. However, ZPP can be affected by lead intoxication, inflammation, or thalassemia (Coad and Conlon 2011).

The zinc protoporphyrin-to-heme ratio (ZPP/H) has been used in studies involving children and adults. ZPP/H measures zinc relative to iron incorporation into protoporphyrin IX in red blood cells. When iron is insufficient, the proportion of incorporated zinc increases, with a consequent increase in ZnPP/H (Mwangi et al. 2014).

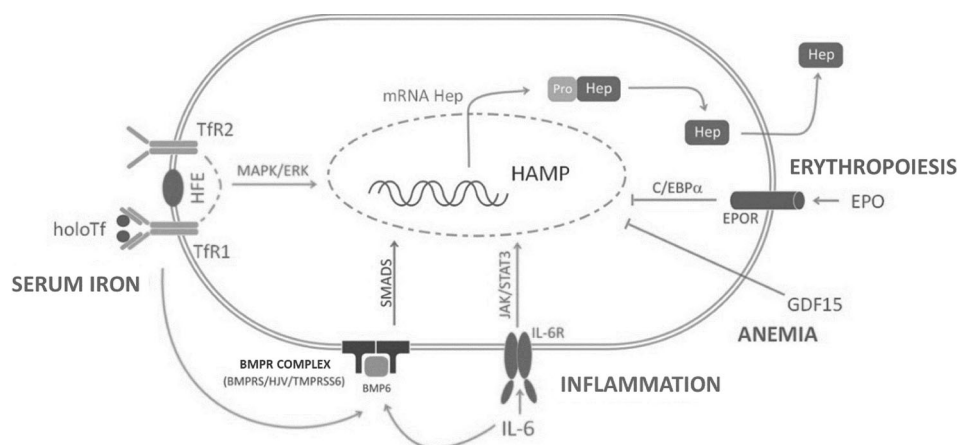


Figure 3. Regulation of the expression of hepcidin. Hep, hepcidin; IL-6, interleukin 6; IL-6R, interleukin 6 receptor; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; JAK, Janus kinase; BMPR, bone morphogenetic protein; BMP6, bone morphogenetic protein 6 receptor; SMADS, transducers and transcription modulators similar to the *Drosophila* gene mothers against decapentaplegic (MAD); C/EBP α , CCAATT-enhancer protein binding alpha; GDF15, growth differentiation factor 15; EPO, erythropoietin; EPOR, erythropoietin receptor; TfR, transferrin receptor; MAPK/ERK, MAP kinase/extracellular regulated kinase; HJV, hemojuvelin; HAMP, hepcidin antimicrobial peptide.

Thomas plot

The Thomas plot is a model suggested by Christian Thomas and Lothar Thomas (2002), which combines hematological and biochemical markers and specifically creates a relational matrix between CHr and the ferritin index. The ferritin index is plotted on the x-axis and CHr values are plotted on the y-axis. Cutoff points are set at 28 pg for CHr and at 0.8 (CRP > 0.5 mg/dL) and 1.5 (CRP \leq 0.5 mg/dL) for the ferritin index. Quadrants are defined to determine the iron status, as shown in Figure 1.

Emergent parameters

Hepcidin

At the systemic level and in healthy individuals, iron metabolism is mainly regulated by hepcidin. This hormone was discovered in 2000 and initially identified as an antimicrobial peptide (hence its name: *hep* = liver, *cidin* = with microbial activity). Hepcidin is produced in the liver, but there is evidence of its expression in macrophages, kidneys, pancreatic beta-cells, and fat tissues. However, its role in these tissues is not directly related to iron but to its antimicrobial function (Kemna et al. 2008).

Hepcidin is encoded by the hepcidin antimicrobial peptide (HAMP) gene, which is located on the long arm of chromosome 19. It is initially translated as pre-pro-hepcidin (84 aa), enzymatically cleaved into pro-hepcidin (64 aa), and exported from the cytoplasm to the endoplasmic reticulum where it is transformed into its mature form (25 aa) (Petraik and Vyoral 2005; Viatte and Vaulont 2009; B. Singh et al. 2011).

Hepcidin is considered the master hormone of iron regulation. The general mechanism consists of binding to ferroportin (FPN) and inducing its internalization and lysosomal degradation. Thus, in the presence of iron overload, hepcidin expression increases and reduces iron efflux from enterocytes (Figure 2). Oppositely, in the presence of ID, hepcidin expression decreases and iron efflux into the circulation increases because of the absence of FPN internalization (Ganz 2008;

Tussing-Humphreys et al. 2012; Przybyszewska and Żekanowska 2014). This mechanism does not only occur in the enterocyte but has also been found in other tissues such as cardiac tissue (Ge et al. 2009).

In view of the importance of hepcidin as a regulator of iron homeostasis, it is necessary to know more about its transcription regulatory pathways not only under normal health conditions but in specific situations such as inflammation and anemia. These mechanisms are illustrated in Figure 3. Plasma iron concentration is the master regulator of hepcidin production under normal conditions. Nevertheless, hepcidin has to be used in combination with other parameters in the presence of inflammation and anemia. TfR1 and TfR2 sense iron availability according to circulating concentrations of transferrin and regulate hepcidin synthesis through the mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase (MAPK/ERK) pathway (Ganz and Nemeth 2015).

During inflammation, there is strong regulation of hepcidin by factors associated with IL-6 that increase its transcription, especially in anemia of chronic disease. That regulation probably occurs due to the antimicrobial activity of hepcidin. The mechanism used by IL-6 to regulate hepcidin involves the transducers and transcription modulators similar to the *Drosophila* gene mothers against decapentaplegic – MAD (SMADs) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK/STAT3) pathways. The SMAD pathway is activated by the bone morphogenetic protein receptor (BMPR) complex, which phosphorylates proteins SMAD4 and receptor-regulated SMAD (R-SMAD). The complex enters the nucleus and stimulates the transcription of HAMP. In another pathway, IL-6 binds to interleukin receptors (IL-Rs) and signals through JAK-induced phosphorylation of STAT3 and the binding of phosphorylated STAT3 to cognate motifs in the HAMP promoter (da Cunha et al. 2014; Ganz and Nemeth 2015)

Erythropoiesis and anemia require high concentrations of circulating iron. It is therefore expected that both situations negatively regulate hepcidin expression. Erythropoietin acts as a negative regulator through the C/EBP α transcription

Table 5. Indicators for human iron status assessment.

