**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Ingestão de ferro: associação com resistência à insulina e
síndrome metabólica na era da fortificação mandatória**

Diva Aliete dos Santos Vieira

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do
título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Profa. Assoc. Regina Mara Fisberg

**São Paulo
2016**

Ingestão de ferro: associação com resistência à insulina e síndrome metabólica na era da fortificação mandatória

Diva Aliete dos Santos Vieira

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Profa. Assoc. Regina Mara Fisberg

**Versão Original
São Paulo
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Assoc. Regina Mara Fisberg, minha querida orientadora, agradeço pela confiança, oportunidades e apoio incondicional durante as mudanças do percurso. Obrigada por sempre extrair o melhor de todas nós e ser uma fonte constante de inspiração e motivação.

Aos professores Marcelo Macedo Rogero, Marilisa Berti de Azevedo Barros, Elizabeth Fujimori e Josefina Aparecida Pellegrini Braga, obrigada pela leitura, disponibilidade e importantes contribuições para o aprimoramento da tese.

À Profa. Assoc. Lígia Martini pelo carinho e aprendizado durante o estágio de preparação pedagógica PAE.

À Profa. Assoc. Dirce Marchioni pelas contribuições ao longo do doutorado.

À Raquel Simões Mendes Netto, o meu carinho e agradecimento pelos ensinamentos durante a graduação e por despertar o meu interesse pela pesquisa.

À querida Andreia Miranda, minha irmãzinha portuguesa, pela amizade, companhia, conversas e risadas. Obrigada por me ouvir, pelas palavras de incentivo e por todo o cuidado.

À querida Mariane Fontanelli, pela amizade, parceria, pelas longas conversas na “salinha”. Obrigada pelo carinho e preocupação.

À querida Josiane Steluti, pela amizade, pelos momentos de descontração, parceria e contribuições. Obrigada pela generosidade e otimismo.

À queridíssima Michelle Castro, fonte de ternura, pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos, sempre com tanto carinho. Obrigada pelas contribuições e parceria.

À querida Ana Pallottini, pela amizade e risadas durante os longos cafés.

Às queridas Jaqueline Lopes e Aline Mendes pela amizade e acolhida na minha chegada ao grupo. Obrigada pelo companheirismo ao longo das disciplinas e pelos longos e proveitosos períodos de discussão.

À querida Cristiane Hermes, pela amizade, parceria e contribuições.

À querida Aline Martins, pela amizade e infinita doçura.

Aos atuais e ex-alunos do Grupo de Avaliação do Consumo Alimentar, pelo carinho, ensinamentos e colaboração.

Aos participantes do estudo ISA-Capital pela confiança, por me tornarem observadora, pesquisadora. Obrigada por permitir responder os meus questionamentos e aguçar ainda mais o meu espírito científico.

Aos funcionários da Pós-graduação da Nutrição em Saúde Pública, do Departamento de Nutrição e da Biblioteca, por serem sempre tão solícitos.

À minha família paulista, Aline Vial, Mari Foresto, Anelise Timm, Carolzinha Pelatieri e Bia Ribeiro, pela amizade, carinho, conversas, risadas, brigadeiros, festinhas e por tornarem os dias sempre tão leves.

À Bruna Zavarize e a Priscila Dryelle, pela companhia, amizade, momentos de saudades divididos...obrigada por trazerem um pedaço do meu Sergipe a cada encontro.

À Dayanne da Costa pela amizade, companheirismo, apoio durante todos esses anos de amizade...apesar da distância sempre esteve muito presente.

Às minhas amigas Mônica, Lillian, Katiane, Danielle, Sayanne e Rakeane pela amizade, torcida e incentivo.

À Angélica e Ângela por darem um tom mais colorido às nossas vidas.

Ao meu amor, Bruno, pelo apoio, compreensão, cumplicidade e por todo amor ao longo desses anos.

Aos meus pais, Adenilza e Carlos Alberto, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para a realização dessa conquista.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado que muito contribuiu para a realização desse estudo.

Recria tua vida, sempre, sempre.

Remove pedras e planta roseiras e faz doces.

Recomeça.

Cora Coralina

RESUMO

Vieira DAS. Ingestão de ferro: associação com resistência à insulina e síndrome metabólica na política de fortificação mandatória [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2016.

Introdução: A fortificação mandatória de ferro foi implantada no Brasil em 2004 com o intuito de combater a deficiência desse micronutriente. No entanto, alguns estudos indicam que o consumo excessivo de ferro pode estar relacionado ao desenvolvimento de síndrome metabólica, resistência à insulina e alterações do metabolismo lipídico. **Objetivos:** Avaliar a ingestão de ferro antes e após a implementação da política de fortificação mandatória, investigar a associação da ingestão de ferro heme, não heme e total com a síndrome metabólica e seus componentes, avaliar o papel da ingestão do ferro heme, não heme e total na resistência à insulina mediado pela interleucina-6, malondialdeído e leptina. **Metodologia:** Os dados foram provenientes de dois estudos transversais de base populacional (ISA-Capital 2003 e 2008), conduzidos em amostra representativa de residentes do município de São Paulo, de ambos os sexos e com idade superior a 12 anos. O consumo alimentar foi avaliado por meio de recordatórios de 24 horas e utilizou-se um questionário estruturado para obter informações socioeconômicas, demográficas e de estilo de vida. Coletou-se amostras de sangue em jejum de 12h para as análises bioquímicas e aferiu-se pressão arterial, peso, estatura e circunferência da cintura. Os analitos avaliados foram glicemia plasmática de jejum, insulina sérica de jejum, triglicerídeos plasmáticos, lipoproteína de alta densidade, malondialdeído, proteína C reativa ultrasensível, interleucina-6 e leptina sérica. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Stata®, versão 13 e Mplus®, versão 7.4, com nível de significância de 0,05. **Resultados:** A média do consumo de ferro aumentou em todas as faixas

etárias no período pós-fortificação. Houve uma redução superior a 90% na prevalência de inadequação dos homens em todas as faixas etárias, no entanto, apesar da substancial redução nas mulheres em idade fértil (63%), estas ainda possuem alta prevalência de inadequação desse micronutriente (34%). Maior ingestão de ferro total (OR=3,98; IC 95%=1,21–13,12) e não heme (OR= 2,92; IC 95%=1,10-7,72) foram positivamente associadas a hiperglicemia. Houve uma associação positiva entre maior ingestão de ferro heme com síndrome metabólica (OR=2,39; IC 95%=1,10–5,21) e concentrações elevadas de triglicérides (OR=2,51; IC 95%=1,06–5,91). A ingestão de ferro heme, não heme e total tiveram um efeito direto e positivamente associado às concentrações de interleucina-6 e negativamente associado às concentrações de malondialdeído. Observou-se um efeito indireto da ingestão do ferro heme, não heme e total na resistência à insulina mediado pela interleucina-6. **Conclusão:** Este estudo sugere que os diferentes tipos de ferro estão associados a importantes fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis. Assim, o monitoramento da adição de ferro na farinha de trigo e milho é essencial para garantir uma ingestão ferro segura para toda a população.

Descritores: Consumo alimentar, Ferro, Fortificação Mandatória, Síndrome metabólica, Resistência à insulina.

ABSTRACT

Vieira DAS. Iron intake: association with insulin resistance and metabolic syndrome in the era of mandatory fortification [thesis]. Sao Paulo: School of Public Health, USP; 2016.

Introduction: The mandatory fortification of foods with iron was initiated in Brazil in 2004 with order to combat this micronutrient deficiency. However, some studies indicate that excessive consumption of iron can be related to the development of metabolic syndrome, insulin resistance and alterations in lipid metabolism. **Objectives:** To assess the iron intake before and after the implementation of the mandatory fortification policy, to investigate the association of haem, nonhaem iron and total iron intake with metabolic syndrome and its components, and to evaluate the role of haem, nonhaem iron, and total iron intake in insulin resistance mediated by interleukin-6, leptin and malondialdehyde. **Methods:** Data were drawn from two cross-sectional population-based studies (ISA-Capital 2003 and 2008), conducted with a representative sample of residents of São Paulo, of both sexes and aged over 12 years old. Dietary intake was measured by two 24-hour dietary recall. Socioeconomic, demographic and lifestyle data were obtained through a structured questionnaire. Blood samples were collected after a 12-hour fasting for biochemical analysis and blood pressure, weight, height and waist circumference were measured. The analytes analysed were fasting plasma glucose, fasting serum insulin, plasma triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, malondialdehyde, C-reactive protein, interleukin-6 and serum leptin. All analyses were performed with Stata®, version 13 e Mplus®, version 7.4, and a p-value < 0.05 was considered statistically significant. **Results:** The iron intake mean increased in all the population in the post-fortification period. The prevalence of inadequate iron intake decreased by over 90% in men in all

analyzed age groups. Although despite the substantial decrease (over 63%), women in reproductive age remain with a high inadequate intake (34%). Higher total iron intake (OR=3.98, 95% CI=1.21–13.12) and nonhaem iron intake (OR=2.92, 95% CI=1.10–7.72) were positively associated with hyperglycaemia. There was a positive association between higher haem iron intake with metabolic syndrome (OR=2.39, 95% CI=1.10–5.21) with elevated triglyceride levels (OR=2.51, 95% CI=1.06–5.91). Haem, nonhaem iron and total iron intake had a direct and positive effect on levels of interleukin-6 and negative effect on malondialdehyde levels. There was an indirect effect of haem, nonhaem iron and total iron intake on insulin resistance mediated by interleukin-6.

Conclusion: This study suggests that the different types of dietary iron are associated with major risk factors of noncommunicable diseases. Thus, monitoring of iron addition in wheat and maize flour is essential to guarantee a safe iron intake for all the population.

Keywords: Dietary intake, Iron, Mandatory Fortification, Metabolic Syndrome, Insulin Resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	O MINERAL	17
1.2	ABSORÇÃO E METABOLISMO	18
1.3	RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS	22
1.4	A POLÍTICA DE FORTIFICAÇÃO MANDATÓRIA.....	24
1.5	EXCESSO DE FERRO, RESISTÊNCIA À INSULINA E SÍNDROME METABÓLICA... ..	28
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	ANTECEDENTES	35
4.2	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
4.3	AMOSTRAGEM	35
4.3.1	Projeto ISA-Capital 2003	36
4.3.2	Projeto ISA-Capital 2008	37
4.4	TAMANHO DA AMOSTRA.....	38
4.5	COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS	40
4.5.1	Dados socioeconômicos, de estilo de vida e saúde	41
4.5.2	Avaliação antropométrica e pressão arterial	42
4.5.3	Dados de consumo alimentar	43
4.5.4	Dados bioquímicos	44
4.5.5	Avaliação da resistência à insulina.....	45
4.5.6	Avaliação do perfil lipídico.....	46
4.5.7	Avaliação da síndrome metabólica	46
4.5.8	Avaliação da peroxidação lipídica, inflamação e leptina	47
4.6	VARIÁVEIS ESTUDADAS	47

4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4.8	ASPECTOS ÉTICOS	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	PRIMEIRO MANUSCRITO	51
5.2	SEGUNDO MANUSCRITO	67
5.3	TERCEIRO MANUSCRITO	83
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
7	REFERÊNCIAS	103
	CURRÍCULO LATTES.....	109

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Absorção do ferro heme e não heme no enterócito. Extraído de GROTTTO (2008).	19
Quadro 1. Recomendações nutricionais de ferro segundo estágio de vida e sexo. Extraído de OTTEN et al. (2006).	24
Figura 2. Sobrecarga de ferro e sua associação com doenças crônicas não transmissíveis. Extraído de GOZZELINO e AROSIO (2016).	30
Figura 3. Fluxograma da amostra elegível para o primeiro manuscrito, São Paulo, 2016.	38
Figura 4. Fluxograma da amostra elegível para o segundo manuscrito, São Paulo, 2016	39
Figura 5. Fluxograma da amostra elegível para o terceiro manuscrito, São Paulo, 2016.	40
Quadro 2. Variáveis de estudo segundo manuscrito, São Paulo, 2016.	48

Manuscrito 1

Table 1. Prevalence of inadequate intake of iron in the pre and post-fortification second stage of life and sex. São Paulo, 2008.	64
Table 2. Food contributors to total intake of iron in the pre-fortification period according to life stage. São Paulo, 2003.	65
Table 3. Food contributors to total intake of iron in the post-fortification period according to life stage. São Paulo, 2008.	66

Manuscrito 2

Table 1. Association between quintiles of iron intake (haem, nonhaem and total) and metabolic syndrome in ISA-Capital. São Paulo, Brazil, 2008.	79
--	----

Table 2. Association between quintiles of iron intake (haem, nonhaem and total) and components of metabolic syndrome in ISA-Capital. São Paulo, Brazil, 2008.	80
--	----

Manuscrito 3

Figura 1. Modelo teórico da relação entre ferro total, ferro heme, ferro não heme e resistência à insulina. São Paulo, 2008.	100
---	-----

Tabela 1. Estimativas padronizadas e índices de ajustes dos modelos de equação estrutural da associação entre ferro total, heme, não heme, fatores metabólicos e resistência à insulina. São Paulo, 2008.	101
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCG2, membro de número 2 da subfamília G dos ABC-transportadores

ALAS-2, delta aminolevulínico sintetase 2

BCRP, proteína de resistência do câncer de mama

DCNT, doenças crônicas não transmissíveis

Dcytb, redutase citocromo b duodenal

DMT-1, proteína transportadora de metal divalente

DRI, *Dietary References Intake*

EAR, *Estimated Average Requirements*

Fe²⁺, estado ferroso

Fe³⁺, estado férrico

FLVC1, receptor de vírus de leucemia felina,

FPT, ferroportina

HCP1, proteína transportadora do heme-1

HDL-c, lipoproteína de alta densidade

HO-1, hemopexina, heme oxigenase 1

HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of insulin resistance*

hs-PCR, proteína C reativa ultrassensível

IL-6, interleucina-6

IPAQ, *International Physical Activity Questionnaire*

IREs, elementos responsivos ao ferro

IRPs, proteínas reguladoras do ferro

MDA, malondialdeído

MSM, *Multiple Source Method*

NDSR, *Nutrition Data System Research*

NEE, necessidade energética estimada

NTBI, ferro não ligada à transferrina

PNAD, Pesquisa Nacional de Amostragem Domiciliar

PNDS, Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher

POF, Pesquisa Orçamentos Familiares

R24h, recordatório de 24 horas

RDA, *Recommended Dietary Allowance*

T3, triiodotironina

UL, *Tolerable Upper Intake Level*

APRESENTAÇÃO

A tese está estruturada em formato de artigo científico, conforme as diretrizes aprovadas na 9ª. Sessão da Comissão da Pós-graduação da Faculdade de Saúde Pública em 05 de junho de 2008 e segue as normas estabelecidas pela Guia de Apresentação de Teses elaborado pela Instituição.

A tese está organizada nas seguintes seções: (1) *Introdução*, que aborda o referencial teórico que norteia as hipóteses do presente trabalho; (2) *Justificativa*, que discorre sobre a relevância do trabalho e as possíveis contribuições para o conhecimento científico; (3) *Objetivos*, no qual são expostos os propósitos do estudo; (4) *Metodologia*, que contempla os procedimentos, técnicas e instrumentos utilizados na coleta, bem como o processamento e análise dos dados; (5) *Resultados e Discussão*, que incluem os manuscritos elaborados; (6) *Considerações finais*, que apresenta a síntese dos principais resultados do estudo.

O primeiro manuscrito intitulado “*Brazilians experiences with iron fortification: evidences of effectiveness for reducing iron inadequate intake with fortified flour policy*” foi publicado no periódico *Public Health Nutrition*. O segundo manuscrito intitulado “*Influence of dietary haem, nonhaem iron, and total iron intake on the presence of metabolic syndrome and its components: a population-based study*” foi submetido à *British Journal of Nutrition*. Já o terceiro manuscrito intitulado “*O papel da ingestão de ferro na resistência à insulina mediado pela interleucina-6: uma abordagem por modelos de equação estrutural*” será submetido ao periódico *Diabetologia* após a avaliação da banca examinadora.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O MINERAL

O ferro desempenha um papel importante no metabolismo, sobrevivência e proliferação celular. Este micronutriente atua em diversos processos biológicos fundamentais, como transporte de oxigênio, biossíntese de DNA, como cofator para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio. Nos mamíferos, o ferro é utilizado principalmente para a síntese de hemoglobina, mioglobina e dos citocromos (BOGDAN et al., 2016; STEINBICKER E MUCKENTHALER, 2013; GROTTTO, 2008).

Um indivíduo adulto tem aproximadamente 4 a 5 gramas de ferro no organismo. Desses, quase dois terços encontram-se presentes na forma de hemoglobina, 25% em depósitos, principalmente hepático, e 15% ligado a mioglobina e a diversas enzimas envolvidas no metabolismo celular. Por outro lado, em mulheres em idade fértil, o ferro corporal apresenta-se em quantidades menores do que em homens, principalmente a fração de depósito corporal. (ABBASPOUR et al., 2014; BRAGA e BARBOSA, 2006; MUÑOZ et al., 2009).

Apesar do ferro ser um dos elementos mais abundantes do planeta, apresenta-se em sua forma insolúvel e possui baixa biodisponibilidade na dieta de humanos e animais. Para suprir essa limitação, o organismo desenvolveu mecanismos eficientes para a conservação e manutenção do ferro (GANZ e NEMETH, 2011). Esses mecanismos são extremamente importantes para evitar o

acúmulo celular do ferro, que pode levar a toxicidade e morte celular por meio da formação de radicais livres e peroxidação lipídica (MUÑOZ et al., 2009; BRAGA e BARBOSA, 2006).

1.2 ABSORÇÃO E METABOLISMO

A quantidade de ferro absorvida pelo organismo varia de 5% a 35%, dependendo do *status* e do tipo de ferro (ABBASPOUR et al., 2014). A absorção é o principal mecanismo para a manutenção da homeostase no organismo, uma vez que não há um sistema de excreção (BRAGA e BARBOSA, 2006). O ferro proveniente da dieta é absorvido no duodeno, e envolve diversas etapas, desde a redução do ferro do estado férrico (Fe^{3+}) ao ferroso (Fe^{2+}), captação na região apical do enterócito, armazenamento e tráfico intracelular e liberação basolateral (Figura 1) (MUÑOZ et al., 2009).

Figura 1. Absorção do ferro heme e não heme no enterócito. Extraída de GROTTTO (2008).

O ferro dietético apresenta-se nas formas heme e não heme e a absorção de ambos ocorre na superfície apical dos enterócitos duodenais por diferentes mecanismos (MUÑOZ et al., 2009). Cerca de 1 a 2 mg de ferro são absorvidos por dia pelo epitélio duodenal. O ferro não heme, na sua forma Fe^{3+} , necessita ser reduzido a Fe^{2+} por meio da redutase citocromo b duodenal (Dcytb) e então é transportado para o interior do enterócito por meio da proteína transportadora de metal divalente (DMT-1). O ferro heme é transportado, intacto, para o interior do enterócito por meio da proteína transportadora do heme-1 (HCP1), localizada na membrana apical das células do duodeno (GROTTTO, 2008).

No interior da célula, a hemo oxigenase libera o ferro do grupo heme, e este irá participar do mesmo *pool* do ferro não heme, podendo ser armazenado no enterócito na forma de ferritina ou

exportado através da membrana basolateral do enterócito para a circulação sanguínea. O ferro na sua forma Fe^{2+} é liberado para a circulação por meio da ferroportina (FPT), que está localizada na extremidade basolateral dos enterócitos, bem como pode ser encontrada nos hepatócitos e macrófagos (GROTTO, 2008).

Diversos fatores podem influenciar a absorção do ferro, favorecendo-a (ácido ascórbico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico e carnes) ou inibindo-a (fitatos, taninos, polifenóis, oxalatos, fosfatos e cálcio). O principal mecanismo que tornam a carne e os ácidos agentes facilitadores da absorção é a capacidade desses formarem complexos solúveis de baixo peso molecular. Em relação aos agentes inibidores, esses formam complexos insolúveis, comprometendo sua absorção (BRAGA e BARBOSA, 2006).

Uma vez exportado, o ferro Fe^{2+} é oxidado em Fe^{3+} pela hefaestina, e em seguida liga-se a transferrina que transporta os íons Fe^{3+} aos tecidos-alvo para absorção pelos receptores de transferrina-1 (GROTTO, 2008; MUÑOZ et al., 2009; GANZ, 2013). A transferrina, em condições normais, tem capacidade de transportar aproximadamente 12 mg de ferro, no entanto apenas 30% dos receptores estão saturados. Em situações de sobrecarga, a capacidade de ligação está saturada e o ferro pode circular pelo soro, na forma não ligada à transferrina (NTBI), favorecendo o dano celular devido a facilidade de internalização pela célula (GROTTO, 2008). O ferro ligado à transferrina entra nas células-alvo, como células eritróides, hepáticas e imunes, por meio de um processo de endocitose mediado pelo receptor de transferrina-1. Após a endocitose, há alterações conformacionais na transferrina e no seu receptor, por meio do influxo de prótons dependente de ATP, que promove a liberação de Fe^{3+} . A ação da ferrireductase reduz o ferro à Fe^{2+} e este é transportado para o citoplasma, através da DMT-1, ao passo que o receptor de transferrina é reciclado para a membrana celular e a transferrina volta para a circulação (MUÑOZ et al., 2009).

O ferro é estocado nas células reticuloendoteliais de diversos órgãos como fígado, baço e medula óssea (GROTTO, 2008; ABBASPOUR et al., 2014). Dentro das células, o ferro pode ser armazenado na forma de ferritina e, após a sua degradação pelos lisossomos, como hemossiderina (MUÑOZ et al., 2009).

