UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Avaliação de variantes do gene *TMPRSS6* e sua relação com o *status* de ferro de mulheres em condições de eritropoese normal e aumentada

EDUARDO DE CARLI

Tese para obtenção do título de
DOUTOR
Orientadora:
Profa. Dra. Célia Colli

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Avaliação de variantes do gene *TMPRSS6* e sua relação com o *status* de ferro de mulheres em condições de eritropoese normal e aumentada

EDUARDO DE CARLI

Versão corrigida da tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de DOUTOR.

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

De Carli, Eduardo
D291a Avaliação de variantes do gene *TMPRSS6* e sua relação com o *status* de ferro de mulheres em condições de eritropoese normal e aumentada / Eduardo De Carli. -- São Paulo, 2016.
215p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador : Colli, Célia

1. Biodisponibilidade : Nutrição experimental 2. Interação genótipo-ambiente I. T. II. Colli, Célia, orientador.

641.1 CDD

EDUARDO DE CARLI

Avaliação de variantes do gene *TMPRSS6* e sua relação com o *status* de ferro de mulheres em condições de eritropoese normal e aumentada

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Titulo de DOUTOR

_____
Orientadora/presidente

_____
1º Examinador

_____
2º Examinador

_____
3º Examinador

_____
4º Examinador

São Paulo, _____ de 2016

Aos meus pais, Daniel e Neusa,
com carinho e gratidão, e ao Luigi,
que veio encher nossas vidas de luz.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela concessão de apoio financeiro junto à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Professora Dra. Célia Colli, minha orientadora, pelo acolhimento em seu laboratório. Muito obrigado pela confiança, amizade e carinho ao longo desses anos e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Levarei sempre comigo o exemplo de ser bom mestre e zelar pela excelência de ensino e pesquisa. Que tenhamos ainda muitas conquistas e bons motivos para comemorar!

À Professora Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, pelo apoio, amizade e colaboração. Obrigado por abrir as portas de seu laboratório e generosamente permitir que parte desta tese fosse lá desenvolvida.

Aos amigos Gabriel Costa Moreira e Isabella Pimentel, por terem me despertado a coragem de vir em busca desta realização e por terem enfrentado junto os desafios do início desta jornada. Estaremos sempre ligados. Amo vocês!

À amiga Pryscila Dryelle Sousa Teixeira, por ter sido minha família nesses anos de convívio. Pelo amor, carinho e lealdade. É exemplo de pessoa e profissional que procuro ser.

A todos os colegas que fizeram parte do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição e que contribuíram com meu aprendizado, além de serem companheiros de todas as horas: Viviane Rocha, Eduardo Gaievsk, Cristiane Hermes Sales, Camila Torreglosa, Jéssica Silva e Fernanda Brunacci. Por terem me acolhido e sido grandes amigos, agradeço à Ana Lina Cunha Sales e ao Alexandre Rodrigues Lobo. Por terem tornado os dias difíceis amenos e terem sido parceiros de trabalho e

diversão, agradeço à Amanda Romero, Beatriz Fragal, Vitor Machado e Fabiana Lima. Meu especial agradecimento à fiel companheira e colega na realização deste projeto, Gisele Cristina Dias. Sem você teria sido muito difícil. Fomos uma dupla imbatível!

Aos colegas do Laboratório de Hematologia, em especial ao Clóvis Paniz, ao Juliano Bertinato e à Maylla Lucena que me acolheram junto aos seus projetos e foram grande colaboradores na aplicação dos inquéritos alimentares. Agradeço à Cecília Palchetti, pela parceria no processamento dos dados de consumo alimentar.

Aos colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela amizade, colaborações diversas e trocas de experiências: Bruna Zavarize Reis, Graziela Biude, Ernesto Vargas, Janaina Donadio, José Gustavo Satler, Kaluce Almondes, Fernanda Santana, Kristy Coelho, Mariana Souto e Mayara Miranda.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, Maria Lourdes Silva, Aline Oliveira, Alexandre Pimentel, Ivanir Pires, Cleonice Estrela, Edilson Feitosa, Mônica Perussi e Roberta Uehara pela presteza em ajudar.

Às professoras Dra. Julia Pavan e Dra. Juliana Morimoto e ao aluno de iniciação cientifica Eduardo Edamatsu, pelas valiosas contribuições e conhecimentos compartilhados nas análises estatísticas.

Aos professores Dr. Fernando Salvador e Dr. Tomas Ong pelas contribuições durante o exame de ingresso e às professoras Dra. Silvia Cozzolino, Dra. Maria Stella Figueiredo e Dra. Regina Mara Fisberg pelas contribuições durante o exame de qualificação.

A minha família, em especial a minha amada mãe. Por vocês, quero fazer sempre melhor. Obrigado pela compreensão, pelo suporte e pelo incentivo na busca por meus sonhos. Sou eternamente grato.

A todas as voluntárias que gentilmente participaram deste estudo. Muito obrigado!

A Deus e aos anjos que me regem, guardam, governam e iluminam. Obrigado pela inspiração e proteção.

RESUMO

DE CARLI, E. **Avaliação de variantes do gene *TMPRSS6* e sua relação com o *status* de ferro de mulheres em condições de eritropoese normal e aumentada.** 2016. Tese [Doutorado Direto em Ciência dos Alimentos] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Introdução: A deficiência de ferro é frequente entre mulheres na idade reprodutiva e é considerada problema de saúde pública mundial. Por outro lado, patologias associadas com aumentada atividade eritropoética e sobrecarga de ferro, como as talassemias e a anemia falciforme, estão entre as doenças monogênicas mais frequentes em muitas populações. Os genes *HFE* e *TMPRSS6* codificam as proteínas hemocromatose hereditária (HFE) e matriptase-2 (MT2) que, no fígado, modulam a produção de hepcidina, o hormônio regulador central do metabolismo de ferro. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre o consumo alimentar de ferro, as variantes rs855791 ($MT2^{736V}$), rs4820268 ($MT2^{521V}$), rs1799945 (HFE^{63D}) e rs1800562 (HFE^{282Y}) e o *status* corporal do mineral entre mulheres com atividade eritropoética normal (aparentemente saudáveis) ou levemente aumentada (com β-talassemia menor). **Casuística e métodos:** Inicialmente, foram incluídas 127 estudantes universitárias na idade reprodutiva (18 a 42 anos) e em aparente balanço estacionário do ferro corporal (necessidades fisiológicas e consumo alimentar de ferro pouco variáveis há pelo menos 12 meses). Em um segundo estudo, foram incluídos 33 casos de β-talassemia menor (18 na pós-menopausa), registrados em serviços de hematologia de dois hospitais de São Paulo-SP e um de Sorocaba-SP. Essas foram pareadas com 66 controles, segundo idade, índice de massa corporal, *status* reprodutivo e uso de anticoncepcionais hormonais. A partir de inquéritos feitos com registros alimentares ou recordatórios de 24 horas foi estimado o consumo de ferro total e biodisponível. Amostras de sangue foram utilizadas para a extração de DNA e determinações de ferritina sérica, saturação da transferrina e hemoglobina. As genotipagens do *TMPRSS6* e do *HFE* foram realizadas por PCR em tempo real. **Resultados:** Considerando as 226 mulheres avaliadas, as frequências dos alelos $MT2^{736V}$, $MT2^{521D}$, HFE^{63D} e HFE^{282Y} foram estimadas em 40,3%, 44,0%, 16,3% e 1,5% respectivamente. No primeiro estudo, foi estimada média de consumo de ferro

de 10,9 mg/dia e prevalência de deficiência do mineral de 12,6%. Estimativas de consumo de ferro biodisponível, mas não de ferro total, foram correlacionadas com os valores de ferritina e saturação da transferrina. As associações entre a biodisponibilidade dietética de ferro e seus biomarcadores foram especialmente evidentes entre as carreadoras da variante HFE^{63D}, indicando uma significante interação gene-nutriente. Por outro lado, valores relativamente menores de saturação da transferrina foram associados à presença do alelo $MT2^{736V}$, independentemente do consumo de ferro biodisponível. Mulheres com β-talassemia menor e suas controles não diferiram quanto à frequência das variantes *TMPRSS6* e *HFE* ou à biodisponibilidade dietética de ferro. Na pós-menopausa, a β-talassemia menor foi associada com valores duas vezes maiores de ferritina, 20% maiores de saturação da transferrina e com probabilidade 3,5 vezes maior de hiperferritinemia. Entretanto, para casos e controles na idade reprodutiva, foi estimada probabilidade de inadequação do consumo de 20,7% e prevalências de deficiência do mineral de 13,3% e 10,0%, respectivamente. Entre essas mulheres, o genótipo positivo ou negativo para a variante $MT2^{736V}$ foi também associado com diferenças nas médias de saturação da transferrina. No entanto, o contraste nesses valores foi relativamente maior entre as mulheres com β-talassemia menor. Além disso, mais acentuada hipocromia acompanhou a presença da variante $MT2^{736V}$ nessa condição. **Conclusão:** Os achados sugerem que, entre mulheres com eritropoese normal ou com β-talassemia menor, a variante $MT2^{736V}$ não afeta tão fortemente as reservas de ferro corporal como faz a adequação do consumo desse mineral. Ainda assim, a variante HFE^{63D} pode modificar a relação da biodisponibilidade de ferro com seu *status* corporal e, portanto, ser um importante marcador preditivo de resposta diferencial à dieta. A variante $MT2^{736V}$ foi associada com menor disponibilidade de ferro na circulação de mulheres na idade reprodutiva e, entre aquelas com β-talassemia menor, com indício de acentuada alteração morfológica dos eritrócitos.

Palavras-chave: Biodisponibilidade, interação gene-dieta, β-talassemia menor

ABSTRACT

DE CARLI, E. **Evaluation of *TMPRSS6* genetic variants and its relationship with iron status of women with normal and increased erythropoiesis**. 2016. Thesis [Doctor Degree in Food Science] – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Introduction: Iron deficiency is common among women at childbearing age and it is regarded as a worldwide public health issue. On the other hand, disorders associated with increased erythropoietic activity and iron overload, such as thalassemias and sickle cell disease, are among the most frequent Mendelian diseases in many populations. *HFE* and *TMPRSS6* genes encode the hereditary hemochromatosis protein (HFE) and the matriptase-2 (MT2) both of which modulate the hepatic production of hepcidin, the main hormone regulator of iron metabolism. The aim of this study was to evaluate the relationship among dietary iron intake, rs855791 ($MT2^{736V}$), rs4820268 ($MT2^{521D}$), rs1799945 (HFE^{63D}) and rs1800562 (HFE^{282Y}) genetic variants and body iron status of women with normal (apparently healthy) or slightly increased (β-thalassemia minor) erythropoietic activity. **Casuistic and methods:** Initially, 127 university students at childbearing age (18 to 42 years old) and with steady state body iron (few variations on physiological requirements and dietary iron intake at least for the last 12 months) were included. In a second study, it was included 33 cases of β-thalassemia minor (18 of them post-menopaused) registered in Hematology Services from two hospitals from São Paulo-SP and one from Sorocaba-SP. They were paired with 66 controls by age, body mass index, reproductive status and hormonal contraceptive use. Using food diaries or 24 hours food recalls, total and bioavailable dietary iron intakes were estimated. Blood samples were used for DNA extraction and for determinations of ferritin, transferrin saturation with iron and hemoglobin. *TMPRSS6* and *HFE* genotyping were performed by real time PCR. **Results:** Considering all the 226 women studied, the allelic frequencies of $MT2^{736V}$, $MT2^{521D}$, HFE^{63D} e HFE^{282Y} genetic variants were em 40.3%, 44.0%, 16.3% e 1.5%, respectively. In the first study, a total dietary iron intake of 10.9 mg/day and an iron deficiency prevalence of 12.6% were estimated. There were correlations among ferritin and transferrin saturation values with estimates of bioavailable, but not of total dietary iron intake s. Associations between dietary iron bioavailability and iron biomarkers were especially evident among carriers of HFE^{63D}

variant, indicating a significant gene-diet interaction. On the other hand, lower levels of transferrin saturation were associated with the presence of $MT2^{736V}$ variant allele, irrespective of bioavailable iron intake. *TMPRSS6* and *HFE* variants frequencies and dietary iron bioavailability estimates did not differ between women with β-thalassemia minor and their controls. Among postmenopausal women, β-thalassemia minor was associated with two times higher ferritin values, 20% higher transferrin saturation values and 3.5 times higher chance for hiperferritinemia. However, among cases and controls at childbearing age, it was estimated a probability of inadequacy in the dietary iron intake of 20.7% and iron deficiency prevalences of 13.3% and 10.0%, respectively. Among these women, a positive or negative genotype for $MT2^{736V}$ was also associated with differences in transferrin saturation. Nevertheless, the contrast between these values was relatively higher among women with β-thalassemia minor. Moreover, a more accentuated hypochromia accompanied the presence of the $MT2^{736V}$ variant in this condition. **Conclusions:** Our findings suggest that, among women with normal erythropoiesis or β-thalassemia minor, the presence of the $MT2^{736V}$ variant does not strongly impact the body iron stores as does dietary iron adequacy. Nevertheless, the HFE^{63D} variant may modify the relationship between the dietary iron bioavailability and the body iron status. Therefore, it might be an important predictive marker of women's differential response to diet. The $MT2^{736V}$ variant was associated with lower availability of circulating iron in women at childbearing age and, among those with β-thalassemia minor, with suggestive accentuated morphological alteration of erythrocytes.

Keywords: Bioavailability, gene-diet interaction, β-thalassemia minor

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de seleção das mulheres para o estudo. 74
Figura 2. Relação entre a prevalência de inadequação do consumo de ferro total e sua biodisponibilidade dietética entre não usuárias e usuárias de anticoncepcionais hormonais, segundo modelo probabilístico. 80
Figura 3. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina (A e D), saturação da transferrina (B e E) e hemoglobina (C e F), segundo conteúdo dietético de ferro biodisponível1, entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. 104
Figura 4. Correlação entre biomarcadores do *status* de ferro e o conteúdo dietético de ferro biodisponível, segundo genótipo *TMPRSS6* (A a C) e *HFE* (D a F) entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. 105
Figura 5. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* combinados com ferritina (A), saturação da transferrina (B) e hemoglobina (C), segundo conteúdo dietético de ferro biodisponível, entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. 110
Figura 6. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina (A e D), saturação da transferrina (B e E) e hemoglobina (C e F) entre mulheres na idade reprodutiva com β-talassemia menor e suas controles. 127
Figura 7. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina (A e D), saturação da transferrina (B e E) e hemoglobina (C e F) entre mulheres na pós-menopausa com β-talassemia menor e suas controles. 128

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. SNPs associados com marcadores do *status* de ferro em estudos de associação genômica ampla (GWAS)..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização geral de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 76
Tabela 2. Estimativas de biodisponibilidade dietética do ferro segundo algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 81
Tabela 3. Coeficientes de correlação e equações de regressão linear simples entre estimativas obtidas com diferentes algoritmos do ferro biodisponível (mg/dia) na dieta de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 82
Tabela 4. Características dietéticas selecionadas segundo quantis de consumo de ferro biodisponível (mg/dia) estimado com algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 84
Tabela 5. Médias geométricas brutas e ajustadas das concentrações séricas de ferritina (µg/L) segundo quantis de consumo de ferro biodisponível estimado com algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 88
Tabela 6. Distribuição de ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina segundo características nutricionais e sociodemográficas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 97
Tabela 7. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 101
Tabela 8. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* combinados com ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016. 108
Tabela 9. Caracterização geral de mulheres na idade reprodutiva com β-talassemia menor e suas controles. São Paulo, 2016. 120
Tabela 10. Caracterização geral de mulheres na pós-menopausa com β-talassemia menor e suas controles. São Paulo, 2016. 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	Alfa1-glicoproteína ácida
ANOVA	Análise de variância
BMP	Proteína morfogenética óssea
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CTLF	Capacidade total de ligação do ferro
DcytB	Citocromo B duodenal
DMT-1	Proteína de metal divalente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRI	Referência de ingestão dietética
FCF	Faculdade de ciências farmacêuticas
FPN1	Ferroportina
GETp	Gasto energético total predito
GWAS	Estudo de associação genômica ampla
Hb	Hemoglobina
HCP-1	Proteína transportadora de heme
HFE	Proteína da hemocromatose hereditária
HH	Hemocromatose hereditária
HJV	Hemojuvelina
HO-1	Heme-oxigenase 1
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HP	Haptoglobina
Ht	Hematócrito
IMC	Índice de massa corporal
IME	Instituto de matemática e estatística
IE	Ingestão energética
IRIDA	Anemia ferropriva refratária ao ferro
IPAQ	Questionário internacional de atividade física
MSM	Método de múltipla fontes
MT2	Matriptase-2
OR	Razão de probabilidades
PCR	Proteína C reativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PhZ	Fenillhidrazina
QFA	Questionário de frequência alimentar
RA	Registro alimentar
RAPI	Registro alimentar pela internet
RA24h	Recordatório alimentar de 24 horas
RDW	Ìndice de anisocitose
SNP	Polimorfismo de nucleotídio único
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TF	Transferrina
TMPRSS6	Protease transmembranal em serina 6
TRF1	Receptor de transferrina 1
TRF2	Receptor de transferrina 2
UNESP	Universidade Estadual Paulista

UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DA LITERATURA 23

2.1 *STATUS* DE FERRO E ERITROPOESE..... 23
2.2 VARIABILIDADE GENÉTICA E *STATUS* DE FERRO 30
2.3 DIETA E *STATUS* DE FERRO 37
2.4 *TMPRSS6*, DIETA E *STATUS* DE FERRO 43

3 OBJETIVO 45

3.1 GERAL 45
3.2 ESPECÍFICOS 45

4 CASUÍSTICA 46

4.1 ESTUDO 1 46
4.1.1. Delineamento 46
4.1.2. Critérios de inclusão 47
4.1.3. Aspectos éticos 48
4.2. ESTUDO 2 49
4.2.1. Delineamento 49
4.2.2. Critérios de inclusão 50
4.2.3. Aspectos éticos 50

5 MATERIAL E MÉTODOS 52

5.1 ESTUDO 1 52
5.1.1 Coleta de dados gerais 52
5.1.2 Avaliação Antropométrica 53
5.1.3 Avaliação do consumo alimentar 54
5.1.4 Amostras biológicas 61
5.1.5 Análise estatística 64
5.2 ESTUDO 2 67
5.2.1 Coleta de dados gerais 67
5.2.2 Avaliação do consumo alimentar 67
5.2.3 Amostras biológicas 69
5.2.4 Análise estatística 71

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 74

6.1 ESTUDO 1 – ARTIGO 1: Biodisponibilidade dietética de ferro: concordância entre métodos de estimativa e sua associação com as concentrações séricas de ferritina de mulheres na idade reprodutiva 74
6.2 ESTUDO 1 – ARTIGO 2: Genótipos *TMPRSS6* e *HFE* podem modificar a associação do consumo de ferro com seu *status* corporal: evidências de um estudo transversal com mulheres na idade reprodutiva 96
6.3 ESTUDO 2 – ARTIGO 3: Efeito diferencial do genótipo *TMPRSS6* sobre *status* de ferro e a eritropoese de mulheres com β-talassemia menor: um estudo piloto .. 119
CONCLUSÕES 136
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 137
REFERÊNCIAS 138
APÊNDICES 158

1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas cinco décadas, as estratégias que ficaram consagradas para a prevenção da deficiência de ferro foram a suplementação, a fortificação e a biofortificação de alimentos e a educação nutricional, cujos objetivos principais são sempre o aumento do consumo diário de ferro biodisponível (WHO, 2006). Contudo, o fato de a anemia ferropriva permanecer altamente prevalente entre crianças e mulheres na idade reprodutiva, tanto na população de países em desenvolvimento, quanto na de países desenvolvidos, faz com que a deficiência de ferro continue sendo alvo de intensa pesquisa em nutrição e segurança alimentar (LYNCH, 2011).