Indicator	Reference values	What does it measure?	Pros	Cons	Influenced by inflammation?	References
Bone marrow iron	Not visible or small iron particles just visible in few reticulum cells under high power magnification ($\times 1000$)	Hemosiderin	Measures iron stores and has good correlation with other indicators	The sampling is invasive and painful	No	(Gale, Torrance, and Bothwell 1963; Phiri et al. 2009; Bableswhar et al. 2013; Bârsan et al. 2015; Anupama et al. 2017)
Serum iron	50 – 175 $\mu\text{g}/\text{dL}$	Amount of circulating iron that is bound to transferrin and serum ferritin	Simple to measure	It does not give information about the iron status, must be analyzed together with other indicators. Affected by some medications like birth control pills, not relevant in clinical practice. Low in chronic disease.	No	(Grotto 2010; Coad and Conlon 2011; D. Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba, and Halwachs-Baumann 2015; von Drygalski and Adamson 2013; Åsberg et al. 2014; Zhang et al. 2014)
Hemoglobin (Hb)	Men: 13.5 – 17.5 g/dL Women: 12.0 – 15.5 g/dL	Concentration of hemoglobin	Simple to measure	Need some adjustments by altitude, smoking, pregnancy, age, sex.	No	(Ziaei, Mehrnia, and Faghihzadeh 2008; Stevens et al. 2013; WHO. 2011a)
Reticulocyte hemoglobin content (CHr)	28–35 pg	Iron incorporation into erythroid precursors	High sensitivity and specificity	Expensive laboratory devices to be reliable	No	(Syed et al. 2017; Mullier et al. 2011; Baart et al. 2018; Hashemi et al. 2017; Nalado et al. 2018)
Mean cell volume (MCV)	80 – 100 fL	Average size of red blood cells	Allows to classify anemia as macrocytic (MCV > 100 fL) or microcytic (MCV < 80 fL)	Expensive laboratory devices to be reliable. Low in thalassemia and inflammation.	Yes	(Urrechaga, Borque, and Escanero 2010; Buttarello 2016; Balci et al. 2016; Carlos et al. 2018)
Red cell distribution width (RDW)	11.5–14.5%	Amount of red blood cell variation in volume and size	Allows to classify anemia as homogeneous (normal RDW) and heterogeneous (increased RDW) when combined with MCV. Indicator of numerous clinical conditions	Expensive laboratory devices to be reliable. Low in thalassemia and inflammation.	Yes	(Aslan et al. 2002; Aulakh et al. 2009; Sultana et al. 2011; Naidu et al. 2014)
Ferritin (Fn)	Men: 24–336 $\mu\text{g}/\text{L}$ Women: 11–307 $\mu\text{g}/\text{L}$	Size of iron stores	Reflects iron status	It is an acute-phase protein (APP)	Yes	(Åsberg et al. 2014; Pfeiffer and Looker 2017; Namaste et al. 2017; Thurnham et al. 2010; Kell and Pretorius 2014)
Transferrin (Tf)	200–400 mg/dL	Transferrin concentration and Total Iron Binding Capacity (TIBC)	Good indicator of ID since its concentrations increase proportionally to the iron requirements	It is an APP	Yes	(Brissot et al. 2012; Podmore et al. 2016; Guerra et al. 2009; de Lima and Grotto 2002)
Transferrin saturation (TSAT)	20–50%	Ratio of the serum iron	Useful for the detection of	It varies diurnally and after meals.	Yes	(Gropper and Smith 2013; Urrechaga,

(continued)

Table 5. Continued.

Indicator	Reference values	What does it measure?	Pros	Cons	Influenced by inflammation?	References
		concentration and the TIBC expressed as a percentage	hereditary hemochromatosis	As it depends on the transferrin value, it is also affected by inflammation		Boruçe, and Escanero 2013; Pfeiffer and Looker 2017; Martin-Cabrera et al. 2015)
Soluble transferrin receptor (sTfR)	0.76–1.76 mg/L	Amount of soluble transferrin receptors	It shows the functional iron status and erythropoietin activity. Not affected by inflammation.	Affected by the rate of erythropoiesis	No	(de Lima and Grotto 2002; Infusino et al. 2012; Uijterschout et al. 2014; Büyükkaragöz et al. 2017; Speeckaert, Speeckaert, and Delanghe 2010; Rohner et al. 2017)
Ferritin index (sTfR/Log Ferritin Index)	0.62–1.12	Provides information about functional iron and its stores	It shows high sensitivity and specificity	As ferritin, it is an APP and affected by inflammation	Yes	(Punnonen, Irjala, and Rajamäki 1997; Drakesmith 2016; Enko et al. 2015; Vázquez-López et al. 2016; Infusino et al. 2012)
Zinc Protoporphyrin (ZPP)	<35 mcg/dL	Impact of lead on RBC synthesis	Low cost, but point-of-care testing and simplicity	Affected by inflammation. Increased during exposure to lead.	Yes	(Chung et al. 2012; Syed et al. 2017; Mwangi et al. 2014)
Hepcidin (Hep)	6.7–10.4 ng/mL	Regulation of iron efflux from the enterocyte	More informative than the traditional markers of iron status	Affected by inflammation. Influenced by vitamin A deficiency.	Yes	(Zipperer et al. 2013; Arruda, de Almeida Siqueira, and de Valência 2009; Koliarakis et al. 2009; Delaby et al. 2014)
Erythroferrone (EFE)	Not established in humans	It describes the erythropoietic response to recombinant erythropoietin	The erythroferrone/hepcidin ratio might be used to describe the request of iron from the bone marrow	Lack of studies in humans	No	(Kautz et al. 2014; Kim and Nemeth 2015; Camaschella et al. 2016; Lawen 2015; Ganz 2019)
Low hemoglobin density (LHD)	5.5%	It is a sigmoid transformation of the MCHC value	It improves the resolution of the results, especially in blood samples with very low MCHC levels	Requires further improvement	No	(Urrechaga et al. 2012; Dopsaj et al. 2012; Aulakh et al. 2009; Singh et al. 2018)

factor in erythropoiesis and the transcription growth/differentiation factor 15 (GDF15) in anemia (Porto, Oliveira, and Pinto 2012; Uijterschout et al. 2014).

Hepcidin is affected by inflammation (Coad and Conlon 2011). Rubab et al. (2015) confirmed this association in a study involving renal patients on hemodialysis. The authors found a positive correlation between hepcidin and CRP ($r_{\text{Pearson}} = 0.304$, $p < 0.05$). In that study, a reference range of 8.1 ± 2.3 ng/mL for hepcidin was determined in a control group of 42 subjects aged 18 and 60 years, homogeneous in terms of gender (Rubab et al. 2015). In a similar group, Ford et al. (2010) found that hepcidin is not an adequate parameter for iron status in patients on hemodialysis due to

its intra-individual variability. Additionally, the samples must be taken in the morning since the results are more consistent than those obtained with samples taken in the evening or at night due to the diurnal variation of serum iron (Ganz et al. 2008). Hepcidin can also be measured in serum or urine by immunoassays or mass spectrometry. Nevertheless, the main deficiency relies on the standardization of the methods, differences between the assays (Pfeiffer and Looker 2017), and the absence of therapeutic reference ranges (Ambroszkiewicz et al. 2017).

Although there is sufficient evidence to support the reliability of hepcidin as a marker of human iron status, the work of Enko, Wagner, Kriegshäuser, Kimbacher, Stolba,

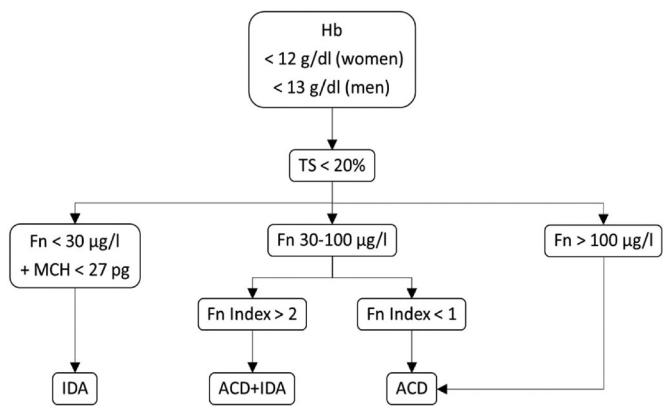


Figure 4. Algorithm for the diagnosis of iron deficiency suggested by Muñoz, Villar, and García-Erce (2009). Hb, hemoglobin; TS, transferrin saturation; Fn, ferritin; MCH, mean corpuscular hemoglobin; IDA, iron deficiency anemia; ACD, anemia of chronic disease.

and Halwachs-Baumann (2015) showed that ferritin index and sTfR are better predictors of functional ID in patients with and without acute-phase reactions.