A maior parte do ferro do organismo está ligada a molécula de hemoglobina, e a sua degradação por meio da fagocitose das hemácias senescentes, provê ferro necessário para a manutenção diária da eritropoiese (GROTTO, 2008; MUÑOZ et al., 2009). Outro importante local de estoque de ferro é o fígado. Em situações de sobrecarga, este é o principal sítio afetado pela toxicidade desse mineral (PIETRANGELO, 2016).

Mecanismos que regulem a homeostase do ferro heme e não heme são essenciais para prevenir sua citotoxicidade. Dois mecanismos regulam a homeostase do ferro não heme, um intracelular e outro sistêmico. No interior da célula, as proteínas reguladoras do ferro (IRPs) e elementos responsivos ao ferro (IREs) são responsáveis pelo controle pós-transcricional dos genes moduladores da expressão de diversas proteínas responsáveis pela internalização, estoque e utilização do ferro (GOZZELINO e AROSIO, 2016; GROTTO, 2008). A regulação sistêmica é realizada por meio da hepcidina, hormônio peptídico produzido pelo fígado, que atua como regulador negativo da captação de ferro por ligar-se à FPT, causando a sua internalização e degradação, impedindo a entrada do ferro na circulação (GOZZELINO e AROSIO, 2016; ABBASPOUR et al., 2014; GROTTO, 2008). A hepcidina também atua inibindo a transcrição da DMT-1 nos enterócitos, reduzindo absorção deste mineral (GROTTO, 2008).

Do mesmo modo, o ferro heme tem sua homeostase regulada por meio de mecanismos intracelular e sistêmico. As proteínas haptoglobina e hemopexina atuam na captação da hemoglobina e do grupo heme proveniente da hemólise das hemácias. A regulação intracelular ocorre em diferentes etapas, como na síntese do ferro heme, degradação, transporte e diversas

proteínas estão envolvidas, tais como: delta aminolevulínico sintetase 2 (ALAS-2), hemopexina, heme oxigenase 1 (HO-1), receptor de vírus de leucemia felina (FLVC1), ABCG2 (membro de número 2 da subfamília G dos ABC-transportadores ou BCRP – proteína de resistência do câncer de mama) e HCP1. O controle da homeostase previne a toxicidade extracelular e intracelular do ferro heme (CHIABRANDO et al., 2014).

1.3 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS

Em indivíduos saudáveis, os níveis corporais de ferro devem ser mantidos entre 4 a 5 gramas por dia para a manutenção das funções vitais. Aproximadamente, 90% dessa necessidade é suprida pela degradação das hemácias senescentes pelos macrófagos e posterior reciclagem do ferro e os 10% restantes são provenientes da dieta (ZHANG et al., 2014).

O ferro dietético pode ser encontrado na forma de ferro heme e não heme. O ferro heme, corresponde a hemoglobina e mioglobina provenientes do consumo de carne bovina, peixe e aves, sendo proximamente 40% do ferro proveniente dessa fonte. O ferro não heme é encontrado principalmente nas hortaliças, leguminosas, ovos, produtos lácteos e produtos fortificados. O ferro heme é mais biodisponível quando comparado ao ferro não heme (15%-35%) e sofre pouca interferência de fatores dietético durante a sua absorção. O ferro não heme, por outro lado, é menos biodisponível (2% a 20%) e tem sua absorção reduzida pela presença de outros compostos na dieta (BRAGA e BARBOSA, 2006; HURRELL e EGLI, 2010).

Não há recomendações nacionais para a ingestão de ferro. No entanto, utiliza-se as recomendações (*Dietary Reference Intakes - DRIs*) para a população norte-americana e canadense desenvolvidas pelo *Institute of Medicine of The National Academies* com base em evidências da literatura científica. As recomendações de ferro foram calculadas por meio de modelos fatoriais que levaram em considerações as perdas basais de ferro, perdas menstruais, necessidade do feto durante a gestação, aumento da necessidade no período de crescimento para a expansão do volume sanguíneo, crescimento dos tecidos e estoque de ferro (OTTEN et al., 2006).

Essas equações permitiram estimar as necessidades individuais (*Recommended Dietary Allowance – RDA*), bem como para grupos populacionais (*Estimated Average Requirements – EAR*) para os diferentes estágios de vida (Quadro 1). No entanto, é importante destacar que a distribuição da necessidade de ferro para as mulheres em idade fértil é assimétrica devido as perdas menstruais (OTTEN et al., 2006). Assim, estudos que avaliem a prevalência de inadequação desse mineral neste grupo etário precisam utilizar métodos estatísticos que considerem essa limitação.

Quadro 1. Recomendações nutricionais de ferro segundo estágio de vida e sexo. Extraído de OTTEN et al. (2006).

Estágio de vida	Valores da <i>Dietary Reference Intakes</i> (mg/dia)				
	EAR		RDA		AI
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	UL
0 a 6 meses					0,27
7 a 12 meses	6,9	6,9	11,0	11,0	40,0
1 a 3 anos	3,0	3,0	7,0	7,0	40,0
4 a 8 anos	4,1	4,1	10,0	10,0	40,0
9 a 13 anos	5,9	5,7	8,0	8,0	40,0
14 a 18 anos	7,7	7,9	11,0	15,0	45,0
19 a 30 anos	6,0	8,1	8,0	18,0	45,0
31 a 50 anos	6,0	8,1	8,0	18,0	45,0
51 a 70 anos	6,0	5,0	8,0	8,0	45,0
71 anos e mais	6,0	5,0	8,0	8,0	45,0

EAR: Estimated Average Requirement; RDA: Recommended Dietary Allowance; AI: Adequate Intake; UL: Tolerable Upper Intake Level.

As estimativas do nível tolerável de ingestão (UL), nível em que a ingestão de ferro pode causar efeitos adversos à saúde, como desconforto gastrointestinal, foram situadas entre 40 a 45 mg/dia. O risco de efeito adverso do ferro proveniente da dieta na população é baixo (OTTEN et al., 2006).

1.4 A POLÍTICA DE FORTIFICAÇÃO MANDATÓRIA

A anemia ferropriva é um importante problema de saúde pública em todo mundo (WHO, 2008). A anemia é caracterizada por reduções nas concentrações de hemoglobina e glóbulos

vermelhos, comprometimento das demandas de oxigênio dos tecidos e pode atingir todas as faixas etárias, mas é mais prevalente entre crianças e mulheres em idade fértil (KASSEBAUM et al., 2014; WHO, 2008). Estima-se que em 2010, a anemia acometeu cerca de 32,9% da população mundial, sendo responsável por 68,3 milhões de anos vividos com incapacidade (KASSEBAUM et al., 2014). Na América Latina e Caribe, a prevalência de anemia varia de 4,0% a 61,3% em crianças menores de 6 anos e de 5,1% a 45,5% em mulheres em idade fértil (MUJICA-COOPMAN et al., 2015).

Segundo dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS) realizada em 2006 estima-se que a prevalência de anemia entre crianças menores de 5 anos seja de 20,9%, e de 29,4% entre mulheres em idade fértil não grávidas. Semelhantes aos dados nacionais, na região sudeste essa prevalência é de 22,6% entre as crianças e de 28,5% entre as mulheres (BRASIL, 2009). Não há dados nacionais recentes ou representativos da população de São Paulo que estimem a prevalência dessa carência nos grupos de risco e nas demais faixas de idade.

A deficiência de ferro pode ter diversas consequências a saúde, comprometendo o desenvolvimento cognitivo em todas as fases da vida, reduzindo a resistência à infecção e perda da capacidade física e desempenho no trabalho. O *status* em ferro está associado com a aumento da mortalidade maternal e prematuridade durante a gestação, além de modificar a produção e metabolismo de triiodotironina (T3), catecolaminas e outros neurotransmissores (WHO, 2001; WHO, 2008, NOKES et al. 1998; THOMAS e FRANKENBERG, 2002; BLACK et al., 2013).

As causas da deficiência de ferro são múltiplas e estão interconectadas. Dentre essas diversas etiologias, a inadequação na ingestão alimentar apresenta-se como principal problema para o seu desenvolvimento. O problema torna-se ainda mais preocupante quando se leva em

consideração a ineficiência dos sistemas de saúde, condições higiênico-sanitárias inadequadas e aumento na prevalência de morbidades (WHO, 2009).

Embora essa deficiência seja de elevada prevalência em muitas regiões do mundo e apresente elevado impacto social (UNICEF, 2004), existem alternativas de baixo custo e alta efetividade para o seu controle. Os programas incluem desde a diversificação alimentar para promover o consumo dos alimentos ricos em vitaminas e minerais, a distribuição de suplementos medicamentosos e a fortificação de alimentos (WHO, 2006).

A fortificação de alimentos, estratégia que consiste na adição de micronutrientes ao alimento durante o seu processamento, constitui uma intervenção de baixo custo e alta eficácia (da SILVA et al. 2012; FIEDLER e MACDONALD, 2009). Diversos países têm adotado essa medida para o combate às deficiências de micronutriente. Revisões sistemáticas têm mostrado que a fortificação com ferro resulta na melhoria das concentrações de hemoglobina, ferritina e reduz as prevalências de anemia (BARKLEY et al., 2015; GERA et al., 2012). No entanto, evidências da efetividade dos programas nacionais de fortificação são inconsistentes e limitadas (BARKLEY et al., 2015). Segundo HURRELL e colaboradores (2010) ao avaliarem o impacto do programa de fortificação da farinha de trigo com ferro em 78 países, observaram que apenas 9 países podem esperar um impacto positivo dos programas de fortificação, devido ao fornecimento de quantidades adequadas de ferro por meio da farinha fortificada. O impacto de um programa de fortificação depende de diversos fatores, como a prevalência da deficiência na população, acesso aos alimentos fortificados, quantidade consumida, estado de saúde do indivíduos, tipo de ferro utilizado, dentre outros (FIEDLER e MACDONALD, 2009).

No Brasil, a fortificação mandatória das farinhas de trigo e milho foi instituída pela Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, com o intuito de reduzir a prevalência de

anemia. A resolução determina a adição obrigatória de 4,2 mg de ferro por 100 gramas de farinha de trigo e milho, sendo iniciada em 2004 (BRASIL, 2002).

O principal tipo de ferro adicionado às farinhas é o ferro reduzido, utilizado por 66% das indústrias, seguido pelo fumarato ferroso, utilizado por 33% (BRASIL, 2011). No entanto, esse tipo de ferro tem baixa biodisponibilidade quando comparado ao sulfato ferroso e fumarato ferroso. O largo uso deve-se a estabilidade, baixo custo e ausência de alterações na cor do produto (EMBRAPA, 2001). HURREL e colaboradores (2010) revisaram a efetividade e eficácia da utilização de diversos tipos de ferro nos programas de fortificação de diversos países e evidenciaram que a utilização de ferro reduzido ou outras formas com baixa biodisponibilidade pode não prover impacto esperado no *status* em ferro.

Não há estudos nacionais que avaliem o impacto da implementação da política de fortificação mandatória no Brasil. SANTOS e colaboradores (2014) ao avaliarem o programa de fortificação mandatória de ferro do Brasil, a partir dos dados de consumo obtidos por meio da Pesquisa Orçamentos Familiares (POF), evidenciaram que o impacto dos produtos fortificados na ingestão de ferro é reduzido. Os autores atribuem esse reduzido impacto a possíveis problemas no planejamento do processo de fortificação. ASSUNÇÃO e colaboradores (2012) investigaram o impacto da política de fortificação na prevalência de anemia em crianças de Pelotas, município do Rio Grande do Sul e observaram que não houve redução na prevalência de anemia após a implementação da política. Esse resultado deve-se principalmente a baixa biodisponibilidade do ferro utilizado na fortificação da farinha e a pobre qualidade da dieta das crianças avaliadas.

A ausência de monitoramento da política de fortificação e os escassos estudos que avaliaram sua efetividade não permitem concluir sobre os possíveis impactos para a redução da prevalência de anemia. Os estudos apontam que é necessário rever as etapas do processo de

planejamento e implementação dessa importante política, principalmente no que se refere ao tipo de ferro utilizado (SANTOS et al., 2014; ASSUNÇÃO et al., 2012).

Por outro lado, a política abrange toda a população, inclusive grupos populacionais que não possuem deficiência de ferro. ABTAHI e colaboradores (2014) ao avaliarem o efeito do pão fortificado com ferro nos biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos saudáveis, encontraram que o consumo de farinha fortificada com ferro em homens não anêmicos promoveu uma redução na capacidade antioxidante total e aumento nas concentrações de superóxido dismutase. Este estudo sugere que o consumo de alimentos fortificados por indivíduos sem deficiência de ferro pode causar algum efeito adverso.

1.5 EXCESSO DE FERRO, RESISTÊNCIA À INSULINA E SÍNDROME METABÓLICA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são a principal causa de mortalidade do mundo e apresentam-se como um importante desafio para saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, nos quais acontecem 85% das mortes prematuras (WHO, 2016; WHO, 2014). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, projeta-se um aumento da mortalidade por DCNT de 38 milhões em 2012 para 52 milhões em 2030. As doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes são responsáveis por 82% das mortes por DCNT (WHO, 2014). No Brasil estima-se que 19,4% das mortes prematuras entre os 30 e 70 anos foram decorrentes dessas patologias no ano de 2012 (WHO, 2014).

Estratégias efetivas para a prevenção das doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 têm sido amplamente estudadas pela comunidade científica. O papel do ferro como um possível fator de risco para o desenvolvimento dessas doenças tem recebido crescente atenção por tratar-se de um fator dietético modificável (BASULI et al., 2014). Diversos estudos epidemiológicos recentes evidenciaram que estoques de ferro estão associados ao desenvolvimento de síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 (ABRIL-ULLOA et al., 2014; MA et al., 2015; RYOO et al., 2015; SEO et al., 2015; ARIJA et al., 2014; PODMORE et al., 2016; GUO et al., 2013; WLAZLO et al., 2015).

A síndrome metabólica e a resistência à insulina são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de DCNT. A síndrome metabólica compreende um conjunto de fatores de risco que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2. Diversas definições de síndrome metabólica têm sido propostas ao longo dos anos, sendo a mais recente publicada em 2009, a qual define a síndrome como a presença pelo menos três dos seguintes fatores de risco: glicemia elevada, pressão arterial elevada, concentrações elevadas de triglicerídeos, baixas concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e adiposidade central (ALBERTI et al., 2009; BROWN e WALKER, 2016). A resistência à insulina, por outro lado, é definida como a resposta inapropriada, principalmente nos tecidos periféricos, à ação da insulina (BROWN e WALKER, 2016).

Apesar do mecanismo envolvendo o excesso de ferro no desenvolvimento da resistência à insulina e síndrome metabólica ainda não estar completamente elucidado, diversas hipóteses são utilizadas para esclarecer essa relação (BASULI et al., 2014). As hipóteses que norteiam o presente estudo são que a maior ingestão de ferro (heme, não heme e total), incluindo o ferro proveniente da fortificação, pode modular as concentrações de leptina, aumentar a produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e de produtos finais da peroxidação lipídica, como

malondialdeído (MDA), condições associadas a síndrome metabólica. Esses fatores, por sua vez, em concentrações elevadas no organismo podem alterar o metabolismo da glicose, sinalização da insulina e provocar disfunção das células- β pancreáticas, promovendo resistência à insulina e atuando como mediadores da associação entre a ingestão do ferro e a resistência à insulina.

O ferro tem características pró-oxidante e pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio em diferentes tecidos corporais, sempre que o controle do metabolismo do ferro for interrompido (GAMMELLA et al., 2016). A sobrecarga de ferro tem sido associada à formação de espécies reativas de oxigênio que provocam danos ao DNA e peroxidação lipídica, que por sua vez, relacionam-se ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares, cânceres, aterosclerose, degeneração neurológica e diabetes *mellitus* tipo 2 (Figura 2) (JOMOVAA e VALKO, 2011; SIMCOX e MCCLAIN, 2013; MENA et al., 2015).

Figura 2. Sobrecarga de ferro e sua associação com doenças crônicas não transmissíveis. Extraído de GOZZELINO e AROSIO (2016).

As espécies reativas de oxigênio podem causar resistência à insulina por meio da disfunção das células- β pancreática, e consequente diminuição da expressão do gene da insulina. Isso ocorre devido a redução da expressão de fatores de transcrição ligados ao DNA, como o fator de transcrição FOXO1 que tem papel fundamental na apoptose, na proliferação e diferenciação celular e no metabolismo da glicose (KANETO et al., 2010).

Estudos experimentais têm identificado que o excesso de ferro pode promover disfunção mitocondrial e, consequentemente provocar anormalidade na gliconeogênese hepática (LEE et al., 2015; CHOI et al., 2013). CHOI e colaboradores (2013) ao avaliarem o efeito da sobrecarga de ferro e da dieta rica em gordura no metabolismo da glicose, em modelo animal de obesidade, identificaram que o consumo de uma dieta rica em gordura e em ferro atua de forma sinérgica no aumento da resistência à insulina. Os autores sugerem ainda que a ingestão excessiva de ferro pode estar associada à diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólica e desordens vasculares. Estudo recente demonstrou que a ingestão de ferro afeta o ritmo circadiano da gliconeogênese hepática por alterar a síntese do ferro heme, que por sua vez, afeta um importante componente da maquinaria circadiana, Rev-Erb α , responsável pela expressão da ritmicidade do relógio central de mamíferos (SIMCOX et al., 2015).

Distúrbios na homeostase de ferro também resultam no comprometimento da diferenciação dos adipócitos e capacidade adipogênica (FERNÁNDEZ-REAL et al., 2015). Dietas ricas em ferro foram associadas à hiperplasia e hipertrofia no tecido adiposo visceral em modelo animal (DONGIOVANNI et al., 2013). O uso de quelante, com o intuito de reduzir a quantidade de ferro disponível, inibiu a hipertrofia por meio da supressão do estresse oxidativo, infiltração de macrófagos e menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, em ratos KKAy obesos e com diabetes *mellitus* tipo 2 (TAJIMA et al., 2012).

Estudo em humanos, culturas de célula e modelos animais demonstrou que o ferro desempenha um papel importante e causal na regulação da transcrição da leptina. Essa regulação ocorre por meio da resposta dos adipócitos ao aumento da disponibilidade do ferro, ajustando assim a expressão da leptina, principal regulador do apetite, homeostase energética e metabolismo (GAO et al., 2015).

O grupo heme também apresenta-se com um potente pró-oxidante, capaz de oxidar lipídios, proteínas e causar danos ao DNA. Além disso, também participa da ativação de células imunes promovendo inflamação (DUTRA e BOZZA, 2014). A associação positiva entre o risco de diabetes *mellitus* tipo 2 e a ingestão de ferro heme foi encontrada em recentes meta-análises (BAO et al., 2012; ZHAO et al., 2012).

Essas evidências sugerem que a prevenção primária do excesso de ferro e a manutenção dos seus níveis fisiológicos pode contribuir para a redução de importantes fatores de risco das DCNT, como diabetes e doenças cardiovasculares.

2 JUSTIFICATIVA

O aumento na prevalência de doenças crônicas e o grande impacto na mortalidade precoce e invalidez no Brasil, exigem o planejamento de estratégias para prevenção de fatores de risco modificáveis. Dentre estes, a dieta destaca-se pela importante contribuição no desenvolvimento de fatores de risco como a obesidade, inflamação, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial.

No Brasil, as evidências sobre a relação entre a dieta e fatores de riscos para o desenvolvimento da diabetes *mellitus* tipo 2, como a resistência à insulina e a síndrome metabólica são escassas e não há estudos de base populacional que investiguem essa associação. Este é o primeiro estudo na literatura nacional e internacional que busca compreender as complexas relações entre a ingestão de ferro, resistência à insulina e síndrome metabólica por meio de técnicas de modelagem multivariada de dados. Além disso, buscou-se avaliar a efetividade da política de fortificação e como esta contribui para a ingestão desse mineral.

Com este estudo, espera-se avançar no conhecimento entre ingestão em ferro, síndrome metabólica e resistência à insulina, e contribuir com o entendimento da etiologia dessa associação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ingestão de ferro e sua associação com resistência à insulina e síndrome metabólica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ingestão de ferro, calcular a prevalência de inadequação e identificar os alimentos que contribuem com a ingestão de ferro antes e após a implementação da política de fortificação mandatória (Manuscrito 1);
- Investigar a associação da ingestão de ferro heme, não heme e total com a síndrome metabólica e seus componentes (Manuscrito 2);
- Avaliar o papel da ingestão do ferro heme, não heme e total na resistência à insulina mediado pela IL-6, malondialdeído e leptina (Manuscrito 3).

4 METODOLOGIA

4.1 ANTECEDENTES

Esta tese utiliza os dados de dois estudos transversais de base populacional “Inquérito de Saúde do município de São Paulo” – ISA-Capital 2003 e ISA-Capital 2008. Esta pesquisa é realizada com periodicidade de cinco anos, com o intuito de monitorar as condições de saúde, acesso a serviços e avaliar o impacto de políticas públicas na população residente no município de São Paulo.

4.2 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Tratam-se de estudos transversais de base populacional com amostra probabilística de adolescentes, adultos e idosos, de ambos os sexos, residentes em domicílios particulares do município de São Paulo.

4.3 AMOSTRAGEM

O plano de amostragem foi desenvolvido com o objetivo de otimizar a logística de campo e manter a representatividade da população do município de São Paulo. As informações dos inquéritos de saúde dos anos anteriores foram utilizadas como referência para estimar perdas e recusas.