Os efeitos biológicos do acúmulo corporal de ferro, por outro lado, tem despertado crescente preocupação, não só devido à gravidade clínica de estados patológicos como a hemocromatose hereditária, mas também porque processos oxidativos (ROMEU et al., 2013; LEE et al., 2012; BROEDBAEK et al, 2011) e de resistência à insulina (ZARIBAF et al., 2014; WLAZLO e al., 2014) tem sido associados com variações nos biomarcadores do *status* do mineral, mesmo na população geral. Nesse sentido, discute-se a necessidade de as recomendações dietéticas de ferro serem menores para subgrupos populacionais com risco aumentado para a sobrecarga de ferro, como são os homozigotos para os alelos da hemocromatose e indivíduos com determinados tipos de anemias hemolíticas congênitas (MORRETI et al., 2013; ZIMMERMAN et al., 2008; GREENWOOD et al., 2005; CADE et al., 2005; FNB, IOM, 2001).

Uma das dificuldades em se estabelecer a relação entre dieta e *status* de ferro, contudo, vem do fato de muitos estudos de epidemiologia nutricional mostrarem fracas correlações entre estimativas de ingestão e biomarcadores sanguíneos do metabolismo de ferro. Uma explicação para esse fato é que tanto fatores dietéticos (consumo de ferro e de componentes promotores e inibidores de sua absorção intestinal) como não dietéticos (perdas de sangue, crescimento e reparação de tecidos, inflamação, complicações nutricionais, metabólicas, hematológicas e genéticas) afetam o balanço corporal do mineral. Se, por um lado, este quadro sugere que a relação entre consumo de ferro e os desfechos de saúde ou doença dependa tanto da disponibilidade do mineral para absorção intestinal quanto de sua quantidade total na dieta (RICKARD et al., 2009), por outro, sinaliza a existência de

importantes diferenças interindividuais na eficiência de absorção, transporte e utilização deste nutriente (ZIMMERMAN et al., 2010; ROE et al., 2009).

Em condições normais, a absorção intestinal do ferro é negativamente regulada por suas reservas corporais. Em contrapartida, a atividade eritropoética estimula o mesmo processo e, em condições em que se encontra acelerada, seu efeito é predominante sobre o repressor (ESTATIEV & GASCHE, 2011). Assim, nas anemias congênitas associadas com hemólise e/ou eritropoese ineficaz, como as talassemias e as anemias sideroblásticas, a produção cronicamente aumentada de eritrócitos promove aumento inapropriado da absorção do ferro. Em consequência, ocorre acúmulo secundário do mineral no fígado, coração e outros tecidos (LI & GINZBURG, 2010; ZIMMERMAN et al., 2008). Repetidas transfusões de sangue, que são parte da conduta clínica indicada para o tratamento dessas anemias, também podem contribuir com quantidades excedentes de ferro (MARIANI et al., 2009).

O risco para sobrecarga de ferro pode ser importante mesmo em condições leves de eritropoese ineficaz, como na β-talassemia menor (ZIMMERMAN et al., 2008). Quando co-herdam alelos de risco para hemocromatose, de fato, indivíduos com β-talassemia menor apresentam estoques aumentados de ferro corporal (MARTINS et al., 2004; MELIS et al., 2002). O papel da dieta neste contexto não está ainda totalmente esclarecido (ZIMMERMAN et al., 2008), ainda que na prática clínica, intervenções dietéticas voltadas para a redução no consumo de ferro não façam mais parte da terapêutica das talassemias ou das anemias sideroblásticas (ELMONEIM et al, 2015; FUNG et al., 2012; GREER et al., 2009; MARIANI et al., 2009).

Um rápido progresso no entendimento dos mecanismos que interligam a dieta, a eritropoese e o *status* de ferro tem ocorrido nos últimos anos, após a descoberta da hepcidina como o hormônio limitante da absorção e utilização do ferro (NEMETH et al., 2004). A produção inapropriadamente baixa de hepcidina nas anemias hemolíticas e na hemocromatose hereditária parece, em grande parte, ser responsável pela absorção aumentada do ferro dietético nessas condições (BESHALAWY et al., 2012; ESTATIEV & GASCHE, 2011). Por outro lado, a concentração inapropriadamente alta de hepcidina explica muitas das alterações hematológicas e do *status* de ferro na anemia da inflamação (CULIS, 2001) e é

característica marcante da anemia ferropriva refratária ao ferro (IRIDA) (FINBERG e al., 2008).

O papel central da hepcidina na homeostase do ferro e na eritropoese normal é ainda destacado por uma série de estudos de associação genômica ampla (GWAS – Genome-Wide Asssociation Studies) que apontam polimorfismos em genes envolvidos na sua produção como potenciais marcadores preditivos de anemia e de sobrecarga de ferro (SORANZO et al., 2009; BENYAMIN et al., 2009a; BENYAMIN et al., 2009b; CHAMBERS et al., 2009; GANESH et al., 2009; TANAKA et al., 2010; PICHLER et al., 2011; MCLAREN et al., 2011; OEXLE et al., 2011). Deste modo, a variabilidade genética na expressão de hepcidina pode, em parte, explicar porque as estimativas do consumo do ferro não são forte e diretamente associadas com as variações nos seus biomarcadores. Fatores genéticos podem ainda explicar a resposta diferenciada ao ferro dietético e/ou suplementar de indivíduo para indivíduo, tanto em condições fisiológicas que implicam em risco aumentado para a deficiência, quanto em condições patológicas de risco à sobrecarga do mineral.

No presente estudo, determinantes genéticos e dietéticos do *status* de ferro nas condições de eritropoese normal e aumentada foram estudados, respectivamente, em mulheres adultas aparentemente saudáveis e em mulheres com diagnóstico de β-talassemia menor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *STATUS* DE FERRO E ERITROPOESE

O ferro, um elemento essencial a processos metabólicos básicos em todas as células, pode ser tóxico quando em excesso na sua forma livre (HENTZE et al., 2010). Assim, sob pressões evolucionárias, humanos e outros mamíferos desenvolveram um refinado controle da distribuição e compartimentalização tecidual do ferro (GANZ, 2011). Genes e proteínas envolvidos com a absorção intestinal e utilização sistêmica desse mineral tornaram-se altamente reguláveis e interativos, compensando a falta de mecanismos especializados na sua excreção fecal ou urinária (SHARP, 2010). O ferro se destaca neste cenário como o único nutriente cuja homeostase é, sobretudo, mantida pela regulação de sua absorção intestinal (ESTATIEV & GASCHE, 2011).

Homens adultos saudáveis sofrem pequenas perdas fisiológicas de ferro (de 0,9 a 1 mg/dia) e são capazes de manter a homeostase deste mineral, mesmo quando sua biodisponibilidade na dieta for baixa (STOLTZFUS, 2011; FNB, IOM, 2001). Mulheres adultas apresentam necessidades corporais de ferro relativamente maiores (de 1,3 a 2,8 mg/dia), principalmente devido à menstruação e aos desafios impostos pela gravidez e lactação (FNB, IOM, 2001; FAO, 2001). A menos que a dieta seja rica em ferro biodisponível, sua absorção intestinal é muitas vezes insuficiente para equilibrar as perdas, o que faz das mulheres em idade reprodutiva um grupo populacional altamente vulnerável à deficiência de ferro (STOLTZFUS, 2011; COAD, COLDON, 2011; HALBERG & HULTHÉN, 1991).

Reservas variáveis de ferro (120 a 1000 mg) são mantidas na forma atóxica de ferritina em hepatócitos e macrófagos do fígado e do baço. Entretanto, aproximadamente 2,5 g de ferro estão estruturalmente contidos na hemoglobina presente em eritrócitos e seus precursores (GANZ & NEMETH, 2012). Na medula óssea, diariamente, são sintetizados 6 gramas de hemoglobina (30 pg / eritrócito), o que perfaz uma produção total de $2x10^{11}$ novas células (LI & GINZBURG, 2010). Assim, de 20 a 25 mg de ferro devem ser entregues aos precursores eritróides, via transferrina sérica, a proteína que transporta o ferro na circulação. A captação celular do ferro ligado à transferrina ocorre após a interação desta proteína com seu

receptor de membrana, expresso em todas as células do corpo, mas com maior abundância nos precursores eritróides (ESTATIEV & GASCHE, 2011).

A quantidade de ferro diariamente absorvida da dieta (1 – 3 mg) compensa as perdas fisiológicas do mineral, mas representa apenas uma pequena parte do *pool* da transferrina (HENTZE et al., 2010). Assim, depois de uma média de 120 dias na circulação, eritrócitos são fagocitados por macrófagos do sistema mononuclear fagocitário para que o ferro seja reciclado, devolvido à circulação e então utilizado para produção de novos eritrócitos, fechando o ciclo que garante a conservação e o balanço corporal do mineral (CAMASCHELLA, 2013).

Vários mecanismos de sinalização sistêmica e celular interagem para equilibrar a oferta de ferro com as demandas do mineral para a eritropoese (LI & GINZBURG, 2010). Aumentos de até 20 vezes na eficiência de absorção do ferro ocorrem quando a eritropoese é acelerada, por exemplo, em resposta a hemorragias (GANZ & NEMETH, 2012). Nesses casos, a saturação de ferro da transferrina se mantem em proporções suficientemente adequadas para suprir a demanda aumentada do mineral para a síntese de hemoglobina, evitando a anemia (PAK et al., 2006). Paralelamente, quando a capacidade total de ligação do ferro (CTLF) da transferrina começa a ser excedida, observa-se um aumento na produção de eritrócitos e na concentração de hemoglobina celular, dentro da faixa da normalidade, com a suposta finalidade de sequestrar excessos tóxicos do mineral em um compartimento inerte (ACHTSCHIN, 2010; LI & GINZBURG, 2010).

O ferro da dieta onívora está presente nas formas heme (encontrado exclusivamente em tecidos animais) e não heme (predominantemente presente em cereais e vegetais, mas também nos tecidos animais). A absorção dessas duas formas de ferro ocorre por mecanismos de transporte independentes, presentes na membrana apical dos enterócitos, principalmente do duodeno e da parte superior do jejuno (SHARP, 2010). Moléculas de heme no lúmen intestinal são captadas intactas pelo enterócito, via proteína transportadora de heme (HCP-1). Uma vez internalizada na célula, sob ação da heme-oxigenase 1 (HO-1), a molécula heme é hidrolisada e os íons de ferro nela contidos são liberados (LE BLANC, GARRICK & ARREDONDO, 2012).

O ferro não heme no lúmen intestinal está, em sua maior parte, como Fe^{3+}, que deve ser reduzido a Fe^{2+} para ser captado pelos enterócitos. A proteína responsável pela internalização destes íons é o transportador de metal divalente

(*divalent metal transporter 1,* DMT-1), enquanto que o citocromo B duodenal (DcytB) é estabelecida como importante redutase férrica intestinal (LATUNDE-DADA, SIMPSON & MCKIE, 2008). O ferro não heme internalizado, junto daquele liberado da molécula de heme, compõem um *pool* comum de ferro dentro do enterócito. Ali, pode ser armazenado como ferritina ou deixar o enterócito via transportador ferroportina (FPN1). Esta proteína é considerada a única responsável pelo efluxo de ferro, não só dos enterócitos, mas também dos macrófagos, hepatócitos e sinciciotrofoblastos placentários (DONAVAN et al., 2005).

A hepcidina, peptídeo hepático recentemente identificado como regulador central da absorção e utilização do ferro, interage com a ferroportina e promove sua internalização celular e subsequente degradação, limitando assim a taxa de transferência para o plasma daquele ferro captado pelos enterócitos (NEMETH et al., 2004). Do mesmo modo, o eixo hepcidina-ferroportina limita a passagem ao plasma do ferro reciclado em macrófagos ou mobilizado dos estoques contidos nestas células ou nos hepatócitos (HENTZE et al., 2010). A síntese da hepcidina é controlada predominantemente em nível transcricional e é responsiva à inflamação (resposta de fase aguda), à saturação da transferrina sérica e à abundância das reservas hepáticas de ferro (regulação pelos estoques) e à necessidade desse mineral para a eritropoese (regulação eritróide) (NEMETH et al., 2004).

As funções biológicas da hepcidina foram primeiramente elucidadas em modelos animais. Observou-se que camundongos *knockout* para o gene da hepcidina desenvolvem grave hemocromatose (LESBORDES-BRION et al., 2006), enquanto, animais que superexpressam esse gene desenvolvem deficiência de ferro e anemia (NICOLAS et al., 2002). O entendimento da modulação da expressão de hepcidina pela eritropoese vem ocorrendo com estudos em modelos de anemia hemolítica induzida por fenillhidrazina (PhZ), modelos genéticos de hipotransferrinemia (LATUNDE-DADA et al., 2006) e modelos genéticos de β-talassemia intermedia e maior (FRAZER et al., 2012; GARDENGHI et al., 2007).

Em reposta à hemólise quimicamente induzida pela fenillhidrazina, animais exibem redução do hematócrito e hiperplasia da medula óssea com consequente reticulocitose pronunciada. Ocorre rápido *turnover* do ferro reciclado pelo sistema mononuclear fagocitário e um grande aumento da eficiência de absorção intestinal de ferro. Essas alterações no metabolismo do mineral são comparáveis àquelas observadas na esferocitose hereditária em humanos (LATUNDE-DADA et al., 2006).

Já os modelos de β-talassemia exibem variados graus de descompartimentalização tecidual do ferro, dependentes da magnitude de apoptose dos precursores eritróides na medula óssea e do encurtamento do tempo de vida dos eritrócitos, o que caracteriza estes animais como modelos de eritropoese ineficaz (GARDENGHI et al., 2007).

A eritropoese acelerada é associada com redução na expressão de hepcidina no fígado, mesmo quando as reservas hepáticas de ferro são elevadas (GUIMARÃES et al., 2015; FRAZER et al., 2012; GARDENGHI et al., 2007; LATUNDE-DADA et al., 2006). Esta observação, não só nos modelos animais, mas também em doenças genéticas humanas, destacam o regulador eritróide como o principal e mais forte repressor da expressão de hepcidina (CAMASCHELLA, 2013). Supostamente, sinais emitidos pela hipóxia (NICOLAS et al., 2002), pela eritropoetina (PAK et al., 2006) e/ou por mediadores humorais derivados dos precursores eritróides em diferenciação (KAUTZ et al., 2014; TANNO et al., 2007) estão envolvidos neste processo. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual o regulador eritróide modula a expressão de hepcidina ainda precisa ser esclarecido.

Em humanos, distúrbios genéticos associados a desequilíbrios na expressão ou na ação da hepcidina estão entre as doenças hereditárias mais frequentes em algumas populações (GREER et al., 2009). Exemplos são as hemocromatoses hereditárias, cujos fenótipos clínicos são as sobrecargas primárias de ferro. Estas doenças resultam da herança recessiva de mutações em genes envolvidos na produção de hepcidina (*HFE, HJV, HAMP, TRF2*) ou da herança dominante de mutações no gene da ferroportina (*FPN*) (WEISS, 2010).

A mais comum das hemocromatoses, a do tipo I, acomete principalmente indivíduos de ascendência europeia que herdam o genótipo homozigoto para a variante HFE^{282Y} (rs1800562) ou heterozigoto composto com a variante HFE^{63D} (rs1799945). Essas mutações comprometem a função do gene HFE na cascata de sinalização da proteína morfogenética óssea 6 (*Bone Morphogenetic Protein 6* - BMP6), responsável pelo estímulo da produção de hepcidina em resposta à sobrecarga sistêmica e celular de ferro (MUCKENTHALER, 2014). No fígado, quando as concentrações de ferro são aumentadas, a BMP6 se liga ao seu receptor e promove fosforilação de fatores de transcrição da família S*on of Mothers Against Decapentaplegic Homologs* (SMADs), que se ligam a elementos regulatórios no gene da hepcidina (*HAMP*), favorecendo sua transcrição (KNUTSON, 2009). Assim,

na hemocromatose, observa-se alta saturação da transferrina, associada com altas concentrações de ferritina, mas concentrações inapropriadamente baixas de hepcidina na circulação (WEISS, 2010).

A única doença genética conhecida por cursar com produção inadequadamente alta de hepcidina é a anemia ferropriva refratrária ao ferro (IRIDA – *Iron-refractory Iron Deficiency Anemia*) (CAMASCHELLA, 2013). Nesta rara condição, há hipoferremia inexplicável, acompanhada por microcitose (baixo volume corpuscular médio – VCM) e hipocromia (baixa hemoglobina corpuscular média – HCM) que não são responsivas à terapia oral com ferro. Mutações de perda de função do gene *TMPRSS6* são detectadas nas crianças afetadas (FINBERG et al., 2008). A matriptase-2 (MT2), o produto gênico do *TMPRSS6*, é expressa na membrana plasmática dos hepatócitos e, em estados de depleção de ferro, funciona como um regulador negativo da via da BMP6. A ativação intracelular das SMADs em resposta à BMP6 é dependente da integridade de uma proteína co-receptora conhecida como hemojuvelina (HJV). Supõe-se que a matriptase-2 tenha ação proteolítica sobre a HJV, o que faz como que o efeito da BMP6 sobre a produção da hepcidina seja bloqueado, levado a consequente redução das concentrações circulantes do hormônio (NAI et al., 2011; KNUTSON, 2009).

Além das hemocromatoses, outras doenças genéticas associadas com baixa produção de hepcidina são as anemias hemolíticas congênitas (talassemias, anemia falciforme, anemia sideroblástica, esferocitose hereditária, entre outras) (PASRICHA et al., 2013; BESHLAWY et al., 2012; KEARNEY et al., 2007). Embora as bases moleculares destas doenças não estejam diretamente relacionadas com a maquinaria de produção da hepcidina, muitas complicações destas síndromes hemolíticas são decorrentes da descompartimentalização corporal do ferro (GREER et al., 2009). Assim como nos modelos animais de hemólise, a aumentada taxa de destruição de eritrócitos acompanhada por acelerada eritropoese é característica comum destas doenças, entretanto, a depender do grau de eritropoese compensada ou ineficaz, maior ou menor comprometimento da homeostase do mineral é observado (FRAZER et al., 2012; GARDENGHI et al., 2007; LATUNDE-DADA et al., 2006).

A esferocitose hereditária, a mais comum das anemias hemolíticas na Europa, é decorrente de defeitos em proteínas de membrana dos eritrócitos que modificam a capacidade dessas células se deformarem. Isto faz com que estas

células sejam prematuramente sequestradas e destruídas pelo baço (GALLAGHER, 2010; IOLASCON, AVVISATI & PISCOPO, 2010). Achados laboratoriais na doença incluem anemia, reticulocitose e aumentada concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), secundária à desidratação do eritrócito, que se torna esférico (esferócito) devido aos defeitos na membrana. O quadro de hemólise, que varia de leve até grave, diferencia indivíduos assintomáticos daqueles que apresentam anemia crônica tratável ao longo da vida (ROCHA et al., 2011). Tendo o baço um papel central na fisiopatologia da esferocitose hereditária, por muitos anos, a esplenectomia foi adotada como tratamento primário da doença (GREER et al., 2009).