Erythroferrone

Erythroferrone (ERFE) is a protein discovered in 2014, which has been proposed to be the erythroid regulator of iron metabolism. It is produced by erythroblasts in response to erythropoietin. Once secreted, ERFE blocks hepcidin expression, inducing the release of iron from the hepatocyte or enterocyte (Kautz et al. 2014; Kim and Nemeth 2015; Camaschella et al. 2016). In some pathologies like intermediate thalassemia, it has been found that iron overloads correspond to high levels of ERFE. The use of ERFE as a parameter for human iron status assessment has not yet been accepted. Its discovery is too recent, its effect in humans has not been confirmed, and it is necessary to standardize a method for its determination. ERFE could be an essential indicator of iron status, describing the erythropoietic response to recombinant erythropoietin in renal pathologies. In addition, the ERFE/hepcidin ratio might be used to describe the demand of iron from the bone marrow in other disorders such as thalassemia or inflammation (Lawen 2015; Drakesmith 2016; Honda et al. 2016).

Low hemoglobin density

Low hemoglobin density (LHD) is a parameter proposed by Beckman Coulter, which uses MCHC in its formula:

$$\%LHD = 100 \sqrt{1 - \left(\frac{1}{1 + e^{1.8(30 - MCHC)}} \right)}$$

It is simply a sigmoid transformation of the MCHC value and is useful to improve the resolution of the results, especially in blood samples with very low MCHC levels. LHD has been validated in a multicenter study in which a cutoff point of 5.5% was established with 88.6% sensitivity and 76.9% specificity (Urrechaga 2010).

LHD could be used for ID assessment in cases of both cyanotic and acyanotic congenital heart disease as demonstrated by Dopsaj et al. (2012). LHD has been validated as an indicator of ID when it is combined with the microcytic anemia factor (MAf) as a low-cost tool (Aulakh et al. 2009). This parameter has also been used in combination with other markers such as TS and bone marrow morphology for the identification of treatable anemia presenting for cardiac surgery (Martin-Cabrera et al. 2015). There is not sufficient evidence of its validity in other conditions like pregnancy (Crispin, Sinclair, and Andriolo 2016). The inconsistency in the different studies allows us to conclude that further studies are necessary to establish its use as a screening parameter for iron status assessment (Singh et al. 2018). However, LHD could be useful to confirm ID when other indicators are not reliable, especially in inflammation or non-iron deficiency, and in cases in which it is necessary to differentiate between functional and absolute ID in children (Yildirim, Kaya, and Bakkaloglu 2019).

Conclusion

Human iron status assessment is essential both in healthy people and in people with morbidity. Numerous indicators have been used for a long time, and as summarized in Table 5, it is not possible to select a single indicator for a reliable, cost-effective, and easy diagnosis of iron status in humans.

Based on the information collected from the different publications, the most accurate procedure is the combination of various indicators to avoid the influence of conditions such as inflammation, pregnancy, age, sex, and infection. In this respect, the application of algorithms that combine different indicators, such as that proposed by Muñoz, Villar, and García-Erce (2009), might be useful (Figure 4). The adequate combination of various parameters can improve the diagnosis of ID and distinguish it from anemia of chronic disease.

As a general recommendation in the daily practice of those involved in human iron status assessment, a procedure from the basic to the more specific indicators is proposed. In a preliminary stage, indicators for a rapid screening as hemoglobin and ferritin could be used, both of them are easy and low-cost and allow a quick classification of the presence or absence of anemia. As a second step, it is necessary to conduct an assessment of the inflammatory status of the subject. If there is inflammation, then reticulocyte hemoglobin content (CHr) and soluble transferrin receptor (sTfR) are the best indicators or, an adjustment procedure must be conducted to give an appropriate interpretation of the ferritin values. To go more in-depth on the classification of the type of anemia, when confirmed, additional hematological tests like CHr, MCV, RDW must be conducted. The combined use of CHr and ferritin index (with the corresponding adjustments for inflammation) in tools like Thomas Plot gives a reliable approach to the iron status and better information to choose the right treatment to improve it, together with the emerging indicators hepcidin and erythroferrone, which have represented important advances in the

pathophysiology of iron deficiency (Nielsen, Coskun, and Weiss 2016; Serati and Torella 2019).

The following step, after assessment of the iron nutritional status if any deficiency is diagnosed and classified, is the choice of treatment. Dietary interventions have been widely used when the patient's condition is not critical (Ribeiro Silva Neto et al. 2019; Sun et al. 2018; Hoppe et al. 2013). In critical conditions, iron replacement therapy (IRT) has been practiced since the seventeenth century (Girelli et al. 2018), and represents, besides dietary interventions, the most indicated treatment for patients diagnosed with iron deficiency, with or without anemia (Girelli et al. 2018). The choice of the right IRT, oral or intravenous (IV), and the best chemical form of iron to be used will depend on the cause of iron deficiency and the physiological conditions of the patient (Baird-Gunning and Bromley 2016; Auerbach 2018). Oral iron administration is a commonly used and cost-effective option to treat iron-deficiency anemia, but the bioavailability of iron is relatively low. It is less effective than IV iron in patients with an additional condition like cancer, inflammatory bowel disease (IBD), Chron's Disease (CD) or cardiac surgery and is not suitable for many patients for its gastrointestinal side-effects which comprise nausea, abdominal discomfort, constipation, diarrhea and dyspepsia (Nielsen, Coskun, and Weiss 2016).

The constant validation of the current indicators, the development of standardized measurement methods, and the new knowledge about emerging parameters will improve iron nutritional assessment according to each health condition and the right choice or treatment for improve the iron status. Finally, it is relevant to emphasize that both classical and emergent indicators must be under constant evaluation to obtain more reliable results.

Author contributions

M.R.G. interpreted and analyzed the data and wrote the manuscript. P.H.C. and L.D.B. interpreted the data and critically revised the article. All authors have read and approved the final version of the document.

Declaration of interest

The authors declare no known conflicts of interest associated with this publication.

Funding

Mauricio Restrepo-Gallego (M.R.G.) thanks the Colombian Ministry of Science, Technology, and Innovation (Minciencias) for its support through a national doctoral fellowship (grant 567 2012).

ORCID

Mauricio Restrepo-Gallego  <http://orcid.org/0000-0002-8631-3547>
Luis E. Díaz  <http://orcid.org/0000-0002-9588-9935>
Patricia H.C Rondó  <http://orcid.org/0000-0002-8308-6393>