4.3.1 Projeto ISA-Capital 2003

O processo de amostragem do ISA-Capital 2003 foi realizado em dois estágios, setor censitário e domicílio. Utilizou-se as informações da Pesquisa Nacional de Amostragem Domiciliar (PNAD) 2002 que amostrou no município de São Paulo 264 setores censitários urbanos, dos quais foram sorteados 60 para compor a amostra do ISA-Capital 2003. O município foi estratificado segundo escolaridade do chefe de família, considerando o percentual de chefes com nível universitário em três níveis: até 5%, 5% a 25% e 25% ou mais.

Fixou-se oito domínios de estudo formados pelos grupos etários: menores de um ano, de 1 a 11 anos de idade, mulheres de 12 a 19; 20 a 59 e 60 ou mais, e homens, nas mesmas faixas etárias. Para cada um desses domínios, foi planejada a realização de 420 entrevistas, perfazendo um tamanho de amostra total de 3360 indivíduos. Em cada setor censitário, planejou-se a obtenção de sete entrevistas de cada grupo sexo/idade, prevendo uma perda amostral de 20% e permitindo estimar proporções de 0,50, com erro de amostragem de seis pontos percentuais, considerando nível de confiança de 95 % e efeito de delineamento de 1,5.

Foram realizadas 3357 entrevistas. Em 2386 indivíduos foram coletadas informações referentes ao consumo alimentar, compondo a amostra do estudo 807 adolescentes (12-19 anos), 754 adultos (20-59 anos) e 825 idosos (60 anos e mais) de ambos os sexos.

4.3.2 Projeto ISA-Capital 2008

A amostra do estudo ISA-Capital 2008 foi obtida mediante amostragem por conglomerados em dois estágios: setor censitário e domicílio. No primeiro estágio, realizou-se sorteio aleatório simples de 70 setores censitários (unidades primárias de amostragem) dentre os 267 setores de área urbana do município de São Paulo que constavam no cadastro da PNAD 2005.

A partir dos objetivos do projeto, foram fixados oito domínios de estudo formados pelos grupos sexo/idade: menores de um ano, de 1 a 11 anos de idade, mulheres de 12 a 19; 20 a 59 e 60 ou mais, e homens, nas mesmas faixas etárias. Planejou-se a realização de pelo menos 300 entrevistas em cada subgrupo populacional de interesse. Esse tamanho permitiria estimar proporções ($P=0,50$) com erros de amostragem de 7 pontos percentuais ($d=0,07$) ao nível de confiança de 95% e com efeitos do delineamento de 1,5.

O tamanho da amostra estipulado foi de 4024, prevendo-se uma taxa de não-resposta de 20% e encontro de 5% dos domicílios fechados. Devido a perdas por recusa, falecimento e mudanças de endereço, a amostra final totalizou 3271 indivíduos (580 crianças, 605 adolescentes, 1162 adultos e 924 idosos), dos quais 1662 (560 adolescentes, 585 adultos e 517 idosos) tiveram coletadas as informações dietéticas.

Durante a segunda fase do projeto, 750 indivíduos (158 adolescentes, 302 adultos e 290 idosos) tiveram a segunda medida dietética coletada e foram aferidas as medidas antropométricas, de pressão arterial e coleta de sangue. A perda amostral ocorreu devido a recusas ou mudança de endereço/telefone. No entanto, esta ocorreu de forma aleatória em todos os estratos considerados para a amostragem, sem a ocorrência de viés por perdas diferenciais.

4.4 TAMANHO DA AMOSTRA

A amostra utilizada no presente estudo difere de acordo com os objetivos de cada manuscrito. O fluxograma com a amostra elegível para cada manuscrito está apresentado nas Figuras 3, 4 e 5.

Figura 3. Fluxograma da amostra elegível para o primeiro manuscrito, São Paulo, 2016.

Figura 4. Fluxograma da amostra elegível para o segundo manuscrito, São Paulo, 2016.

Figura 5. Fluxograma da amostra elegível para o terceiro manuscrito, São Paulo, 2016.

4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS

O ISA-Capital 2003 ocorreu entre março e dezembro de 2003 e durante esse período foram coletadas informações referentes ao nível socioeconômico, uso de serviços de saúde, estilo de vida e auto avaliação de saúde, por meio da aplicação de questionário estruturado em visita domiciliar.

Nesse momento aplicou-se o recordatório alimentar de 24 horas (R24h) com intuito de obter informações sobre os hábitos alimentares da população.

O ISA-Capital 2008 ocorreu em duas fases. A primeira fase, que teve início em setembro de 2008, consistiu da primeira visita domiciliar, na qual foi aplicada um questionário estruturado, que contém informações referentes ao nível socioeconômico, estilo de vida, morbidade referida, histórico familiar de morbidade, uso de medicamentos, dentre outras. A aplicação do R24h foi realizada em uma subamostra. Na segunda fase, que iniciou em janeiro de 2010, realizou-se uma nova visita domiciliar, na qual foi aferida a antropometria (peso, estatura e circunferência da cintura), pressão arterial e coleta de sangue. Nessa mesma fase realizou-se o segundo R24h por telefone.

Para o presente estudo serão avaliados apenas os domínios de adolescentes, adultos e idosos, de ambos os sexos.

4.5.1 Dados socioeconômicos, de estilo de vida e saúde

Em ambos os inquéritos, as informações de renda familiar *per capita*, sexo, idade, raça, consumo de bebida alcoólica, nível de atividade física, hábito de fumar e uso de medicamentos, foram obtidas por meio da aplicação de questionário estruturado durante a primeira visita domiciliar.

A atividade física foi mensurada por meio do IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) versão longa validado no Brasil (MATSUDO et al., 2001), no qual o entrevistado

é questionado sobre a duração, frequência e intensidade da atividade física nos diferentes domínios: ocupacional, lazer, doméstico e transporte. Utilizou-se o domínio do lazer para classificar os indivíduos em insuficientemente ativos (prática de atividade vigorosa < 3 dias/semana e menos de vinte minutos por sessão ou atividade moderada < 5 dias/semana e menos de trinta minutos por sessão) e suficientemente ativos (prática de atividade vigorosa ≥ 3 dias/semana e vinte minutos ou mais por sessão ou atividade moderada ≥ 5 dias/semana e trinta minutos ou mais por sessão).

Os dados de tabagismo foram coletados a partir de questões sobre fumo atual ou pregresso, número de cigarros fumados por dia e, os participantes foram classificados em não fumantes, ex-fumante e fumantes. Em relação ao consumo de álcool, a informação foi obtida a partir das questões sobre preferência do consumo de bebida alcoólica e frequência de consumo, classificando os indivíduos em não consumidores e consumidores.

4.5.2 Avaliação antropométrica e pressão arterial

Os dados aferidos de peso, estatura, circunferência da cintura e pressão arterial foram obtidos somente no ISA-Capital 2008. Para aferição da estatura utilizou-se estadiômetro portátil fixado em parede lisa e sem rodapé com escala de 0 a 220 cm e precisão de 0,1 centímetro (Seca®, modelo 208, Hamburg, Alemanha).

O peso foi mensurado utilizando balança calibrada, do tipo plataforma, com capacidade máxima de 150 quilogramas e precisão de 100 gramas, a qual foi apoiada em superfície plana, firme, lisa e afastada da parede (Tanita®, modelo HD-313, Brisbane, Austrália).

O índice de massa corporal foi calculado por meio da equação de Quetelet ($\text{IMC} = \text{peso (kg)}/\text{estatura (m)}^2$). A circunferência da cintura foi aferida utilizando-se fita métrica inextensível, a qual foi posicionada no plano horizontal, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e a mensuração realizada após a expiração. As aferições de peso, estatura e circunferência da cintura foram realizadas segundo a metodologia proposta pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

A pressão arterial foi aferida por meio de aparelho automático (Omron modelo HEM 7113, Omron Health Care, Inc, EUA) seguindo o protocolo da V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC, 2007).

4.5.3 Dados de consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado por meio da aplicação do R24h. A aplicação dos R24h seguiram a metodologia do *Multiple Pass Method* (GUENTHER et al., 1995) e do *Automated Multiple Pass Method* (BLANTON et al., 2006), no qual o entrevistado é conduzido por meio de cinco passos (listagem rápida; revisão preliminar; nomeação das refeições, detalhamento do consumo e revisão final) em um processo padronizado, que visa manter o indivíduo interessado e engajado na entrevista, ajudando-o a recordar todos os itens consumidos.

As informações geradas a partir dos R24h foram utilizadas para identificar a estimativa de ingestão de ferro na população. A energia e nutrientes foram estimados pelo *software Nutrition Data System Research* (NDSR, version 2014, Nutrition Coordinating Center [NCC], University of Minnesota, Minneapolis). Após a tabulação dos dados foi realizada análise de consistência dos

dados na tentativa de identificar possíveis erros durante a digitação dos dados. O programa NDSR possui como base de dados a tabela norte-americana desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (RAPPER et al., 2004). A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) foi utilizada para verificar a adequação dos valores nutricionais dos alimentos presentes no *software*, bem como para as correções dos valores de ferro dos alimentos. Os valores de ferro heme foram estimados como 40% do total de ferro proveniente de carne bovina, peixe e aves (MONSEN et al., 1978), e o ferro não heme foi calculado com a diferença entre o ferro total e o ferro heme.

O percentual de *misreporting* (implausibilidade do relato da energia) foi estimado por meio da equação $[\text{Energia total} - \text{NEE (necessidade energética estimada)} / \text{NEE} \times 100]$ (KELLY et al., 2009), sendo as necessidades energéticas individuais determinadas a partir das equações do *Institute of Medicine of the National Academies* (IOM, 2002). O ponto de corte de Goldberg de ± 1 desvio-padrão foi utilizado para classificar os indivíduos em sub-relatores, relatores plausíveis e super-relatores. Para tal, foi necessário estimar, o valor de ± 1 desvio-padrão, a partir da equação descrita por BLACK e colaboradores (2000), que leva em consideração o número de recordatórios, coeficiente de variação intrapessoal da ingestão energética, coeficiente de variação da taxa metabólica basal e o coeficiente de variação do nível de atividade física.

4.5.4 Dados bioquímicos

No ISA-Capital 2008, as amostras sanguíneas foram coletadas no domicílio, por técnico de enfermagem treinado, por meio de punção venosa cubital. Os indivíduos foram orientados a permanecerem 12 horas em jejum, não alterarem a sua alimentação habitual nos dias anteriores a coleta, evitarem de fazer atividade física intensa e não ingerirem bebida alcoólica 72 horas antes da coleta. Essas orientações foram dadas, por telefone, ao indivíduo ou familiar, dias antes da visita domiciliar.

Os tubos foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo reciclável e transportados ao Laboratório Nutrição Humana da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, onde as amostras foram processadas. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior dosagem e as demais enviadas a laboratório externo credenciado.

No presente estudo, as variáveis bioquímicas utilizadas foram: glicemia de jejum plasmática, insulina sérica de jejum, triglicerídeos plasmáticos, HDL-c, MDA, proteína C reativa ultrasensível (hs-PCR), IL-6 e leptina sérica.

4.5.5 Avaliação da resistência à insulina

A glicemia de jejum plasmática foi determinada por método enzimático colorimétrico com a glicose oxidase (Glucose Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) utilizando sistema automatizado (LabMax 240, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). A insulina sérica de jejum foi mensurada utilizando o kit ELISA AccuBind® (Monobind Inc, Lake Forest, CA, USA).

A resistência à insulina foi estimada indiretamente usando-se o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina – HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of insulin*

resistance) proposto por MATTHEWS et al. (1985): $\text{HOMA-IR} = [\text{insulina srica de jejum (mU/mL)} \times \text{glicemia srica de jejum (mmol/L)}] / 22,5$.

4.5.6 Avaliao do perfil lipdico

As concentraes plasmticas de triglicerdeos e HDL-c foram mensuradas por meio do mtodo colormetro-enzimtico (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

4.5.7 Avaliao da sndrome metablica

A sndrome metablica foi definida como a presena de pelo menos trs dos seguintes fatores de risco: circunferncia da cintura elevada ($\text{CC} \geq 90$ cm para homens e $\text{CC} \geq 80$ cm para mulheres), elevadas concentraes de triglicerdeos (triglicerdeos > 150 mg/dL) ou uso de hipolipemiante, baixas concentraes de HDL-c ($\text{HDL-c} < 40$ mg/dL para homens e $\text{HDL-c} < 50$ mg/dL para mulheres) ou uso de hipolipemiante, presso arterial elevada (presso arterial sistlica ≥ 130 mmHg e/ou presso arterial diastlica ≥ 85 mmHg) ou uso de anti-hipertensivo, glicemia de jejum elevada (> 110 mg/dL) ou uso de hipoglicemiante (ALBERTI et al., 2009)..

4.5.8 Avaliação da peroxidação lipídica, inflamação e leptina

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da dosagem de MDA. O MDA é indicador da ação de radicais livres no organismo, sendo um importante parâmetro para avaliar o estresse oxidativo celular. A concentração de MDA no plasma foi determinada após a derivatização com ácido tiobarbitúrico e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC/DAD), como descrito por BASTOS et al. (2012) e HONG et al. (2000).

A inflamação foi mensurada por meio da concentração plasmática de hs-PCR e IL-6. O hs-PCR foi determinado utilizando o kit IMAGE® (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, US, cat n 474630) e a IL-6 por meio do kit MILLIPLEX MAP 13-plex Cytokine Kit (Millipore, Billerica, MA).

A leptina sérica foi determinada utilizando radioimunoensaio (h-leptin RIA, HL-81 K, Millipore, Saint Charles, MO, USA).

4.6 VARIÁVEIS ESTUDADAS

As variáveis estudadas em cada manuscrito, estão descritas no quadro 2.

Quadro 2. Variáveis de estudo segundo manuscrito, São Paulo, 2016.

	Variável	Descrição
1º Manuscrito	Ferro total	mg/dia
	Sexo	masculino, feminino
	Idade	9-13 anos, 14-18 anos, 19-50 anos, 51 anos ou mais
	Alimentos	gramas/dia
2º Manuscrito	Ferro total	quartil de consumo
	Ferro heme	quartil de consumo
	Ferro não heme	quartil de consumo
	Síndrome metabólica	não, sim
	Circunferência da cintura elevada	não [CC < 90 cm para homens e CC < 80 cm para mulheres], sim [CC ≥ 90 cm para homens e CC ≥ 80 cm para mulheres]
	Elevadas concentrações de triglicerídeos	não [triglicerídeos < 150 mg/d L], sim [triglicerídeos ≥ 150 mg/d L ou uso de hipolipemiante]
	Baixas concentrações de HDL-c	não [HDL-c ≥ 40 mg/dL para homens e HDL-c ≥ 50 mg/dL para mulheres], sim [HDL-c < 40 mg/dL para homens e HDL-c < 50 mg/dL para mulheres ou uso de hipolipemiante]
	Pressão arterial elevada	não [pressão arterial sistólica < 130 mmHg e/ou pressão diastólica < 85 mmHg], sim [pressão arterial sistólica ≥ 130 mmHg e/ou pressão diastólica ≥ 85 mmHg ou uso de anti-hipertensivo]
	Glicemia de jejum elevada	não [< 100 mg/dL], sim [≥ 100 mg/dL ou uso de hipoglicemiante]
	Sexo	masculino, feminino
	Idade	adultos, idosos
	Raça	branco, não branco
	Consumo de álcool	não, sim
	Tabagismo	nunca, ex-fumante, fumante
	Atividade física	insuficientemente ativo, suficientemente ativo
	Misreporting	percentual de misreporting
	Energia	kcal/dia
	Renda familiar <i>per capita</i>	Dólar
	IMC	kg/m ²
3º Manuscrito	hs-PCR	mg/L
	Gordura saturada	g/dia
	Vitamina C	mg/dia
	Ferro total	mg/dia
	Ferro heme	mg/dia
	Ferro não heme	mg/dia
	MDA	mmol/L
	Leptina	ng/mL
	IL-6	pg/mL
	Gordura saturada	g/dia
	HOMA-IR	mmol/L* mU/L
	Circunferência da cintura	Cm
	Misreporting	Sub-relator, relator plausível, super-relator
	Atividade física	insuficientemente ativo, suficientemente ativo

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva dos dados foi realizada no software STATA (Statistics/Data Analysis, version 13.0, Texas, 115 USA). Foram calculadas medidas de tendência central (médias ou medianas), proporção e dispersão (desvio-padrão ou percentil) e verificou-se a distribuição mais adequada para os dados, que serviu de apoio para a escolha dos testes estatísticos que foram empregados. O nível de significância considerado foi de 0,05.

O consumo de ferro e dos demais nutrientes foram ajustado pela energia total pelo método de resíduos (WILLETT et al., 1997) e a ingestão habitual dos nutrientes foi estimada por técnicas de modelagem estatística incorporadas na plataforma online *Multiple Source Method* (MSM) (DiFe, 2012). Este método permite estimar a ingestão habitual de nutrientes provenientes de dois recordatórios de 24 horas, removendo a variabilidade intrapessoal em três passos. O primeiro passo estima a probabilidade de ingestão do nutriente para cada indivíduo. No segundo, a quantidade habitual da ingestão do nutriente nos dias de consumo é estimada e, no último passo, os números resultantes do passo um e dois são multiplicados para estimar a ingestão diária habitual individual (HARTTIG et al., 2011).

O presente estudo faz uso de diferentes modelagens estatísticas, de acordo com os objetivos de cada manuscrito. A descrição detalhada da análise estatística pode ser encontrada na seção métodos dos manuscritos.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública – número CAAE 59449516.2.0000.5421. Cabe reiterar que o estudo garantiu a confidencialidade dos dados, sendo voluntária a participação dos indivíduos, após consentimento livre e esclarecido. Ademais, o estudo principal atendeu às exigências da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRO MANUSCRITO

Brazilians experiences with iron fortification: evidences of effectiveness for reducing iron inadequate intake with fortified flour policy.

Artigo publicado na Public Health Nutrition

Diva Aliete dos Santos Vieira¹

Josiane Steluti¹

Eliseu Verly-Jr²

Dirce Maria Marchioni¹

Regina Mara Fisberg¹

¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo. Avenida Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, CEP 01246-904, São Paulo, SP – Brazil.

² Department of Epidemiology, Institute of Social Medicine, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil. Rua São Francisco Xavier, 524, Pavilhão João Lyra Filho, 7º andar – Maracanã, CEP 20550-013, Rio de Janeiro, RJ – Brazil.

Abstract

Objectives: To assess the iron intake, to calculate the prevalence of inadequate (PI) iron intake, and to identify the food contributors to iron intake during 2003 and 2008 in a population-based study, reflecting the before and after mandatory fortification of flour with iron.

Design: Two cross-sectional population-based studies conducted in 2003 and 2008. Dietary intake was evaluated by 24-hour recall. The Software for Intake Distribution Estimation (PC-SIDE) was used to estimate within-person variance and the PI iron intake. The statistical analysis was conducted considering the complex survey design.

Setting: Sao Paulo, Brazil

Subjects: Adolescents, adults and elderly adults both sexes interviewed in 2003(n=2,386) and 2008(n=1,661).

Results: The iron intake mean increased in all population in post-fortification period. There was a reduction of over 90% in the PI in men in all age groups analyzed. When evaluating women, despite the substantial reduction(over 63%), women between 19 and 50 years remain with high inadequate intake(34%). The major food contributors to the iron intake before fortification were: beans, beef, vegetables and dairy. In post-fortification period there was an alteration in the contributions, i.e., bread, beef, beans and biscuit as main contributors.

Conclusion: The mandatory fortification with iron significantly furthered the reduction in the PI, except for women in reproductive age, and changed the main contributors of this nutrient in the studied population. Therefore, monitoring of iron addition in flour is essential to assess the compliance of the fortified flour policy, and to guarantee a safe iron intake for all the population.

Keywords: Fortification, Programme assessment, Iron, Dietary intake, Prevalence of inadequacy.

Introduction

Worldwide, iron deficiency is the most common and widespread micronutrient malnutrition, and is a public health problem in both industrialized and non-industrialized countries which affects over 24% of the world's population but even more so in developing regions. Iron deficiency can reach all age groups, but young children and women tend to be among those most at risk of developing micronutrient deficiencies⁽¹⁾.

Several studies have shown that the population of countries such as Denmark, Germany, Spain, The Netherlands, The United Kingdom, Poland, France, Ireland and Italy has an inadequate intake of iron, especially among women in reproductive age^(2,3). Although micronutrient deficiency is highly prevalent in many regions of the world and has a high social impact⁽⁴⁾, there are low cost and highly effective alternatives. The programs comprise food diversification to promote the consumption of food sources of iron, the distribution of supplements and food fortification⁽⁵⁾. Food fortification is a safe and cost effective strategy used in several countries to reduce micronutrient deficiencies^(6,7). Although many countries combat the iron deficiency with a flour fortification strategy, it seems that only 9 of the 78 national fortification programs can have a desired nutritional impact due to the use of iron with low bioavailability⁽⁸⁾.

In Brazil, there are no past or current figures for iron deficiency. Since 1999, with the intent being to increase the amount of this micronutrient intake to prevent low stores and iron-deficiency anemia, the Brazilian Ministry of Health took on some strategies that include the promotion of health diet, use of supplements in target groups and fortification of foods. The mandatory fortification of foods with iron was initiated in 2004, and wheat and maize flour were selected as the major vehicle with 4.2 mg of iron per 100 g of flour⁽⁹⁾.

The main objectives of the study are to assess the iron intake, to calculate the prevalence of inadequate iron intake, and to identify the food contributors to iron intake during 2003 and 2008 in a population-based study, reflecting the before and after mandatory fortification of flour with iron.