Tanto na esferocitose hereditária leve quanto na anemia falciforme estável, a eritropoese compensada e eficaz acelera o *turnover* de ferro e, em decorrência da menor produção de hepcidina, a absorção intestinal de ferro pode ser aumentada (MORENI et al., 2009; LATUNDE-DADA et al., 2006). Antigos estudos ferrocinéticos em pacientes com esferocitose hereditária indicam que a demanda diária do mineral aos tecidos hematopoiéticos pode ser até seis vezes maior (150 mg) do que a de indivíduos saudáveis (CONRAD & BARTON, 1981 *apud* LATUNDE-DADA et al., 2006; FINCH et al., 1970). Apesar de, nesta condição, as concentrações circulantes de hepcidina se mostrem inversa e fortemente relacionadas com a atividade eritropoética (BESHLAWY et al., 2012; KEARNEY et al., 2007), uma sobrecarga de ferro clinicamente importante não é ocorrência comum, a menos que transfusões de sangue sejam frequentes (ROCHA et al., 2011; LATUNDE-DADA et al., 2006; MEYRICK, WEBB & COLE, 2002).

Nas β-talassemias intermedia e maior, anemias sideroblásticas e algumas anemias diseritropoéticas associadas com eritropoese ineficaz, as concentrações circulantes de hepcidina são inadequadamente baixas e há sobrecarga de ferro clinicamente importante (PASRICHA et al., 2013; BESHLAWY et al., 2012; KEARNEY et al., 2007). Assim como na esferocitose hereditária, o acúmulo de ferro nestas doenças é principalmente secundário às repetidas transfusões de sangue necessárias para o manejo da anemia. Entretanto, em pacientes com β-talassemia grave não transfundidos são absorvidas da dieta, a cada ano, quantidades excedentes de ferro da ordem de 5 g (MARIANI et al., 2009).

O estado heterozigoto da β-talassemia (β-talassemia menor) é caracterizado por várias magnitude de redução na produção da cadeia beta da hemoglobina, a

depender do tipo de mutação presente no gene *HBB*. Classificam-se essas mutações em dois tipos, nomeadamente β^0 ou β+, se associadas com ausência ou diminuição da síntese da cadeia de beta-globina, respectivamente (CAO & GALANELLO, 2010). O desequilíbrio na síntese da cadeia beta compromete a produção de hemoglobina A (HbA) e promove ligeiro aumento na concentração de hemoglobina A2 (HbA_2) (WEATHERALL, 2010). Em geral, a β-talassemia menor não se associa com alterações hematológicas graves ou sintomas clínicos evidentes (GREER et al., 2009; WEATHERALL, 2010). Leve anemia, microcitose e reticulocitose podem ser observados (GREER et al., 2009). Precipitação de cadeias alfa desemparelhadas dentro dos progenitores eritróides pode provocar dano oxidativo da membrana, resultando em apoptose destas células (CAO & GALANELLO, 2010).

Em virtude dos variados graus de eritropoese ineficaz que acompanham a hemólise crônica, indivíduos com β-talassemia menor podem apresentar maiores taxas de absorção do ferro dietético (GUIMARÃES et al., 2015; ZIMMERMAN et al., 2008; WHITE et al.1986). Ensaios de absorção de ferro, nesta condição, têm chegado a conclusões controversas a este respeito (ZIMMERMAN et al., 2008; HEINRICH et al., 1973; ERLANDSON et al., 1962). Ainda, estudos epidemiológicos que não observaram diferenças no *status* de ferro entre controles e indivíduos com β-talassemia menor (NOBILI et al., 2000; MARUF-UR-RAHMAN et al., 2011) são contrapostos por outros que descrevem maiores concentrações séricas de ferritina e menores prevalências de deficiência de ferro associadas com o traço beta talassêmico (GUIMARÃES et al., 2015; ESTEVÃO et al., 2010; HOORFAR et al., 2008; HINCHLIFFE & LILLEYMAN, 1995; GALANELLO et al., 1990; WHITE et al., 1986).

Curiosamente, sugere-se que, quando co-herdam o genótipo de HH (HFE^{262Y}/ HFE^{262Y} ou HFE^{262Y}/ HFE^{63D}), indivíduos com β-talassemia menor tem mais grave quadro de sobrecarga de ferro e podem apresentar valores de ferritina sérica e de saturação da transferrina tão altos quanto os observados em outras anemias hemolíticas associadas com a hemocromatose (ZANELLA et al., 2001; PIPERNO et al., 2000). A associação da heterozigose para as variantes *HFE* com as mesmas alterações laboratoriais ainda não é conclusiva (NADKARNI et al., 2016; WILSON et al., 2015; ON et ESTEVÃO et al., 2011; MADANI et al., 2011; YAMSRI et al., 2007; GARWAL et al., 2005; MARTINS et al., 2004; MELIS et al., 2002), o que abre

espaço à investigação de outros determinantes genéticos do *status* de ferro na β-talassemia menor.

Embora o papel da dieta no acúmulo de ferro corporal em algumas síndromes hemolíticas não esteja claro (FUNG et al., 2012; ZIMMERMAN et al., 2008), sua importância para a adequada atividade eritropoética é justificada pelo quadro de anemia mais grave apresentado por indivíduos com traço β-talassêmico ou outras anemias hemolítica hereditárias quando expostos à deficiência de ferro (VERMA et al., 2014; ROCHA et al., 2011; GALANELLO et al., 1990; ZANELLA et al., 1989). Contudo, esses indivíduos podem recuperar-se rapidamente da deficiência se suplementados com ferro (VERMA et al., 2014), provavelmente em virtude da maior eficiência de absorção intestinal do mineral.

2.2 VARIABILIDADE GENÉTICA E *STATUS* DE FERRO

Estudos de herdabilidade estimam que 20 a 50% da variação dos valores de ferro sérico, ferritina e saturação da transferrina são dependentes de fatores genéticos (FAIWEATHER-TAIT et al., 2013; NJAJOU et al., 2006; WHITFIELD et al., 2000; BENYAMIN et al., 2009). Por muitos anos, essa premissa motivou a investigação de associações entre biomarcadores do *status* de ferro e variações em genes sabidamente relacionados com o metabolismo do mineral, tais como os da haptoglobina (*HP*), ferroportina (*FPN*), heme-oxigenase1 (*HO-1*), transferrina (*TF*), entre outros. Os resultados desses estudos contribuiriam para o melhor entendimento do metabolismo do ferro e apontaram para potenciais marcadores de susceptibilidade e resistência à anemia ferropriva e a sobrecarga do mineral. Entretanto, uma vez que poucas variantes genéticas foram identificadas como importantes determinantes do metabolismo do ferro, apenas pequena parte da variabilidade de seus biomarcadores pode, por ora, ser explicada (EURECCA, 2011).

Estudos de associação genômica ampla (GWAS – *Genome-Wide Asssociation Studies*) são, na atualidade, a estratégia mais utilizada para identificar variantes genéticas que são associadas a um dado fenótipo. Nesse tipo de estudo, dezenas de milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polimorfism* - SNP) são analisados simultaneamente em um grande número de indivíduos fenotipicamente distintos (BUSH & MOORE, 2012). Para a identificação de genes associados com fenótipos complexos, GWAS oferecem vantagens em

relação aos estudos genéticos realizados antes do advento de organizações como o *HapMap* (INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT, 2005), que compilam informações sobre a variabilidade genética das populações. Essa facilitação vem do fato de estes estudos não exigirem o recrutamento de grandes amostras familiares, nem o conhecimento biológico prévio do fenótipo analisado (BUSH & MOORE, 2012).

Recentemente, uma série de GWAS descreveu a associação de SNPs com as concentrações de hemoglobina, volume corpuscular médio, ferro sérico, ferritina sérica, transferrina sérica, saturação da transferrina e receptor solúvel da transferrina, entre outros marcadores do *status* de ferro. No quadro 1 são apresentados os SNPs que, em no mínimo dois diferentes GWAS descritos na literatura, estiveram associados a no mínimo dois diferentes biomarcadores do *status* de ferro.

Beanyamin e colaboradores (2009) foram pioneiros a investigar associações entre a bioquímica do *status* de ferro e dados de mapeamento do genoma completo. Nesse estudo australiano feito com uma amostra de 870 indivíduos com ascendência européia, a mutação HFE^{262Y} (HFE - rs1800562), sabidamente relacionada com a hemocromatose hereditária tipo I, foi fortemente associada com aumentados níveis de ferro sérico e de saturação da transferrina. Além disso, um SNP no próprio gene da transferrina (*TF* – rs3811647) foi associado com concentrações aumentadas dessa proteína na circulação (BENYAMIN et al., 2009). Os autores observaram que as variantes identificadas desses dois genes explicaram mais de 40% da herdabilidade estimada para a transferrina sérica. À época, foi evidenciada a eficiência de GWAS em identificar polimorfismos associados com as variações no *status* de ferro.

Entre 2009 e 2016, no mínimo 20 novos GWAS exploraram e replicaram associação de SNPs com marcadores hematológicos e bioquímicos do ferro em populações caucasianas (KOLLER et al., 2016; BENYAMIN et al., 2014; VAN DER HARST et al., 2012; MCLAREN et al., 2011; PICHLER et al., 2011; OEXLE et al., 2010; TANAKA et al., 2010; KULLO et al., 2010; BENYAMIN et al., 2009a; BENYAMIN et al., 2009b, ANDREWS, 2009; FERREIRA et al., 2009), asiáticas (LIAO et al., 2014; KAMATANI et al., 2011; CHAMBERS et al., 2009) e afro-americana (LI et al., 2014; CHEN et al., 2013; LO et al., 2011). Muitos genes relacionados ao metabolismo do ferro (*TF*, transferrina; *TFR*, receptor de transferrina; *SLC40A1*, ferroportina; *PCSK7*, protease análoga à furina, GAB3,

envolvida em rotas de sinalização inflamatória) e à eritropoese (*EPO*, eritropoetina, *SPTA*, alfa-espectrina, *HBA2-HBA1* e *HBB*, cadeias alfa e beta da hemoglobina, *G6PD*, enzima do metabolismo energético no eritrócito e *HBS1L-MYB* e *BCL11A*, genes envolvidos na síntese de hemoglobina fetal, *LUC7L,* gene localizado na região flanqueadora do *HBA1*) foram associados com, no mínimo, um dos biomarcadores avaliados. Entretanto, apenas poucos polimorfismos nos genes *TFR2*, *TMPRSS6* e *HFE* foram repetida e simultaneamente associados com múltiplos biomarcadores, em diferentes grupos étnicos (Quadro 1).

Notoriamente, os três genes acima mencionados, que mais fortemente se associaram com o *status* de ferro da população geral, são também aqueles relacionados com doenças monogênicas do metabolismo do mineral (*TRF2* e *HFE* – hemocromatoses; *TMPRSS6* – IRIDA). Em vista das supostas funcionalidades destes genes na regulação da síntese de hepcidina, acredita-se que suas associações com os biomarcadores do ferro sejam intermediadas por seus efeitos sobre a produção deste hormônio (GALESLOOT et al., 2013; PICHLER et al., 2011; TRAGLIA et al., 2011).

O receptor de transferrina 2 (*TRF2*), juntamente com a proteína HFE e o receptor de transferrina 1 (TFR1), é um importante sensor e regulador dos níveis séricos de ferro. Sua função biológica está relacionada com a capacidade de interagir com a transferrina sérica. Supostamente, em situações de aumento da concentração sérica de ferro, o TRF1, acoplado à proteína HFE na membrana plasmática das células, excede sua capacidade de ligação à transferrina, dando espaço à ligação desta molécula com o TRF2. A ligação TF-TFR2 é então estabilizada pela HFE, deslocada do TFR1. Subsequentemente, o complexo HFE-TFR2 interage com o receptor de membrana das BMPs, ativando-o e, deste modo, desencadeando a cascata de sinalização intracelular das SMADs. Os níveis de saturação da transferrina são então readequados em resposta a um aumento da produção de hepcidina e consequente redução na absorção e na mobilização do ferro (ESTATIEV & GASCHE, 2011).

O polimorfismo rs7385804 do *TFR2* é localizado em uma região intrônica do gene e, assim, não provoca alterações estruturais na proteína. Embora se acreditasse que a troca de nucleotídeo (c.8204G>T) estivesse associada com expressão alélica diferencial do *TFR2*, verificou-se que, na presença desta variante, não houve diferença na abundância do mRNA do gene em amostras de fígado

humano (PICHLER et al, 2011). Além disso, a validação dos resultados de GWAS em estudo observacional não confirmou a associação desta variante com alterações significantes no *status* de ferro de mulheres chinesas (AN et al., 2012).

Mais da metade dos GWAS que estudaram o *status* de ferro de populações caucasianas encontraram associação da variante HFE^{282Y} (rs1800562) com mais de um biomarcador avaliado (Quadro 1), corroborando sua forte influência sobre o funcionamento da maquinaria de produção da hepcidina (MUCKENTHALER, 2014). Em alguns estudos, a variante HFE^{63D} (rs1799945) também foi associada com aumentadas concentrações de ferro sérico (PICHLER et al., 2011) e de hemoglobina (CHEN et al., 2013), contudo, essas associações não foram sistematicamente reproduzidas.

A frequência polimórfica (~4%) da mutação HFE^{282Y} em regiões do norte europeu é contrastante com sua ausência em populações africanas (populações CEU e YRI - INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT, 2014). Ainda assim, o efeito desta variante sobre o *status* de ferro parece ser independente da ancestralidade biogeográfica, já que, na população afro-americana, produto da miscigenação entre europeus e africanos, esta variante foi associada com aumentadas concentrações de hemoglobina (CHEN et al., 2013). Na população brasileira, também resultante de miscigenação entre europeus, africanos e indígenas, a frequência das variantes HFE^{282Y} e HFE^{63D} são baixas (~1,5% e ~11%, respectivamente) (BUENO, DUCH & FIGUEIREDO, 2006), ainda assim, estes polimorfismos foram associados com variações no *status* de ferro de doadores de sangue (SANTOS et al., 2010). Acompanhando a diversidade ancestral da nossa população (LIMA-COSTA et al., 2015), importantes diferenças nas frequências alélicas das variantes HFE^{282Y} e HFE^{63D} são observadas entre as regiões do país e entre grupos de indivíduos com diferentes classificações étnicas (LEÃO et al., 2014).

Quadro 1. SNPs associados com marcadores do *status* de ferro em estudos de associação genômica ampla (GWAS).

Gene	SNP	População	Frequência alélica*	Biomarcador do *status* de ferro	Referência
HFE	rs1800562 (HFE^{282Y})	Australianos	0,04	↑ Hb, ↑ VCM, ↑ HCM, ↑ Fe, ↑ %Sat, ↑ Ferritina	BENYAMIN et al., 2009
		Europeus	0,04		SORANZO et al., 2009
		Europeus	0,04		GANESH et al., 2009
		Norte americanos	0,06		KULLO et al., 2010
		Norte americanos	0,06		LO et al., 2011;
		Europeus	0,07		TRAGLIA et al., 2011
		Norte americanos	0,07		MCLAREN et al., 2011
		Norte americanos	0,08		KOLLER et al., 2016
TFR2	rs7385804	Europeus	0,35	↓ Ht, ↓ RBC, ↓ Fe	GANESH et al., 2009
		Europeus	0,35		PICHLER et al., 2011
TMPRSS6	rs855791 ($MT2^{736V}$)	Australianos	0,42	↓ Hb, ↓ VCM, ↓ HCM, ↓ Fe, ↓ %Sat, ↑ sTfr, ↓ Ferritina	BENYAMIN et al,, 2009b
		Europeus	0,39		GANESH et al., 2009
		Indianos	0,47		CHAMBER et al., 2009
		Japoneses	0,56		KUMATANI et al, 2010
		Norte americanos	0,44		KULLO et al., 2010
		Europeus	0,45		TRAGLIA et al., 2011
		Norte americanos	0,44		LI et al., 2013
TMPRSS6	rs4820268	Norte americanos	0,47	↓ HCM, ↓ CHCM, ↓ Fe	KULLO et al., 2010
		Europeus	0,50		PICHLER et al., 2011

* Frequência do alelo supostamente responsável pela direção da associação.

Polimorfismos no gene *TMPRSS6* são relatados pelos GWAS como os mais fortemente associados com menores concentrações de ferro sérico e hemoglobina, bem como com índices eritrocitários indicativos de eritropoese deficiente em ferro, tanto na população europeia quanto na asiática e afro-americana (Quadro 1). Os polimorfismos rs4820268 ($MT2^{521D}$) e rs855791 ($MT2^{736V}$) parecem modificar a atividade normal deste gene, influenciar a produção hepática de hepcidina e, por sua vez, afetar a absorção intestinal do ferro dietético (NAI et al., 2011). Há ainda evidências que a variante $MT2^{736V}$ exerça efeitos pleiotrópicos sobre o metabolismo do ferro e da eritropoese, por mecanismos ainda não elucidados, que podem ser independentes das concentrações circulantes de hepcidina (GALESLOOT et al, 2013; TRAGLIA et al., 2011; BENYAMIN et al, 2009).

A significância do *TMPRSS6* (matriptase 2 – MT2) no metabolismo do ferro não só é destacada pelos GWAS, como também por muitos estudos "*in vitro*" e "*in vivo*", que atestaram a funcionalidade desta proteína no controle da expressão hepática de hepcidina. Modelos de camundongos mutantes, com deleção do domínio catalítico da matriptase-2 exibem aumento na expressão hepática de hepcidina, reduzida absorção de ferro dietético e desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica grave. Ao contrário, em linhagens de células HepG2, a super expressão da matriptase-2 selvagem provoca reduzida ativação do promotor do gene *HAMP* (DU et al., 2008). Em humanos, a presença de mutações que provocam a perda de função do gene *TMPRSS6* está associada ao desenvolvimento da anemia ferropriva refratária ao ferro (IRIDA – *Iron-refractory Iron Deficiency Anemia*).

Os polimorfismos rs4820268 e rs855791 no *TMPRSS6*, apesar de não alterarem a atividade da matriptase-2 na mesma magnitude que as mutações associadas à IRIDA, de modos diferentes, parecem afetar a produção natural de hepcidina pelo fígado. O polimorfismo rs855791, no éxon 17 do gene, é a variante funcional mais importante, por causar uma substituição não sinônima de alanina por valina (c.2321A>G – p.A736V) no domínio catalítico da matriptase-2 e, assim, provocar redução significante na atividade dessa protease. Não obstante, indivíduos homozigotos para o alelo polimórfico do rs855791 ($MT2^{736V}$/$MT2^{736V}$) exibem maiores concentrações séricas de hepcidina e menores valores de ferro e saturação da transferrina quando comparados aos homozigotos para o alelo selvagem ($MT2^{736A}$/$MT2^{736A}$) (NAI et al., 2011). Nos diferentes grupos étnicos, uma grande

proporção da população é carreadora da variantes $MT2^{736V}$ (Quadro 1). Sua frequência alélica na Europa e na Ásia é de 45% a 50%, enquanto, em populações africanas, é estimada em 10% (INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT, 2005).