References

- Hashemi, S. M., M. A. Mashhadi, M. Mohammadi, M. Ebrahimi, and A. Allahyari. 2017. Absolute and functional iron deficiency anemia among different tumors in cancer patients in south part of Iran, 2014. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 11 (3):192–8.
- Stevens, G. A., M. M. Finucane, L. M. De-Regil, C. J. Paciorek, S. R. Flaxman, F. Branca, J. P. Peña-Rosas, Z. A. Bhutta, and M. Ezzati. 2013. Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995–2011: A systematic analysis of population-representative data. *The Lancet. Global Health* 1 (1):e16. doi: [10.1016/S2214-109X\(13\)70001-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70001-9).
- Vázquez-López, M. A., E. López-Ruzafa, F. Lendinez-Molinos, M. Ortiz-Pérez, L. Ruiz-Tudela, and M. Martín-González. 2016. Reference values of serum transferrin receptor (STfR) and STfR/Log ferritin index in healthy children. *Pediatric Hematology and Oncology* 33 (2):109–20. doi: [10.3109/08880018.2015.1138007](https://doi.org/10.3109/08880018.2015.1138007).
- Akchurin, O., E. Patino, V. Dalal, K. Meza, D. Bhatia, S. Brovender, Y.-S. Zhu, S. Cunningham-Rundles, E. Perelstein, J. Kumar, et al. 2019. Interleukin-6 contributes to the development of anemia in juvenile CKD. *Kidney International Reports* 4 (3):470–83. doi: [10.1016/j.ekir.2018.12.006](https://doi.org/10.1016/j.ekir.2018.12.006).
- Ambroszkiewicz, J., W. Klemarczyk, J. Mazur, J. Gajewska, G. Rowicka, M. Strucińska, and M. Chelchowska. 2017. Serum hepcidin and soluble transferrin receptor in the assessment of iron metabolism in children on a vegetarian diet. *Biological Trace Element Research* 180 (2):182–90. doi: [10.1007/s12011-017-1003-5](https://doi.org/10.1007/s12011-017-1003-5).
- Anupama, K. V., S. R. Purnima, S. Adappa, P. Balanthimogru, and C. Mahabala. 2017. Correlation between serum ferritin and bone marrow iron stores. *Tropical Doctor* 47 (3):217–21. doi: [10.1177/0049475516678478](https://doi.org/10.1177/0049475516678478).
- Arruda, S. F., E. M. de Almeida Siqueira, and F. F. de Valência. 2009. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 25 (4): 472–8. doi: [10.1016/j.nut.2008.11.030](https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.11.030).
- Åsberg, A. E., G. Mikkelsen, M. W. Aune, and A. Åsberg. 2014. Empty iron stores in children and young adults—the diagnostic accuracy of MCV, MCH, and MCHC. *International Journal of Laboratory Hematology* 36 (1):98–104. doi: [10.1111/ijlh.12132](https://doi.org/10.1111/ijlh.12132).
- Aslan, D., F. Gümrük, A. Gürgey, and Ç. Altay. 2002. Importance of RDW value in differential diagnosis of hypochrome anemias. *American Journal of Hematology* 69 (1):31–3. doi: [10.1002/ajh.10011](https://doi.org/10.1002/ajh.10011).
- Auerbach, M. 2018. New paradigms and therapies for iron replacement in iron deficiency anemia. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O* 16 (11):712–5.
- Aulakh, R., I. Sohi, T. Singh, and N. Kakkar. 2009. Red cell distribution width (RDW) in the diagnosis of iron deficiency with microcytic hypochromic anemia. *The Indian Journal of Pediatrics* 76 (3):265–8. doi: [10.1007/s12098-009-0014-4](https://doi.org/10.1007/s12098-009-0014-4).
- Baart, A. M., M. G. J. Balvers, M. T. E. Hopman, T. M. H. Eijsvogels, J. M. T. Klein-Gunnewiek, and C. A. van Kampen. 2018. Reticulocyte hemoglobin content in a large sample of the general Dutch population and its relation to conventional iron status parameters. *Clinica Chimica Acta* 483:20–4. doi: [10.1016/j.cca.2018.04.018](https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.04.018).
- Bableswhar, R. S., M. Roy, A. Bali, P. V. Patil, and S. Inumella. 2013. Intensive method of assessment and classification of the bone marrow iron status: A study of 80 patients. *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 56 (1):16–9. doi: [10.4103/0377-4929.116142](https://doi.org/10.4103/0377-4929.116142).
- Baird-Gunning, J., and J. Bromley. 2016. Correcting iron deficiency. *Australian Prescriber* 39 (6):193–9. doi: [10.18773/austprescr.2016.069](https://doi.org/10.18773/austprescr.2016.069).
- Baker, E. N., H. M. Baker, C. A. Smith, M. R. Stebbins, M. Kahn, K. E. Hellström, and I. Hellström. 1992. Human melanotransferrin (P97) has only one functional iron-binding site. *FEBS Letters* 298 (2–3): 215–8. doi: [10.1016/0014-5793\(92\)80060-T](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80060-T).
- Balci, Y. I., F. O. Akpınar, A. Polat, U. Uzun, and A. Ergin. 2016. Evaluation of reticulocyte parameters in iron deficiency, vitamin B12