Methods

Study population

For the present analysis, we compared data from two population-based ‘Health Survey-São Paulo (ISA-Capital 2003 and ISA-Capital 2008)’. The Healthy Survey-São Paulo is a cross-sectional study of health and living conditions among a representative sample of individuals living in São Paulo city, south-eastern Brazil. The ISA-2003 conducted during 2003, reflecting the time prior to iron fortification, and ISA-2008, reflecting the time period after fortification.

The sampling process in ISA-2003 was carried out in two stages: census tracts and households. For the draw, gathered them sectors into three strata based on percentage family heads with university level: less than 5%, 5% to 24.9% and 25% and more. A total of 2,386 individuals were interviewed, 183 adolescents (12-13 years), 523 adolescents (14 to 18 years), 747 adults (19-59 years) and 933 adults (51 years and more), both sexes.

The sample at ISA-2008 was defined in eight age domains: less than 1 year old; 1 to 11 years old, and three more age groups for each sex: 12 to 19 years (adolescents), 20 to 59 years (adults) and 60 years or over (elderly adults). Two-stage cluster sampling of census tracts and households was performed. In the first stage, by using probability proportional to size, ten census tracts were drawn from each of the strata, making a total of 30 census tracts for each region. In the second stage, households were drawn from each sector. A total of 3271 individuals (197 less than 1 year, 383 1-11 years, and 2691 (12 years and older) participated in the ISA-2008. For the present study, we invited all individuals older than 12 years from the ISA-2008 sample to answer one 24-

hour recall (24HR). Of these, 1662 individuals completed the dietary measurement. One person was excluded to make use of supplement, leaving 1661 individuals, 151 adolescents (12-13 years), 357 adolescents (14 to 18 years), 529 adults (19-59 years) and 624 adults (51 years and more), both sexes.

Data collection and processing

In both surveys (ISA-2003 and ISA-2008), information on food intake, demographics, and socioeconomic variables were obtained using structured questionnaires through household interviews. The twenty four hours recall (24HR) was administered in the household by trained interviewers using the Multiple-Pass Method. The respondent in this process is guided through five steps (quick listing, quick listing review, naming meals, detail cycle and general review) using a standardized process that keeps individuals interested and engaged in the interview, which helps them remember all items consumed⁽¹⁰⁾. The sampling days for all participants covered all the days of the week.

Foods reported in each 24HR were critically reviewed to identify any failures in reporting related to the descriptions of the consumed food or to food preparation techniques, including their apportioning and quantification. The iron data was analyzed using the Nutrition Data System for Research software program version 2007 (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA), which is based on data from tables published by the United States Department for Agriculture (USDA). The iron amount added to fortified products was corrected to account for the quantity of fortification in maize and wheat flour that has been mandatory in Brazil since 2004. There is a difference between the quantities of iron added to fortified foods in Brazil and in the United States. In addition, the Brazilian Food Composition Table was used to verify the adequacy of nutritional values of iron from food.

Estimating usual iron intake in the pre and post-fortification period

Due to day-to-day variation (within-person random error), nutrient intake distributions based on one or few collection-days of 24HR provide biased estimations of percentiles of intake, and consequently biased estimations of the prevalence of inadequacy⁽¹¹⁾. The use of methods to remove within-person variance and estimate usual nutrient intake is widely recommended and has been implemented in several studies worldwide. To do so, it is need at least on replication of the 24HR in a subsample of the study population⁽¹²⁾. In the post-fortification period we administered two non-consecutive 24HR, the first was in-person and the following phone-based interview (in a sample of 50.06%). Mean time interval between the first and second measurement was about six months. Nonetheless, in the pre-fortification period, there was only a single measurement for each participant. According to previous studies^(13,14), it is advised that in case of absence of the repetition of the 24HR, the within-person variance component from a study with similar population should be applied in order to correctly estimate distribution of usual nutrient intake. Then, to correct the distribution of iron intake in the pre-fortification period, we applied the variance components derived from post-fortification period. To estimate within-person variance components by each age and sex group and the prevalence of inadequate iron intake we used the Software for Intake Distribution Estimation (PC-SIDE) that implements the method proposed by Nusser *et al.*⁽¹²⁾.

Prevalence of inadequacy

The Institute of Medicine set of intake recommendations for iron were used as reference for intake adequacy, specifically the Estimated Average Requirement (EAR)⁽¹⁵⁾. Prevalence of inadequate iron intake was calculated as the proportion of individuals whose usual intake falls below EAR for specific sex and age group. To provide valid estimates of prevalence of inadequate intake, the distribution of the intake requirement must be symmetric, which is not the case for women in reproductive age due to iron loss in their menstrual cycle. In this case, a suitable method to estimate usual intake that accounts for menstrual losses was applied⁽¹⁶⁾. Confidence intervals for

the prevalence of inadequate intake were derived from standard errors based on Jackknife replication technique considering the complex sample design. Specifically, for women in reproductive age (14-18 years and 19-50 years) it was not possible to estimate standard errors due to statistical constraints.

The contribution of food intake of nutrients was calculated by the methodology described in Block *et al.*⁽¹⁷⁾, considering the study sampling design. This method estimates the major contributors to the total iron intake through a ratio of the daily total iron provided by the specific food or food group over the total intake of iron from all foods. Subsequently, the food was ordered in decreasing order, according to the amount of this nutrient per food portion, calculated from the median of food consumption in grams in the study population.

All analyses were conducted using the appropriate sample weights to account for the complex survey design. For all analyses, the STATA® statistical software package version 12 was used and a $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Means and the prevalence of inadequate iron intake in the pre and post-fortification are shown in Table 1. The mean of iron intake increased in all stage life and sex ranged from 3.91-6.99 mg/day in pre-fortification period to 7.81-15.20 mg/day in post-fortification. There was no identified risk of excessive iron intake in this population.

There was a reduction of over 90% in the prevalence of inadequacy in men in all age groups analyzed. When evaluating women, it is noted that despite the substantial reduction (over 63%), women between 19 and 50 years old remain with high inadequate intake (34%).

The food groups that contributed most to the intake of iron before fortification were beans, beef, vegetables and dairy with more than 58% of the intake in all groups studied (Table 2). In the

post-fortification period, there was a change in the pattern of contributions, i.e., the bread, beef, beans and biscuit as main contributors (Table 3).

Discussion

Our results show that there was impact of fortified food in reduction in the prevalence of inadequate and increase in mean of iron intake in all stages of life, regardless of sex.

The mean of iron intake in post-fortification period in all age groups and sex was similar to that found by Santos *et al.*⁽¹⁸⁾ to evaluate the program of flour fortification in a representative sample of Brazil. Berner *et al.*⁽¹⁹⁾ found that food fortification with iron contributed to reducing the prevalence of inadequacy of this nutrient in adolescents, similar to the results of this study. Martorell *et al.*⁽²⁰⁾ showed that iron fortification policy in Costa Rica reduced the prevalence of anemia from 18.4% to 10.2% in adult women. In South Africa the fortification policy implemented in 2003 also led to an increase in iron intake. The average intake in men and in adult women was higher than that evidenced in this study⁽²¹⁾. Fulgoni *et al.*⁽²²⁾ assessed the contribution of various micronutrients in the usual estimates from different sources (natural, fortified or enriched and dietary supplement) in individuals over two years according to NHANES 2003-2006 and found that the percentage of the population with usual intakes below the EAR decreased from 21.8% to 6.5%.

The prevalence of inadequate iron in women of reproductive age, was over 20% even after the mandatory fortification. This high prevalence in this age group suggests that the policy has limited effectiveness and it is necessary to intake a greater amount of fortified flour⁽⁶⁾. However, the incentive to increase consumption of flour should not be stimulated by the growing prevalence of weight excess⁽²³⁾. Thus, other iron intake increase programs (e.g. supplementation) should be considered in this group of population in region where anemia is highly prevalent⁽²⁴⁾.

Bioavailability is the other relevant issue regarding iron fortification. In Brazil, reduced iron is the main source used by the industry in the fortification policy⁽²⁵⁾. However, this type of iron provides a low bioavailability when compared to sulfate and ferrous fumarate⁽²⁶⁾. The extent of its use is due to the low cost and stability when added in flour. The low bioavailability of this source may explain the findings of Assunção and colleagues⁽²⁷⁾ which showed that iron fortification in Brazil had no impact on anemia in children under 6 years old living in the urban area of the city of Pelotas, Southern Brazil. Hurrell *et al.*⁽⁸⁾ reviewed the efficacy and effectiveness studies with various iron fortified foods and found strong evidence that reduced iron and other forms of iron with low bioavailability cannot be efficacious to a satisfactory impact in status iron. Thus, it is necessary that the fortification policy is reviewed by the government in order to increase the effectivity of the program using the iron form with better bioavailability.

Despite a significant increase in iron intake after fortification, the population of this study showed no intakes near the UL of this micronutrient. The p95 intake (11-19 mg/d) of iron in the post-fortification period has a lower intake than observed in adult women population of Europe, whose p95 intake of iron ranged from 13 mg/d (Ireland) to 20 mg/d (Germany). However, p95 intake of iron observed in adult men in the current study population was similar to levels found in Denmark, The Netherlands and Spain⁽³⁾.

Although there is no evidence of risk of adverse effects related to higher intake of iron from the fortification^(3,28), studies are needed to assess the impact of fortification in individuals with low nutritional risk. Abtahi and colleagues⁽²⁹⁾ evaluated the effects of iron-fortified bread consumption on oxidative stress in healthy individuals in Iran. They showed that in men there was an increase in the levels of superoxide dismutase and a reduction in the values of the total antioxidant capacity. These results suggested that fortification of flour with iron in non-anemic adults in the long term

cannot be without adverse effects. Furthermore, monitoring of iron addition in flour is essential to assess the compliance of the fortified flour policy, and to guarantee a safe iron intake.

The panorama of foods that contributed to the iron intake was also changed after fortification. In 2003, the main contributors were food groups that were natural sources of this nutrient, such as beef and beans. However, there was an important change after fortification, in which bread, biscuits, wheat and maize flour were among the top five contributors. Therefore, flour was a good vehicle of iron fortification corroborating results observed in previous studies, in which higher intakes of iron are associated with high consumption of fortified foods^(3,19,30).

Food fortification is a safe and cost effective strategy used in several countries to reduce micronutrient deficiencies^(6,7). Baltussen, Knai and Sharan⁽³¹⁾ estimated the cost-effectiveness of iron supplementation and iron fortification programs, in different coverage levels, in four subregions of the world. The cost-effectiveness of fortification was always lower than the cost-effectiveness of supplementation, regardless of the coverage levels. Fiedler and Macdonald⁽³²⁾ estimated that in Brazil the fortification of wheat and maize flour has a cost, over 10 years, of about \$ 41 per DALY saved (Disability-Adjusted Life years). Whereas health interventions with a good cost-effectiveness are those with a cost lower than \$ 200 per DALY saved –as suggested by the World Bank –then the fortification appears to be a public health strategy with good cost-effectiveness⁽³³⁾.

Few studies in Brazil evaluated the effectiveness of the policy in a representative sample and in different age groups. So, this is the first study to provide representative estimates of prevalence of inadequate intake of iron in the pre and post-fortification period in this country. The reduction in inadequacy may be associated with reducing iron deficiency, but due to the methodological limitations inherent in the evaluation methods of dietary intake and the lack of knowledge of iron bioavailability, this result may not have a significant impact on body stores of

this nutrient. Another limitation of the study is the use of the food composition tables from USDA. However, foods available in Brazilian Food Composition Table were corrected. Moreover, during the pre-fortification period there was no replication of 24HR using the variance components derived from post-fortification period to estimate within-person variance.

In conclusion, the mandatory fortification of wheat and maize flour with iron significantly furthered the reduction in the prevalence of inadequate intake, except for women in reproductive age, and changed the main contributors of this nutrient in the studied population. Therefore, monitoring of iron addition in flour is essential to assess the compliance of the fortified flour policy, and to guarantee a safe iron intake for all the population.

References

1. World Health Organization (2008) *Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia*. Geneva: WHO.
2. Mensink GBM, Fletcher R, Gurinovic M *et al.* (2013) Mapping low intake of micronutrients across Europe. *British Journal of Nutrition* **110**, 755–773.
3. Flynn A, Hirvonen T, Mensink GBM *et al.* (2009) Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food & Nutrition Research*, Suppl. 1, 1-51.
4. United Nations Children's Fund and The Micronutrient Initiative (2004) *Vitamin & Mineral deficiency: A Global Progress Report*. Ottawa.
5. World Health Organization (2001) *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers*. Geneva: WHO.
6. World Health Organization World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006) *Guidelines on food fortification with micronutrients*. Geneva: WHO.
7. Bailey RL, West Jr. KP, Black RE (2015) The Epidemiology of Global Micronutrient Deficiencies. *Ann Nutr Metab* **66**, Suppl.2, S22–S33.
8. Hurrell R, Ranum P, de Pee S, *et al.* (2010) 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* **31**, Suppl. 1, S7–S21.

9. Brazil. Ministry of Health (2002) Resolução nº344, 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro ácido fólico, constante no anexo desta resolução. Diário Oficial da União.
10. Guenther PM, DeMaio TJ, Ingwersen LA, *et al.* (1995) The multiple-pass approach for the 24 hour recall in the Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1994-1996. *Presented at the International Conference on Dietary Assessment Methods*; Boston, Mass.
11. Dodd KW, Guenther PM, Freedman LS *et al.* (2006) Statistical Methods for Estimating Usual Intake of Nutrients and Foods: A Review of the Theory. *J Am Diet Assoc***106**, 1640-1650.
12. Nusser SM, Carriquiry AL, Dodd KW *et al.* (1996) A semiparametric transformation approach to estimating usual daily intake distributions. *J Am Stat Assoc***91**, 1440-1449.
13. Verly-Jr E, Cesar CLG, Fisberg RM *et al.* (2013) Variância intrapessoal da ingestão de energia e nutrientes em adolescentes: correção de dados em estudos epidemiológicos. *RverBras Epidemiol***16**, 170-177.
14. Jahns L, Carriquiry A, Arab L *et al.* (2004) Within- and between-person variation in nutrient intakes of Russian and U.S. children differs by sex and age. *J Nutr***134**, 3114-3120.
15. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board (2000). *Using the Estimated Average Requirement for Nutrient Assessment of Groups*. In: Dietary reference intakes: applications in dietary assessment. Washington D.C.: National Academy Press.
16. National Research Council (1989) *Recommended Dietary Allowances*. Washington D.C.: National Academy Press.
17. Block G, Dresser CM, Hartman AM *et al.* (1985) Nutrient sources in the American diet: quantitative data from the NHANESII survey. II. Macronutrients and fats. *Am J Epidemiol***122**, 27-40.
18. Santos Q, Nilson EAF, Verly-Junior E *et al.* (2014) An evaluation of the effectiveness of the flour iron fortification programme in Brazil. *Public Health Nutrition***18**, 1670–1674.
19. Berner LA, Keast DR, Bailey RL *et al.* (2014) Fortified Foods Are Major Contributors to Nutrient Intakes in Diets of US Children and Adolescents. *J Acad Nutr Diet***114**, 1009-1022.
20. Martorell R, Ascencio M, Tacsan L *et al.* (2015) Effectiveness evaluation of the food fortification program of Costa Rica: impact on anemia prevalence and hemoglobin concentrations in women and children. *Am J Clin Nutr***101**, 210–217.
21. Steyn NP, Wolmarans P, Nel JH *et al.* (2007) National fortification of staple foods can make a significant contribution to micronutrient intake of South African adults. *Public Health Nutrition***11**, 307–313.
22. Fulgoni VL, Keast DR, Bailey RL *et al.* (2011) Foods, Fortificants, and Supplements: Where Do Americans Get Their Nutrients? *J. Nutr.***141**, 1847–1854.

23. Brazil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011) *Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil, 2008–2009 (Family Budget Survey, 2008–2009)*. Rio de Janeiro: IBGE.
24. World Health Organization (2011) Guideline. *Intermittent iron and folic acid supplementation in menstruating women*. Geneva: WHO.
25. Brazil. Ministry of Health (2011) II Reunião Ordinária da Comissão Interinstitucional para Implementação, Acompanhamento e Monitoramento das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo, Milho e de seus subprodutos. Brasília, 2011. Available online: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/2_reuniao_ordinaria.pdf (accessed September 2015).
26. Germani R, Ascheri JLR, Silva FT *et al.* (2001) Manual de fortificação de farinha de trigo com ferro. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos. Available online: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/manual_fortificacao.pdf (accessed September 2015).
27. Assunção MCF, Santos IS, Barros AJD *et al.* (2012) Flour fortification with iron has no impact on anaemia in urban Brazilian children. *Public Health Nutrition***15**, 1796–1801.
28. Hennessy A, Walton J, Flynn A (2013) The impact of voluntary food fortification on micronutrient intakes and status in European countries: a review. *Proceedings of the Nutrition Society***72**, 433–440.
29. Abtahi M, Neyestani TR, Pouraram H *et al.* (2014) Iron-fortified flour: can it induce lipid peroxidation? *Int J Food Sci Nutr***65**, 649–654.
30. Fulgoni VL, Buckley RB (2015) The Contribution of Fortified Ready-to-Eat Cereal to Vitamin and Mineral Intake in the U.S. Population, NHANES 2007–2010. *Nutrients***7**, 3949–3958.
31. Baltussen R, Knai C, Sharan M (2004) Iron Fortification and Iron Supplementation are Cost-Effective Interventions to Reduce Iron Deficiency in Four Subregions of the World. *J Nutr***134**, 2678–2684.
32. Fiedler JL, Macdonald B (2009) A strategic approach to the unfinished fortification agenda: Feasibility, costs, and cost-effectiveness analysis of fortification programs in 48 countries. *Food and Nutrition Bulletin***30**, 238–316.
33. World Bank (1993) *World Development Report: Investing in Health*. Oxford University Press: New York.

Table 1. Prevalence of inadequate intake of iron in the pre and post-fortification second stage of life and sex. São Paulo, 2008.

Pre-fortification (mg/day)												
Age/sex	EAR	Mean	95% CI	p5	p10	p25	p50	p75	p90	p95	Prevalence of inadequacy (%)	95% CI
Males (years)												
12-13	5.9	5.72	4.88-6.56	3.10	3.60	4.50	5.60	6.80	8.00	8.80	57.00	37.40-76.60
14 -18	7.7	6.68	6.21-7.15	3.50	4.10	5.20	6.50	8.00	9.00	10.50	70.00	60.20-79.80
19-50	6.0	6.99	6.60-7.38	3.90	4.50	5.40	6.80	8.20	9.80	10.80	34.00	28.12-39.88
51 +	6.0	5.69	5.12-6.26	3.10	3.60	4.40	5.60	7.10	8.80	10.10	58.00	48.20-67.80
Females (years)												
12-13	5.7	5.75	4.65-6.85	3.20	3.50	4.30	5.40	6.80	8.40	9.60	56.00	36.40-75.60
14 -18	7.9	5.78	5.21-6.35	3.60	3.90	4.60	5.60	6.70	7.90	8.70	86.00	
19-50	8.1	4.83	4.48-5.18	3.48	3.74	4.20	4.70	5.40	6.00	6.40	92.00	
51 +	5.0	3.91	3.64-4.18	2.21	2.51	3.07	3.78	4.62	5.49	6.06	82.00	78.08-85.92
Post-fortification (mg/day)												
Males (years)												
12-13	5.9	13.16	11.79-14.53	8.30	9.30	10.90	12.90	15.20	17.40	18.70	0.00	0.00-2.06
14 -18	7.7	15.20	14.00-16.40	9.00	10.20	12.20	14.90	17.70	20.90	23.00	1.00	0.00-2.96
19-50	6.0	12.30	11.42-13.18	7.20	8.10	9.80	12.00	14.50	17.10	18.80	1.00	0.00-2.96
51 +	6.0	9.87	9.05-10.69	6.00	6.70	8.00	9.60	11.50	13.30	14.50	5.00	0.00-10.88
Females (years)												
12-13	5.7	12.70	10.58-14.82	7.60	8.50	10.20	12.40	14.90	17.40	19.10	1.00	0.00-2.56
14 -18	7.9	11.27	10.29-12.25	7.30	8.10	9.40	11.10	12.90	14.70	15.80	18.00	
19-50	8.1	9.27	8.64-9.90	7.16	7.57	8.30	9.20	10.15	11.10	11.60	34.00	
51 +	5.0	7.81	7.32-8.30	5.20	5.70	6.60	7.70	8.90	10.10	11.00	3.00	0.00-8.88

Table 2. Food contributors to total intake of iron in the pre-fortification period according to life stage. São Paulo, 2003.