O polimorfismo rs4820268 no éxon 13 (c.1536G>A – p.D521D) não causa uma substituição de aminoácidos na sequência da matriptase-2. Ainda assim, a presença desse polimorfismo mostrou estar associada à expressão alélica diferencial do mRNA do *TMPRSS6* no fígado (PICHLER et al., 2011). Tal efeito, contudo, pareceu não resultar em diferença significante na atividade normal da matriptase-2. Uma vez que o rs855791 existe em forte desequilíbrio de ligação com o rs4820268 (r^2 entre 0,7 e 0,9), as associações encontradas entre o último polimorfismo e o *status* do ferro podem ser secundárias àquelas condicionadas pelo primeiro (NAI et al., 2011; PICHLER et al., 2011). Entretanto, há evidências que os dois polimorfismos atuem sinergicamente quando em haplótipo (GAN et al., 2012).

Em conjunto, as informações expostas destacam que as variantes comuns dos genes *TMPRSS6* e *HFE* exercem impacto importante sobre a homeostase do ferro. Para o grupo populacional de mulheres na idade reprodutiva, as variantes HFE^{282Y} e HFE^{63D}, em vista de seus supostos efeitos positivos sobre a absorção intestinal do ferro dietético, são apontadas como potenciais marcadores genéticos de proteção à deficiência de ferro (DATZ et al., 1998; TERADA et al., 2009; BLANCO-ROJO et al., 2011). Por outro lado, poucos estudos investigaram os efeitos das variantes do gene *TMPRSS6* sobre o *status* do ferro de mulheres adultas e, dentre esses, resultados inconsistentes foram obtidos quando populações distintas foram avaliadas (BAEZA-RICHER et al., 2015; CHENG et al., 2014; HE et al., 2013; SORENSEN et al., 2012; BLANCO-ROJO et al., 2011, TANAKA et al., 2010; BENYAMIN et al., 2009).

Nos Estados Unidos, He e colaboradores reportam que a variante $MT2^{736V}$ se associou com reduzido estoque corporal de ferro entre mulheres do *Nurses' Heatlh Study* (HE et al., 2012) e, neste mesmo país, um pequeno estudo de base hospitalar encontrou outras variantes no gene *TMPRSS6* (rs2235324 e rs2235321), mas não a $MT2^{736V}$, associadas com a deficiência de ferro (LEE et al., 2012). Blanco-Rojo e colaboradores (2011) não encontraram qualquer relação entre as variantes do *TMPRSS6* e as concentrações de transferrina de espanholas em idade reprodutiva (BLANCO-ROJO et al., 2011) e a falta de associações do mesmo alelo com a ferritina foi descrita por outro estudo com doadoras de sangue na Dinamarca

(SORENSEN et al., 2012). Na China, por outro lado, An (2012), Pei (2014) e seus colaboradores observaram que a variante $MT2^{736V}$ estava não somente associada com menores concentrações de ferro sérico e hemoglobina, mas também era fator de risco genético à deficiência de ferro e à anemia ferropriva entre as mulheres idosas (AN et al., 2012) e na idade reprodutiva (PEI et al., 2014) daquela população.

O conflito entre os estudos acima citados pode se relacionar aos seus delineamentos, que combinam indivíduos saudáveis e doentes, com faixas etárias distantes e com exposição a diferentes fatores fisiológicos, ambientais e comportamentais não controlados. Ao se considerar que o prejuízo na absorção do ferro dietético é o principal mecanismo pelo qual as variantes do *TMPRSS6* afetam a homeostase do mineral, a relação genótipo-fenótipo pode ser mascarada ou evidenciada por fatores que modificam sua biodisponibilidade na dieta. Ao passo que essas variantes são fatores de proteção à hemocromatose (GAN et al., 2012) e moduladoras da expressividade desta doença (VALLENTI et al., 2012), possivelmente, são também determinantes da eficiência de absorção do ferro dietético e, assim, da resposta dos biomarcadores do mineral ao seu consumo alimentar.

2.3 DIETA E *STATUS* DE FERRO

Fleming (1998), Liu (2003) e seus colaboradores descreveram dois dos mais importantes estudos epidemiológicos sobre o papel da dieta no *status* de ferro de populações aparentemente saudáveis. Em uma amostra originalmente composta por 5127 americanos participantes do *Framingham Heart Study*, os principais fatores dietéticos associados com as reservas corporais de ferro foram: o consumo de ferro heme, de suplementos de ferro, de vitamina C, de álcool e de café (FLEMING et al., 1998). Entre mulheres do *Nurses´ Health Study*, ferro heme, suplementos de ferro e álcool também foram determinantes dietéticos das concentrações séricas de ferritina (LIU et al., 2003). A observação, nestes estudos, de que o consumo de ferro em si não se relacionou com os biomarcadores do mineral é frequentemente descrita (FBN, IOM, 2001) e é coerente com os achados de trabalhos experimentais, realizados com alimentos e refeições isolados, os quais confirmam que a absorção do ferro dietético depende muito mais de sua biodisponibilidade que de seu conteúdo total na dieta (RICKARD et al., 2009; FLEMING et al., 1998; HALLBER, HULTHÉN, 2000).

Visando facilitar o entendimento da relação entre dieta e *status* de ferro, mais de dez diferentes algoritmos de predição da biodisponibilidade de ferro em refeições e/ou dietas completas foram propostos nos últimos 40 anos (COLLINGS et al., 2013; ARMAH et al. 2013; HUNT, 2010; RICKARD et al., 2009; CONWAY et al., 2007; REDDY, 2005; MONESEN et al., 1978). As mais confiáveis dessas equações foram derivada de ensaios laboratoriais com humanos, nos quais foram testadas a absorção e a utilização do ferro heme e não heme após marcá-los com radioisótopos ou isótopos estáveis do mineral em refeições ou dietas completas quimicamente caracterizadas (MONSEN et al., 1978; REDDY et al., 2000; HALLBERG & HULTHÉN, 2000; ARMAH et al., 2013; COLLINGS et al., 2013). Nesses mesmos ensaios, o efeito que o estado nutricional de ferro exerce, por si, sobre a biodisponibilidade do mineral, foi também estabelecido (HUNT, 2010; FAIRWEATHER-TAIT, COLLINGS, 2010). Assim, depois de levada em consideração a influencia inversamente proporcional entre a magnitude das reservas corporais de ferro e sua taxa de absorção intestinal, os diferentes autores resumiram, em equações matemáticas, os efeitos ajustados de componentes da dieta sobre a biodisponibilidade do mineral (REDDY, 2005).

Estão entre as potenciais utilidades práticas dos algoritmos de biodisponibilidade de ferro a avaliação da adequação do consumo alimentar e a predição do efeito de diferentes intervenções dietéticas sobre o *status* do mineral, tanto em nível individual, quanto populacional (HUNT, 2010). Contudo, limitações em suas aplicações incluem a necessidade de obtenção de dados acurados sobre a forma química do ferro presente nos alimentos (ferro heme é mais bem absorvido que ferro não heme) e do conteúdo de outros nutrientes e não nutrientes, muitas vezes indisponíveis nas tabelas de composição química (HUNT, 2010; LYNCH, 2005; REDDY, 2005). A vitamina C, o álcool e os tecidos animais (carne, peixe e frango) são alguns dos fatores dietéticos que aumentam a biodisponibilidade do ferro não heme, enquanto que, o cálcio, o fitatos e os polifenóis são, por exemplo, fatores dietéticos que a diminuem (HUNT, 2010; RICKARD et al., 2009; CONWAY et al., 2007; REDDY, 2005).

Monsen e colaboradores (1978) foram pioneiros ao criarem o modelo mais tradicional para avaliação da biodisponibilidade do ferro em refeições. Com base em dados obtidos na época, taxas de absorção de ferro heme entre 15% e 35% foram atribuídas a indivíduos com diferentes reservas corporais de ferro (valores cogitados

de 0, 250, 500 ou 1000 mg). Já para o ferro não heme, taxas de absorção que variavam de 2% a 20% foram propostas, a depender do somatório do conteúdo de vitamina C e de tecidos animais em cada refeição (MONSEN et al., 1978). Nenhum efeito dos elementos dietéticos reconhecidos como inibidores da absorção do ferro foi assumido nesse algoritmo, o que, anos mais tarde, motivou alguns pesquisadores a modificar o modelo inicial. Com base principalmente em observações não laboratoriais, Tseng (1997), Bhargava (2000), Du (2000) e seus colaboradores, incluíram, no modelo, correções para efeitos presumidos do fitato e de chás (ricos em polifenóis) sobre a absorção do ferro não heme, a fim de possibilitar a utilização do algoritmo na avaliação de dietas orientais, pobres em carnes (BHARGAVA et al., 2001; DU et al., 2000; TSENG et al., 1997).

O mais complexo dos algoritmos já publicado foi desenvolvido por Hallberg e Húlthen (2000). Esses autores estimaram acuradamente o efeito dos mais conhecidos inibidores (fitato, polifenóis, cálcio, proteína de soja, ovo) e facilitadores (vitamina C, tecidos animais e álcool) da absorção do mineral, bem como o efeito interativo entre alguns deles (por exemplo, redução dos efeitos atribuídos ao fitato e aos polifenóis na presença de vitamina C ou tecidos animais). Além disso, equações de regressão obtidas entre determinações individuais da concentração sérica de ferritina e valores de absorção de doses referências foram utilizadas para o ajuste das estimativas de biodisponibilidade do ferro heme e não heme em função do *status* corporal do mineral (HALLBERG & HULTHÉN, 2000).

Reddy e colaboradores (2000) publicaram, no mesmo ano, outro algoritmo de predição da absorção do ferro não heme, também baseado em refeições. Entretanto, esse modelo foi limitado ao computar apenas os efeitos isolados de tecidos animais, vitamina C e fitato, sendo, assim, uma alternativa mais simplificada ao algoritmo de Hallberg e Húlthen (2000) (REDDY et al., 2000). Propostas posteriores de algoritmos de predição da absorção do ferro não heme baseados em refeições foram geradas a partir de meta-análise (CONWAY et al., 2007), de ensaios com curvas de ferro sérico (RICKARD et al., 2009) ou de ensaios de dialisabilidade *in vitro* (CHIPLONKAR & AGTE, 2006). Entretanto, esses modelos não tiveram suas validades apropriadamente atestadas por estudos externos (HUNT, 2010).

Por muitos anos, argumentou-se que o somatório do ferro biodisponível calculado em cada refeição de um dia poderia ser assumido como o total da dieta em avaliação (MONSEN et al., 1978; HALLBERG & HULTHÉN, 2000; HALLBERG,

2000). Entretanto, alguns autores relatam discrepâncias importantes nos resultados de absorção de ferro de refeições teste e de dietas completas, monitoradas por períodos de 2 a 10 semanas, mesmo asseguradas similaridades na composição química dos alimentos consumidos (COOK, 1991; HUNT & ROUGHEAD, 2000; HUNT, 2010). Com esses achados, foi sugerido que, frente ao consumo regular de determinados elementos dietéticos, indivíduos com pequenas necessidades fisiológicas do mineral poderiam adaptar seus mecanismos de absorção, a fim de manter suas reservas corporais homeostáticas. Essa adaptação atenuaria, então, os efeitos presumidos da dieta sobre as variações no *status* corporal de ferro (COOK, 1991; HUNT & ROUGHEAD, 2000). Em resposta a essa premissa e com o intuito de suplantar a suposta deficiência dos algoritmos baseados em refeições em superestimarem ou subestimarem os efeitos de facilitadores ou inibidores da absorção do ferro, dois novos modelos para predição da biodisponibilidade do mineral, baseados em dietas completas, foram recentemente publicados (COLLINGS et al., 2013; ARMAH et al., 2013).

Há que se considerar que muitos componentes dietéticos não reconhecidos pelos algoritmos de biodisponibilidade de ferro possam ter influência importante sobre a absorção e utilização do mineral (HALLBERG & HULTHÉN, 2000) e que efeitos interativos entre componentes já identificados não estejam suficientemente ponderados nos modelos atualmente disponíveis (LYNCH, 2005). Não é surpresa, assim, que a precisão e a acurácia das predições de biodisponibilidade obtidas com essas equações sejam ainda questionáveis (HUNT, 2010; ZIMMERMAN et al., 2005; BEARD et al., 2007; LYNCH, 2005). Além disso, entre os poucos estudos populacionais que buscaram avaliar a validade de alguns algoritmos em predizer variações no *status* de ferro (ZIMMERMAN et al., 2005; BEARD et al., 2007), importantes limitações metodológicas foram identificadas (HUNT, 2010; LYNCH, 2005), o que ainda torna inconclusiva a questão sobre qual método melhor de aplica aos diferentes tipos de dietas.

Hunt (2010) e Lynch (2005), em suas revisões críticas sobre a validade dos algoritmos de biodisponibilidade de ferro, relatam que comparações entre estudos são muitas vezes limitadas pela falta de consenso na definição do termo “biodisponibilidade” (HUNT, 2010; LYNCH, 2005). Neste sentido, comitês científicos que propõe valores de referência de ingestões dietéticas, como a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2001) e o Instituto de Medicina

dos Estados Unidos (FNB, IOM, 2001), definem a biodisponibilidade de ferro como a fração do conteúdo total consumido capaz de ser extraída da dieta por indivíduos com mínimas reservas corporais do mineral, sem comprometimentos das funções fisiológicas dele dependentes (FAO, 2001; FNB, IOM, 2001; LYNCH, 2005). Como exemplo, nas referências de ingestão dietética (DRI – *Dietary Reference Intakes*), atribui-se para a dieta de norte-americanos uma biodisponibilidade de ferro de 18% (FNB, IOM, 2001), ainda que o valor não ajustado de sua absorção total, nesta população, tenha sido estimado em 3,7% (ARMAH et al., 2015). Assim, por definição, estimativas de biodisponibilidade devem refletir a média da máxima habilidade fisiológica de absorção do ferro por indivíduos não anêmicos e com mínimos valores de ferritina (~15 µg/L), e não como a média de absorção por indivíduos com variadas magnitudes de reservas corporais do mineral (LYNCH, 2005).

Recentemente, visando à obtenção de estimativas com a acurácia aceitável para os ajustes de referências de ingestão dietética, foi proposto um método alterativo de estimativa da biodisponibilidade dietética de ferro a partir de dados pontuais de seu consumo habitual e do seu *status* corporal (DAINTY et al., 2014). Esse método se baseia em um modelo probabilístico de aproximação, onde curvas de distribuição das necessidades fisiológicas de ferro são comparadas a uma série de valores teóricos de absorção do ferro total estimado nas dietas, a fim de estabelecer, para a população estudada, a relação entre a biodisponibilidade média do mineral e a probabilidade de inadequação do seu consumo e/ou *status* corporal. A partir das médias de inadequação do consumo de ferro calculadas para cada intervalo de absorção teórica, é estimado, por aproximação, o valor que seria compatível com a prevalência observada de indivíduos com adequação do seu *status* corporal (ferritina ≥ 15 µg/L) (DAINTY et al., 2014).

Uma vantagem deste último modelo, em relação aos algoritmos de biodisponibilidade, é a dispensa da coleta de dados quantitativos de ferro heme ou de inibidores e facilitadores da absorção do ferro não heme, como já citado, muitas vezes de difícil obtenção (por exemplo, fitato e polifenóis) (DAINTY et al., 2014; HUNT, 2010). Por outro lado, por gerar uma única média populacional, variações interpessoais da biodisponibilidade do mineral não são calculadas por esse modelo. Além disso, sua aplicação é válida somente para grupos de indivíduos em balanço estacionário do ferro corporal (DAINTY et al., 2014) que, por sua vez, é estabelecido

após longo prazo de invariabilidade das necessidades fisiológicas e do consumo dietético individuais (HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 1998). Assim, crianças e adolescentes em crescimento, mulheres com mudanças transitórias das perdas de ferro (períodos perimenarcal, gestacional, perimenopausal ou de mudança recente no uso de anticoncepcionais hormonais) e indivíduos com mudanças recentes no consumo e/ou na biodisponibilidade do ferro dietético (por exemplo, histórico recente de mudança dos hábitos alimentares ou no uso de suplementos) são exemplo de grupos populacionais para os quais este método não é recomendado (DAINTY et al., 2014; HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 1998),.

Como extensivamente pesquisado por Hallberg e seus colaboradores, utilizando uma variedade de modelos matemáticos desenvolvidos em seu laboratório, períodos tão longos quanto 12 e 36 meses são necessários para que um balanço estacionário do ferro corporal seja estabelecido em resposta a variações na biodisponibilidade dietética de ferro e/ou nas necessidades fisiológicas do mineral (HALLBERG, 2000; HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 1998; HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 2000). Mudanças abruptas e com grande impacto sobre o balanço de ferro podem resultar em prolongações ainda maiores no estabelecimento do equilíbrio entre a absorção e as suas perdas corporais. Exemplo disso é a doação voluntária de sangue que, entre mulheres na idade reprodutiva, pode acarretar em um risco substancialmente aumentado de deficiência de ferro, até dois anos após a última doação (CABLE et al., 2012).

Neste sentido, considerando-se uma mulher na idade reprodutiva (~60 kg de peso corporal), com necessidade fisiológica mediana de ferro (~20 µg de Fe / kg de peso/ dia) e com dieta típica das populações ocidentais (~30 µg de Fe / kg de peso/ dia), estima-se que suas reservas corporais do mineral sejam estabilizadas em cerca de 70 mg (ferritina sérica ~ 20 µg/L) e que sua concentração de hemoglobina circulante esteja próxima de 13,5 g/dL (HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 2000). E, ainda, que mais de 230 mg de ferro sejam perdidos com uma unidade de doação de sangue (450-500 ml) (CABLE et al., 2012), o que, por consequência, levaria a um déficit momentâneo de 160 mg do ferro corporal total e queda da concentração de hemoglobina para cerca de 12,0 g/dL (HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 2000). Em concordância com os achados do estudo epidemiológico citado acima (CABLE et al., 2012), mais de dois anos são supostamente necessários para que o *status* de ferro anterior à doação de sangue seja reestabelecido, mesmo que 80% da recuperação

ocorra no primeiro ano (HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 2000; HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 1998).

Outros fatores não dietéticos que afetam o balanço corporal de ferro e/ou a relação da biodisponibilidade dietética com seu *status* corporal incluem a idade, o índice de massa corporal (IMC), o tabagismo, o grau de atividade física, o uso crônico de aspirina e o uso crônico de inibidores de bombas de próton (PYNAERT et al., 2008; CADE et al., 2005;, FBN, IOM 2001). A gravidez e a lactação podem repercutir em alterações da homeostase do ferro até 24 meses após o parto (BODNAR, COGSWELL, MCDONALD, 2005). A presença de infecções, inflamações e doenças crônicas (incluindo a obesidade) também influenciam o *status* do mineral, independentemente de outras variáveis (HENTZE et al., 2010; TUSSING-HUMPHREYS et al., 2009). Não obstante, métodos de correção dos valores de ferritina pela presença de inflamação têm sido propostos, a fim de contornar os problemas relacionados com a interpretação dos resultados deste biomarcador em populações com alta prevalência de obesidade e/ou de doenças infectocontagiosas (GARTNER et al., 2013; WHO, 2012). Os efeitos que os fatores não dietéticos exercem sobre a absorção e a utilização do ferro são mediados pela ação da hepcidina que, como já citado, tem sua produção determinada não só pelas reservas de ferro, mas também pela inflamação, hipóxia e atividade eritropoética (ESTATIEV & GASCHE, 2011).