- deficiency and mixed anemia. *Clinical Laboratory* 62 (3):343–7. doi: [10.7754/Clin.Lab.2015.150616](https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150616).
- Bârsan, L., A. Stanciu, S. Stancu, C. Căpușă, L. Brătescu, E. Mandache, E. Radu, and G. Mircescu. 2015. Bone marrow iron distribution, hepcidin, and ferroportin expression in renal anemia. *Hematology* 20 (9):543–52. doi: [10.1177/1607845415Y.0000000004](https://doi.org/10.1177/1607845415Y.0000000004).
- Brindle, E., D. Stevens, C. Crudder, C. E. Levin, D. Garrett, C. Lyman, and D. S. Boyle. 2014. A multiplex immunoassay method for simultaneous quantification of iron, vitamin A and inflammation status markers. *PLoS One*. 9 (12):e115164. doi: [10.1371/journal.pone.0115164](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115164).
- Brissot, P., M. Ropert, C. L. Lan, and O. Loréal. 2012. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820 (3):403–10. doi: [10.1016/j.bbagen.2011.07.014](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.014).
- Buttarelo, M. 2016. Laboratory diagnosis of anemia: Are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *International Journal of Laboratory Hematology* 38 (Suppl 1):123–32. doi: [10.1111/ijlh.12500](https://doi.org/10.1111/ijlh.12500).
- Büyükkaragöz, B., N. A. Akgun, A. D. Bulus, S. D. Aydogdu, and C. Bal. 2017. Can soluble transferrin receptor be used in diagnosing iron deficiency anemia and assessing iron response in infants with moderate acute malnutrition? *Archivos Argentinos de Pediatría* 115 (2):125–31.
- Camaschella, C., A. Pagani, A. Nai, and L. Silvestri. 2016. The mutual control of iron and erythropoiesis. *International Journal of Laboratory Hematology* 38 (Suppl 1):20–6. doi: [10.1111/ijlh.12505](https://doi.org/10.1111/ijlh.12505).
- Carlos, A. M., B. M. B. de Souza, R. A. V. de Souza, G. A. D. Resende, G. A. Pereira, and H. Moraes-Souza. 2018. Causes of microcytic anaemia and evaluation of conventional laboratory parameters in the differentiation of erythrocytic microcytosis in blood donors candidates. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 23 (9):705–11. doi: [10.1080/10245332.2018.1446703](https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1446703).
- Cascio, M. J., and T. G. DeLoughery. 2017. Anemia: Evaluation and diagnostic tests. *The Medical Clinics of North America* 101 (2): 263–84. doi: [10.1016/j.mcna.2016.09.003](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.003).
- Chung, M., D. Moorthy, N. Hadar, N. Salvi, R. C. Iovin, and J. Lau. 2012. Biomarkers for assessing and managing iron deficiency anemia in late-stage chronic kidney disease. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US).
- Coad, J., and C. Conlon. 2011. Iron deficiency in women: Assessment, causes and consequences. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 14 (6):625–34. doi: [10.1097/MCO.0b013e32834be6fd](https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834be6fd).
- Crispin, P., F. Sinclair, and K. Andriolo. 2016. Low haemoglobin density for detecting iron deficiency across a large population, including pregnancy. *International Journal of Laboratory Hematology* 38 (4): 397–402. doi: [10.1111/ijlh.12510](https://doi.org/10.1111/ijlh.12510).
- da Cunha, M. S. B., E. M. A. Siqueira, L. A. Trindade, and S. F. Arruda. 2014. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (10):1035–44. doi: [10.1016/j.jnutbio.2014.05.005](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.005).
- de Lima, G. A. F. M., and H. Z. W. Grotto. 2002. Laboratory assessment of iron status and reticulocyte parameters in differential diagnosis of iron deficiency anemia and heterozygous beta-thalassemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 38 (4):273–80. doi: [10.1590/S1676-24442002000400005](https://doi.org/10.1590/S1676-24442002000400005).
- de Mast, Q., E. C. van Dongen-Lases, D. W. Swinkels, A.-E. Nieman, M. Roestenberg, P. Druihle, T. A. Arens, A. J. Luty, C. C. Hermesen, R. W. Sauerwein, et al. 2009. Mild increases in serum hepcidin and interleukin-6 concentrations impair iron incorporation in haemoglobin during an experimental human malaria infection. *British Journal of Haematology* 145 (5):657–64. doi: [10.1111/j.1365-2141.2009.07664.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07664.x).
- Delaby, C., J. Vialaret, P. Bros, A. Gabelle, T. Lefebvre, H. Puy, C. Hirtz, and S. Lehmann. 2014. Clinical measurement of hepcidin-25 in human serum: Is quantitative mass spectrometry up to the job? *EuPA Open Proteomics* 3:60–7. doi: [10.1016/j.euprot.2014.02.004](https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.02.004).
- Dopsaj, V., G. Mikovic-Golubovic, J. Martinovic, and D. Kalimanovska-Ostric. 2012. Evaluation of derived coulter red blood cell parameters for the assessment of iron deficiency in adults with congenital heart disease. *International Journal of Laboratory Hematology* 34 (5):461–72. doi: [10.1111/j.1751-553X.2012.01417.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2012.01417.x).
- Drakesmith, H. 2016. Next-generation biomarkers for iron status. *Nestlé Nutrition Institute Workshop* 84:59–69.
- Emiralioglu, N., I. Yenicesu, S. Sari, O. Egritas, A. Poyraz, O. T. Pasaoglu, B. Celik, and B. Dalgic. 2015. An insight into the relationships between prohepcidin, iron deficiency anemia, and interleukin-6 values in pediatric helicobacter pylori gastritis. *European Journal of Pediatrics* 174 (7):903–10. doi: [10.1007/s00431-014-2482-4](https://doi.org/10.1007/s00431-014-2482-4).
- Enko, D., H. Wagner, G. Kriegshäuser, C. Kimbacher, R. Stolba, and G. Halwachs-Baumann. 2015. Assessment of human iron status: A cross-sectional study comparing the clinical utility of different laboratory biomarkers and definitions of iron deficiency in daily practice. *Clinical Biochemistry* 48 (13-14):891–6. doi: [10.1016/j.clinbiochem.2015.05.008](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.05.008).
- Enko, D., H. Wagner, G. Kriegshäuser, C. Kimbacher, R. Stolba, E. Worf, and G. Halwachs-Baumann. 2015. Hepcidin-25 vs. conventional clinical biomarkers in the diagnosis of functional iron deficiency. *European Journal of Haematology* 95 (6):507–13. doi: [10.1111/ejh.12523](https://doi.org/10.1111/ejh.12523).
- Ford, B. A., C. S. Eby, M. G. Scott, and D. W. Coyne. 2010. Intra-individual variability in serum hepcidin precludes its use as a marker of iron status in hemodialysis patients. *Kidney International* 78 (8): 769–73. doi: [10.1038/ki.2010.254](https://doi.org/10.1038/ki.2010.254).
- Fuqua, B. K., C. D. Vulpe, and G. J. Anderson. 2012. Intestinal iron absorption. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 26 (2-3):115–9. doi: [10.1016/j.jtemb.2012.03.015](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.03.015).
- Gale, E., J. Torrance, and T. Bothwell. 1963. The quantitative estimation of total iron stores in human bone marrow. *Journal of Clinical Investigation* 42 (7):1076–82. doi: [10.1172/JCI104793](https://doi.org/10.1172/JCI104793).
- Ganz, T. 2008. Iron homeostasis: Fitting the puzzle pieces together. *Cell Metabolism* 7 (4):288–90. doi: [10.1016/j.cmet.2008.03.008](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.008).
- Ganz, T. 2019. Erythropoietic regulators of iron metabolism. *Free Radical Biology & Medicine* 133:69–74. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.003](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.003).
- Ganz, T., and E. Nemeth. 2015. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Reviews. Immunology* 15 (8):500–10. doi: [10.1038/nri3863](https://doi.org/10.1038/nri3863).
- Ganz, T., G. Olbina, D. Girelli, E. Nemeth, and M. Westerman. 2008. Immunoassay for human serum hepcidin immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 112 (10):4292–7. doi: [10.1182/blood-2008-02-139915](https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-139915).
- Ge, X. H., Q. Wang, Z. M. Qian, L. Zhu, F. Du, W. H. Yung, L. Yang, and Y. Ke. 2009. The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (11):860–5. doi: [10.1016/j.jnutbio.2008.07.014](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.07.014).
- Girelli, D., S. Ugolini, F. Busti, G. Marchi, and A. Castagna. 2018. Modern iron replacement therapy: Clinical and pathophysiological insights. *International Journal of Hematology* 107 (1):16–30. doi: [10.1007/s12185-017-2373-3](https://doi.org/10.1007/s12185-017-2373-3).
- Gropper, S., and J. L. Smith. 2013. *Advanced nutrition and human metabolism*. United States: Cengage Learning.
- Grotto, H. Z. W. 2010. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 32:08–17. doi: [10.1590/S1516-84842010005000050](https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000050).
- Guerra, L. T., A. R. Rosa, R. F. Romani, R. R. Gurski, C. C. Schirmer, and C. D. P. Krueel. 2009. Serum transferrin and serum prealbumin as markers of response to nutritional support in patients with esophageal cancer. *Nutricion Hospitalaria* 24 (2):241–2.
- Honda, H., Y. Kobayashi, S. Onuma, K. Shibagaki, T. Yuza, K. Hirao, T. Yamamoto, N. Tomosugi, and T. Shibata. 2016. Associations among erythroferrone and biomarkers of erythropoiesis and iron metabolism, and treatment with long-term erythropoiesis-stimulating agents in patients on hemodialysis. *PLoS ONE* 11 (3):e0151601. doi: [10.1371/journal.pone.0151601](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151601).
- Hoppe, M., B. Brün, M. P. Larsson, L. Moraeus, and L. Hulthén. 2013. Heme iron-based dietary intervention for improvement of iron