Pre-fortification																		
9-13 y					14-18y					19-50y					51y and +			
Rank	Food	Percentage (%)			Rank	Food	Percentage (%)			Rank	Food	Percentage (%)			Rank	Food	Percentage (%)	
		Median (g)	Relative	Cumulative			Median (g)	Relative	Cumulative			Median (g)	Relative	Cumulative			Median (g)	Cumulative
1	Beans	86.0	22.3	22.3	1	Beef	99.2	26.6	26.6	1	Beef	100.0	29.7	29.7	1	Beef	80.0	27.0
2	Beef	70.0	21.1	43.4	2	Beans	86.0	26.2	52.8	2	Beans	86.0	22.8	52.5	2	Beans	86.0	51.1
3	Dairy	25.0	9.7	53.1	3	Vegetables	18.0	6.2	59.0	3	Vegetables	20.0	7.8	60.3	3	Vegetables	20.0	61.7
4	Vegetables	10.0	5.3	58.4	4	Dairy	25.0	5.7	64.7	4	Processed meat and sausages	45.0	4.6	64.9	4	Fruits and juices	101.0	67.0
5	Cereals	1.8	4.8	63.3	5	Processed meat and sausages	39.1	3.8	68.5	5	Fruits and juices	91.3	3.6	68.5	5	Poultry	60.0	71.1
6	Processed meat and sausages	30.0	4.4	67.7	6	Poultry	51.0	3.7	72.1	6	Poultry	60.0	3.5	72.1	6	Processed meat and sausages	40.0	74.6
7	Candies	11.3	4.0	71.7	7	Fruits and juices	99.4	3.5	75.7	7	Rice	150.0	3.2	75.3	7	Rice	116.3	78.2
8	Poultry	44.3	3.8	75.5	8	Rice	150.0	3.3	79.0	8	Dairy	25.0	2.9	78.2	8	Tuber	62.2	80.8
9	Sauces	20.0	3.2	78.7	9	Candies	15.7	2.9	81.8	9	Tubers	77.3	2.6	80.8	9	Legumes	6.2	83.3
10	Fruits and juices	86.0	3.1	81.8	10	Tubers	78.1	2.6	84.4	10	Candies	16.8	2.2	83.0	10	Cereals	3.0	85.3
11	Rice	125.0	2.8	84.5	11	Sauces	15.0	2.3	86.7	11	Sauces	15.0	2.1	85.1	11	Milk	123.8	87.1
12	Tubers	78.1	2.7	87.3	12	Cereals	1.8	1.7	88.5	12	Flavored drink	10.8	1.9	87.0	12	Candies	15.0	88.7
13	Cheese	22.1	1.6	88.9	13	Cheese	22.0	1.3	89.8	13	Cheese	30.0	1.8	88.8	13	Sauces	13.6	90.3
14	Other flour	8.0	1.6	90.4	14	Snacks	38.0	1.1	90.9	14	Fish and seafood	50.0	1.2	90.1	14	Cheese	30.0	91.6
15	Flavored drink	10.8	1.3	91.7	15	Flavored drink	10.8	1.1	92.0	15	Cereals	1.7	1.0	91.1	15	Fish and seafood	63.6	92.9

Table 3. Food contributors to total intake of iron in the post-fortification period according to life stage. São Paulo, 2008.

Post-fortification																			
9-13 y					14-18y					19-50y					51y and +				
Percentage (%)					Percentage (%)					Percentage (%)					Percentage (%)				
Rank	Food	Median (g)	Relative	Cumulative	Rank	Food	Median (g)	Relative	Cumulative	Rank	Food	Median (g)	Relative	Cumulative	Rank	Food	Median (g)	Relative	Cumulative
1	Bread	50.0	26.6	26.6	1	Bread	50.0	24.9	24.9	1	Bread	50.0	27.0	27.0	1	Bread	50.0	26.4	26.4
2	Biscuit	40.0	13.4	40.0	2	Beef	80.0	16.2	41.1	2	Beef	82.5	15.6	42.5	2	Beef	75.0	15.5	41.9
3	Beef	99.2	13.1	53.0	3	Beans	107.6	11.4	52.5	3	Beans	86.0	12.9	55.4	3	Beans	86.0	14.5	56.3
4	Beans	86.0	11.3	64.3	4	Biscuit	63.0	8.6	61.0	4	Wheat and maize flour	17.5	6.0	61.4	4	Vegetables	20.0	5.7	62.1
5	Wheat and maize flour	18.8	5.8	70.1	5	Wheat and maize flour	19.7	6.8	67.8	5	Biscuit	30.0	5.0	66.4	5	Wheat and maize flour	14.5	5.2	67.3
6	Pastas	150.5	4.0	74.1	6	Dairy	32.0	4.0	71.9	6	Vegetables	20.0	4.8	71.3	6	Fruits and juices	86.0	3.7	71.0
7	Dairy	32.0	3.9	78.0	7	Pastas	100.4	3.9	75.8	7	Pastas	96.7	4.4	75.7	7	Pastas	81.0	3.5	74.4
8	Vegetables	14.4	2.9	80.9	8	Vegetables	16.7	3.1	78.9	8	Poultry	70.0	2.8	78.5	8	Biscuit	24.0	3.3	77.8
9	Processed meat and sausages	38.6	2.5	83.5	9	Processed meat and sausages	38.6	2.8	81.7	9	Processed meat and sausages	34.0	2.8	81.3	9	Poultry	65.0	2.6	80.3
10	Candies	20.0	2.0	85.4	10	Candies	15.0	2.0	83.6	10	Dairy	32.0	2.2	83.4	10	Processed meat and sausages	31.0	2.1	82.4
11	Pork	37.9	1.6	87.0	11	Poultry	75.0	1.9	85.5	11	Fruits and juices	80.4	2.1	85.5	11	Rice	119.3	1.9	84.4
12	Fruits and juices	54.0	1.5	88.6	12	Fruits and juices	55.8	1.6	87.1	12	Rice	124.0	1.7	87.2	12	Tuber	60.0	1.2	85.5
13	Poultry	55.0	1.4	90.0	13	Rice	150.0	1.3	88.4	13	Candies	14.7	1.4	88.6	13	Pork	32.0	1.6	87.1
14	Rice	125.0	1.4	91.4	14	Tubers	85.6	1.3	89.6	14	Sauces	11.9	1.4	90.0	14	Candies	14.7	1.3	88.4
15	Other flour	12.2	1.3	92.7	15	Cereals	2.0	1.2	90.8	15	Tubers	81.9	1.4	91.4	15	Cereals	3.8	1.2	89.6

5.2 SEGUNDO MANUSCRITO

Influence of dietary haem, nonhaem iron, and total iron intake on the presence of metabolic syndrome and its components: a population-based study

Artigo submetido ao periódico British Journal of Nutrition

Diva Aliete dos Santos Vieira¹

Cristiane Hermes Sales¹

Chester Luiz Galvão Cesar²

Dirce Maria Marchioni¹

Regina Mara Fisberg¹

¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo. Avenida Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, CEP 01246-904, São Paulo, SP – Brazil.

² Department of Epidemiology, School of Public Health, University of Sao Paulo. Avenida Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, CEP 01246-904, São Paulo, SP – Brazil.

Abstract

Studies suggest that haem, nonhaem iron and total iron intake may be related to non-communicable diseases, especially metabolic syndrome. This study aimed to investigate the association of haem, nonhaem iron and total iron intake with metabolic syndrome and its components. A cross-sectional population-based survey was performed in 2008, enrolling 591 adults and elderly adults living in the urban areas of São Paulo, Brazil. Dietary intake was measured by two 24-hour dietary recalls. The nutrients were adjusted for total energy intake and the usual intake was estimated using the Multiple Source Method. Metabolic syndrome was defined as the presence of at least three of the following: hypertension, hyperglycaemia, dyslipidaemia and central obesity. The association between haem, nonhaem iron and total iron intake, and metabolic syndrome and its components was evaluated using multiple logistic regression. All analyses considered the complexity of the sample design. After adjustment for potential confounders, higher haem iron intake (OR=2.39, 95% CI=1.10–5.21) was positively associated with metabolic syndrome and with elevated triglyceride levels (OR=2.51, 95% CI=1.06–5.91). Higher total iron intake (OR=3.98, 95% CI=1.21–13.12) was positively associated with hyperglycaemia. Nonhaem iron intake (OR=2.92, 95% CI=1.10–7.72) was positively associated with hyperglycaemia in the fourth quintile. This study suggests that the different types of dietary iron are associated with metabolic syndrome, elevated triglyceride levels and hyperglycaemia. In addition, it emphasises the importance of investigating the roles of dietary haem, nonhaem iron and total iron intake in health outcomes, since their consumption may have different impacts on health.

Keywords: Iron intake, epidemiologic surveys, nutritional assessment, metabolic syndrome.

Introduction

Studies indicate that consumption of haem and nonhaem iron may be related to the risk of developing metabolic syndrome (MetS), hyperglycaemia and alterations in lipid metabolism⁽¹⁻³⁾. MetS is a set of risk factors that are interrelated in the pathogenesis of cardiovascular disease and type 2 diabetes⁽⁴⁾, which are major causes of morbidity and mortality worldwide⁽⁵⁾.

Since these diseases are preventable and diet is among their predisposing factors, identification of nutritional factors that may be associated with increased risk of developing MetS is relevant to public health. Iron overload has been linked to the formation of reactive oxygen species, especially via the Fenton reaction, that may lead to DNA damage and lipid peroxidation. These conditions have been related to the development of cardiovascular diseases, cancers, and type 2 diabetes^(6,7).

Haem and nonhaem iron present differences in absorption, metabolism, bioavailability and food sources, and the investigation of these different types of iron in MetS may help to clarify their role in shaping different health outcomes. To our knowledge, no published study has examined the influence of haem and nonhaem iron, separately, on MetS and its components. Therefore, the aim of this study was to investigate the association of dietary haem, nonhaem iron and total iron intake, with MetS and its components.

Methods

Study population

Data were collected from the 2008 Health Survey of São Paulo (“Inquérito de Saúde de São Paulo”; ISA-Capital), a cross-sectional population-based survey conducted in São Paulo, Brazil. São Paulo City is a major financial and commercial centre and the most populous city of Latin America, with an estimated eleven million inhabitants in 2008. In this survey,

information about health, nutrition, and living conditions of a section of the population was collected.

The sample was recruited in two stages. In the first stage, 70 census tracts were randomly selected from 267 urban census tracts in the city of São Paulo as the primary sampling units. In the second stage, households were randomly selected within these census tracts, considering different probabilities of selection for each domain: (1) infants (< 1-year old; both genders); (2) children (1–11 y; both genders); (3) male adolescent (12–19 y); (4) female adolescent (12–19 y); (5) male adults (20–59 y); (6) female adults (20–59 y); (7) male elderly (≥ 60 y); and (8) female elderly (≥ 60 y). A sample size of 300 in each domain was estimated to be the minimum, based on a prevalence of 0.5 with a standard error of 0.07 at a 5% significance level and a design effect of 1.5. Nutritional and biochemical data were collected from a subsample of adults and elderly adults of both genders. In this study, the sample comprised 591 individuals: 301 adults and 290 elderly adults.

The Ethics Committee of the Public Health School of the University of São Paulo approved this survey (protocol # 26800414.1.0000.5421). Written informed consent was obtained from all individuals.

Dietary assessment

Two 24-hour dietary recalls (24HR) were collected from each individual by trained interviewers. The first was collected in the home and the second over telephone. These 24HRs were collected using the Multiple-Pass Method⁽⁸⁾ and Automated Multiple-Pass Method⁽⁹⁾, respectively, on non-consecutive days, regardless of day of the week and season.

The information generated from the 24HR was used to assess intake of iron and others nutrients. The nutrients were estimated using Nutrition Data System for Research software, version 2007 (NDS-R, Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). This software has the United States Department of Agriculture Food Composition

Table as the primary database⁽¹⁰⁾. The nutritional values of the food, as derived from NDS-R, were compared with those in the Brazilian Food Composition Table, and the iron content was corrected where it showed differences. Haem iron was estimated as 40% of the total iron from beef, fish and poultry⁽¹¹⁾, and nonhaem iron was calculated as the difference between total iron and haem iron.

Metabolic Syndrome assessment

During the study, a trained nursing technician collected 12-hour fasting blood samples and recorded blood pressure and anthropometric measurements of the individuals in the household, following standardised protocols.

Blood pressure was measured according to the Fifth Brazilian Guidelines for Hypertension⁽¹²⁾ using a validated oscillometer (Omron®, model HEM-712 C, Omron Health Care, Inc, Lake Forest, IL, USA). Waist circumference (WC) was measured in duplicate using a flexible, inelastic tape measure positioned midway between the last rib and the iliac crest.

Fasting plasma glucose levels were analysed using the enzymatic method of glucose oxidase (Glucose Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) using an automated system (LabMax 240, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). Plasma triglyceride and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) levels were measured with the Roche Modular Auto Analyzer using the colourimetric-enzymatic method (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

MetS was identified by the presence of at least three of the following metabolic abnormalities: (1) increased waist circumference ($WC \geq 90$ cm for men and $WC \geq 80$ cm for women), (2) elevated triglyceride levels (triglycerides ≥ 150 mg/dL) or use of hypolipidaemic drugs, (3) reduced HDL-c levels ($HDL-c < 40$ mg/dL for men and < 50 mg/dL for women) or use of hypolipidaemic drugs, (4) high blood pressure (systolic blood pressure ≥ 130 mm Hg and/or diastolic blood pressure ≥ 85 mm Hg) or use of antihypertensive drugs, and (5) high fasting glucose levels (≥ 100 mg/dL) or use of hypoglycaemic drugs⁽⁴⁾.

Other covariates

A structured questionnaire was used to gather information on socio-demographics (gender, age, self-reported skin colour, household *per capita* income), and lifestyle characteristics (smoking habits, alcohol consumption and physical activity). Household *per capita* income was calculated by summing the monetary income reported and dividing by the number of all family members (R\$ 1.00 = US\$ 1.83, in 2008). Smoking status was ascertained from questions about current or past smoking and the number of cigarettes smoked per day. Alcohol consumption was assessed from information about amount, frequency and preferences. The International Physical Activity Questionnaire-long form was used to collect data on physical activity⁽¹³⁾ and information from the leisure domain of the questionnaire was used to classify the level of physical activity. Body mass index (BMI) was calculated using the Quetelet equation ($\text{BMI} = \text{weight (kg)} / \text{height (m)}^2$), from data measured by trained nurses in the home. The C-reactive protein (CRP) level was measured by kinetic turbidimetry, using the IMMAGE® immunochemistry system kit (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). The misreporting percentage of each individual's energy needs was determined thus: $(\text{Total energy intake} - \text{EER (estimated energy requirements)}) / \text{EER} \times 100$ ⁽¹⁴⁾. These variables were used as potential confounders in the analytical models.

Statistical analysis

Subject characteristics were presented as medians and interquartile ranges (IQR) for continuous variables, and as percentages for categorical variables. The nutrients were adjusted for total energy intake using a nutrient residual model⁽¹⁵⁾, and usual intake was estimated using the Multiple Source Method (MSM)⁽¹⁶⁾. Dietary intakes of haem, nonhaem iron, and total iron were classified into quintiles. The association between the quintile categories of haem, nonhaem iron and total iron intakes with MetS and its components was analysed using logistic regression models. The analyses were adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption,

household *per capita* income, BMI, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, misreporting, and intakes of total energy, saturated fat, fibre and vitamin C. Haem and nonhaem iron were mutually adjusted. The Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test was used to assess model fit. All analyses considered the complexity of the sample design and were performed with Stata Statistical Software, Release 13 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Results

The sample consisted of 591 individuals of whom 80.80% were adults, 53.92% were women, 60.88% self-reported their skin colour as white, 58.85% self-reported never having smoked, 51.88% were alcohol consumers, and 88.52% had insufficient leisure time physical activity. The median household *per capita* income was 274.87 (IQR 159.03–471.20) US\$ *per* month and the median BMI was 25.61 (IQR 22.96–29.53) kg/m².

Thirty-two percent of these individuals were classified with MetS. Considering the components of MetS separately, 66.02% of the individuals had increased WC, 41.54% reduced HDL-c, 31.01% elevated triglyceride levels, 43.30% hypertension, and 11.23% hyperglycaemia.

In crude models, higher intakes of haem iron (fifth quintile) (OR=2.13, 95% CI=1.01–4.52) were positively associated with MetS, and there was a negative association between the fourth quintiles of total iron intake (OR=0.57, 95% CI=0.32–0.99) and MetS. After further adjustment for potential confounders, only higher haem iron intakes (OR=2.39, 95% CI=1.10–5.21) were found to be positively associated with MetS when compared to the first quintile (Table 3).

Considering the components of MetS separately, crude models showed positive associations between the fifth quintile of total iron intake (OR=4.59, 95% CI=1.71–12.29) and the fourth quintile of nonhaem iron intake (OR=2.86, 95% CI=1.19–6.89) with hyperglycaemia,

and between the fifth quintile of haem iron intake (OR=2.73, 95% CI=1.25–5.96) and elevated triglyceride levels. After further adjustment for potential confounders, higher haem iron intakes (OR=2.51, 95% CI=1.06–5.91) were positively associated with elevated triglyceride levels. Higher total iron intake (OR=3.98, 95% CI=1.21–13.12) was positively associated with hyperglycaemia. Nonhaem iron intake (OR=2.92, 95% CI=1.10–7.72) was positively associated with hyperglycaemia in the second and fourth quintile (Table 2).

Discussion

To our knowledge, this is the first population-based study examining associations between haem, nonhaem iron, and total iron intakes, and MetS and its components. Our results suggest that haem iron intake is positively associated with MetS and with elevated triglyceride levels, and nonhaem iron and total iron intakes are positively associated with hyperglycaemia.

Epidemiological studies have associated haem iron intake and cardiovascular diseases⁽¹⁷⁾, MetS⁽²⁾ and type 2 diabetes⁽¹⁸⁾. However, the aetiology of the association is not well understood. Haem iron has higher bioavailability compared to nonhaem iron, and the main source is dietary red meat. Haem is an important prosthetic group present in many proteins which are essential for life. However, it can be harmful in excess due to its high toxicity^(19,20).

De Oliveira Otto *et al.*⁽²⁾, when investigating associations of iron and others micronutrients with the incidence of MetS in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, found that intakes of haem and haem iron from red meat were positively associated with the risk of MetS, results similar to those found in this study. Higher haem iron intake may lead to overload, and its excess may promote lipid peroxidation and reactive oxygen species, and stimulate the production of inflammatory mediators⁽²⁰⁾, conditions associated with MetS⁽²¹⁾.

The mechanisms underlying the relationship between haem iron intake and elevated triglyceride levels are unclear. However, we hypothesize that higher haem iron intake might increase the risk of haem overload, which can promote generation of free radicals and

inflammation⁽²⁰⁾, which are causally involved in insulin resistance. In hyperinsulinaemia or insulin resistance states, there may be reduced insulin-mediated suppression of hormone-sensitive lipase, an enzyme responsible for triglyceride mobilization. In these conditions, intracellular lipolysis is increased leading to elevated circulating levels of free fatty acids and their increased transport to the liver. This increase in the levels of hepatic free fatty acids stimulates the production of triglyceride-rich lipoprotein and very low-density lipoprotein in the liver and in intestinal chylomicrons⁽²²⁻²⁴⁾. Thus, our findings are consistent with previous studies that showed an association between red meat intake (the main source of haem iron) and elevated triglyceride levels⁽²⁵⁻²⁷⁾.

A positive association between hyperglycaemia and nonhaem iron was observed in the second and fourth quintiles. Individuals classified into these consumption quintiles showed lower bean intake when compared to other quintiles (data not shown). Nonhaem iron is present in different foods from plant and animal sources. In Brazil, after the mandatory iron fortification policy implemented in 2004, wheat and maize flour have become important vehicles for iron. As nonhaem iron is present in foods that may be beneficial in the prevention and treatment of non-communicable diseases, such as dark green leafy vegetables and beans, the effect of this nutrient may be attenuated by the presence of other components in these foods.

Several studies have shown the effect of consumption of beans on the glycaemic response in different populations⁽²⁸⁾. Possible explanations for the protective role of beans in the glycaemic response are the high content of fibre and protein, low glycaemic index, high amylose starch and antinutrients. These factors, singly or in association with others, act by delaying gastric emptying, thus reducing the glycaemic response⁽²⁸⁾. Therefore, a greater consumption of beans is probably protective against the deleterious effects of iron on the glycaemic response.

An association between total iron intake and the increased risk of hyperglycaemia has been found in a prospective study and a cross-sectional household survey^(1,29). According to Fernández-Real, McClain and Manco⁽³⁰⁾ iron overload promotes changes in glucose metabolism, causing hyperinsulinaemia either by decreased extraction of insulin or by impaired insulin signalling. Choi *et al.*⁽³⁾ observed that mice on a high-iron diet showed hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and insulin resistance, as well as harmful effects on fatty acid and glucose metabolism.

The different effects of haem and nonhaem iron that we found in this study can be attributed to differences in metabolism, bioavailability and food source. The present study has some limitations that should be considered. The cross-sectional design does not permit inference of causality between exposure and outcome. Despite adjusting for known confounders, residual confounding cannot be excluded from our findings. Another limitation of the study is inherent to the dietary intake evaluation methods; however, care was taken to minimize biases, such as by applying two 24HRs, using the MSM to estimate usual intake, and correcting iron intake data from the Brazilian Food Composition Table.

In conclusion, this study suggests that higher haem iron intake is positively associated with MetS and elevated triglyceride levels, while higher nonhaem and total iron intakes are positively associated with hyperglycaemia. In addition, this study stresses the importance of investigating the different types of dietary iron in relation to health outcomes, since their consumption may have different impacts on health.