2.4 *TMPRSS6*, DIETA E *STATUS* DE FERRO

Resultados de ensaios de absorção de ferro indicam que a biodisponibilidade do mineral, em diferentes refeições ou dietas completas, pode variar de 1 a 58% entre homens e mulheres aparentemente saudáveis. Uma pequena fração dessa variação é atribuída à composição química das refeições testadas, enquanto a maior parte se deve às diferenças nas reservas corporais de ferro entre os indivíduos (ARMAH et al., 2013; HUNT, 2010). No entanto, mesmo depois que componentes dietéticos conhecidos por influenciar a biodisponibilidade de ferro e os valores individuais de ferritina sérica são levados em consideração, juntos, o estoque de ferro e a composição da dieta explicam apenas 50% da variação nos valores observados de sua absorção, sugerindo um que um forte componente genético está relacionado com este processo (ZIMMERMAN et al., 2010).

Em condições de eritropoese acelerada, como na β-talassemia e em outras anemias hemolíticas congênitas, as reservas corporais de ferro exercem influência relativamente menor sobre a biodisponibilidade do ferro dietético que aquela observada em indivíduos saudáveis (ZIMMERMAN et al., 2008). Possivelmente isso faz com que os efeitos de fatores genéticos relacionados com a eficiência de absorção do mineral tenham importâncias relativamente maiores nestas condições.

No presente trabalho, foi estudada a importância relativa que a biodisponibilidade estimada de ferro dietético e que genótipos *TMPRSS6* tem sobre as variações em biomarcadores do seu *status* corporal entre mulheres com atividades eritropoética normal ou aumentada. Para tanto, além de um estudo transversal observacional com universitárias em idade reprodutiva aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal (Estudo 1), foi conduzido outro estudo, do tipo caso-controle, com mulheres diagnosticadas com β-talassemia menor (Estudo 2). Testaram-se as hipóteses de que: 1) a relação da dieta com os biomarcadores do *status* de ferro é modificada por variantes do gene *TMPRSS6* entre mulheres com atividade eritropoética normal; e 2) o impacto de variantes do gene *TMPRSS6* sobre os biomarcadores do *status* de ferro é mais pronunciado entre as mulheres com atividade eritropoética relativamente aumentada.

Com os resultados obtidos, pretende-se melhorar o entendimento sobre como variantes genéticas afetam o metabolismo do ferro e, possivelmente, a resposta individual ao consumo alimentar entre indivíduos com diferentes riscos à sua deficiência ou sobrecarga corporal. Os achados poderão contribuir para o aperfeiçoamento de ações de saúde pública e recomendações dietéticas individualizadas voltadas à prevenção e ao tratamento dos desequilíbrios na homeostase do mineral.

3 OBJETIVO

3.1 GERAL

Avaliar a relação entre genótipos *TMPRSS6,* o consumo de ferro biodisponível e o seu *status* corporal em condições normais (mulheres aparentemente saudáveis) ou de aumento da atividade eritropoética (β-talassemia menor).

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar:

1) a associação entre diferentes estimativas de biodisponibilidade dietética de ferro e biomarcadores do seu *status* corporal entre mulheres adultas aparentemente saudáveis (Estudo 1 - Artigo 1);

2) a importância relativa de genótipos *TMPRSS6* e da biodisponibilidade estimada do ferro dietético em predizer variações nos biomarcadores do seu *status* corporal entre mulheres adultas aparentemente saudáveis (Estudo 1 - Artigo 2);

3) a importância relativa de genótipos *TMPRSS6* em predizer variações nos biomarcadores do seu *status* corporal entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e com β-talassemia menor (Estudo 2 - Artigo 3);

4 CASUÍSTICA

4.1 ESTUDO 1

4.1.1. Delineamento

Entre os meses de maio de 2014 e junho de 2016, foi realizado estudo transversal observacional com mulheres aparentemente saudáveis, selecionadas entre estudantes da Universidade de São Paulo (USP) por amostragem não probabilística de conveniência. O dimensionamento da amostra foi calculado pelo Instituto de Matemática e Estatística (IME) da USP. Assumiu-se a estratificação das mulheres segundo consumo estimado de ferro biodisponível e diferentes classificações genotípicas em grupos com representação mínima de 3,78% da amostra. Um total de 131 mulheres foi calculado, visando o suficiente poder de teste ($1 - \beta = 80\%$) para detectar diferença significativa ($\alpha = 5\%$) de no mínimo um desvio padrão nas médias geométricas de ferritina sérica.

O recrutamento de voluntárias foi feito por mensagens eletrônicas (*e-mails)* encaminhadas pelas secretarias de graduação e pós-graduação às estudantes de cursos oferecidos por faculdades e institutos localizados na cidade de São Paulo - SP. Cartazes de divulgação do estudo também foram afixados em murais autorizados nesses estabelecimentos. As estudantes dispostas a se voluntariar ao estudo acessaram um sítio eletrônico exclusivo da pesquisa (http://www.zeroonze.com.br/pesquisa/cadastro/), no qual fizeram cadastro de nome e endereço eletrônico, declarando que desejavam candidatar-se, estando cientes de que sua candidatura não implicaria em sua seleção. Mensagens de confirmação do voluntariado foram enviadas aos endereços eletrônicos cadastrados no sistema.

Em um primeiro contato, as estudantes foram orientadas a ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊDICE 1) do estudo e, se aceitassem os objetivos e as condições apresentados, a preencher uma ficha cadastral e responder a um questionário de elegibilidade *online* (APÊNDICE 2). Por este questionário, estruturado em 12 questões, foram coletadas informações sobre estado de saúde e estilo de vida (diagnóstico de doença crônica ou diagnóstico de parasitose intestinal recente, uso de medicamentos ou suplementos vitamínico-minerais, história de mudança dos hábitos alimentares ou do peso corporal e uso

abusivo de tabaco e álcool), de história obstétrico-ginecológica (regularidade do ciclo menstrual e história de gravidez ou amamentação recentes) e de perda ou reposição de sangue (doação ou transfusão de sangue, perda acidental de sangue ou cirurgia de grande porte recentes). Além disso, o diagnóstico de obesidade ou de desnutrição foi feito pela classificação do índice de massa corporal (IMC), calculado a partir dos valores auto relatados de estatura (em metros) e de peso corporal (em quilogramas) inseridos no sistema.

Candidatas que atenderam aos critérios de inclusão foram orientadas, via *e-mail*, a preencher três Registros Alimentares Pela *Internet* (RAPIs), em dias não consecutivos, no sistema Nutriquanti de acompanhamento do consumo alimentar (GALANTE, 2007) (APÊNDICE 3). Além disso, receberam instruções para preenchimento de um Questionário de Frequência Alimentar (QFA) no mesmo sistema (FISBERG et al., 2008; GALANTE, 2004) (APÊNDICE 4).

Sub-relato ou superrelato da ingestão energética foram considerados critérios de exclusão das mulheres no presente estudo. Assim, somente as estudantes com os RAPIs devidamente preenchidos e com dados de consumo alimentar aparentemente válidos tiveram data e horário agendados para que, depois de jejum de no mínimo oito horas, se apresentassem na FCF/USP para assinar o TCLE, coletar amostras de sangue, responder questionários de caracterização geral e ter medidas antropométricas aferidas.

4.1.2. Critérios de inclusão

- Idade entre 18 e 45 anos;

  E que, no questionário de elegibilidade, relataram:

  - Menstruação regular (ciclo menstrual de 28 dias ± 7 dias) nos últimos dois anos e não terem:
    - estado grávidas e lactantes nos últimos dois anos;
    - doado sangue, sofrido trauma ou recebido transfusão sanguínea nos últimos dois anos;
    - diagnóstico de parasitose intestinal nos últimos dois anos;
    - feito grandes mudanças em seus hábitos alimentares nos últimos seis meses;
    - feito uso contínuo de medicamentos e/ou suplementos vitamínico-minerais nos últimos seis meses;

- feito uso abusivo de álcool (>30g/dia ou 14 doses por semana) nos últimos seis meses;
- sido fumantes nos últimos seis meses;
- apresentado IMC ≥ 30 kg/m^2 (obesidade) ou ≤ 17 kg/m^2 (desnutrição) nos últimos seis meses;
- diagnóstico de doença crônica grave, incluindo Diabetes Mellitus, Hipertensão, Dislipidemias, Sobrecarga de ferro, Talassemias, Doença inflamatória intestinal, Úlcera gástrica, Doença celíaca, Doenças hemorrágicas, Doenças Renais ou Doenças Hepáticas.

Foram excluídas da amostra final as mulheres com:

- dados de ingestão energética subestimado ou superestimado;
- anemia (Hb < 12 g/dL), macrocitose (VCM > 100 fl), microcitose (VCM < 80 fl) ou anisocitose (RDW > 14,5) não associadas à deficiência de ferro;
- Infecção e/ou inflamação clinicamente importante (PCR > 10 mg/L)

4.1.3. Aspectos éticos

Os procedimentos para o desenvolvimento da pesquisa respeitaram as preconizações da Resolução número 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF/USP (Parecer número: 228.946/03-2013 – ANEXO 1). Somente participaram como voluntárias as estudantes que leram, entenderam e aceitaram os objetivos e os procedimentos descritos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Amostras de sangue, dados antropométricos e de caracterização geral foram obtidos somente após a assinatura do TCLE. O direito das estudantes desistirem de participar da pesquisa ficou garantido a qualquer momento, sem que houvesse qualquer tipo de constrangimento. A participação no estudo foi confidencial e os resultados foram arquivados apenas para fins de publicação científica. Não foi fornecida nenhuma forma de pagamento decorrente da participação na pesquisa.

Os possíveis riscos ou desconfortos relacionados com a participação neste estudo incluíram a dor referente à picada da agulha para a coleta de sangue e a

tontura causada pela hipoglicemia de jejum, que foi contornada pela equipe do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição, fornecendo-se lanche às participantes, imediatamente após a coleta de sangue.

O material utilizado durante a realização da pesquisa foi identificado por códigos e armazenado em biorrepositório na FCF/USP, sob responsabilidade da pesquisadora Doutora Célia Colli. A reutilização das amostras biológicas e informações coletadas em pesquisa futura somente ocorrerão mediante submissão de novo projeto de pesquisa ao CEP da FCF/USP e assinatura de novo TCLE pelos sujeitos da pesquisa.

Os resultados individuais dos exames hematológicos e bioquímicos e das medidas antropométricas foi entregue a todas as voluntárias, via *e-mail*. As estudantes que apresentaram alterações nos exames hematológicos e bioquímicos realizados foram encaminhadas à assistência médica pela Doutora Maria Stella Figueiredo (CRMSP. 44403) da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Ao final do estudo, os resultados individuais dos testes genéticos foram entregues àquelas que, no TCLE, declaram o desejo de conhecer essas informações.

4.2. ESTUDO 2

4.2.1. Delineamento

Dados de um estudo caso-controle sobre dieta, ácido fólico e imunidade, intitulado “Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina”, foram utilizados no presente estudo (PANIZ, 2015). De novembro de 2013 a dezembro de 2014 foram recrutados indivíduos aparentemente saudáveis da comunidade universitária local e indivíduos com β-talassemia menor atendidos nos Ambulatórios de Hematologia: 1) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2) da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e 3) da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica (PUC) de Sorocaba-SP.

4.2.2. Critérios de inclusão

- *Indivíduos com β-talassemia menor*

No estudo original (PANIZ, 2015), foram incluídos 50 indivíduos com diagnóstico de β-talassemia menor, maiores de 18 anos, de ambos os gêneros, que eram atendidos nos ambulatórios de Hematologia acima citados. Foram excluídos do estudo os etilistas crônicos, pacientes com infecções, com doenças crônicas não controladas ou em uso de medicações imunossupressoras. Para o presente estudo, somente os dados de mulheres foram utilizados. Foram ainda excluídas da amostra final aquelas com histórico de transfusão ou doação de sangue, gestação ou amamentação recentes (< 12 meses) e aquelas com diagnóstico prévio de sobrecarga de ferro.

- *Indivíduos aparentemente saudáveis*

No estudo original (PANIZ, 2015), foram incluídos 136 indivíduos aparentemente saudáveis com idade maior de 18 anos, provenientes da comunidade, pareados quanto ao gênero, idade, estado nutricional (IMC) e escolaridade (anos) com os pacientes com esferocitose hereditária e β-talassemia menor ou recrutados para um estudo prospectivo de intervenção com 5 mg/dia de ácido fólico. Foram excluídos do estudo os etilistas crônicos, portadores de doenças crônicas não controladas e aqueles que estiveram em uso de polivitamínicos ou fizeram uso destes nos últimos 6 meses. Foram ainda excluídas da amostra final aquelas com histórico de transfusão ou doação de sangue, gestação ou amamentação recentes (< 12 meses).

4.2.3. Aspectos éticos

Todos os indivíduos participantes do estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Os que foram favoráveis assinaram o TCLE. O projeto foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob parecer número 69/2012 em 25/09/2012; da Universidade Federal de São Paulo sob parecer número 69574 em 08/08/2012; e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo sob parecer número 230.882 em 27/03/2013.

Um adendo do projeto inicial, descrevendo os objetivos do presente estudo, foi enviado para apreciação dos comitês de ética acima citados em janeiro de 2014.

Os indivíduos que já haviam tido suas amostras coletadas antes desse período, lerem, entenderam e assinaram um novo TCLE contendo a descrição dos procedimentos de genotipagem das variantes *HFE* e *TMPRSS6*, assim como as análises bioquímicas e dietéticas relacionadas ao ferro. A partir de fevereiro de 2014, todos os participantes estiveram em acordo com o novo TCLE (APÊNDICE 5).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ESTUDO 1

5.1.1 Coleta de dados gerais

Informações sobre identificação (idade, naturalidade, estado civil, cor da pele autodeclarada, profissão e grau de formação), história clínica (histórico de sinais e sintomas e uso precedente de medicamentos ou suplementos), história de perdas ou reposição de sangue (doação ou transfusão de sangue precedente), história comportamental (vegetarianismo, histórico de modificação de hábitos alimentares, frequência semanal de refeições) e história obstétrico-ginecológica (histórico de início, intervalo e duração do ciclo menstrual, auto avaliação da intensidade do fluxo menstrual, uso de métodos anticoncepcionais, histórico de gestação e amamentação) foram obtidas por questionário semiestruturado de caracterização geral (APENDICE 6).

O tempo aproximado desde o dia da última menstruação foi informado pelas voluntárias a fim de definir a fase do ciclo menstrual em que ocorreu a coleta de sangue. Classificou-se: 1) fase menstrual: último dia da menstruação há mais de quatro semanas; 2) fase folicular: último dia há menos de uma semana 3) fase lútea: último dia entre uma e duas semanas; e 4) fase lútea tardia: último dia entre três e quatro semanas. Mulheres foram classificadas como usuárias de anticoncepcionais se relatado o uso contínuo destes hormônios há mais de 18 meses ou o abandono recente (há menos de 6 meses) da medicação após utilização ininterrupta por mais de dois anos. Não usuárias de anticoncepcionais foram aquelas sem histórico de uso contínuo de qualquer hormônio há pelo menos dois anos.

Um questionário de avaliação das perdas sanguíneas menstruais, previamente validado por Heath, Skeaff e Gibson (1998), foi integrado ao de caracterização geral a fim de se calcular um escore de fluxo menstrual individual. As mulheres informaram o número de dias com fluxo menstrual leve e intenso durante um período de menstruação normal e as quantidades médias de absorventes íntimos (internos e internos) utilizados em cada dia típico de menstruação. Informaram também o grau de absorvibilidade dos absorventes íntimos mais comumente utilizados, conforme descrito pelos fabricantes. Para produtos

classificados como normal, tipo mini e tipo noturno ou super foram atribuídos os valores de absorvibilidade relativa 1, 2 e 3, respectivamente. O escore do fluxo menstrual foi então calculado com a equação (HEATH, SKEAFF & GIBSON, 1998):

$$\text{Escore de Fluxo Menstrual} = (N_{MI} * \text{Índice}_{MI}) + (N_{ML} * \text{Índice}_{ML})$$

Onde: N_{MI} = número de dias de fluxo menstrual intenso; Índice_{MI} = (número médio de absorventes usados em dias de menstruação intensa * suas absorvibilidades relativas); N_{ML} = número de dias de fluxo menstrual leve; Índice_{MI} = (número médio de absorventes usados em dias de menstruação leve * suas absorvibilidades relativas).

O IPAQ (*International Physical Activity Questionnaire*) versão 8 curta, validado para a população brasileira (MATSUDO et al., 2001), também foi integrado ao questionário de caracterização geral. As mulheres indicaram o tempo gasto com atividades físicas na semana antecedente à coleta de sangue. De acordo com a frequência e a duração de execução de três tipos de atividade com diferentes graus de intensidades (caminhada, moderada ou vigorosa), classificou-se o nível de atividade física individual em sedentário ou irregularmente ativo, ativo e muito ativo (MATSUDO et al., 2001).

Por fim, foram adotados critérios de classificação do nível socioeconômico propostos pela Associação Brasileira de Empresa de Pesquisa (ABEP), com base na presença de funcionários e bens de posse domésticos. A partir da pontuação obtida com cada item do questionário, estratificaram-se as mulheres nas classes sociais A-E (ABEP, 2014).

5.1.2 Avaliação Antropométrica

A estatura e o peso corporal foram aferidos, em triplicata, com precisões de 0,1 centímetro e 10 gramas em estadiômetro portátil (*Alturaexata*) e balança digital portátil (*Kratos*), respectivamente. As mulheres foram pesadas e medidas, sempre pelo mesmo profissional treinado, descalças e usando roupas leves, em posição ereta, com os pés unidos e olhando para frente.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como a razão entre o peso corporal e o quadrado da estatura (kg / m²). A referência para avaliação do estado nutricional foi a proposta pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995), sendo consideradas eutróficas as mulheres que apresentaram valores de IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²; com baixo peso as que apresentaram valores abaixo de 18,5 kg/m² e

com sobrepeso valores entre 25 e 29,9 kg/m². Como já citado, mulheres obesas (IMC ≥ 30 kg/m^2) ou desnutridas (IMC < 17 kg/m^2) não foram selecionadas para o estudo.

A circunferência da cintura foi aferida, em triplicata, com auxílio de fita métrica inextensível (*AvaNutri*) com precisão de 0,1 centímetro. As medidas foram feitas no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e as leituras registradas no momento da expiração. As mulheres com valores de circunferência da cintura ≥80 e ≥88 centímetros foram classificadas com risco aumentado e muito aumentado de complicações metabólicas relacionadas à adiposidade abdominal, respectivamente, conforme propostos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998).

5.1.3 Avaliação do consumo alimentar

A coleta de dados de consumo alimentar foi feita com os inquéritos de Registro Alimentar Pela *Internet* (RAPI) e de Questionário de Frequência Alimentar (QFA) com a finalidade de: 1) estimar o consumo de ferro e outros elementos dietéticos relacionados com a biodisponibilidade do mineral; 2) estimar a biodisponibilidade do mineral em refeições e/ou dietas completas; 3) identificar os principais grupos de alimentos contribuintes para a ingestão de elementos dietéticos relacionados com a biodisponibilidade do mineral.

5.1.3.1 Registros Alimentares Pela Internet (RAPIs)

O Registro Alimentar Pela *Internet* (RAPI) foi desenvolvido pelo grupo de pesquisas do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da FCF/USP e validado por Galante (2007) para utilização em população adulta usuária da *internet*. Nesse tipo de inquérito, o indivíduo é orientado a acessar o *site* Nutriquanti (GALANTE, COLLI, 2007 – http://www.zeroonze.com.br/pesquisa/registro), fornecer *login* e senha individuais e, em três diferentes dias da semana, relatar sua ingestão de alimentos e bebidas em sete diferentes opções de refeição (café da manhã, lanche da manhã, almoço, lanche da tarde, jantar, lanche da noite e lanches diversos) realizadas durante as 24 horas de cada dia.