- status in young women. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 29 (1):89–95. doi: [10.1016/j.nut.2012.04.013](https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.04.013).
- Hoppe, M., B. Lönnerdal, B. Hossain, S. Olsson, F. Nilsson, P. A. Lundberg, S. Rödger, and L. Hulthén. 2009. Hepcidin, interleukin-6 and hematological iron markers in males before and after heart surgery. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (1):11–6. doi: [10.1016/j.jnutbio.2007.11.008](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.008).
- Infusino, I., F. Braga, A. Dolci, and M. Panteghini. 2012. Soluble transferrin receptor (STfR) and STfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia: A meta-analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 138 (5):642–9. doi: [10.1309/AJCP16NTXZLZFAIB](https://doi.org/10.1309/AJCP16NTXZLZFAIB).
- Kautz, L., G. Jung, E. Valore, S. Rivella, E. Nemeth, and T. Ganz. 2014. Identification of erythroferone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics* 46 (7):678–84. doi: [10.1038/ng.2996](https://doi.org/10.1038/ng.2996).
- Kell, D. B., and E. Pretorius. 2014. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics : Integrated Biometal Science* 6 (4): 748–73. doi: [10.1039/C3MT00347G](https://doi.org/10.1039/C3MT00347G).
- Kemna, E. H. J. M., H. Tjalsma, H. L. Willems, and D. W. Swinkels. 2008. Hepcidin: From discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 93 (1):90–7. doi: [10.3324/haematol.13095](https://doi.org/10.3324/haematol.13095).
- Kim, A., and E. Nemeth. 2015. New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology* 22 (3):199–205.
- Koliarakis, V., M. Marinou, T. P. Vassilakopoulos, E. Vavourakis, E. Tsochatzis, G. A. Pangalis, G. Papatheodoridis, A. Stamoulakatou, D. W. Swinkels, G. Papanikolaou, et al. 2009. A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS ONE* 4 (2):e4581. doi: [10.1371/journal.pone.0004581](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004581).
- Koperdanova, M., and J. Cullis. 2015. Interpreting raised serum ferritin levels. *The BMJ* 351:9–11.
- Lambert, L. A. 2012. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects* 1820 (3):244–55. doi: [10.1016/j.bbagen.2011.06.002](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.002).
- Lamy, P. J., A. Durigova, and W. Jacot. 2014. Iron homeostasis and anemia markers in early breast cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 434:34–40. doi: [10.1016/j.cca.2014.04.011](https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.011).
- Lawen, A. 2015. Is erythroferone finally the long sought-after systemic erythroid regulator of iron? *World Journal of Biological Chemistry* 6 (3):78–82. doi: [10.4331/wjbc.v6.i3.78](https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.78).
- Lönnerdal, B. 2017. Development of iron homeostasis in infants and young children. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106 (Suppl 6):1575S–80S. nodoi: [10.3945/ajcn.117.155820](https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155820).
- Lynch, S., C. M. Pfeiffer, M. K. Georgieff, G. Brittenham, S. Fairweather-Tait, R. F. Hurrell, H. J. McArdle, and D. J. Raiten. 2018. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-iron review. *The Journal of Nutrition* 148 (suppl_1):1001S–67S. doi: [10.1093/jn/nxx036](https://doi.org/10.1093/jn/nxx036).
- Malczewska-Lenczowska, J., J. Orysiak, B. Szczepańska, D. Turowski, K. Burkhard-Jagodźńska, and J. Gajewski. 2017. Reticulocyte and erythrocyte hypochromia markers in detection of iron deficiency in adolescent female athletes. *Biology of Sport* 2 (2):111–8. doi: [10.5114/biolSport.2017.64584](https://doi.org/10.5114/biolSport.2017.64584).
- Martin-Cabrera, P., M. Hung, E. Ortman, T. Richards, M. Ghosh, F. Bottrill, T. Collier, A. A. Klein, and M. W. Besser. 2015. Clinical use of low haemoglobin density, transferrin saturation, bone marrow morphology, PerI's stain and other plasma markers in the identification of treatable anaemia presenting for cardiac surgery in a prospective cohort study. *Journal of Clinical Pathology* 68 (11):923–30. doi: [10.1136/jclinpath-2015-203024](https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203024).
- Mullier, F., E. Lainey, O. Fenneteau, L. da Costa, F. Schillinger, N. Bailly, Y. Cornet, C. Chatelain, J. M. Dogne, and B. Chatelain. 2011. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: Results of a multicentre study. *Annals of Hematology* 90 (7):759–68. doi: [10.1007/s00277-010-1138-3](https://doi.org/10.1007/s00277-010-1138-3).
- Muñoz, M., I. Villar, and J. A. García-Erce. 2009. An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology* 15 (37):4617–26. doi: [10.3748/wjg.15.4617](https://doi.org/10.3748/wjg.15.4617).
- Mwangi, M. N., S. Maskey, P. E. Andang'o, N. K. Shinali, J. M. Roth, L. Trijsburg, A. M. Mwangi, H. Zuilhof, B. van Lagen, H. F. Savelkoul, et al. 2014. Diagnostic utility of zinc protoporphyrin to detect iron deficiency in Kenyan pregnant women. *BMC Medicine* 12 (1):1–13. doi: [10.1186/s12916-014-0229-8](https://doi.org/10.1186/s12916-014-0229-8).
- Naidu, R. V., R. Desai, A. M. Dorle, and I. Shivanand. 2014. Red cell distribution width (RDW) in the diagnosis of iron deficiency anaemia in children between 6 months to 2 years. *UPDATE* 3 (1): 61–5. .
- Nakagawa, H., T. Tamura, Y. Mitsuda, Y. Goto, Y. Kamiya, T. Kondo, K. Wakai, and N. Hamajima. 2014. Inverse correlation between serum interleukin-6 and iron levels among Japanese adults: A cross-sectional study. *BMC Hematology* 14 (1):6. doi: [10.1186/2052-1839-14-6](https://doi.org/10.1186/2052-1839-14-6).
- Nalado, A. M., J. N. Mahlangu, R. Duarte, G. Paget, G. Olorunfemi, B. F. Jacobson, and S. Naicker. 2018. Utility of reticulocyte haemoglobin content and percentage hypochromic red cells as markers of iron deficiency anaemia among Black CKD patients in South Africa. *PLoS ONE* 13 (10):e0204899. doi: [10.1371/journal.pone.0204899](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204899).
- Namaste, S. M. L., F. Rohner, J. Huang, N. L. Bhushan, R. Flores-Ayala, R. Kupka, Z. Mei, et al. 2017. Adjusting ferritin concentrations for inflammation: Biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants of anemia (BRINDA) project. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106:359S–71S.
- Nemeth, E., S. Rivera, V. Gabayan, C. Keller, S. Taudorf, B. K. Pedersen, and T. Ganz. 2004. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of Clinical Investigation* 113 (9):1271–6. doi: [10.1172/JCI200420945](https://doi.org/10.1172/JCI200420945).
- Nielsen, O. H., M. Coskun, and G. Weiss. 2016. Iron replacement therapy: Do we need new guidelines? *Current Opinion in Gastroenterology* 32 (2):128–35. doi: [10.1097/MOG.0000000000000247](https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000247).
- Northrop-Clewes, C. A., and D. I. Thurnham. 2013. Biomarkers for the differentiation of anemia and their clinical usefulness. *Journal of Blood Medicine* 2013 (4):11–22. doi: [10.2147/JBM.S29212](https://doi.org/10.2147/JBM.S29212).
- Paesano, R., M. Pietropaoli, S. Gessani, and P. Valenti. 2009. The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. *Biochimie* 91 (1):44–51. doi: [10.1016/j.biochi.2008.06.004](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.06.004).
- Petrak, J., and D. Vyoral. 2005. Hephaestin—A ferroxidase of cellular iron export. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (6):1173–8. doi: [10.1016/j.biocel.2004.12.007](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.12.007).
- Peuhkuri, K., H. Vapaatalo, and R. Korpela. 2010. Even low-grade inflammation impacts on small intestinal function. *World Journal of Gastroenterology* 16 (9):1057–62. doi: [10.3748/wjg.v16.i9.1057](https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i9.1057).
- Pfeiffer, C. M., and A. C. Looker. 2017. Laboratory methodologies for indicators of iron status: Strengths, limitations, and analytical challenges. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106 (Suppl 6): 1606S–14S. doi: [10.3945/ajcn.117.155887](https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155887).
- Phiri, K. S., J. C. J. Calis, D. Kachala, E. Borgstein, J. Waluza, I. Bates, B. Brabin, and M. Boele Van Hensbroek. 2009. Improved method for assessing iron stores in the bone marrow. *Journal of Clinical Pathology* 62 (8):685–9. doi: [10.1136/jcp.2009.064451](https://doi.org/10.1136/jcp.2009.064451).
- Podmore, C., K. Meidtner, M. B. Schulze, R. A. Scott, A. Ramond, A. S. Butterworth, E. Di Angelantonio, J. Danesh, L. Arriola, A. Barricarte, et al. 2016. The association of multiple biomarkers of iron metabolism and type 2 diabetes: The EPIC-InterAct study. *Diabetes Care* 39 (4):572–81. doi: [10.2337/dc15-0257](https://doi.org/10.2337/dc15-0257).
- Porto, G., S. Oliveira, and J. P. Pinto. 2012. Hepcidina: A molécula-chave na regulação do metabolismo do ferro. *Jornal Português de Gastroenterologia* 18:26–32.
- Przybyszewska, J., and E. Żekanowska. 2014. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract. *Gastroenterology Review* 4 (4):208–13. doi: [10.5114/pg.2014.45102](https://doi.org/10.5114/pg.2014.45102).
- Punnonen, K., K. Irjala, and A. Rajamäki. 1997. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 89 (3):1052–7. doi: [10.1182/blood.V89.3.1052](https://doi.org/10.1182/blood.V89.3.1052).