References

1. Shi Z, Zhou M, Yuan B et al. (2010) Iron intake and body iron stores, anaemia and risk of hyperglycaemia among Chinese adults: the prospective Jiangsu Nutrition Study (JIN). *Public Health Nutr* **13**, 1319–1327.
2. de Oliveira Otto MC, Alonso A, Lee DH et al. (2012) Dietary intakes of zinc and heme iron from red meat, but not from other sources, are associated with greater risk of metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Nutr* **142**, 526–533.
3. Choi JS, Koh IU, Lee HJ et al. (2013) Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* **24**, 1634–1644.
4. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM et al. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640–1645.
5. World Health Organization (2014) Global status report on noncommunicable diseases 2014. Available on http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf.
6. Jomovaa K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**, 65–87.
7. Simcox JA, McClain DA (2013) Iron and diabetes risk. *Cell Metab* **17**, 329–341.
8. Guenther PM, DeMaio TJ, Ingwersen LA et al. (1995) The multiple-pass approach for the 24 hour recall in the Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1994–1996. Presented at the International Conference on Dietary Assessment Methods; Boston, Mass.
9. Blanton CA, Moshfegh AJ, Baer DJ et al. (2006) The USDA Automated Multiple-Pass Method accurately estimates group total energy and nutrient intake. *J Nutr* **136**, 2594–2599.
10. Raper N, Perloff B, Ingwersen L et al. (2004) An overview of USDA's Dietary Intake Data System. *J Food Compos Anal* **17**, 545–555.
11. Monsen ER, Hallberg L, Layrisse M et al. (1978) Estimation of available dietary Fe. *Am J Clin Nutr* **31**, 134–41.
12. Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. *Arq Bras Cardiol* **89**, e24–e79.
13. Matsudo S, Araujo T, Matsudo V et al. (2001) Questionario Internacional de Atividade Fisica (IPAQ): Estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Atividade Física & Saúde* **6**, 5–18.
14. Kelly MT, Rennie KL, Wallace JM et al. (2009) Associations between the portion sizes of food groups consumed and measures of adiposity in the British National Diet and Nutrition Survey. *Br J Nutr* **101**, 1413–1420.
15. Willett WC, Howe GR, Kushi LW (1997) Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **65**, 1220S–1228S.
16. German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke (Dife) (2012). Department of Epidemiology. The Multiple Source Method (MSM). Version 1.0.1. Available from: <https://nugo.dife.de/msm>.
17. Fang X, An P, Wang H et al. (2015) Dietary intake of heme iron and risk of cardiovascular disease: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **25**, 24–35.

18. Zhao Z, Li S, Liu G et al. (2012) Body iron stores and heme-iron intake in relation to risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* **7**, 1–17.
19. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V et al. (2014) Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol* **5**, 1-24.
20. Dutra FF, Bozza MT (2014) Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* **5**, 1-20.
21. Grundy SM (2016) Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med* **26**, 364-73.
22. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K et al. (2002) Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rver* **23**, 201–229.
23. Duez H, Lamarche B, Valéro R et al. (2008) Both intestinal and hepatic lipoprotein production are stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in humans. *Circulation* **117**, 2369–2376.
24. Lewis GF, Xiao C, Hegele RA (2015) Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr Rver* **36**, 131–147.
25. Azadbakht L, Esmailzadeh A (2009) Red meat intake is associated with metabolic syndrome and the plasma C-reactive protein concentration in women. *J Nutr* **139**, 335–339.
26. Cocate PG, Natali AJ, de Oliveira A et al. (2015) Red but not white meat consumption is associated with metabolic syndrome, insulin resistance and lipid peroxidation in Brazilian middle-aged men. *Eur J Prev Cardiol* **22**, 223-30.
27. Becerra-Tomás N, Babio N, Martínez-González MA et al. (2016) Replacing red meat and processed red meat for white meat, fish, legumes or eggs is associated with lower risk of incidence of metabolic syndrome. *Clin Nutr* Published online: 31 March 2016. Doi: 10.1016/j.clnu.2016.03.017.
28. Hutchins AM, Winham DM, Thompson SV (2012) Phaseolus beans: impact on glycaemic response and chronic disease risk in human subjects. *Br J Nutr* **108**, S52–S65.
29. Shi Z, Hu X, Yuan B et al. (2006) Association between serum ferritin, hemoglobin, iron intake, and diabetes in adults in Jiangsu, China. *Diabetes Care* **29**, 1878–1883.
30. Fernández-Real JM, McClain D, Manco M (2015) Mechanisms linking glucose homeostasis and iron metabolism toward the onset and progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **38**, 2169-2175.

Table 1. Association between quintiles of iron intake (haem, nonhaem and total) and metabolic syndrome in ISA-Capital. São Paulo, Brazil, 2008.

	Quintiles of iron intake by class, OR (95% CI)					<i>p</i> for trend
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	
Haem iron						
Dietary intake (mg/d)	0.56	0.74	0.91	1.12	1.40	
Crude	1.00	1.74 (0.92–3.29)	1.35(0.69–2.64)	0.88 (0.40–1.93)	2.13 (1.01–4.52)	0.375
Model adjusted*	1.00	1.98 (0.93–4.21)	2.03 (0.94–4.39)	1.17 (0.45–3.07)	2.39 (1.10–5.21)	0.228
Nonhaem iron						
Dietary intake (mg/d)	7.29	8.50	9.14	9.88	11.04	
Crude	1.00	0.98 (0.42–2.26)	1.00 (0.48–2.08)	0.89 (0.49–1.64)	0.98 (0.47–1.64)	0.856
Model adjusted*	1.00	1.02 (0.40–2.64)	1.35 (0.53–3.44)	0.87 (0.44–1.71)	1.05 (0.44–2.48)	0.945
Total iron						
Dietary intake (mg/d)	8.29	9.37	10.14	10.87	11.97	
Crude	1.00	0.94 (0.42–2.08)	1.21 (0.61–2.39)	0.57 (0.32–0.99)	1.18 (0.55–2.41)	0.947
Model adjusted*	1.00	0.83 (0.36–2.70)	1.34 (0.63–2.84)	0.52 (0.26–1.04)	1.14 (0.54–2.40)	0.891

*Adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption, household *per capita* income, BMI, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, total energy intake, misreporting, saturated fat and vitamin C intakes. Haem and nonhaem iron were mutually adjusted.

Table 2. Association between quintiles of iron intake (haem, nonhaem and total) and components of metabolic syndrome in ISA-Capital. São Paulo, Brazil, 2008.

	Quintiles of iron intake by class, OR (95% CI)					<i>p</i> for trend
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	
<i>Hypertension or hypertensive drug therapy for hypertension</i>						
Haem iron						
Crude	1.00	1.63 (0.90–2.96)	1.27 (0.60–2.71)	1.55 (0.74–3.23)	1.51 (0.78–2.93)	0.345
Model adjusted*	1.00	1.72 (0.77–3.82)	1.39 (0.60–3.21)	2.14 (0.97–4.72)	1.59 (0.73–3.49)	0.183
Nonhaem iron						
Crude	1.00	0.96 (0.51–1.77)	0.78 (0.39–1.57)	0.99 (0.51–1.93)	0.54 (0.24–1.26)	0.226
Model adjusted†	1.00	0.73 (0.33–1.63)	0.65 (0.28–1.51)	0.78 (0.34–1.81)	0.40 (0.15–1.10)	0.135
Total iron						
Crude	1.00	1.21 (0.71–2.05)	1.14 (0.55–2.39)	0.66 (0.31–1.39)	0.79 (0.37–1.68)	0.279
Model adjusted‡	1.00	0.85 (0.43–1.66)	0.93 (0.40–2.16)	0.51 (0.21–1.29)	0.57 (0.24–1.39)	0.154
<i>Hyperglycaemia or therapy for elevated glucose</i>						
Haem iron						
Crude	1.00	1.49 (0.69–3.22)	1.94 (0.76–4.99)	0.61 (0.23–1.59)	1.84 (0.75–4.54)	0.660
Model adjusted*	1.00	1.56 (0.56–4.34)	2.53 (0.98–6.57)	0.66 (0.18–2.33)	1.65 (0.63–4.33)	0.746
Nonhaem iron						
Crude	1.00	2.87 (0.96–8.57)	1.78 (0.56–5.63)	2.86 (1.19–6.89)	2.87 (0.99–8.36)	0.070
Model adjusted†	1.00	3.21 (1.11–9.27)	1.93 (0.60–6.26)	2.92 (1.10–7.72)	2.56 (0.83–7.93)	0.183
Total iron						
Crude	1.00	3.64 (1.27–10.44)	1.89 (0.64–5.57)	1.86 (0.76–4.50)	4.59 (1.71–12.29)	0.036
Model adjusted‡	1.00	3.50 (1.28–9.61)	1.75 (0.56–5.43)	1.49 (0.54–4.11)	3.98 (1.21–13.12)	0.131
<i>Elevated triglycerides or therapy for elevated triglycerides</i>						
Haem iron						
Crude	1.00	2.04 (0.92–4.52)	1.46 (0.81–2.63)	1.42 (0.70–2.90)	2.73 (1.25–5.96)	0.060
Model adjusted*	1.00	2.75 (1.13–6.73)	1.87 (0.95–3.66)	1.64 (0.77–3.50)	2.51 (1.06–5.91)	0.139
Nonhaem iron						
Crude	1.00	1.47 (0.77–2.81)	1.54 (0.79–3.01)	1.17 (0.63–2.15)	1.16 (0.52–2.58)	0.852

Model adjusted†	1.00	1.51 (0.71–3.18)	1.78 (0.85–3.72)	0.94 (0.44–2.03)	0.88 (0.31–2.47)	0.554
Total iron						
Crude	1.00	1.11 (0.51–2.43)	1.70 (0.88–3.27)	1.03 (0.54–2.00)	1.19 (0.55–2.56)	0.700
Model adjusted‡	1.00	1.22 (0.54–2.76)	1.95 (1.00–3.86)	0.97 (0.43–2.18)	0.99 (0.43–2.28)	0.821
Reduced HDL-c						
Haem iron						
Crude	1.00	1.27 (0.64–2.52)	0.88 (0.42–1.85)	0.81 (0.33–1.95)	1.70 (0.82–3.50)	0.506
Model adjusted*	1.00	1.22 (0.56–2.66)	1.15 (0.46–2.87)	1.06 (0.41–2.78)	2.09 (0.88–4.94)	0.189
Nonhaem iron						
Crude	1.00	0.71 (0.30–1.66)	0.73 (0.38–1.39)	0.89 (0.42–1.89)	1.26 (0.65–2.47)	0.477
Model adjusted†	1.00	0.68 (0.30–1.54)	0.67 (0.37–1.21)	0.87 (0.36–2.2)	1.16 (0.53–2.55)	0.641
Total iron						
Crude	1.00	0.55 (0.25–1.19)	0.68 (0.37–1.27)	0.65 (0.32–1.33)	1.21 (0.61–2.41)	0.604
Model adjusted‡	1.00	0.50 (0.24–1.06)	0.58 (0.31–1.09)	0.57 (0.25–1.32)	1.16 (0.51–2.63)	0.746
Increased waist circumference						
Haem iron						
Crude	1.00	1.72 (0.62–4.79)	0.99 (0.50–1.98)	0.85 (0.35–2.07)	1.14 (0.50–2.61)	0.650
Model adjusted§	1.00	1.61 (0.56–4.62)	1.18 (0.55–2.53)	0.95 (0.36–2.48)	0.99 (0.39–2.54)	0.644
Nonhaem iron						
Crude	1.00	1.51 (0.67–3.41)	1.04 (0.56–1.93)	1.39 (0.79–2.45)	1.29 (0.56–2.97)	0.555
Model adjusted	1.00	1.38 (0.48–3.93)	1.03 (0.43–2.49)	1.39 (0.68–2.83)	1.23 (0.47–3.20)	0.659
Total iron						
Crude	1.00	1.42 (0.62–3.24)	0.94 (0.49–1.78)	1.31 (0.71–2.40)	1.42 (0.63–3.20)	0.426
Model adjusted¶	1.00	0.97 (0.38–2.49)	0.72 (0.30–1.73)	1.25 (0.58–2.71)	1.00 (0.39–2.56)	0.837

*Adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption, household *per capita* income, BMI, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, total energy intake, misreporting, saturated fat, vitamin C and nonhaem iron intakes.

†Adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption, household *per capita* income, BMI, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, total energy intake, misreporting, saturated fat, fibre, vitamin C and haem iron intakes.

‡Adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption, household *per capita* income, BMI, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, total energy intake, misreporting, saturated fat, fibre, vitamin C intakes.

§Adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption, household *per capita* income, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, total energy intake, misreporting, saturated fat, vitamin C and nonhaem iron intakes.

||Adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption, household *per capita* income, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, total energy intake, misreporting, saturated fat, fibre, vitamin C and haem iron intakes.

¶Adjusted for physical activity, gender, alcohol consumption, household *per capita* income, high-sensitivity C-reactive protein, age, smoking status, race, total energy intake, misreporting, saturated fat, fibre and vitamin C intakes.

5.3 TERCEIRO MANUSCRITO

O papel da ingestão de ferro na resistência à insulina mediado pela interleucina-6: uma abordagem por modelos de equação estrutural

Artigo será submetido ao periódico Diabetologia

Diva Aliete dos Santos Vieira¹

Michelle Alessandra de Castro¹

Dirce Maria Marchioni¹

Regina Mara Fisberg¹

¹ Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Avenida Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, CEP 01246-904, São Paulo, SP – Brasil.

Resumo

Objetivo: Avaliar o papel da ingestão do ferro heme, não heme e total na resistência à insulina e possíveis papéis dos mediadores IL-6, malondialdeído e leptina.

Métodos: Foram utilizados os dados do estudo transversal de base populacional ISA-Capital 2008. Avaliou-se dados de 202 adultos de ambos os sexos residentes da área urbana do município de São Paulo, Brasil. A ingestão de ferro foi avaliada por meio de dois recordatórios de 24 horas aplicados em dias não consecutivos. O ferro heme foi estimado como 40% do total de ferro proveniente de carne bovina, peixe e aves e o ferro não heme foi calculado com a diferença entre o ferro total e o ferro heme. A ingestão habitual de ferro, gordura saturada e energia foram estimadas pelo *Multiple Source Method* e ajustado pela energia por meio do método de resíduos. Foram analisados glicemia plasmática de jejum, insulina sérica de jejum, malondialdeído, IL-6 e leptina sérica. A resistência à insulina foi estimada indiretamente usando o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR). Para investigar a associação entre a ingestão dos diferentes tipos de ferro proveniente da dieta (heme, não heme e total) e o HOMA-IR foram utilizados modelos de equações estruturais (MEE).

Resultados: A ingestão de ferro heme, não heme e total tiveram um efeito direto e positivamente associados às concentrações de interleucina-6 ($\beta = 0,174$; $p = 0,026$) e negativamente associados às concentrações de malondialdeído ($\beta = -0,160$; $p = 0,009$). Observou-se um efeito indireto positivo da ingestão de ferro na resistência à insulina, mediada pela IL-6 ($\beta = 0,061$; $p = 0,042$), independente do tipo de ferro avaliado.

Conclusão: A ingestão de ferro heme, não heme e total estão associadas a resistência à insulina, mediada pela IL-6. Estes resultados sugerem que o metabolismo do ferro tem um importante papel na modulação da inflamação e resistência à insulina.

Palavras-chave: ingestão de ferro, resistência à insulina, inflamação, peroxidação lipídica, modelos de equação estrutural.

Introdução

O ferro é um mineral que atua em importantes vias metabólicas, sendo cofator de enzimas da cadeia respiratória, participando do transporte de oxigênio, síntese de DNA e produção de energia [1]. Revisões sistemáticas e meta-análises evidenciaram que a maior ingestão de ferro heme e maiores estoques de ferro no organismo foram significativamente associados a maior risco de diabetes *mellitus* tipo 2 [2,3]. Posteriormente, estudos prospectivos também identificaram associação entre o excesso de ferro corporal e o risco de diabetes *mellitus* tipo 2 e resistência à insulina [4,5]. Apesar dos achados, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na relação entre ferro e o risco para diabetes *mellitus* tipo 2 ainda não foram completamente elucidados [6].

A sobrecarga de ferro no organismo tem sido associada à formação de espécies reativas de oxigênio que podem causar resistência à insulina por diminuição da expressão do gene da insulina nas células- β pancreáticas. Tal diminuição deve-se à redução da expressão de fatores de transcrição ligados ao DNA, como o fator de transcrição FOXO1 que tem papel fundamental na apoptose, proliferação e diferenciação celular, e no metabolismo da glicose [7]. Além disso, as espécies reativas de oxigênio provocam peroxidação lipídica, que tem como produto final o malondialdeído (MDA) que é comumente utilizado para a avaliação de danos do estresse oxidativo [8].

Alguns estudos sugerem que desordens no metabolismo de ferro afetam principalmente o tecido adiposo. Dietas ricas em ferro foram associadas à hiperplasia e hipertrofia no tecido adiposo visceral [9] e a restrição da ingestão desse micronutriente levou a uma menor infiltração de macrófagos e neutrófilos no tecido adiposo e, conseqüentemente menor produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) [10]. Os adipócitos respondem ao ferro disponível modulando a expressão de leptina, hormônio envolvido na regulação do apetite, homeostase de energia e no metabolismo da glicose [11,12]. Alterações nas concentrações de

IL-6 e leptina estão diretamente envolvidas na resistência à insulina, já que estão associadas ao comprometimento da capacidade adipogênica de pré-adipócitos e prejuízo na sinalização em resposta à liberação da insulina [13,14].

A etiologia da resistência à insulina é complexa, de causa multifatorial e um importante fator no desenvolvimento de inúmeras DCNT, entre elas o diabetes *mellitus* tipo 2. A investigação dos mecanismos que estão associados à resistência à insulina é de fundamental importância para o desenvolvimento de terapias de sensibilização à insulina, e consequente atenuação da epidemia do diabetes, importante causa de óbitos no mundo [15, 16].

A associação entre o risco de diabetes *mellitus* tipo 2 e a ingestão de ferro total, heme e não heme vêm sendo discutida em meta-análises [2,3]. Observou-se que a maior ingestão de ferro heme foi associada a maior risco de diabetes *mellitus* tipo 2, no entanto, não foi encontrada associação para ingestão de ferro total, de ferro não heme e suplementação de ferro [2]. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o papel da ingestão do ferro heme, não heme e total na resistência à insulina e possíveis papéis mediadores da IL-6, malondialdeído e leptina.

Metodologia

População de estudo

Foram utilizados os dados do estudo transversal de base populacional “Inquérito de saúde do município de São Paulo” – ISA-Capital 2008. O tamanho amostral foi calculado com o objetivo de otimizar a logística de campo, e manter a representatividade da população do município de São Paulo.

A amostra do estudo ISA-Capital 2008 foi obtida mediante amostragem por conglomerados em dois estágios: setor censitário e domicílio. No primeiro estágio, realizou-se sorteio aleatório simples de 70 setores censitários (unidades primárias de amostragem) dentre os 267 setores pertencentes a amostra da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) da área urbana do município de São Paulo. Planejou-se a realização de cerca de 600

entrevistas para adultos de ambos os sexos. Na primeira fase do estudo, 585 adultos tiveram coletadas as informações dietéticas, socioeconômicas e demográficas.

Durante a segunda fase do estudo, 301 adultos tiveram a primeira e segunda medida dietética coletada e foram aferidas as medidas antropométricas, de pressão arterial e realizada a coleta de sangue. A perda amostral ocorreu devido a recusas ou mudança de endereço/telefone. No entanto, esta ocorreu de forma aleatória no domínio avaliado, sem a ocorrência de viés por perdas diferenciais. No presente estudo foram utilizados apenas os dados dos adultos que participaram da coleta de sangue, com dados bioquímicos completos e que apresentavam relato plausível de energia, obtendo uma amostra final de 202 indivíduos de ambos os sexos.

Todos os participantes concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (C.A.A.E. 26800414.1.0000.5421).

Avaliação dietética

O consumo alimentar foi avaliado por meio de dois recordatórios alimentares de 24 horas. O primeiro foi aplicado durante a primeira visita domiciliar e o segundo via telefone. A aplicação destes seguiram o *Multiple Pass Method* [17] e o *Automated Multiple Pass Method* [18], no qual o entrevistado é conduzido por meio de cinco passos (listagem rápida; revisão preliminar; nomeação das refeições, detalhamento do consumo e revisão final) em processo padronizado, que visa manter o indivíduo interessado e engajado na entrevista, ajudando-o a recordar todos os itens consumidos.

Os alimentos e as preparações culinárias consumidos pelos indivíduos e reportados nos recordatórios foram digitados no *software Nutrition Data System Research* (NDSR, version 2014, Nutrition Coordinating Center [NCC], University of Minnesota, Minneapolis) para

obtenção do valor nutricional de energia, ferro total e outros nutrientes. Após a tabulação dos dados foi realizada análise de consistência dos dados na tentativa de identificar possíveis erros durante a digitação dos dados. O programa NDSR possui como base de dados a tabela norte-americana desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) [19]. A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos [20] foi utilizada para verificar a adequação dos valores nutricionais dos alimentos presentes no *software* e para corrigir os valores de ferro dos alimentos. Os valores de ferro heme foram estimados como 40% do total de ferro proveniente de carne bovina, peixe e aves [21], e o ferro não heme foi calculado com a diferença entre o ferro total e o ferro heme.

Os indivíduos com relato implausível de energia foram identificados segundo Black e colaboradores [22] e classificados como sub-relatores, relatores plausíveis e super-relatores. Os indivíduos sub e super-relatores de energia foram removidos das análises devido à possibilidade de atenuação das medidas de associação entre dieta e desfecho [23].

Atividade física e aferição da circunferência da cintura

A atividade física foi mensurada por meio do IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) versão longa validado no Brasil [24], no qual o entrevistado é questionado sobre a duração, frequência e intensidade da atividade física. No presente estudo utilizou-se o domínio do lazer para classificar os indivíduos em insuficientemente ativos (prática de atividade vigorosa < 3 dias/semana e menos de vinte minutos por sessão ou atividade moderada < 5 dias/semana e menos de trinta minutos por sessão) e suficientemente ativos (prática de atividade vigorosa $\geq$ 3 dias/semana e vinte minutos ou mais por sessão ou atividade moderada $\geq$ 5 dias/semana e trinta minutos ou mais por sessão).