As orientações para o preenchimento dos RAPIs foram enviadas às voluntárias, via *e-mail*, junto das chaves de acesso ao Nutriquanti, num manual

explicativo anexado às mensagens (APÊNDICE 3). Nesse contato, as voluntarias foram solicitadas a não alterar seu hábito alimentar durante os dias de preenchimento dos RAPIs e, sempre que possível, detalhar ao máximo os tipos, porções e marcas de alimentos e bebida consumidos. Solicitou-se ainda o cadastro de alimentos e bebidas por refeições, definidas como: 1) café da manhã - principal refeição realizada durante o período da manhã; 2) almoço - principal refeição realizada no meio do dia ou durante a tarde, independente de ser composta por preparações quentes, frias ou lanches; 3) jantar - mesmo tipo de refeição do almoço, realizado no fim da tarde ou durante a noite; 4) lanches - refeições realizadas antes ou após as três principais refeições.

Ao receber as chaves de acesso ao sistema, dentro de um prazo de duas semanas, os três RAPIs deveriam ser preenchidos, em dias não consecutivos, incluindo um dia do final de semana. Nos casos em que nenhum acesso ao sistema foi efetuado após 15 dias do envio das chaves de acesso, dois novos prazos eram oferecidos às voluntárias a fim de que pudessem preencher todos os três RAPIs. Durante o período do estudo, dúvidas em relação ao preenchimento dos RAPIs foram esclarecidas com o pesquisador, via *e-mail* ou telefone. Quaisquer alimentos, bebidas ou medidas caseiras de alimentos não localizadas no sistema foram imediatamente inseridos, antes que as voluntárias finalizassem o registro alimentar no qual as informações estavam em falta.

No sistema Nutriquanti, alimentos, bebidas e preparações, assim como suas respectivas medidas de porção, apresentam códigos individuais, que são utilizados para atribuir dados de composição química e de energia a cada item alimentar cadastrado. A base de dados utilizada inclui mais de 3000 itens codificados. Referências de publicações nacionais são utilizadas para atribuir peso e volume às medidas caseiras de alimentos e bebidas, bem para desagregar receitas e preparações elaboradas em ingredientes (PINHEIRO et al., 2008; FISBERG & VILLAR, 2002; ARAÚJO & GUERRA, 1995).

O conteúdo de energia e de alguns componentes dietéticos necessários para a estimativa da biodisponibilidade do ferro (ferro total, vitamina C, cálcio e álcool) são calculados pelo sistema, a partir dos dados de tabelas nacionais e internacionais de composição química de alimentos (TACO, 2006; IGBE, 1996; PHILIPPI, 2001; TBCAUSP, 2008; USDA, 2003). Entretanto uma limitação destas tabelas é a ausência de informações sobre conteúdo de ferro heme, ferro derivado

de fortificações, fitatos, polifenóis, carnes, ovos e proteína de soja em alimentos, bebidas e preparações. Assim, para o presente estudo, uma base de dados com essas informações foi construída, a fim de enriquecer o sistema (APÊNDICE 7).

5.1.3.2 Questionário de Frequência Alimentar (QFA)

O QFA utilizado neste estudo foi validado por Fisberg et al. (2008) e modificado para utilização entre adultos e adolescentes do estudo de base populacional Inquérito de Saúde em São Paulo (ISA) 2013 (GAC, 2014). A frequência de ingestão habitual de 84 alimentos, bebidas ou grupos de alimentos nos 12 meses antecedentes à coleta de sangue foi questionada, sem referências ao tamanho de porções. As respostas foram auto preenchidas e incluíam as opções de consumo igual a zero, quatro categorias de unidades de tempo (consumo diário, semanal, mensal ou anual) e dez categorias de frequência. Dados faltantes (sem resposta ou rasurados) foram recuperados dentro de um prazo máximo de sete dias após a coleta de sangue, via *e-mail*.

Um mesmo profissional procedeu toda a digitação dos dados do QFA em máscara criada no programa Excel 2010 (*Microsoft*). Inconsistências ou erros de digitação foram checados no banco final, por um segundo profissional, antes destas informações serem utilizadas nas estimativas do consumo alimentar habitual.

5.1.3.3 Identificação de relato inválido da ingestão energética

O sub-relato da ingestão energética foi identificado pelo método proposto por McCrory e colaboradores (2002). Calculou-se a média individual de ingestão energética (IE) dos três RAPIs e a estimativa do gasto energético total predito (GETp) pela equação descrita por Vinken e colaboradores (1999), que emprega os dados de idade, gênero, estatura e peso corporal indiviudais. O ponto de corte para a detecção de subrelato foi considerado o limite inferior do intervalo de ±2 desvios padrão da razão IE:GETp. O cálculo do desvio padrão para esta razão levou em considerações as variações na ingestão energética (variação intrapessoal de 26% para mulheres), na estimativa do GETp (variação intrapessoal de 17,7%) e no gasto energético total quando calculado por método padrão-ouro de água duplamente marcada (variação de 8,2%) (MCCRORY et al., 2002; BLACK, 2000; VINKEN et al., 1999).

Foram considerados sub-relatoras as mulheres com razão IE:GETp ≤ 0,51. Por outro lado, foram consideras super-relatoras da ingestão energética as voluntárias com IE > 4000 Kcal por dia (WILLET, 1998).

5.1.3.4 Biodisponibilidade do ferro dietético

Três algoritmos baseados em refeições (MONSEN et al., 1978; HALLBERG & HULTHÉN, 2000; REDDY et al., 2000) e dois em dietas completas (ARMAH et al., 2013; COLLINGS et al., 2013) foram utilizados para estimativas da biodisponibilidade dietética do ferro. Em concordância com o conceito tradicional de biodisponibilidade (LYNCH, 2005; FNB, IOM, 2001; FAO, 2001), em todos os cálculos, o *status* de ferro individual foi ajustado para o nível de 0 mg de reserva corporal ou concentração sérica de ferritina igual a 15 µg/L. A medida foi usada para: 1) classificar as dietas do grupo, independentemente de diferenças interindividuais no *status* do mineral; 2) comparar as estimativas de cada algoritmo com a obtida por modelo probabilístico de aproximação, descrito a seguir; e 3) comparar as estimativas de cada algoritmo com o valor de biodisponibilidade de 18% adotado pelo Instituo de Medicina dos Estados Unidos para derivar as referências de ingestão para a população americana e canadense (FNB, IOM, 2001).

O conteúdo de ferro biodisponível (mg/dia) foi calculado separadamente para as frações heme e não-heme, contudo, o somatório total de cada RAPI foi utilizado para caracterizar a dieta das mulheres. Nos cálculos da biodisponibilidade do ferro heme, fixaram-se valores de absorção constantes nas equações de Monsen et al. (1978) (35%), Reddy et al. (2000) (25%), Armah et al. (2013) (25%) e Collings et. al. (2000) (25%), mas não de Hallberg e Hulthén (2000), na qual um efeito dietético variável (cálcio) foi computado.

Os elementos dietéticos empregados nos diferentes cálculos de biodisponibilidade do ferro não heme incluíram: ferro total (mg), ferro heme (mg), ferro não-heme (mg), ferro derivado de fortificação de alimentos (mg), carnes vermelhas, peixe e frango (tecido cru ou tecido preparado, g), vitamina C (mg), fitato ou ácido fítico (mg), polifenóis (equivalentes de ácido tânico, mg), cálcio (mg), proteína de soja (g), álcool (g ou doses, 15 g), ovos (unidades, 60 g) e equivalentes de cafés e chás (xícaras por dia). Quando necessário, valores de fitato e de tecidos animais crus foram convertidos a unidades de ácido fítico (3,53 mg = 1 mg de fitato-

fósforo) ou tecidos processados (1g = 1,3g de tecido cru) (MONSEN et al., 1978; HALLBERG & HULTHÉN, 2000).

Diferenças nas propriedades físico-químicas entre o ferro de compostos de fortificação e o ferro naturalmente presente nos alimentos foram consideradas nas estimativas de biodisponibilidade do ferro não heme. A razão para isto é o fato de que, tanto em ensaios com humanos como em modelos animais, apenas 50% do ferro de compostos de fortificação com baixa solubilidade em água entra no *pool* de ferro não heme naturalmente presente nos alimentos. Isso significa que aproximadamente metade do ferro presente como ferro elementar (ferro reduzido, ferro eletrolítico e ferro carbonila) ou sais de ferro insolúveis (pirofosfato de ferro, ortofosfato férrico) não é disponível para captação pelo enterócito (WHO, 2006).

No Brasil, a legislação referente à fortificação mandatória das farinhas de trigo e milho com ferro, vigente até o presente ano (BRASIL, 2002), permite que moinhos adicionem aos seus produtos uma série de compostos de ferro com diferentes solubilidades, entretanto, ferro reduzido parece ser o fortificante de escolha por mais de 70% dos moinhos (ASSUNÇÃO et al., 2012). Neste sentido, para os cálculos de biodisponibilidade do ferro, o total de ferro não heme das refeições e dietas completas foi calculado como a diferença entre o ferro total, o ferro não heme e 50% do total de ferro advindo da fortificação mandatória das farinhas de trigo e milho (assumida como sendo 4,2 mg do mineral a cada 100 g de produto). O ferro de fortificações voluntárias de alimentos não foi considerado, visto não se ter conhecimento do tipo específico de composto utilizado pela indústria.

Em estudos prévios, verificou-se que há superestimação nas predições obtidas com os algoritmos de Hallberg & Hulthén (2000) e de Reddy et al. (2000) em refeições ricas em facilitadores da absorção do ferro (RICKARD et al., 2011; HOPPE et al., 2008; BEARD et al., 2007). Para contornar o problema, como sugerido por Hoppe et al. (2008), as refeições com altos conteúdos de vitamina C (> 85 mg) e/ou de tecidos animais (> 175 g), quando avaliadas com os dois algoritmos, tiveram os valores destes elementos fixados em 85 mg e 175 g (134,6 g de tecidos preparados), respectivamente (13,8% das refeições). Além disso, estimativas de absorção do ferro não heme maiores que 45% foram manualmente ajustadas para este limite máximo, quando necessário (5,8% das refeições). Todos os cálculos de biodisponibilidade baseado em refeições foram realizados com comandos no programa Excel 2010 (*Microsoft*).

Nos cálculos propostos por Armah, et al. (2013) e Collings et al. (2013), os somatórios de consumo observados nos RAPIs individuais foram empregados como dados de dietas completas. No último modelo, é requerida a classificação subjetiva das dietas em três diferentes tipos (Collings et al. 2013). Em nosso estudo, duas discriminações foram consideradas, sendo dietas vegetarianas ou restritas em carnes julgadas como ricas em inibidores e/ou pobres em facilitadores da absorção do ferro, e dietas onívoras como dietas não modificadas.

Uma estimativa adicional de biodisponibilidade média do ferro dietético, independente dos erros associados à quantificação de inibidores e facilitadores da sua absorção, foi obtida com modelagem probabilística, como proposto por Dainty et al. (2014). Inicialmente, percentis de necessidades fisiológicas de ferro (FNB, IOM, 2001) foram utilizados para construir curvas de probabilidades de inadequação, variando em incrementos de 5% dentro de uma faixa de 0 a 100%, com auxílio do comando de interpolação no programa *online* R (R CORE TEAM, 2013). Em seguida, os valores foram comparados a estimativas teóricas de absorção do ferro dietético de cada mulher, numa faixa de 1 a 40%, a fim de estimar a probabilidade de cada nível de consumo estar atendendo a necessidade corporal individual. A média amostral de inadequação associada a cada intervalo de absorção foi calculada e utilizada para determinar, por aproximação, o valor médio de absorção do ferro dietético que seria compatível com a prevalência observada de suficiência de ferro (ferritina > 15 µg/L). Por fim, médias separadamente determinadas para usuárias e não usuárias de anticoncepcionais foram combinadas para obter a estimativa amostral.

5.1.3.5 Grupos de alimentos e ingestão de ferro

A contribuição de grupos de alimentos para a ingestão de ferro total, ferro heme, ferro não-heme, ferro de fortificação, vitamina C, fitato, polifenóis e cálcio foi calculada a partir dos dados dos RAPIs, utilizando equação descrita por Block e colaboradores (1985) e programada em planilhas do programa Excel 2010 (*Microsoft*).

Alimentos foram codificados em grupos alimentares descritos no Guia Alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2006), com o acréscimo do grupo “Cafés e chás”. O grupo de “Carnes e ovos” foi subdividido em categorias de itens

segundo procedência (peixes e frutos do mar, frango e aves, boi, porco e ovos) e segundo o tipo de processamento.

O grupo de “Frutas” incluiu aquelas consumidas inteiras ou na forma de sucos integrais, além do conteúdo empregado em néctares (30% do peso total) e refrescos naturais (10% do peso total). O grupo “Hortaliças” incluiu itens crus e cozidos, mas não inclui quantidades pequenas de ingredientes (cebola, tomate e temperos verdes) utilizados em preparações elaboradas como molhos e acompanhamentos. O somatório de leguminosas e soja compreendeu todos os tipos de feijões secos cozidos, soja em grãos e preparações com proteína de soja texturizada. Outros produtos derivados de soja (tofu e extratos de soja líquidos ou em pó) foram codificados como “Laticínios”. O grupo “Cafés e chás” compreendeu o somatório do consumo, em gramas, das preparações em infusão. O fator de diluição de 2,6% foi utilizado para converter medidas de pós solúveis em equivalentes das preparações em infusão (FISBERG & VILLAR, 2002).

5.1.3.6 Consumo habitual de elementos dietéticos

A partir das medidas dos RAPIs, médias de consumo habitual de ferro total e de ferro biodisponível, assim como de outros elementos dietéticos (ferro não heme, ferro de fortificação, tecidos animais, vitamina C, cálcio, fitato e polifenóis) foram obtidas após a remoção da variabilidade intrapessoal dos dados, utilizando o programa *online Multiple Source Method* (MSM) (HAUBROCK et al., 2011; HARTIG et al., 2011). Informações obtidas com o QFA foram utilizadas para distinguir não consumidoras (frequências = 0) de consumidoras habituais (frequências > 0) de carnes e bebidas alcóolicas, o que serviu, nos modelos do MSM, como variável de ajuste das distribuições de ferro heme e álcool dietético, respectivamente. A mesma estratégia foi empregada na estimativa do consumo habitual de chás e cafés, expressos como unidades equivalentes das duas bebidas, conforme proposto por Armah et al. (2013).

Valores de biodisponibilidade dietética do ferro (%) obtidos com cada algoritmo foram calculados como a razão entre as estimativas de consumo habitual de ferro biodisponível (mg/dia) e de ferro total (mg/dia). Todas as variáveis dietéticas, antes de serem empregadas em análises de correlações ou estratificação em quantis, foram ajustadas pelos valores de consumo habitual de energia, usando o método de resíduos (WILLET, HOWE & KUSHI, 1997).

5.1.3.7 Probabilidade de inadequação do consumo de ferro total

O método de abordagem probabilística foi utilizado para estimar a inadequação no consumo de ferro total pelo grupo, conforme recomendado pelas *Dietary Reference Intake* (DRI) (FNB, IOM, 2001). Primeiramente, a distribuição do consumo habitual do mineral foi gerada pela remoção da variabilidade intrapessoal nos dados, conforme descrito no item 5.1.3.6. Em seguida, os valores de ingestão habitual de ferro total foram ajustados pelos valores de energia habitual das dietas, utilizando o método de resíduos (WILLET, HOWE & KUSHI, 1997). Estimativas de inadequação no consumo foram feitas separadamente para usuárias e não usuárias de anticoncepcionais hormonais, pois apresentam diferentes distribuições das necessidades de ferro (FBN, IOM, 2001). A probabilidade de inadequação do grupo total foi calculada pela combinação destas duas estimativas.

5.1.4 Amostras biológicas

No dia anterior à coleta de sangue, as voluntárias foram orientadas a evitar o consumo de bebidas alcoólicas e não consumir alimentos após as 24:00h do mesmo dia, a fim de garantir jejum de no mínimo 8 horas até o momento da coleta. Um volume total de 20 mL de sangue foi coletado, no Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da FCF/USP, por um único profissional experiente, utilizando material estéril e descartável. O tempo de jejum foi calculado como a diferença entre a hora da coleta de sangue e a hora da última refeição realizada pela voluntária no dia anterior.

Do volume total de sangue, 8 mL foram coletados em tubos à vácuo *BD Vacutainer* com anti-coagulante EDTA (10 μL/mL de sangue). Alíquotas deste sangue total (1 mL), destinadas à extração de DNA genômico, foram distribuídas em microtubos de polipropileno, imediatamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para ultrafreezer a -80° C. Uma segunda alíquota de sangue total (5 mL) foi encaminhada para análise de hemograma completo e contagem de reticulócitos, dentro do prazo máximo 2 horas após a coleta.

O sangue restante (16 mL) foi coletado em tubos a vácuo *BD Vacutainer* sem anti-coagulante, mantido em temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos e então centrifugado a 4000 RPM, utilizando equipamento *Sorvall ST 16R*

Centrifuge (*ThermoScientific),* para separação do soro*.* Uma das alíquotas de soro (3 mL) foi encaminhada para análise de Ferro sérico, Capacidade Total de Ligação do Ferro, Saturação da transferrina, Ferritina sérica, Proteína C Reativa (PCR) e Alfa1-Glicoproteína Ácida (AGP), dentro do prazo máximo de 60 minutos após a centrifugação. O restante do soro (5 mL) foi distribuído em microtubos de polipropileno desmineralizados, imediatamente congelados por imersão em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em ultrafreezer a -80° C, junto das alíquotas de sangue total, em biorrepositório do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da FCF/USP.

5.1.4.1 Análises hematológicas, status de ferro e inflamação

As determinações de hemograma completo, reticulócitos, *status* de ferro e de inflamação foram realizadas por laboratório clínico certificado do Hospital Universitário da USP.

O hemograma completo (hemoglobina – Hb, hematócrito – Ht, volume corpuscular médio – VCM, amplitude de variação do tamanho dos eritrócitos – RDW, hemoglobina corpuscular média – HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM, Leucócitos totais, Contagem Diferencial de Leucócitos e plaquetas) e a contagem de reticulócitos foram analisados por métodos automatizados no equipamento *XT-2000i* (*Sysmex*). Valores de referências adotados pelo laboratório seguem os descritos por *Wintrobe's Clinical Hematology* (GREER et. al., 2009).

Ferro sérico e capacidade total de ligação do ferro (CTLF) foram analisados por ensaios colorimétricos automatizados no equipamento *Advia Centaur XP* (*Siemens*). Com estas determinações, calculou-se o índice de saturação da transferrina como (WHO, 2007):

Saturação da Transferrina (%) = (Ferro sérico (µg/dL) * 100) / CTLF (µg/dL).

Ferritina sérica foi determinada por imunoensaio utilizando quimiluminescência direta, automatizado nos equipamentos *Advia Centaur XP* e *Advia Centaur CP* (*Siemens*). Coeficientes de variação de controles internos com concentrações altas e baixas de analito foram 1,72%, 2,92% e 5,01% e 4,73%, 2,59% e 5,81% para as determinações de ferro sérico, CTLF e ferritina, respectivamente.

Proteína C Reativa (PCR) ultra sensível e Alfa1-Glicoproteína Ácida (AGP) foram analisadas por nefelometria automatizada em equipamento *BNII* (*Siemens*).