- Raiten, D. J., S. M. L. Namaste, B. Brabin, G. Combs, Jr, M. R. L. Abbe, E. Wasantwisut, and I. Darnton-Hill. 2011. Executive summary-biomarkers of nutrition for development: Building a consensus. *The American Journal of Clinical Nutrition* 94 (2):633S–50S. doi: [10.3945/ajcn.110.008227](https://doi.org/10.3945/ajcn.110.008227).
- Ribeiro Silva Neto, L. G., J. E. dos Santos Neto, N. Bezerra Bueno, S. L. de Oliveira, and T. da Rocha Ataíde. 2019. Effects of iron supplementation versus dietary iron on the nutritional iron status: Systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59 (16):2553–61. doi: [10.1080/10408398.2018.1459469](https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1459469).
- Righetti, A. A., R. Wegmüller, D. Glinz, M. Ouattara, L. G. Adiassan, E. K. N'Goran, J. Utzinger, and R. F. Hurrell. 2013. Effects of inflammation and plasmodium falciparum infection on soluble transferrin receptor and plasma ferritin concentration in different age groups: A prospective longitudinal study in Côte d'Ivoire. *American Journal of Clinical Nutrition* 97:1354–74.
- Rohner, F., S. M. L. Namaste, L. M. Larson, O. Y. Addo, Z. Mei, P. S. Suchdev, and A. M. Williams. 2017. Adjusting soluble transferrin receptor concentrations for inflammation: Biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants of anemia (BRINDA) project. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106:372S–82S.
- Rosa, L., A. Cutone, M. S. Lepanto, R. Paesano, and P. Valenti. 2017. Lactoferrin: A natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9):1985. doi: [10.3390/ijms18091985](https://doi.org/10.3390/ijms18091985).
- Rubab, Z., H. Amin, K. Abbas, S. Hussain, M. I. Ullah, and S. Mohsin. 2015. Serum hepcidin levels in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 26 (1):19–25. doi: [10.4103/1319-2442.148716](https://doi.org/10.4103/1319-2442.148716).
- Salvagno, G. L., F. Sanchis-Gomar, A. Picanza, and G. Lippi. 2015. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 52 (2):86–105. doi: [10.3109/10408363.2014.992064](https://doi.org/10.3109/10408363.2014.992064).
- Scherer, P. S., D. Moraes, T. P. Munhoz, and V. Sgnaolin. 2015. New red blood cell and reticulocyte parameters and reference values for healthy individuals and in chronic kidney disease. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 51 (2):77–84. doi: [10.5935/1676-2444.20150014](https://doi.org/10.5935/1676-2444.20150014).
- Sekyere, E., L. Dunn, Y. Rahmanto, and D. Richardson. 2006. Role of melanotransferrin in iron metabolism: Studies using targeted gene disruption in vivo. *Blood* 107 (7):2599–601. doi: [10.1182/blood-2005-10-4174](https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4174).
- Sekyere, E., and D. Richardson. 2000. The membrane-bound transferrin homologue melanotransferrin: Roles other than iron transport? *FEBS Letters* 483 (1):11–6. doi: [10.1016/S0014-5793\(00\)02079-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02079-2).
- Serati, M., and M. Torella. 2019. Preventing complications by persistence with iron replacement therapy: A comprehensive literature review. *Current Medical Research and Opinion* 35 (6):1065–72. doi: [10.1080/03007995.2018.1552850](https://doi.org/10.1080/03007995.2018.1552850).
- Singh, B., S. Arora, P. Agrawal, and S. K. Gupta. 2011. Hepcidin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 412 (11–12):823–30. doi: [10.1016/j.cca.2011.02.014](https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.02.014).
- Singh, A., R. Chaudhary, H. Pandey, and A. Sonker. 2018. Identification of iron status of blood donors by using low hemoglobin density and microcytic anemia factor. *Asian Journal of Transfusion Science* 12 (1):46–50. doi: [10.4103/ajts.AJTS_30_17](https://doi.org/10.4103/ajts.AJTS_30_17).
- Speeckaert, M. M., R. Speeckaert, and J. R. Delanghe. 2010. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 47 (5–6):213–28. doi: [10.3109/10408363.2010.550461](https://doi.org/10.3109/10408363.2010.550461).
- Suchdev, P., S. Namaste, G. Aaron, D. Raiten, K. Brown, and R. Flores-Ayala. 2016. Overview of the biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 7 (2):349–56. doi: [10.3945/an.115.010215](https://doi.org/10.3945/an.115.010215).
- Suchdev, P. S., A. M. Williams, Z. Mei, R. Flores-Ayala, S.-R. Pasricha, L. M. Rogers, and S. M. Namaste. 2017. Assessment of iron status in settings of inflammation: Challenges and potential approaches. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106 (Suppl 6):1626S–33S. doi: [10.3945/ajcn.117.155937](https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155937).
- Sultana, G. S., S. A. Haque, T. Sultana, Q. Rahman, and A. N. N. Ahmed. 2011. Role of red cell distribution width (RDW) in the detection of iron deficiency anaemia in pregnancy within the first 20 weeks of gestation. *Bangladesh Medical Research Council Bulletin* 37 (3):102–5. doi: [10.3329/bmrcb.v37i3.9122](https://doi.org/10.3329/bmrcb.v37i3.9122).
- Sun, J., L. Zhang, J. Cui, S. Li, H. Lu, Y. Zhang, H. Li, J. Sun, and Z. Baloch. 2018. Effect of dietary intervention treatment on children with iron deficiency anemia in China: A meta-analysis. *Lipids in Health and Disease* 17 (1):1–7. doi: [10.1186/s12944-018-0749-x](https://doi.org/10.1186/s12944-018-0749-x).
- Syed, S., S. Kugathasan, A. Kumar, J. Prince, B. Schoen, C. McCracken, T. R. Ziegler, and P. S. Suchdev. 2017. Use of reticulocyte hemoglobin content in the assessment of iron deficiency in children with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 64 (5):713–20.
- Thomas, D. W., R. F. Hinchliffe, C. Briggs, I. C. Macdougall, T. Littlewood, and I. Cavill. 2013. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *British Journal of Haematology* 161 (5):639–48. doi: [10.1111/bjh.12311](https://doi.org/10.1111/bjh.12311).
- Thomas, C., and L. Thomas. 2002. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clinical Chemistry* 48 (7):1066–76. doi: [10.1093/clinchem/48.7.1066](https://doi.org/10.1093/clinchem/48.7.1066).
- Thurnham, D. I., L. D. McCabe, S. Haldar, F. T. Wieringa, C. A. Northrop-Clewes, and G. P. McCabe. 2010. Adjusting plasma ferritin concentrations to remove the effects of subclinical inflammation in the assessment of iron deficiency: A meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 92 (3):546–55. doi: [10.3945/ajcn.2010.29284](https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29284).
- Thurnham, D. I., C. A. Northrop-Clewes, and J. Knowles. 2015. The use of adjustment factors to address the impact of inflammation on vitamin A and iron status in humans. *The Journal of Nutrition* 145 (5):1137S–43S. doi: [10.3945/jn.114.194712](https://doi.org/10.3945/jn.114.194712).
- Turgeon O'Brien, H., R. Blanchet, D. Gagné, J. Lauzière, and C. Vézina. 2016. Using soluble transferrin receptor and taking inflammation into account when defining serum ferritin cutoffs improved the diagnosis of iron deficiency in a group of Canadian preschool Inuit children from Nunavik. *Anemia* 2016:1–10. doi: [10.1155/2016/6430214](https://doi.org/10.1155/2016/6430214).
- Tussing-Humphreys, L., C. Pusatcioglu, C. Pustacioglu, E. Nemeth, and C. Braunschweig. 2012. Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: Introducing hepcidin. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 112 (3):391–400. doi: [10.1016/j.jada.2011.08.038](https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.08.038).
- Uijterschout, L., D. W. Swinkels, M. D. Akkermans, T. Zandstra, M. Nuijsink, D. Hendriks, C. Hudig, H. Tjalsma, R. Vos, J. B. van Goudoever, et al. 2014. The value of soluble transferrin receptor and hepcidin in the assessment of iron status in children with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 13 (6):639–44. doi: [10.1016/j.jcf.2014.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.03.007).
- Urrechaga, E. 2010. The new mature red cell parameter, low haemoglobin density of the Beckman-Coulter LH750: Clinical utility in the diagnosis of iron deficiency. *International Journal of Laboratory Hematology* 32 (1p1):e144–e150. doi: [10.1111/j.1751-553X.2008.01127.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2008.01127.x).
- Urrechaga, E., L. Borque, and J. F. Escanero. 2010. Erythrocyte and reticulocyte indices on the LH 750 as potential markers of functional iron deficiency. *Anemia* 2010:1–7. doi: [10.1155/2010/625919](https://doi.org/10.1155/2010/625919).
- Urrechaga, E., L. Borque, and J. F. Escanero. 2013. Biomarkers of hypochromia: The contemporary assessment of iron status and erythropoiesis. *BioMed Research International* 2013:603786–8. doi: [10.1155/2013/603786](https://doi.org/10.1155/2013/603786).
- Urrechaga, E., M. Unceta, L. Borque, and J. F. Escanero. 2012. Low hemoglobin density potential marker of iron availability. *International Journal of Laboratory Hematology* 34 (1):47–51. doi: [10.1111/j.1751-553X.2011.01355.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2011.01355.x).
- van den Broek, N. R., E. A. Letsky, S. A. White, and A. Shenkin. 1998. Iron status in pregnant women: Which measurements are valid? *British Journal of Haematology* 103 (3):817–24. doi: [10.1046/j.1365-2141.1998.01035.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.01035.x).