A circunferência da cintura foi aferida utilizando fita métrica inextensível, a qual é posicionada no plano horizontal, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e a

mensuração realizada após a expiração. A aferição foi realizada segundo a metodologia proposta pelo Ministério da Saúde [25].

Dados bioquímicos

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção venosa cubital. Os indivíduos foram orientados a permanecerem 12 horas em jejum, não alterarem a sua alimentação habitual nos dias anteriores a coleta, evitarem fazer atividade física intensa e não ingerirem bebida alcoólica 72 horas antes da coleta.

A glicemia de jejum plasmática foi determinada por método enzimático colorimétrico com a glicose oxidase (Glucose Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) utilizando sistema automatizado (LabMax 240, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). A insulina sérica de jejum foi mensurada utilizando o kit ELISA AccuBind® (Monobind Inc, Lake Forest, CA, USA).

A resistência à insulina foi estimada indiretamente usando o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina – HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of insulin resistance*) proposto por Matthews et al [26]: $HOMA-IR = [insulina\ sérica\ de\ jejum\ (mU/L) \times glicemia\ sérica\ de\ jejum\ (mmol/L)] / 22,5$.

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da dosagem de MDA. O MDA é indicador da ação de radicais livres no organismo, sendo um importante marcador de avaliação do estresse oxidativo celular. A concentração de MDA no plasma foi determinada após a derivatização com ácido tiobarbitúrico e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC/DAD), como descrito por Bastos et al [27] e Hong et al [28].

A inflamação foi avaliada por meio da concentração plasmática de IL-6. A IL-6 foi determinada utilizando o kit MILLIPLEX MAP 13-plex Cytokine Kit (Millipore, Billerica,

MA). E a leptina sérica foi determinada utilizando radioimunoensaio (h-leptin RIA, HL-81 K, Millipore, Saint Charles, MO, USA).

Análise estatística

A análise descritiva dos dados foi realizada no software STATA (Statistics/Data Analysis, version 13.0, Texas, 115 USA). O consumo de ferro total, heme e não heme foi ajustado pela energia pelo método de resíduos [29] e a ingestão habitual de ferro, gordura saturada e energia foram estimadas por técnicas de modelagem estatística incorporadas na plataforma online *Multiple Source Method* (MSM) [30]. Este método permite estimar a ingestão habitual de nutrientes provenientes de dois recordatórios de 24 horas, removendo a variabilidade intrapessoal em três passos. O primeiro passo estima a probabilidade de ingestão do nutriente para cada indivíduo. No segundo, a quantidade habitual da ingestão do nutriente nos dias de consumo é estimada e, no último passo, os números resultantes do passo um e dois são multiplicados para estimar a ingestão diária habitual individual [31].

Para investigar a associação entre a ingestão dos diferentes tipos de ferro proveniente da dieta (heme, não heme e total) e o HOMA-IR foram utilizados modelos de equações estruturais (MEE). Essa técnica multivariada permite compreender melhor as complexas relações entre as múltiplas variáveis estudadas, por meio de procedimentos estatísticos que combinam análise fatorial e de regressão múltipla para investigar, simultaneamente, relações entre variáveis especificadas num modelo teórico [32,33].

Os modelos teóricos foram construídos *a priori*, baseado em evidências científicas e hipóteses fundamentadas na literatura acerca do tema estudado (Figura 1). A hipótese testada é que a ingestão de ferro (heme, não heme e total), e consequentemente maior disponibilidade desse mineral no organismo, pode modular as concentrações de leptina, aumentar a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-6 e de produtos finais da peroxidação lipídica, como MDA. Esses fatores, por sua vez, em concentrações elevadas no organismo podem afetar o

metabolismo da glicose, sinalização da insulina e provocar disfunção das células- β pancreáticas, promovendo resistência à insulina e atuando como mediadores da ingestão do ferro na resistência à insulina.

Os MEE foram mensurados por meio das relações entre as variáveis observadas e o desfecho de interesse, por meio de regressões (setas unidirecionais) e correlações (seta bidirecional) previstas inicialmente nos modelos teóricos. Os modelos foram ajustados pela ingestão habitual de gordura saturada. Os índices de ajustes utilizados para avaliar a qualidade do modelo foram os índices de ajuste absoluto RMSEA (*Root-Mean Square Error of Approximation*) e SRMR (*Standardized Root Mean Square Residual* e os índices de ajuste incremental) e índices de ajuste incremental CFI (*Comparative Fit Index*) e TLI (*Tucker-Lewis Index*). Os modelos foram considerados ajustados quando apresentaram valores de RMSEA < 0,06, SRMR < 0,08, CFI > 0,95 e TLI > 0,95 [34]. O nível de significância considerado foi de 0,05.

As análises foram realizadas no software Mplus versão 7.4. O método de estimação máxima verossimilhança robusta foi utilizado para estimativa dos parâmetros do modelo. Esse método foi escolhido por ser apropriado para dados que não seguem distribuição normal multivariada [33]. Estimativas padronizadas de coeficientes de regressão, coeficientes de correlação, efeitos diretos e indiretos foram apresentadas, bem como os ajustes dos modelos. Os efeitos diretos referem-se as relações que conectam duas variáveis observadas por meio de uma só seta. Os efeitos indiretos são as relações que envolvem uma sequência de relações com pelo menos uma variável observada intermediária. Também foi estimado o efeito direto total, que é a soma dos efeitos diretos e indiretos das relações estudadas e o efeito indireto total, soma dos efeitos indiretos de determinada variável observada no desfecho de interesse, considerado as variáveis intermediárias.

Resultados

A amostra do presente estudo foi composta por 64,85% de mulheres, 55,45% com excesso de peso (sobrepeso e obesidade) e apenas 10,89% suficientemente ativos. A média da circunferência da cintura da população foi de 92,73 cm (DP 14,07 cm), e as médias da ingestão de ferro total, heme e não heme foram, respectivamente, 9,92 mg/dia (DP 1,61 mg/dia), 0,76 mg/dia (DP 0,32 mg/dia) e 9,16 mg/dia (DP 1,59 mg/dia). Em média, a concentração sanguínea de IL-6 nos indivíduos avaliados foi 3,30 pg/mL (DP 7,85 pg/mL), de leptina 19,78 ng/mL (DP 15,87 ng/mL) e de MDA 0,68 mmol/L (DP 0,30 mmol/L). O valor médio de HOMA-IR foi de 3,32 mmol/L* mU/L (DP 5,09 mmol/L* mU/L).

Na Tabela 1 estão apresentadas as estimativas padronizadas dos coeficientes de regressão e correlação dos modelos de equações estruturais em que foram testadas a associação direta entre os diferentes tipos de ferro provenientes da dieta e a resistência à insulina, bem como a associação de fatores como IL-6, MDA, leptina e a resistência à insulina. Os modelos apresentaram exatamente as mesmas estimativas para todos os parâmetros avaliados, independente do tipo de ferro. Houve associação positiva entre a ingestão de ferro e concentrações de IL-6 ($\beta = 0,174$; $p = 0,026$) e das concentrações de IL-6 e HOMA-IR ($\beta = 0,352$; $p = 0,000$). A ingestão de ferro foi negativamente associada às concentrações de MDA ($\beta = -0,160$; $p = 0,009$) e a concentração de leptina sérica também esteve negativamente associada com o HOMA-IR ($\beta = -0,075$; $p = 0,009$).

O efeito indireto da ingestão dos diferentes tipos de ferro na resistência à insulina mediada por fatores como IL-6, leptina e MDA são apresentadas na Tabela 1. Observa-se um efeito indireto positivo da ingestão de ferro na resistência à insulina, mediada pela IL-6 ($\beta = 0,061$; $p = 0,042$), independente do tipo de ferro avaliado.

Discussão

Este é o primeiro estudo que investiga a relação da ingestão dos diferentes tipos de ferro na resistência à insulina, considerando o papel mediador da IL-6, MDA e leptina. Os resultados do presente estudo evidenciam o papel da ingestão de ferro na resistência à insulina mediada pela IL-6, bem como a associação desse micronutriente com biomarcadores de inflamação e peroxidação lipídica.

Dietas ricas em ferro estão diretamente associadas à diferenciação dos adipócitos [9]. A redução dos níveis de ferro por meio do uso de deferoxamina, agente quelante de ferro, mostrou inibição na hipertrofia dos adipócitos por meio da redução na infiltração de macrófagos no tecido adiposo e diminuição na produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e MCP-1, conduzindo à melhor sinalização da insulina no tecido adiposo e no músculo esquelético em ratos [10]. O ferro heme também participa da ativação das células imunes inatas e promove a inflamação por meio do recrutamento de neutrófilos, atuando como uma molécula quimiotática e de ativação de macrófagos induzindo a produção de citocinas inflamatórias [35].

No estudo de Moreno-Navarrete e colaboradores [36] observou-se em humanos a relação inversa entre FTL (*Ferritin light polypeptide* – marcador intracelular de acúmulo de ferro) e SLC40A1 (*Solute carrier family 40 [iron-regulated transporter], member 1* –mediador da exportação de ferro) com genes adipogênicos e associação positiva com marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Esses resultados evidenciam que a sobrecarga de ferro é um importante fator envolvido na disfunção do tecido adiposo induzida pela obesidade e inflamação [36, 37].

Diversos estudos têm identificado a IL-6 como co-indutor no desenvolvimento de resistência à insulina [38, 39]. Estudos experimentais sugerem que a exposição crônica a IL-6 pode induzir resistência à insulina nos hepatócitos, músculo esquelético e nos adipócitos [14, 40-42]. Contudo, mecanismos envolvidos na relação entre a IL-6 e resistência à insulina ainda não estão completamente elucidados.

O papel da IL-6 no comprometimento da capacidade adipogênica pode ser uma possível explicação. A formação de novas células adiposas podem atenuar o acúmulo de ácidos graxos em outros órgãos e, conseqüentemente, previne a lipotoxicidade nesses tecidos, importante causa da resistência à insulina [43]. Níveis elevados de ácidos graxos circulantes podem relacionar-se ao comprometimento da ação de proteínas-chave na sinalização da insulina [44]. Almuraikhy e colaboradores [14] relatam os primeiros achados do comprometimento da capacidade adipogênica de pré-adipócitos e sua relação com a resistência à insulina, independente da obesidade em humanos. Os resultados mostraram que a capacidade adipogênica dos pré-adipócitos foi menor em indivíduos com resistência à insulina quando comparado a indivíduos com sensibilidade à insulina. O comprometimento da adipogênese subcutânea foi mediado pela IL-6 que leva à redução na capacidade de estocar triacilgliceróis e resistência à insulina associada à obesidade.

Os dados do presente estudo mostraram uma associação inversa entre a ingestão de ferro e MDA, produto final da peroxidação lipídica. No entanto, os mecanismos que envolvem a relação entre o ferro e a peroxidação lipídica não estão bem elucidados. Abtahi e colaboradores [45] ao avaliarem o efeito do consumo de pão fortificado com ferro nos biomarcadores de estresse oxidativo em adultos saudáveis, não encontraram diferença nas concentrações de MDA após oito meses de intervenção. Por outro lado, estudos têm evidenciado associação positiva entre dietas ricas em ferro heme e não heme e elevadas concentrações de MDA [46, 47]. Esses resultados conflitantes podem ser atribuídos às quantidades de ferro utilizadas nos estudos experimentais que são doses de suplementação. Os resultados do presente estudo sugerem que apesar da população estudada apresentar média de consumo superior à EAR (dados não apresentados), esses níveis de ingestão parecem não contribuir de forma negativa para a peroxidação lipídica.

As concentrações de leptina foram associadas inversamente à resistência à insulina. Resultados similares foram encontrados por Almuraikhy e colaboradores [14] que mostraram concentrações plasmáticas de leptina reduzidas em indivíduos com resistência à insulina quando comparados a indivíduos com sensibilidade à insulina. A leptina tem um importante papel na regulação da gliconeogênese hepática e sensibilidade à insulina [12]. Esse hormônio aumenta a captação de glicose por meio da ativação da enzima PI3 quinase e da proteína AMPK que estimulam a translocação do transportador de glicose GLUT4, do interior da célula para a membrana celular, melhorando a homeostase de glicose. Além disso, também atua na redução da expressão e no aumento da fosforilação das proteínas TBC1D1 e TBC1D4, reguladores negativos da translocação do GLUT4 para a membrana plasmática [13].

Diversos estudos experimentais têm demonstrado que a administração de leptina melhorou a sensibilidade à insulina em ratos saudáveis e diabéticos [13, 48, 49]. No entanto, em humanos o aumento dos níveis circulantes de leptina está associado à hiperleptinemia e resistência à leptina [50]. Essas alterações estão associadas ao aumento do IMC, comprometimento do metabolismo de glicose e ação da insulina e desregulação no balanço energético [12].

Limitações do estudo incluem o método para a avaliação do consumo alimentar que pode não refletir ingestão habitual do ferro, no entanto os autores utilizaram procedimentos de coleta de dados padronizados internacionalmente e métodos de ajustes com o intuito de minimizar os vieses inerentes ao método. O delineamento transversal do estudo não permite que a relação de causalidade seja estabelecida. Outra importante limitação é a ausência de biomarcadores de ferro e do metabolismo desse mineral que impossibilitou avaliar a possível influência desses marcadores com a ingestão de ferro e como mediadores na resistência à insulina. Os resultados dos modelos teóricos apresentados neste estudo não invalidam os

resultados de outros modelos com qualidade de ajuste similar que tenham testado outras relações entre as variáveis investigadas.

Nossos resultados mostram que ferro heme, não heme e total exercem papeis semelhante na resistência à insulina, mediada pela IL-6. Além disso, a ingestão do ferro apresentou uma associação negativa com produto final da peroxidação lipídica. Em relação a leptina, apesar de não se associar a ingestão de ferro apresenta uma associação inversa com a resistência à insulina. Estes resultados sugerem que o metabolismo do ferro tem um importante papel na modulação da inflamação e resistência à insulina, independente do tipo de ferro.

Referências

1. Grotto HZW (2008) Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *RverBras Hematol Hemoter* 30(5):390–397.
2. Bao W, Rong Y, Rong S et al (2012) Dietary iron intake, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* 10(119):1-13.
3. Zhao Z, Li S, Liu G et al (2012) Body iron stores and heme-iron intake in relation to risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 7(7):1–17.
4. Wlazlo N, van Greevenbroek MM, Ferreira I et al (2015) Iron metabolism is prospectively associated with insulin resistance and glucose intolerance over a 7-year follow-up period: the CODAM study. *Acta Diabetol* 52(2):337-348.
5. Arija V, Fernández-Cao JC, Basora J et al (2014) Excess body iron and the risk of type 2 diabetes mellitus: a nested case-control in the PREDIMED (Prevention with Mediterranean Diet) study. *Br J Nutr* 112(11):1896–904.
6. Hubler MJ, Peterson KR, Hasty AH (2015) Iron homeostasis: a new job for macrophages in adipose tissue? *Trends Endocrinol Metab* 26(2):101–109.
7. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M et al (2010) Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010:1–11.
8. Bai J, Zheng S, Jiang D et al (2015) Oxidative stress contributes to abnormal glucose metabolism and insulin sensitivity in two hyperlipidemia models. *Int J Clin Exp Pathol* 8(10):13193-2009.
9. Dongiovanni P, Ruscica M, Rametta R et al (2013) Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. *Am J Pathol.* 2013;182(6):2254-63. Doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.019.
10. Tajima S, Ikeda Y, Sawada K et al (2012) Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in

- obese and type 2 diabetes KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(1):E77-86. Doi: 10.1152/ajpendo.00033.2011.
11. Gao Y, Li Z, Scott Gabrielsen et al (2015) Adipocyte iron regulates leptin and food intake. *J Clin Invest* 125(9):3681-91. Doi: 10.1172/JCI81860.
 12. Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ et al (2015) Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* 64(1):35-46. Doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.015.
 13. Sáinz N, Rodríguez A, Catalán V et al (2012) Leptin reduces the expression and increases the phosphorylation of the negative regulators of GLUT4 traffic TBC1D1 and TBC1D4 in muscle of ob/ob mice. *PloS One* 7(1):e29389. Doi: 10.1371/journal.pone.0029389.
 14. Almuraikhy S, Kafienah W, Bashah M et al (2016) Interleukin-6 induces impairment in human subcutaneous adipogenesis in obesity-associated insulin resistance. *Diabetologia* [in press]. Doi 10.1007/s00125-016-4031-3.
 15. Ginsberg HN (2000) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 106:453–458.
 16. Johnson AMF, Olefsky JM (2013) The origins and drivers of insulin resistance *Cell* 152(4):673–684.
 17. Guenther PM, DeMaio TJ, Ingwersen LA et al (1995) The multiple-pass approach for the 24 hour recall in the Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1994-1996. Presented at the International Conference on Dietary Assessment Methods, Boston, Mass.
 18. Blanton CA, Moshfegh AJ, Baer DJ et al (2006) The USDA Automated Multiple-Pass Method accurately estimates group total energy and nutrient intake. *J Nutr* 136:2594–2599.
 19. Raper N, Perloff B, Ingwersen L et al (2004) An overview of USDA's Dietary Intake Data System. *J Food Compos Anal* 17:545–555.
 20. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)/NEPA – UNICAMP (2011). 4. Ed. Campinas: NEPA-UNICAMP.
 21. Monsen ER, Hallberg L, Layrisse M et al (1978) Estimation of available dietary Fe. *Am J Clin Nutr* 31:134–41.
 22. Black AE (2000) Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A practical guide to its calculation, use and limitations. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(9):1119-30.
 23. Mendez MA (2015) Invited commentary: Dietary misreporting as a potential source of bias in diet-disease associations: future directions in nutritional epidemiology research. *Am J Epidemiol* 181(4):234-6. Doi: 10.1093/aje/kwu306.
 24. Matsudo S, Araujo T, Matsudo V et al (2001) Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): Estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Atividade Física & Saúde* 6(2):5–18.
 25. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica (2004) Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. Brasília: Ministério da Saúde.

26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS et al (1985) Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–429.
27. Bastos AS, Loureiro APM, Oliveira TF et al (2012) Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method. *Analytical Biochemistry* 423(1):141-146.
28. Hong YL, Yeh SL, Chang CY et al Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem* 33:619–625.
29. Willett WC, Howe GR, Kushi LW (1997) Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 65(4):1220S–1228S.
30. German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke (Dife). Department of Epidemiology (2012) The Multiple Source Method (MSM). Versão 1.0.1. Disponível em: <https://nugo.dife.de/msm>.
31. Harttig U, Haubrock J, Knueppel S et al (2011) The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur J Clin Nutr* 65:S87-S91. DOI: 10.1038/ejcn.2011.92.
32. Amorim LDAF, Fiaccone RL, Santos CAST et al (2010) Structural equation modeling in epidemiology. *Cad Saúde Pública* 26(12):2251–2262.
33. Hair JF, Black WC, Babin BJ (2009) *Análise multivariada de dados*. 6. Ed. Porto Alegre: Bookman.
34. Hu LT, Bentler PM [1999] Cutoff criteria for fit indexes in covariance structure analysis: Conventional criteria versus new alternatives. *Struct Equ Model* 6:1–55.
35. Dutra FF, Bozza MT (2014) Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* 5:115. Doi: 10.3389/fphar.2014.00115.
36. Moreno-Navarrete JM, Novelle MG, Catalán V et al (2014) Insulin resistance modulates iron-related proteins in adipose tissue. *Diabetes Care* 37(4):1092-100. Doi: 10.2337/dc13-1602.
37. Fernández-Real JM, McClain D, Manco M (2015) Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 38(11):2169-76. Doi: 10.2337/dc14-3082.
38. Pal M, Febbraio MA, Whitham M (2014) From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. *Immunol Cell Biol* 92(4):331-9. Doi: 10.1038/icb.2014.16.
39. Herder C, Faerch K, Carstensen-Kirberg M (2016) Biomarkers of subclinical inflammation and increases in glycaemia, insulin resistance and beta-cell function in non-diabetic individuals: the Whitehall II study. *Eur J Endocrinol* [in press].
40. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, de Alvaro C et al (2008) Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes* 57:3211–3221.
41. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M et al (2003) Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 311(2):372-9.

42. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA et al (2002) Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51(12):3391-9.
43. de Queiroz JCF, Alonso-Vale MIC, Curi R et al (2009) Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 53(5):582-594.
44. Pauli JR. Obesidade e diabetes: bases moleculares da etiopatogenia (2011). In: Cintra DE, Ropelle ER, Pauli, JR. Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular. São Paulo: Sarvier: p. 74-99.
45. Abtahi M, Neyestani TR, Pouraram H et al (2014) Iron-fortified flour: can it induce lipid peroxidation? *Int J Food Sci Nutr* 65:649–654.
46. Choi JS, Koh IU, Lee HJ et al (2013) Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 24(9):1634-44. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.02.004.
47. Guéraud F, Taché S, Steghens JP et al (2015) Dietary polyunsaturated fatty acids and heme iron induce oxidative stress biomarkers and a cancer promoting environment in the colon of rats. *Free Radic Biol Med* 83:192-200. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.023.
48. Park S, Hong SM, Sung SR et al (2008) Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology* 149(2):445-54.
49. Chinookoswong N, Wang JL, Shi ZQ (Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. *Diabetes* 1999;48(7):1487–92.
50. Blüher M, Mantzoros CS (2015) From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* 64(1):131-45. Doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.016.

Figura 1. Modelo teórico da relação entre ferro total, ferro heme, ferro não heme e resistência à insulina. São Paulo, 2008.

HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; IL-6, interleucina 6; MDA, malondialdeído; CC, circunferência da cintura;

Tabela 1. Estimativas padronizadas e índices de ajustes dos modelos de equação estrutural da associação entre ferro total, heme, não heme, fatores metabólicos e resistência à insulina. São Paulo, 2008.