Valores de PCR abaixo do limite de quantificação (< 0,18 mg/L) foram registrados como este valor. A combinação de valores de PCR > 5 mg/L e AGP > 100 mg/dL foi utilizada para classificar o estágio do processo inflamatório em: período de incubação (apenas valores de PCR aumentados), período de convalescência precoce (valores de ambas PCR e AGP aumentados) e período de convalescência tardia (apenas valores de AGP aumentados) (WHO, 2012). Fatores de correção específicos para cada um dos períodos da fase aguda citados acima (0,77, 0,53 e 0,75, respectivamente) foram aplicados às concentrações de ferritina, visando o ajuste pela inflamação (WHO, 2012).

Valores de referência da Organização Mundial da Saúde foram utilizados para avaliação do *status* de ferro (WHO, 2012; WHO, 2007; WHO, 2011). A deficiência de ferro foi diagnosticada como ferritina < 15 µg/L (WHO, 2007; WHO, 2011). Sobrecarga de ferro foi diagnosticada como concentração de ferritina >150 µg/L e saturação da transferrina >50% (WHO, 2001; WHO, 2011).

5.1.4.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o *kit* comercial *PureLink™ Genomic DNA* (*Life Technologies)*, utilizando amostras de sangue congeladas, conforme procedimento do fabricante. A quantificação e a pureza de DNA foram aferidas por espectrofotometria a 260 nm e pela relação A_{260nm}/ A_{280nm}, respectivamente, em equipamento *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*ThermoScientific*). Foram considerados ideais valores de A_{260nm}/A_{280nm} maiores que 1,8.

A integridade do DNA extraído e a avaliação de eventual contaminação por RNA foi verificada após eletroforese do material em gel de agarose com *GelRed*™ (*Biotium*), utilizando cuba horizontal *Midi-Horizontal System* (*Fisher Scientific*), seguida de visualização do padrão de bandas sob luz ultravioleta em equipamento fotodocumentador *Alliance 4.7* (*Uvitec*).

Alíquotas de concentração ajustadas de DNA a 5 ng / µL foram preparadas com tampão TE (pH 7,0) fornecido pelo *kit PureLink™ Genomic DNA* (*Life Technologies)* e mantidas em freezer -20º C até posterior utilização nas genotipagens.

5.1.4.3 Genotipagem das variantes dos genes TMPRSS6 e HFE

O método de discriminação alélica, por ensaios T*aqMan SNP Genotyping Assays* (*Life Technologies)*, foi utilizado para genotipagem das variantes dos genes *TMPRSS6* (rs855791 e rs4820268) *e HFE* (rs1800562 e rs1799945). Este método consiste em reações de PCR em tempo real empregando um par de oligonucleotídeos e um par de sondas marcadas com fluoróforos específicos para cada alelo em análise. A reação tem como resultado a emissão de fluorescência, que com o auxílio do *software ABI 7500 System SDS*, permite a especificação do genótipo analisado. Se um único tipo de fluorescência é emitido ao longo da reação de PCR, o genótipo homozigoto para um determinado alelo é indicado para a amostra. Por outro lado, a emissão simultânea de duas fluorescências implica amostra com genótipo heterozigoto.

As reações foram preparadas em microplacas *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* (*Life Technologies)* num volume final de 10 µL contendo: 5 µL de 2x *TaqMan Universal Master Mix II* (*Life Technologies),* 0,5 µL de 20x *TaqMan SNP Assay*, 10 ng de DNA genômico e água ultrapura DEPC (*Life Technologies)* para completar o volume final. Após serem seladas com filme *adesivo MicroAmp Optical Adhesive Film* (*Life Technologies),* as microplacas foram centrifugadas por 30 segundo a 4000 RPM em temperatura ambiente, utilizando equipamento *Sorvall ST 16R Centrifuge* (*ThermoScientific),* a fim remover bolhas de ar das reações. Foi utilizada a seguinte programação no equipamento *StepOnePlus System* (*Applied Biosystems):* 10 minutos a 95º C para ativação enzimática, seguidos por 40 ciclos de 95º C por 15 segundos e 60º C por 60 segundos para anelamento e extensão.

Em todos os ensaios foram incluídos, em duplicata, controles negativo (água ultrapura) e positivo (amostras com genótipos homozigoto e heterozigoto previamente confirmados). Duplicatas de 20% das amostras foram realizadas e a taxa de concordância dos ensaios, para os quatro genótipos, foi de 100%.

5.1.5 Análise estatística

Os programas *SPSS* versão 20.0 (*SPSS*), *Graphpad Prism* versão 5.0 (*Prism*), *Haploview* verão 4.2 (BARRET et al., 2005), *PLINK* versão 1.07 (PURCELL et al., 2007) e R (R CORE TEAM, 2013) foram utilizados como auxiliares para as análises estatísticas.

Com o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, a normalidade na distribuição de variáveis contínuas foi checada e, antes de analisar diferenças entre grupos, a homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste de *Levene*. Quando necessário, a transformação dos valores em logaritmo natural foi aplicada para melhorar a normalidade e/ou homoscedasticidade das distribuições. Dados são apresentados como média aritmética e desvio padrão ou média geométrica e intervalo de confiança de 95%.

A caracterização da amostra e os determinantes dietéticos e não dietéticos dos valores de ferritina sérica foram estudados inicialmente (Artigo 1). Os valores do biomarcador, já corregidos pela inflamação (WHO, 2012), foram transformados em seu logaritmo natural antes das análises.

Associações bivariadas foram testadas por correlação de *Pearson*, regressão linear simples, teste t de *Student* ou Análise de Variância (ANOVA) unifatorial com contraste polinomial para tendência linear ou com *post hoc* de *Tukey*, conforme indicado. A associação de variáveis categóricas entre si foi verificada com testes de *Qui-quadrado* ou exato de *Fisher*. Para tabelas de contingência com formatos diferentes de 2 x 2 e/ou com mais de 20% das caselas com contagem esperada de casos menor que 5, utilizou-se o teste *Likelihood ratio*.

Ao comparar as estimativas de biodisponibilidade de ferro obtidas com os diferentes algoritmos, foi observado que, embora todas as distribuições dos valores (mg/dia e %) tenham se adequado a uma curva gaussiana, houve heterocedasticidade entre as medidas. Logo, optou-se por verificar as diferenças entre os métodos utilizando o teste não paramétrico de *Friedman* para medidas repetidas, seguido por *post hoc* de *Dunn*.

Modelos de regressão linear múltipla foram utilizados para testar associações entre ferritina e variáveis dietéticas, categorizadas em quantis (tercil ou quartis superiores e inferiores). Critérios para seleção de preditores não dietéticos do biomarcador a serem utilizados no ajuste dos modelos foram: 1) serem reconhecidos na literatura como importantes determinantes do balanço corporal de ferro e, 2) nas análises bivariadas, terem resultado em associação com o biomarcador num nível de significância equivalente a $P < 0,200$. No modelo final, foram mantidas as variáveis: idade (anos), IMC (kg/m^2), uso de anticoncepcional (sim *vs.* não), tercil de escore de fluxo menstrual (ordinal – níveis 1 a 3), cor de pele autodeclarada (branca *vs.* parda ou negra e branca *vs.* amarela) e nível de atividade física

(insuficientemente ativo v*s.* ativo e muito ativo *vs.* ativo). Tercis das estimativas de biodisponibilidade dietética de ferro foram codificados e incluídos na análise como variáveis indicadoras dos níveis (*dummy*). A exponencial dos coeficientes de regressão foi interpretada como a mudança multiplicativa nos valores de ferritina sérica para cada unidade de diferença na variável preditora.

A partir das equações de regressão múltipla, médias ajustadas de ferritina e seus intervalos de confiança de 95% para cada quantil de biodisponibilidade estimada de ferro foram calculadas. Por fim, um ajuste adicional por vegetarianismo ou restrição dietética de carnes (sim *vs.* não) foi testado nos modelos, visto se tratar de uma covariável das estimativas de biodisponibilidade dietética de ferro. Um termo de interação entre quantis dietéticos e uso de anticoncepcionais hormonais foi também testado em todos os modelos, no intuito de verificar qualquer efeito modulador do medicamento sobre as associações observadas. A validade dos modelos finais foi checada pela análise de resíduos e pelo diagnóstico de colinearidade.

Num segundo momento, possíveis preditores genéticos dos valores de hemoglobina e de saturação da transferrina, além da ferritina, foram avaliados (Artigo 2). Inicialmente, a partir dos dados genotípicos, foram estimados a frequência de alelos e haplótipos, o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e os coeficiente de correlação (r^2) e de desequilíbrio de ligação (D') entre loci, utilizando o *software Haploview* (BARRET et al., 2005).

As associações de cada genótipo *TMPRSS6* e *HFE* com os biomarcadores foram testadas em modelos de regressão já ajustados por variáveis não genéticas, selecionadas com mesmos critérios citados acima (Artigo 1). Os preditores significantes de pelo menos um dos três biomarcadores tiveram sua inclusão forçada em todos os modelos. Para testes de efeito genético co-dominante, os genótipos foram codificados e incluídas na análise como variáveis indicadoras dos níveis (*dummy*).

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado) dos modelos foi utilizado para estimar as contribuições das variáveis independentes em predizer as variações dos biomarcadores em estudo. A fim de verificar se os efeitos estimados dos genótipos sobre os biomarcadores eram modificados pela biodisponibilidade estimada de ferro dietético (HALLBERG & HULTHÉN, 2000), foi testada a significância de termos de interação entre tercis de ferro biodisponível (ordinal – 1 a

3) e os níveis dos genótipos. A interação dos genótipos com estimativas do fluxo menstrual (ordinal – 1 a 3) também foi testada. A associação entre haplótipos e biomarcadores foi analisada no *software PLINK* (PURCELL et al., 2007), assumindo como desfechos os valores de hemoglobina, saturação da transferrina e logaritmo natural de ferritina já ajustados pelas variáveis não genéticas.

O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes realizados.

5.2 ESTUDO 2

5.2.1 Coleta de dados gerais

Informações sobre identificação (gênero, idade, estado civil, cor da pele autodeclarada, profissão e grau de formação), história clínica (diagnóstico de hipertensão, diabetes ou doença tireoidiana, uso de medicamentos e suplementos, histórico de infecção no último ano e histórico de transfusão sanguínea) e história comportamental (uso de fumo e álcool) foram obtidas por questionário semiestruturado de caracterização geral (PANIZ, 2015). Foram considerados consumidores de álcool aqueles que indicaram algum consumo diferente de zero, independente de quantidades ou de frequências de consumo. Ex-fumantes foram considerados como não-fumantes, independentemente do tempo de abandono do uso de cigarros.

Com a informação auto relatada de peso e estatura foi calculado o IMC e classificado o estado nutricional utilizando os pontos de corte descritos no item 5.1.2.

Na fase inicial do estudo, não era prevista a avaliação do *status* de ferro dos indivíduos (PANIZ, 2015). Assim, informações como histórico de doação de sangue, regularidade menstrual e menopausa das voluntárias recrutadas antes de fevereiro de 2014 foram coletadas, num segundo momento, em entrevista por telefone (APÊNDICE 8).

5.2.2 Avaliação do consumo alimentar

A coleta de dados de consumo alimentar foi feita com os inquéritos de Recordatório Alimentar de 24 horas (RA24h) e Questionário de Frequência Alimentar (QFA) com a finalidade de: 1) estimar a adequação no consumo de ferro total; 2) estimar a biodisponibilidade dietética de ferro.

5.2.2.1 Recordatório Alimentar de 24 horas (RA24h)

Dois RA24h não consecutivos foram coletados de cada indivíduo. Um primeiro RA24h foi realizado por entrevista pessoal, no dia da coleta de sangue. Um segundo RA24h foi coletado por telefone, após um intervalo médio de 45 dias. Os RA24h foram coletados em dias aleatórios e representaram todos os dias da semana e todas as estações do ano.

O método *USDA Automated Multiple Pass* (BLANTON et al., 2006) foi utilizado para coleta dos RA24h. A entrevista foi estruturada em cinco etapas como segue: 1) listagem rápida, em que o entrevistado relata todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, sem ser interrompido; 2) listagem de alimentos esquecidos, questionados pelo entrevistador por se tratarem de itens comumente desconsiderados pelo entrevistado (açúcar de adição, acompanhamento de pratos e bebidas, molhos, etc.); 3) relato dos horários e locais de consumo dos alimentos e bebidas, bem como o nome das refeições atribuído pelo entrevistado; 4) ciclo de detalhamento, em que o entrevistador questiona modo de preparo e/ou marca comercial de alimentos e bebidas e as quantidades consumidas em medidas caseiras; 5) revisão final, em que o entrevistador verifica a completude do recordatório.

As informação dietéticas obtidas dos RA24h foram inseridas no sistema Nutriquanti e a conversão de medidas caseiras em gramas de alimentos e bebidas, bem como o cálculo da composição química das dietas foi procedido como descrito no item 5.1.3.1.

5.2.2.2 Questionário de Frequência Alimentar (QFA)

Foi utilizado o mesmo QFA descrito no item 5.1.3.2. As respostas foram obtidas por entrevista pessoal, no dia da coleta de sangue. Dados faltantes (sem resposta ou rasurados) foram recuperados, por telefone, no momento da coleta do segundo RA24h.

Um mesmo profissional procedeu toda a digitação dos dados do QFA em máscara criada no programa Excel 2010 (*Microsoft*). Inconsistências ou erros de digitação foram checados no banco final, por um segundo profissional, antes destas informações serem utilizadas nas estimativas do consumo alimentar habitual.

5.2.2.3 Identificação de relato inválido da ingestão energética

O mesmo método descrito no item 5.1.3.3 foi utilizado para identificar o sub-relato da ingestão energética. Contudo, devido ao menor número de dias avaliados neste estudo (n= 2) em relação ao primeiro (n= 3), houve maior grau de incerteza em definir o subrelato a partir da razão IE:GETp . Assim, foram consideradas com dados dietéticos inválidos as mulheres com razão IE:GETp ≤0,46. Por outro lado, foram consideras superrelatores da ingestão energética aquelas com IE > 4000 Kcal por dia (WILLET, 1998).

5.2.2.4. Consumo habitual de elementos dietéticos

Idem item 5.1.3.6.

5.2.2.5 Probabilidade de inadequação no consumo e biodisponibilidade de ferro

O método de abordagem probabilística foi utilizado, como descrito no item 5.1.3.7. A inadequação no consumo do mineral foi calculada separadamente para mulheres na pós-menopausa e para mulheres na idade reprodutiva usuárias e não usuárias de anticoncepcionais hormonais, pois apresentam diferentes distribuições das necessidades de ferro. A probabilidade de inadequação entre mulheres na idade reprodutiva foi calculada pela combinação das duas últimas estimativas.

A biodisponibilidade dietética do ferro foi estimada com algoritmo de Hallberg & Hulthén (2000), conforme descrito no item 5.1.3.4.

5.2.3 Amostras biológicas

Foram colhidos 40 mL de sangue em jejum de no mínimo 8 horas. Foi utilizado tubo *BD Vacutainer* sem anticoagulante para obtenção de soro e tubo *BD Vacutainer* com anticoagulante EDTA (10 μL/mL de sangue) para a obtenção de sangue total, utilizado na realização de hemograma, reticulócitos, perfil de hemoglobinas e extração de DNA.

5.2.3.1 Diagnóstico laboratorial e molecular de β-talassemia

A quantificação de HbA_2 e Hb fetal e a detecção de hemoglobinas S e C foram realizadas no Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista

Júlio de Mesquita Filho (UNESP) São José do Rio Preto – SP. Foi utilizada a técnica de *High-Permormance Liquid Chromatography* (HPLC) em equipamento *Variant* (*BioRad*), utilizando colunas de troca catiônica e sistema de tampões com diferentes forças iônicas, fornecido no *kit VARIANT II β-Thalassemia Short Program* (*BioRad)*. O diagnóstico de β-talassemia menor foi confirmado como HbA_2 >3,5% acompanhada por Hb fetal entre 1 e 5% (GREER et al., 2009).

Mutações responsáveis pela β-talassemia heterozigótica foram investigadas por sequenciamento direto de três regiões do gene da β-globina (*HBB*). *Amplicons* foram obtidos por reação de PCR, utilizando *primers* específicos (PANIZ, 2015) e em seguida sequenciados em equipamento automático *ABI 3500 Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*). As mutações identificadas foram classificadas nos tipos β^+ ou β^0, segundo propostas de Jankovic e colaboradores (1990) e de Patrinos e colaboradores (2004).

5.2.3.2 Análises hematológicas, status de ferro e inflamação

As determinações de hemograma completo, reticulócitos, *status* de ferro e de inflamação foram realizadas por laboratório clínico certificado do Centro de Hematologia de São Paulo – SP.

O hemograma completo foi analisado por métodos automatizados no equipamento *Pentra 120* (*Hiroba*). Extensões sanguíneas do sangue periférico foram utilizadas para avaliação por microscopia e contagem de reticulócitos manual, utilizando o corante azul de cresil brilhante. Para acessar as diferenças nos padrões de reticulocitose que acompanham a eritropoese acelerada, um índice de produção de reticulócitos (IPR) foi calculado como marcador de compensação eritropoética. Para tanto, foram utilizados os dados de hematócrito (%), contagem de reticulócitos (%) e fatores de correção para o tempo de maturação dessas células (KJELDSBERG & PERKINS 2010).

Ferro sérico e capacidade total de ligação do ferro (CTLF) foram analisados por ensaios colorimétricos automatizados no equipamento *Dimension VistaUM* (*Siemens*). Ferritina sérica foi determinada por ensaio imunoensaio utilizando quimiluminescência direta, automatizado no equipamento *Immulite* (*DPC MedLab*). Saturação da transferrina foi calculada como descrito no item 5.4.1.2.

A dosagem de PCR ultrassensível foi determinada por imunoturbidimetria automatizada em equipamento *Cobas 8.000* (*Roche Diagnostics*). Foi considerado como processo inflamatório ativo valores de PCR > 5 mg/L (WHO, 2012).

A deficiência de ferro foi diagnosticada como ferritina < 15 µg/L (WHO, 2007; WHO, 2011). Sobrecarga de ferro foi diagnosticada como concentração de ferritina >150 µg/L, acompanhada por saturação da transferrina > 50% (WHO, 2001; WHO, 2011).

5.2.3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o *kit* comercial *QIAAMP DNA BLOOD MINI kit* (*Qiagen*), utilizando amostras de sangue fresco, conforme procedimento do fabricante. A avaliação do rendimento e da pureza dos extratos de DNA, assim como as diluições e armazenamento foram feitos como descrito no item 5.1.4.3.

5.2.3.4 Genotipagem dos genes TMPRSS6 e HFE

Idem item 5.1.4.3.

5.2.4 Análise estatística

Os programas *SPSS* versão 20.0 (*SPSS*), *Graphpad Prism* versão 5.0 (*Prism*), R (R CORE TEAM, 2013) e *Haploview* versão 4.2 (BARRET et al., 2005) foram utilizados como auxiliares para as análises estatísticas.

No estudo original (PANIZ, 2015), casos de β-talassemia foram pareados com controles (razão 1:2) quanto ao gênero, idade e IMC, entretanto, não houve balanceamento dos grupos quanto à distribuição de mulheres com diferentes *status* reprodutivos ou quanto ao uso de anticoncepcionais hormonais. Uma vez que esses dois fatores são importantes determinantes das necessidades dietéticas de ferro e das variações nos seus biomarcadores (FNB, IOM, 2001), análises de comparação dos grupos quanto ao *status* do mineral poderiam ser comprometidas por vieses de confusão (AUSTIN, 2011). Assim, no presente estudo, um novo agrupamento de casos e controles foi considerado.