- Viatte, L., and S. Vaulont. 2009. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 91 (10):1223–8. doi: [10.1016/j.biochi.2009.06.012](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.06.012).
- Vieth, J. T., and D. R. Lane. 2017. Anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 31 (6):1045–60. doi: [10.1016/j.hoc.2017.08.008](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.08.008).
- von Drygalski, A., and J. W. Adamson. 2013. Iron metabolism in man. *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 37 (5):599–606. doi: [10.1177/0148607112459648](https://doi.org/10.1177/0148607112459648).
- Ward, P. P., and O. M. Conneely. 2004. Lactoferrin: Role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 17 (3):203–8. doi: [10.1023/B:BIOM.0000027693.60932.26](https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027693.60932.26).
- WHO. 2001. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. Geneva, Switzerland.
- WHO. 2011a. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva, Switzerland: World Health Organization: 1–6.
- WHO. 2011b. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. Geneva, Switzerland.
- WHO. 2015. The Global Prevalence of Anaemia in 2011. Geneva: World Health Organization.
- Wong, C. 2017. Iron deficiency anaemia. *Paediatrics and Child Health* 27 (11):527–9. doi: [10.1016/j.paed.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.paed.2017.08.004).
- Yildirim, D. G., Z. Kaya, and S. A. Bakkaloglu. 2019. Utility of new red cell parameters for distinguishing functional iron deficiency from absolute iron deficiency in children with familial mediterranean fever. *International Journal of Laboratory Hematology* 41 (2):293–7. doi: [10.1111/ijlh.12971](https://doi.org/10.1111/ijlh.12971).
- Zhang, S., Y. Chen, W. Guo, L. Yuan, D. Zhang, Y. Xu, E. Nemeth, T. Ganz, and S. Liu. 2014. Disordered hepcidin-ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cellular Signalling* 26 (11):2539–50. doi: [10.1016/j.cellsig.2014.07.029](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.029).
- Zhou, S., X. Du, J. Xie, and J. Wang. 2017. Interleukin-6 regulates iron-related proteins through c-Jun N-terminal kinase activation in BV2 microglial cell lines. *PLoS ONE* 12 (7):e0180464. doi: [10.1371/journal.pone.0180464](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180464).
- Ziaei, S., M. Mehrnia, and S. Faghihzadeh. 2008. Iron status markers in nonanemic pregnant women with and without iron supplementation. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 100 (2):130–2. doi: [10.1016/j.ijgo.2007.07.027](https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2007.07.027).
- Zipperer, E., J. G. Post, M. Herkert, A. Kündgen, F. Fox, R. Haas, N. Gattermann, and U. Germing. 2013. Serum hepcidin measured with an improved ELISA correlates with parameters of iron metabolism in patients with myelodysplastic syndrome. *Annals of Hematology* 92 (12):1617–23. doi: [10.1007/s00277-013-1839-5](https://doi.org/10.1007/s00277-013-1839-5).

**BOGOTÁ
2019**

VII

**Congreso Internacional
del Colegio Colombiano
de Gastroenterología
Hepatología y
Nutrición Pediátrica**



COLGAHNP
Colegio Colombiano de
Gastroenterología,
Hepatología y Nutrición
Pediátrica

El Colegio Colombiano de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica

Certifica que:

Mauricio Restrepo Gallego

Participo en

En la convocatoria de Trabajos Libres del VII Congreso Internacional de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica celebrado el 5, 6 y 7 de septiembre de 2019, en el Hotel Hilton Corferias de la ciudad de Bogotá Colombia

Con el trabajo

"Anemia: El modelo animal como herramienta para estudiar el efecto de la vitamina A sobre algunos parámetros hematológicos y marcadores del estado nutricional del hierro"


Dr. Juan Pablo Riveros
Presidente COLGAHNP


Dr. Johon Francisco Garcés C.
Comité Organizador COLGAHNP

Desafíos, tendencias y oportunidades para la nueva década

Del 19 al 23 de Octubre

Bogotá, 14 de Junio de 2020

Investigadores:
Mauricio Restrepo Gallego, Luis E. Díaz.
Universidad de la Sabana.

Estimados participantes,

Con la presente le estamos confirmando que el Artículo del trabajo titulado:

“Efecto de la deficiencia de vitamina A sobre las proteínas asociadas al almacenamiento y transporte del hierro en un modelo murino.”

Fue aceptado por el Comité Académico para participar en el **IV Premio ACTA/ACOFANUD a la Investigación en alimentación y nutrición**, en la modalidad de **posgrado** que se celebrará entre el 19 al 23 de octubre en Bogotá de manera Virtual, en el marco del XV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos **-CONACTA 2020**.

De igual forma le recordamos que usted tiene derecho a exponer su trabajo en la sala de Investigaciones Universidades - Industria de CONACTA 2020 y presentación del poster en la Pagina web del congreso según las especificaciones disponibles en la página web <https://conacta.org/premios>

Le recordamos que para concursar por el Premio ACTA es indispensable estar inscrito en CONACTA 2020

Nos suscribimos de usted.

Atentamente,

Jorge A. Cabrera L.
Director Premios ACTA.

Laura M. Serrato E.
Coordinadora Premios ACTA

XI Premio ACTA a la investigación
en ciencia y tecnología de
alimentos



VI Premio ACTA a la investigación
en inocuidad de alimentos



IV Premio ACTA/ACOFANUD a la
investigación en alimentación y
nutrición



V Premio ACTA a la contribución
de toda una vida en inocuidad
de alimentos



www.acta.org.co