	Estimativas padronizadas	Erro padrão	p
<i>Ferro*</i>			
Efeito direto			
Ferrol → leptina	-0,011	0,033	0,745
Ferro → HOMA-IR	0,110	0,083	0,187
Ferro → IL-6	0,174	0,078	0,026
Ferro → MDA	-0,160	0,062	0,009
Leptina → HOMA-IR	-0,075	0,029	0,009
IL-6 → HOMA-IR	0,352	0,066	0,000
MDA → HOMA-IR	-0,073	0,095	0,446
CC → HOMA-IR	0,116	0,091	0,202
Coeficientes de correlação			
CC → leptina	-0,060	0,090	0,510
CC → IL-6	-0,111	0,073	0,125
<i>Ferro*</i>			
Efeito indireto**			
Ferro → IL-6 → HOMA-IR	0,061	0,030	0,042
Ferro → MDA → HOMA-IR	0,012	0,016	0,459
Ferro → Leptina → HOMA-IR	0,001	0,002	0,738
Efeito direto total‡			
Ferro → HOMA-IR	0,184	0,091	0,043
Efeito indireto total†			
Ferro → HOMA-IR	0,074	0,032	0,023
Índices de ajustes			
RMSEA (IC 90%)	0,038 (0,000-0,107)		
CFI	0,986		
TLI	0,957		
SRMR	0,036		

HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; IL-6, interleucina 6; MDA, malondialdeído; CC, circunferência da cintura; RMSEA, residual mean square error of approximation; CFI, comparative fit index; TLI, Tucker–Lewis index; SRMR, standardised root mean square residual.

*As estimativas apresentadas referem-se aos Modelos de Equação Estrutural realizados com o ferro heme, não heme e total, separadamente. Os modelos apresentaram exatamente as mesmas estimativas para todos os parâmetros avaliados, independente do tipo de ferro.

** Efeito indireto é o efeito da ingestão de ferro na resistência à insulina, mediados pela IL-6, MDA e leptina.

‡ Efeito direto total é a soma dos efeitos diretos e indiretos da ingestão de ferro na resistência à insulina.

† Efeito indireto total é a soma dos efeitos indiretos da ingestão de ferro na resistência à insulina, mediados pela IL-6, MDA e leptina.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A política de fortificação é uma estratégia adotada por diversos países para o combate à deficiência de ferro em populações vulneráveis. A implementação da política no Brasil, reduziu expressivamente a prevalência de inadequação da ingestão de ferro entre adolescentes, adultos e idosos, com exceção de mulheres em idade fértil no município de São Paulo. No entanto, a ingestão de diferentes tipos de ferro também está associada a importantes fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis nessa população.

Os resultados sugerem que os diferentes tipos de ferro estão associados a importantes desfechos em saúde. A maior ingestão de ferro associou-se à síndrome metabólica e resistência à insulina, importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2. Assim, este estudo avança no conhecimento sobre o papel da ingestão de ferro na síndrome metabólica e resistência à insulina e contribui com entendimento da etiologia dessa associação.

Nessa perspectiva, o monitoramento da adição de ferro na farinha de trigo e milho é essencial para garantir uma ingestão de ferro segura para toda a população. A coexistência de altas prevalências de deficiência de ferro e DCNT exige que medidas mais efetivas sejam adotadas de acordo com as necessidades locais, tendo em vista que o maior consumo desse mineral, independente do tipo, está associado a resistência à insulina e síndrome metabólica.

7 REFERÊNCIAS

- Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014;19(2):164-74.
- Abril-Ulloa V, Flores-Mateo G, Solà-Alberich R, Manuel-y-Keenoy B, Arija V. Ferritin levels and risk of metabolic syndrome: meta-analysis of observational studies. *BMC Public Health*. 2014;14:483. Doi: 10.1186/1471-2458-14-483.
- Abtahi M, Neyestani TR, Pouraram H, Siassi F, Dorosty AR, Elmadfa I, Doustmohammadian A. Iron-fortified flour: can it induce lipid peroxidation? *Int J Food Sci Nutr* 2014;65:649–654.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640-1645.
- Arija V, Fernández-Cao JC, Basora J, Bulló M, Aranda N, Estruch R, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J. Excess body iron and the risk of type 2 diabetes mellitus: a nested case-control in the PREDIMED (PREvention with MEDiterranean Diet) study. *Br J Nutr*. 2014;112(11):1896-904. Doi: 10.1017/S0007114514002852.
- Assunção MCF, Santos IS, Barros AJD, Gigante DP, Victora CG. Flour fortification with iron has no impact on anaemia in urban Brazilian children. *Public Health Nutrition* 2012;15(10), 1796–1801.
- Bao W, Rong Y, Rong S, Liu L. Dietary iron intake, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*. 2012;10:119.
- Barkley JS, Wheeler KS, Pachón H. Anaemia prevalence may be reduced among countries that fortify flour. *Br J Nutr*. 2015;114(2):265-73.
- Bastos AS, Loureiro APM, Oliveira TF, Corbi SCT, Caminaga RMS, Júnior CR, Orrico SRP. Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method. *Analytical Biochemistry*. 2012;423(1):141-146.
- Basuli D, Stevens RG, Torti FM, Torti SV. Epidemiological associations between iron and cardiovascular diseases and diabetes. *Front Pharmacol*. 2014;5(117):1-10. Doi: 10.3389/fphar.2014.00117
- Black AE. Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A practical guide to its calculation, use and limitations. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(9):1119-30.
- Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M, Ezzati M, Grantham-McGregor S, Katz J, Martorell R. Uauy R, the Maternal and Child Nutrition

Study Group. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2013;382:427–51.

Blanton CA, Moshfegh AJ, Baer DJ, Kretsch MJ. The USDA Automated Multiple-Pass Method accurately estimates group total energy and nutrient intake. *J Nutr*. 2006;136:2594–2599.

Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):274–86. Doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.012.

Braga JAP, Barbosa TNNB. Fisiologia e metabolismo do ferro. In: Braga, JAP, Amancio, OMS, Vitalle MSS. O ferro e a saúde das populações. São Paulo: Roca; 2006. p. 10-31.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº344, 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro ácido fólico, constante no anexo desta resolução. *Diário Oficial da União*, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher – PNDS 2006: dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. II Reunião Ordinária da Comissão Interinstitucional para Implementação, Acompanhamento e Monitoramento das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo, Milho e de seus subprodutos. Brasília, 2011. Available online: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/2_reuniao_ordinaria.pdf.

Brown AE, Walker M. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2016;18(8):1-8. doi 10.1007/s11886-016-0755-4.

Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol*. 2014;5(61):1-24. doi: 10.3389/fphar.2014.00061.

Choi JS, Koh IU, Lee HJ, Kim WH, Song J. Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism. *J Nutr Biochem*. 2013;24(9):1634-44. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.02.004.

da Silva CL, Saunders C, Szarfarc SC, Fujimori E, da Veiga GV. Anaemia in pregnant women before and after the mandatory fortification of wheat and corn flours with iron. *Public Health Nutr*. 2012;15(10):1802-9. Doi: 10.1017/S1368980012001206.

DIfE - German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke. Department of Epidemiology. The Multiple Source Method (MSM). Versão 1.0.1, 2012. Disponível em: <https://nugo.dife.de/msm>.

Dongiovanni P, Ruscica M, Rametta R, Recalcati S, Steffani L, Gatti S, Girelli D, Cairo G, Magni P, Fargion S, Valenti L. Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. *Am J Pathol*. 2013;182(6):2254-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.019.

Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol*. 2014;5(115):1-19.

Embrapa Agroindústria de Alimentos. Manual de fortificação de farinha de trigo com ferro. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2001.

Fernández-Real JM, McClain D, Manco M. Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(11):2169-76. doi: 10.2337/dc14-3082.

Fiedler JL, Macdonald B. A strategic approach to the unfinished fortification agenda: Feasibility, costs, and cost-effectiveness analysis of fortification programs in 48 countries. *Food and Nutrition Bulletin*. 2009;30(4):283-316.

Gammella E, Recalcati S, Cairo G. Dual Role of ROS as Signal and Stress Agents: Iron Tips the Balance in favor of Toxic Effects. *Oxid Med Cell Longev* 2016;1-9. doi: 10.1155/2016/8629024

Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and Disorders of Iron Metabolism. *Annu. Rev. Med*. 2011;62:347-360.

Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*. 2013;93:1721-1741.

Gao Y, Li Z, Scott Gabrielsen, Simcox JA, Lee S, Jones D, Cooksey B, Stoddard G, Cefalu WT, McClain DA. Adipocyte iron regulates leptin and food intake. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3681-91. doi: 10.1172/JCI81860.

Gera T, Sachdev HS, Boy E. Effect of iron-fortified foods on hematologic and biological outcomes: systematic review of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(2):309-24. doi: 10.3945/ajcn.111.031500.

Gozzelino R, Arosio P. Iron homeostasis in health and diseases. *Int J Mol Sci*. 2016;17(130):1-24. doi:10.3390/ijms17010130.

Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev Bras Hematol. Hemoter*. 2008;30(5):390-397.

Guenther PM, DeMaio TJ, Ingwersen LA, Berline M. The multiple-pass approach for the 24 hour recall in the Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) 1994-1996. Presented at the International Conference on Dietary Assessment Methods, Jan 1995; Boston, Mass.

Guo X, Zhou D, An P, Wu Q, Wang H, Wu A, Mu M, Zhang D, Zhang Z, Wang H, He L, Liu Y, Wang F. Associations between serum hepcidin, ferritin and Hb concentrations and type 2 diabetes risks in a Han Chinese population. *Br J Nutr*. 2013;110(12):2180-5. doi: 10.1017/S0007114513001827.

Harttig U, Haubrock J, Knueppel S, Boeing H, Consortium EFCOVAL. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:S87-S91. doi: 10.1038/ejcn.2011.92.

Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem*. 2000;33:619-625.

Hurrell R, Ranum P, de Pee S, Biebinger R, Hulthen L, Johnson Q, Lynch S. 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:S7–21.

Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1461S-1467S. doi: 10.3945/ajcn.2010.28674F.

IOM - Institute of Medicine of the National Academies. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fibre, Fat, FattyAcids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. Washington, DC: National Academies Press, 2002.

Jomovaa K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283:65–87.

Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka T. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1–11.

Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R, Regan M, Weatherall D, Chou DP, Eisele TP, Flaxman SR, Pullan RL, Brooker SJ, Murray CJ. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood.* 2014;30;123(5):615-24. doi: 10.1182/blood-2013-06-508325.

Kelly MT, Rennie KL, Wallace JM, Robson PJ, Welch RW, Hannon-Fletcher, MP, Livingstone MBE. Associations between the portion sizes of food groups consumed and measures of adiposity in the British National Diet and Nutrition Survey. *Br J Nutr.* 2009;101(9):1413-1420. doi: 10.1017/S0007114508060777.

Lee HJ, Choi JS, Lee HJ, Kim WH, Park SI, Song J. Effect of excess iron on oxidative stress and gluconeogenesis through hepcidin during mitochondrial dysfunction. *J Nutr Biochem.* 2015;26(12):1414-23. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.07.008.

Ma H, Lin H, Hu Y, Li X, He W, Jin X, Gao J, Zhao N, Song B, Pan B, Gao X. Serum ferritin levels are associated with carotid atherosclerosis in Chinese postmenopausal women: the Shanghai Changfeng Study. *Br J Nutr.* 2015;114(7):1064-71. doi: 10.1017/S0007114515001944.

Matsudo S, Araujo T, Matsudo V, Andrade D, Andrade E, Oliveira LC, Braggion G. Questionario Internacional de Atividade Fisica (IPAQ): Estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Atividade Física & Saúde.* 2001;6(2):5–18.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412–429.

Mena NP, Urrutia PJ, Lourido F, Carrasco CM, Núñez MT. Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion.* 2015;21:92–105.

Monsen ER, Hallberg L, Layrisse M, Hegsted DM, Cook JD, Mertz W, Finch CA. Estimation of available dietary Fe. *Am J Clin Nutr.* 1978;31:134–41.

Mujica-Coopman MF, Brito A, Romaña DL, Ríos-Castillo Israel, Cori H, Olivares M. Prevalence of Anemia in Latin America and the Caribbean. *Food and Nutrition Bulletin* 2015;36(Suppl 2):S119-S128.

Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. Averupdate on iron physiology. *World J Gastroenterol.* 2009;15(37):4617-26.

Nokes C, Van Den Bosch C, Bundy DAP. The Effects of Iron Deficiency and Anemia on Mental and Motor Performance, Educational Achievement, and Behavior in Children. An Annotated Bibliography. International Nutritional Anemia Consultative Group, U.S. 1998.

Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. Dietary references intakes: the essential guide to nutrient requirements. Institute of Medicine. The Nacional Academies Press. Washington, D.C. 2006. p. 328-339.

Pietrangelo A. Iron and the liver. *Liver Int.* 2016;36(Suppl. S1):116–123.

Podmore C, Meidtner K, Schulze MB, Scott RA, Ramond A, Butterworth AS, Di Angelantonio E, Danesh J, Arriola L, Barricarte A, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Cross AJ, Dahm CC, Fagherazzi G, Franks PW, Gavrila D, Grioni S, Gunter MJ, Gusto G, Jakszyn P, Katzke V, Key TJ, Kühn T, Mattiello A, Nilsson PM, Olsen A, Overvad K, Palli D, Quirós JR, Rolandsson O, Sacerdote C, Sánchez-Cantalejo E, Slimani N, Sluijs I, Spijkerman AM, Tjønneland A, Tumino R, van der A DL, van der Schouw YT, Feskens EJ, Forouhi NG, Sharp SJ, Riboli E, Langenberg C, Wareham NJ. Association of Multiple Biomarkers of Iron Metabolism and Type 2 Diabetes: The EPIC-InterAct Study. *Diabetes Care.* 2016;39(4):572-81. doi: 10.2337/dc15-0257.

Raper N, Perloff B, Ingwersen L, Steinfeldt L, Anand J. An overview of USDA's Dietary Intake Data System. *J Food Compos Anal.* 2004;17:545–555.

Ryoo JH, Kim SY, Oh CM, Park SK, Kim E, Park SJ, In Yu J, Kim MG, Choi YS, Ko TS. The incidental relationship between serum ferritin levels and hypertension. *Int J Cardiol.* 2015;183:258-62. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.10.152.

Santos Q, Nilson EAF, Verly-Junior E, Sichieri R. An evaluation of the effectiveness of the flour iron fortification programme in Brazil. *Public Health Nutrition.* 2014;18(9):1670–1674.

Seo SK, Yun BH, Chon SJ, Lee YJ, Han EJ, Park JH, Cho S, Choi YS, Lee BS. Association of serum ferritin levels with metabolic syndrome and subclinical coronary atherosclerosis in postmenopausal Korean women. *Clin Chim Acta.* 2015;438:62-6. doi: 10.1016/j.cca.2014.07.042.

Simcox JA, McClain DA. Iron and Diabetes Risk. *Cell Metab.* 2013;17(3):329–341.

Simcox JA, Mitchell TC, Gao Y, Just SF, Cooksey R, Cox J, Ajioka R, Jones D, Lee SH, King D, Huang J, McClain DA. Dietary iron controls circadian hepatic glucose metabolism through heme synthesis. *Diabetes.* 2015;64(4):1108-19. doi: 10.2337/db14-0646.

SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. *Arq Bras Cardiol.* 2007;89(3):e24-e79.

Steinbicker AU, Muckenthaler MU. Out of Balance —Systemic Iron Homeostasis in Iron-Related Disorders. *Nutrients.* 2013; 5:3034-3061. doi:10.3390/nu5083034.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA – UNICAMP. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

Tajima S, Ikeda Y, Sawada K, Yamano N, Horinouchi Y, Kihira Y, Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tsuchiya K, Tamaki T. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(1):E77-86. doi: 10.1152/ajpendo.00033.2011.

Thomas D, Frankenberg E. Health, nutrition and prosperity: a microeconomic perspective. *Bull. World Health Organ.* 2002;80: 106–113.

UNICEF - United Nations International Children's Emergency Fund and The Micronutrient Initiative. Vitamin & Mineral deficiency: a global progress report. UNICEF, 2004.

WHO - World Health Organization. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva, 2001.

WHO - World Health Organization. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva, 2006

WHO - World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva, 2008.

WHO, UNICEF, USAID, GAIN, The World Bank,.Investing in the Future: A United Call to Action on Vitamin and Mineral Deficiencies: Global Report 2009. Ottawa, The Micronutrient Initiative, 2009.

WHO - World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, 2014.

WHO - World Health Organization. Fiscal policies for diet and prevention of noncommunicable diseases: technical meeting report, Geneva, 2016.

Willett WC, Howe GR, Kushi LW. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(4):1220S–1228S.

Wlazlo N, van Greevenbroek MM, Ferreira I, Jansen EH, Feskens EJ, van der Kallen CJ, Schalkwijk CG, Bravenboer B, Stehouwer CD. Iron metabolism is prospectively associated with insulin resistance and glucose intolerance over a 7-year follow-up period: the CODAM study. *Acta Diabetol.* 2015;52(2):337-48. doi: 10.1007/s00592-014-0646-3.

Zhang DL, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis —an update. *Front. Pharmacol.* 2014;5(124):1-12.

Zhao Z, Li S, Liu G, Yan F, Ma X, Huang Z, Tian H. Body iron stores and heme-iron intake in relation to risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Plos One.* 2012;7(7):1–17.

CURRÍCULO LATTES

Diva Aliete dos Santos Vieira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7846871760840945>

Última atualização do currículo em 18/10/2016

Possui graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Sergipe (2010). Doutoranda em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde pública - USP. Atua principalmente nos seguintes temas: consumo alimentar, micronutriente, doenças crônicas não transmissíveis. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Diva Aliete dos Santos Vieira

Nome em citações bibliográficas

VIEIRA, D. A. S.; VIEIRA, DIVA ALIETE SANTOS; VIEIRA, DIVA ALIETE DOS SANTOS

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Av. Dr. Arnaldo, 715
Pacaembu
01246904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30617804

Formação acadêmica/titulação

2012

Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, FSP - USP, Brasil.
Título: STATUS EM FERRO E RESISTÊNCIA A INSULINA EM ADULTOS E IDOSOS: UM ESTUDO DE BASE POPULACIONAL.
Orientador: ☺ Regina Mara Fisberg.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2007 - 2010

Graduação em Nutrição.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil.
Título: Características socio-econômicas e estado nutricional de crianças e adolescentes em assentamentos rurais de Pacatuba, Sergipe.
Orientador: Raquel Simões Mendes Netto.

Regina Mara Fisberg

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D - CA SN - Saúde Coletiva e Nutrição

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3405418847290218>

Última atualização do currículo em 10/11/2016

Graduada em Nutrição pela Universidade São Camilo (1984), mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Paulo (1989), doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Paulo (1994) e livre-docente em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da USP (2005). Sua carreira de pesquisadora orientadora (já formou 17 mestres e 7 doutores) foi feita no Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP, com ênfase em Técnicas e Métodos na Avaliação Nutricional de População, atuando principalmente nos seguintes temas: epidemiologia nutricional, consumo alimentar, dieta e recomendações nutricionais. De vários projetos pesquisa, realizados com apoio das agências de fomento nacionais e internacionais e em colaboração com outros pesquisadores, resultaram 3 livros e 127 publicações de artigos científicos (índice H=18 ISI). É bolsista de produtividade em pesquisa nível 1D, do CNPq, desde 2003 e líder do diretório de grupos de pesquisa. É membro do corpo editorial da Revista Brasileira de Epidemiologia e da Revista de Nutrição e tem atuado como revisor regular em revistas nacionais e internacionais. Integra o Grupo de Trabalho sobre Nutrição e Alimentos para Fins Especiais (GTNFSDU) do Codex Alimentarius, da ANVISA, desde 2011. Participa ativamente em funções de gestão científica e acadêmica da Universidade, sendo representante da categoria professor Associado 3 no Departamento de Nutrição e na Congregação e chefe do Departamento de Nutrição. Foi presidente da Comissão de Graduação da Faculdade de Saúde Pública entre 2005 e 2011. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Regina Mara Fisberg

Nome em citações bibliográficas

FISBERG, R. M.;Fisberg, Regina Mara;FISBERG, R.;Fisberg, Regina M.;Fisberg, R M.;Mara Fisberg, Regina;Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Disease Expert Group (NutriCoDE);FISBERG, REGINA;Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Disease Expert Group (NUTRICODE);NutriCoDE;Global Burd Dis Nutr

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
USP - Faculdade de Saúde Pública - Dpto. de Nutrição - Av. Dr. Arnaldo, 715
Cerqueira Cesar
01246-904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617869
Fax: (11) 30626748
URL da Homepage: <http://www.fsp.usp.br>

Formação acadêmica/titulação

1991 - 1994

Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) (Conceito CAPES 7).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
Título: Influência da ingestão alimentar nos níveis de zinco, cobre e superóxido dismutase de crianças normais e pacientes com fenilcetonúria, Ano de obtenção: 1994.
Orientador: ☺ Maria Eugênia da Silva Fernandes.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: fenilcetonúria; micronutrientes; zinco e cobre.
Grande área: Ciências da Saúde

1987 - 1989

Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) (Conceito CAPES 7).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
Título: Avaliação antropométrica de crianças fenilcetonúricas submetidas a dieta de substituição, Ano de Obtenção: 1989.
Orientador: ☺ Maria Eugênia da Silva Fernandes.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: fenilcetonúria; avaliação nutricional; aminoacidopatias.
Grande área: Ciências da Saúde
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.

1981 - 1984

Graduação em Nutrição.
Universidade São Camilo, USC*, Brasil.