Inicialmente, as mulheres com β-talassemia e aquelas aparentemente saudáveis foram separadas em grupos independentes de mulheres na idade reprodutiva ou na pós-menopausa. Em seguida, o pareamento de casos e controles foi realizado, nos grupos independentes de mulheres, utilizando método baseado em

escore de propensão (STAMPF, 2015; AUSTIN, 2011). Em resumo, este método de pareamento visa à obtenção de grupos balanceados quanto à distribuição de covariáveis selecionadas, sabidamente determinantes do desfecho em estudo. Além disso, com o auxílio do escore identificador do pareamento, busca-se levar em consideração, nas análises de comparação, a falta de independência entre os casos e controles, visto que sujeitos pareados tendem a ter desfechos mais similares que indivíduos aleatoriamente selecionados (AUSTIN, 2011).

Utilizando o pacote "*nonrandom",* versão 1.3, do programa R (STAMPF, 2015), o escore de propensão foi obtido com o método "*matching*", a partir de um modelo de regressão logística condicional, com o qual foi estimada a probabilidade de cada mulher em análise pertencer ao grupo caso, dada suas categorias de idade (19 a 30 anos; 31 a 50 anos; 50 a 70 anos; > 70 anos), IMC (17 a 18,5 kg/m^2; 18,6 a 24,9 kg/m^2; 25,0 a 29,9 kg/m^2; > 30 kg/m^2) e, entre as mulheres na idade reprodutiva, do uso contínuo de anticoncepcionais hormonais (sim ou não). Por fim, trios de mulheres, compostos por um caso e dois respectivos controles, foram agrupados segundo suas identidades ou similares dos valores de escore estimados de propensão.

Com o teste de *Shapiro-Wilk*, a normalidade na distribuição de variáveis contínuas foi checada e, antes de analisar diferenças entre grupos, a homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste de *Levene*. Quando necessário, a transformação dos valores em logaritmo natural foi aplicada para melhorar a normalidade e/ou homoscedasticidade das distribuições.

Testes de diferenças de médias ou frequências das características sociodemográficas, nutricionais e genotípicas entre casos e controles foram feitos com modelo de regressão linear misto ou de regressão logístico condicional, respectivamente. Como já citado, ajustes pelo escore de propensão do pareamento foram realizados nestes modelos, atribuindo-lhe um efeito aleatório. Conforme indicado nas tabelas, os resultados que descrevem diferenças de médias das variáveis contínuas entre casos e controles são, para aquelas transformadas em logaritmo, razão de médias geométricas e, para as demais variáveis não transformadas, diferenças de médias aritméticas. As diferenças nas frequências dos níveis de variáveis categóricas entre casos e controles são expressas como razões de probabilidades (*Odds Ratio* – OR). Os intervalos de confiança de 95% dessas estimativas são também apresentados.

A associação dos genótipos *TMPRSS6* e *HFE* (efeito dominante) com os biomarcadores em estudo foram testadas em modelos de regressão linear misto, ajustados pelo efeito aleatório do escore de propensão do pareamento e pelos efeitos fixos do consumo estimado de ferro dietético biodisponível (mg/dia), idade (anos), IMC (kg/m^2) e cor de pele autodeclarada (branca *vs.* parda ou negra). Nas análises com mulheres na idade reprodutiva, o ajuste adicional pelo uso de anticoncepcionais (não usuárias *vs.* usuárias) foi efetuado.

A fim de verificar se os efeitos estimados dos genótipos sobre os biomarcadores eram modificados pela presença da β-talassemia menor, testou-se a significância de termos de interação entre grupo (controle *vs.* casos) e os genótipos (homozigotas para o alelo de maior frequência *vs.* carreadoras do alelo polimórfico) nos modelos descritos acima. A validade dos modelos finais foi checada pela análise de resíduos e pelo diagnóstico de colinearidade.

Os testes exato de *Fischer* ou *Likelihood Ratio* foram utilizados para verificar a associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com as categorias de cor de pele e as classificações fenotípicas das mutações responsáveis pela β-talassemia menor. Em análises exploratórias restritas às mulheres de cada grupo, diferenças na mediana de biomarcadores entre genótipos foram avaliadas com teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes realizados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDO 1 – ARTIGO 1: **Biodisponibilidade dietética de ferro: concordância entre métodos de estimativa e sua associação com as concentrações séricas de ferritina de mulheres na idade reprodutiva**

O objetivo deste artigo foi avaliar a associação entre diferentes estimativas de biodisponibilidade dietética de ferro e os valores de ferritina sérica entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal.

6.1.1 Resultados

Caracterização geral dos sujeitos

O fluxograma de seleção das voluntárias é apresentado na **Figura 1** (APÊNDICE 9 - **Figura suplementar 1)**. Cento e vinte e sete estudantes foram selecionadas e forneceram dados dietéticos completos e válidos.

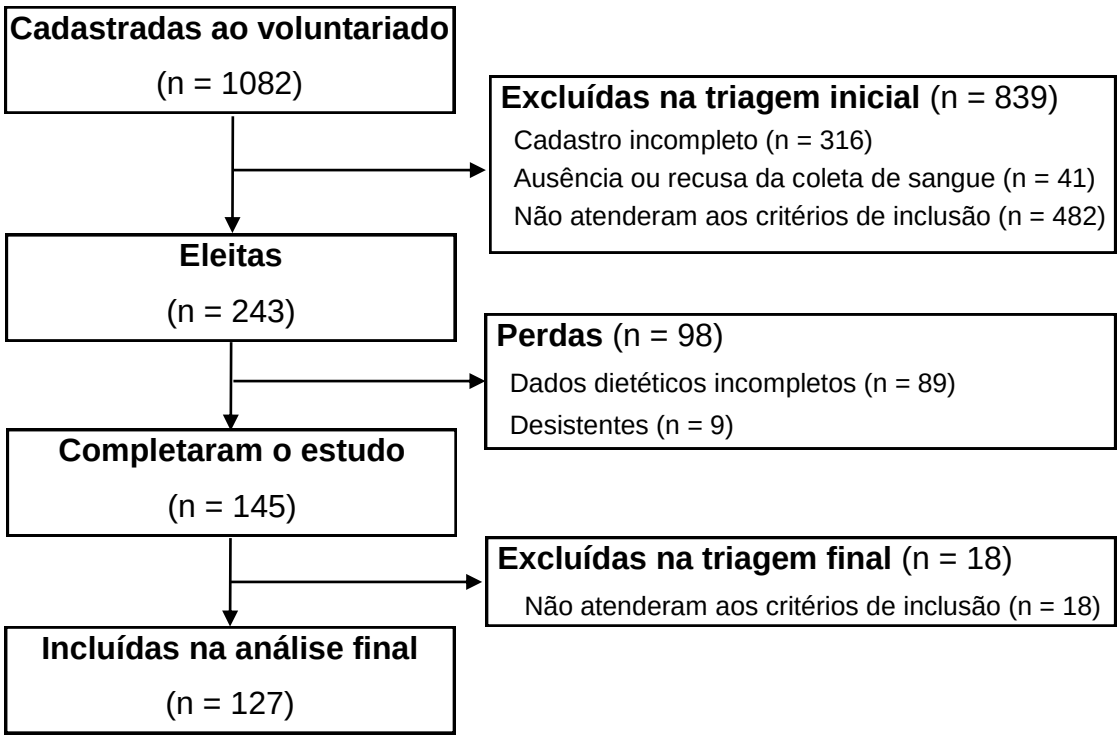


Figura 1. Fluxograma de seleção das mulheres para o estudo.

Na **Tabela 1** estão apresentadas as características dietéticas e não dietéticas da amostra. As médias de idade e índice de massa corporal foram de 27 anos e 22 kg/m^2, respectivamente. Obesas não foram incluídas, entretanto, 26% das mulheres apresentaram circunferência da cintura elevada (> 80 cm) e 11% excesso de peso corporal (IMC > 25 kg/m^2). De acordo com o padrão nacional de categorização socioeconômica, mais de 80% das estudantes foram pertencente às classes sociais média alta ou alta (classes B e A). A maioria declarou cor de pele branca (74,8%), foi classificada como suficientemente ativa ou muito ativa (61,4%) e considerou sua dieta onívora (85,8%). Com exceção de mudanças voluntárias no consumo global de alimentos com vistas ao controle do peso corporal, outras alterações importantes nos hábitos alimentares, pelo menos nos 12 meses precedente ao estudo, não foram relatadas pelas mulheres estudadas. Não onívoras incluíram 2 vegetarianas estritas (1,6%), 10 ovo-lacto-vegetarianas (7,9%) e 6 pesco-ovo-lacto-vegetarianas (4,7%).

Mais de um quarto das mulheres relatou ter sido doadora de sangue no passado (25,9%). Sete (5,5%) tiveram histórico de gestação, com antecedência mínima de 5 anos ao início do estudo. O uso contínuo de anticoncepcionais hormonais era feito por quase 60% das mulheres (n = 75) e foi mais frequente entre aquelas com menos de 30 anos de idade ($P < 0,05$) e pertencentes à classe social média alta ($P < 0,05$). Como esperado, o uso destes medicamentos foi relacionado com menores níveis do escore de fluxo menstrual ($P < 0,01$), mesmo que não tenha se associado à menor duração dos períodos. Curiosamente, houve uma maior prevalência de inflamação ativa, definida como concentrações aumentadas de Proteína C Reativa ultrassensível (PCR > 5 mg/L), entre usuárias de anticoncepcionais ($P < 0,05$). Entretanto, cabe ressaltar que os valores de ferritina, neste estudo, foram corrigidos pelas concentrações de PCR e AGP a fim de remover o efeito da inflamação nas variações do biomarcador (WHO, 2012).

Tabela 1. Caracterização geral de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

	Total	**Anticoncepcionais hormonais**	
		Não usuárias	**Usuárias**
	(n = 127)	(n = 52)	(n = 75)
Caracterização sóciodemográficas e de estilo de vida			
Idade (anos)	27,4 (5,1) [18,0 – 42,0]	27,8 (6,0)	27,2 (4,3)
> 30 anos, n (%)	34 (26,8)	19 (36,5)#	15 (20,0)#
Índice de massa corporal (kg/m2)	22,1 (2,4) [17,0 – 29,1]	21,8 (2,4)	22,2 (2,4)
> 25 Kg/m^2, n (%)	14 (11,0)	5 (9,6)	9 (12,0)
Circunferência da cintura (cm)	75,4 (7,1) [60,5 – 99,3]	75,9 (7,1)	75,5 (7,1)
> 80 cm, n (%)	33 (26,0)	15 (28,8)	18 (24,0)
Cor de pele autodeclarada, n (%)			
Branca	95 (74,8)	36 (69,2)	59 (78,7)
Parda ou negra	24 (18,9)	11 (21,2)	13 (17,3)
Amarela	8 (6,3)	5 (9,6)	3 (4,0)
Nível socioeconômico n (%)*			
Classe A	15 (12,0)	6 (11,5)	9 (12,3)
Classe B	86 (68,8)	30 (57,7)#	56 (76,7)#
Classe C ou D	24 (19,2)	16 (30,8)#	8 (11,0)#
Tipo de dieta autodeclarada, n (%)			
Onívora	109 (85,8)	43 (82,7)	66 (88,0)
Vegetariana ou restrita em carne	18 (14,2)	9 (17,3)	9 (12,0)
Nível de atividade física, n (%)			
Ativo	62 (48,8)	22 (42,3)	40 (53,3)
Muito ativo	16 (12,6)	7 (13,5)	9 (12,0)
Insuficientemente ativo	49 (38,6)	23 (44,2)	26 (34,7)
Caracterização do fluxo menstrual			
Duração dos períodos, n (%)			
2 a 3 dias	20 (15,7)	6 (11,5)	14 (18,7)
4 a 5 dias	89 (70,1)	37 (71,2)	52 (69,3)

6 a 7 dias	18 (14,2)	9 (17,3)	9 (12,0)
Escore de fluxo menstrual, n (%)			
Baixo (≤ 13 unidades)	44 (34,6)	14 (26,9)##	30 (40,0)##
Médio (14 – 21 unidades)	39 (30,7)	12 (23,1)##	27 (36,0)##
Alto (≥ 22 unidades)	44 (34,6)	26 (50,0)##	18 (24,0)##
Caracterização hematológica e bioquímica			
Hemoglobina (g/dL)	13,4 (0,8) [11,0 – 15,4]	13,4 (0,9)	13,4 (0,8)
< 12 g/dL, n (%)	4 (3,1)	3 (5,8)	1 (1,3)
Saturação da transferrina (%)	29,9 (11,4) [6,4 – 59,7]	30,1 (12,8)	29,8 (10,3)
< 16%, n (%)	14 (11,0)	7 (13,5)	7 (9,3)
Ferritina (µg/L)**	36,6 (31,4; 42,6) [4,0 – 198,0]	31,0 (23,6; 40,7)	41,0 (34,3; 49,0)
< 15 µg/L, n (%)	16 (12,6)	11 (21,2)#	5 (6,7)#
Alfa-glicoproteína ácida (mg/dL)	61,4 (18,9) [26,0 – 133,0]	65,6 (16,4)	71,9 (20,8)
≥ 100 mg/dL, n (%)	4 (3,1)	2 (3,8)	2 (2,7)
Proteína C reativa ultrassensível (mg/L)	1,1 (0,9; 1,3) [0,2 – 9,8]	0,5 (0,4; 0,7)##	1,7 (1,4; 2,3)##
≥ 5 mg/L, n (%)	15 (11,8)	1 (1,9)##	14 (18,7)##
Caracterização dietética			
Energia total (kcal/dia)	2032,5 (436,5) [958,0 – 3531,9]	1984,6 (465,5)	2065,7 (415,1)
Ferro total (mg/dia)	10,9 (2,2) [6,1 – 19,5]	10,3 (2,2)#	11,2 (2,2)#
Ferro não-heme (mgl/dia)	10,2 (2,2) [5,8 – 18,1]	9,6 (2,1)#	10,5 (2,2)#
Ferro de fortificação (mg/dia)	3,2 (1,2) [0,4 – 6,3]	2,9 (1,3)#	3,4 (1,1)#
Ferro heme (mg/dia)	0,7 (0,4) [0,0 – 2,1]	0,7 (0,5)	0,7 (0,4)
Tecido animal (g/dia)[1]	169,9 (76,8) [0,0 – 325,2]	172,1 (79,6)	168,4 (75,2)
Vitamina C (mg/dia)	129,0 (81,9) [20,5 – 434,1]	121,1 (65,8)	134,5 (91,5)
Cálcio (mg/dia)	845,1 (285,8) [210,3 – 1872,1]	844,6 (2851)	845,5 (288,2)
Fitato (mg/dia)[2]	260,2 (84,1) [82,0 – 563,5]	246,7 (77,7)	269,5 (87,5)
Polifenóis (mg/dia)[3]	223,3 (82,7) [56,4 – 563,0]	234,1 (94,1)	215,8 (73,4)
Equivalente de café e chá (xícaras/dia)[4]	0,3 (0,3; 0,4) [0,0 – 2,0]	0,4 (0,3; 0,5)	0,3 (0,2; 0,4)
Álcool (g/dia)	1,1 (1,0; 1,3) [0,0 – 11,3]	1,1 (0,9; 1,4)	1,1 (1,0; 1,3)

Dados são média (desvio padrão), média geométrica (intervalo de confiança de 95%) ou contagem absoluta (porcentagem). Faixas de valores para variáveis contínuas são apresentadas em colchetes.

[*] Dado indisponível para duas voluntárias.
** Valores de ferritina corrigidos pela inflamação foram transformados em seu logaritmo natural antes das análises.
[1] Peso de tecido cru (1g = 0,77g de tecido cozido). [2] Fitato-fósforo (1 mg = 3,53 mg de ácido fítico). [3] Equivalente de ácido tânico (1 mg = 1,6 mg de ácido gálico ou ácido clorogênico). [4] Calculado segundo Armah et al. (2013): 1 xícara (240 mL) de chá preto ou verde = 2 xícaras (480 mL) de *ice tea* ou 1,5 xícara (360 mL) de café ou chá de ervas.
[#, ##] Indica diferença na distribuição dos valores entre usuárias e não usuárias de anticoncepcionais hormonais, segundo teste *t-Student* (variáveis contínuas) ou Qui-quadrado, *Likelihood Ratio* ou exato de *Fisher* (variáveis categóricas); [#]$P < 0,05$; [##]$P < 0,01$.

O consumo médio de ferro total foi estimado em 10,9 mg/dia, sendo aproximadamente 6% como ferro heme e 29% como ferro de fortificação das farinhas de trigo e milho (**Tabela 1**). Não obstante, os principais contribuintes alimentares para o consumo de ferro total e ferro não heme foram pães, massas e biscoitos (41,8% e 44,1%, respectivamente). Quase 60% do total de ferro heme foi proveniente de carnes de gado. No almoço e no jantar foram estimados consumos médios comparáveis de ferro não heme (3,28 mg/dia e 2,89 mg/dia, respectivamente), mas diferenças de quase 50% nos conteúdos de tecidos animais e de vitamina C. Nessas duas refeições também foram observadas as maiores proporções do consumo de fitato (35,9% e 28,3%, respectivamente). Polifenóis e cálcio foram consumidos em maiores quantidades no café da manhã e nos lanches, sendo procedentes, sobretudo, de chás e café e de leite e iogurtes, respectivamente (APÊNDICE 9 - **Tabelas Suplementares 1 e 2**).

A média geométrica da concentração de ferritina sérica foi de 36,6 µg/L e a prevalência de deficiência de ferro (ferritina < 15 µg/L) foi de 12,6%. Um quarto das mulheres deficientes em ferro era anêmica (Hb < 12 g/dL). Quatro casos de hiperferritinemia (ferritina > 150 µg/L) foram identificados (3,1%), acompanhados, entretanto, por valores normais de saturação da transferrina (< 50%).

Foi observado que, embora usuárias de anticoncepcionais hormonais tenham tido valores médios de consumo de ferro total 0,9 mg/dia maiores do que não usuárias do medicamento (10,3 mg/dia *vs.* 11,2 mg/dia, $P < 0,05$), a prevalência de deficiência de ferro entre as últimas foi mais do que três vezes maior (6,7% *vs.* 21,2%, $P < 0,05$). Os dois grupos, contudo, não diferiram quanto ao consumo médio de ferro heme ou de outros componentes dietéticos relacionados com a biodisponibilidade do mineral (**Tabela 1**).

Estimativa da biodisponibilidade dietética do ferro: modelo probabilístico

Seguindo o método proposto por Dainty e colaboradores (2014), curvas de distribuição das necessidades fisiológicas de ferro de usuárias e não usuárias de anticoncepcionais (IOM, 2001) foram comparadas a uma série de valores teóricos de absorção do ferro total estimado nas dietas, a fim de estabelecer, para a amostra estudada, a relação entre a biodisponibilidade média do mineral e a probabilidade de inadequação do seu consumo e/ou *status* corporal. A partir desse modelo, presumiu-

se que a prevalência observada de mulheres que atenderam suas necessidades fisiológicas de ferro (ferritina ≥ 15 µg/L) seria coerente com médias de eficiência máxima de sua absorção, num estado limítrofe de adequação (ferritina = 15 µg/L), de 16% e 19% entre as usuárias e não usuárias de anticoncepcionais, respectivamente. A média ponderada dessas duas estimativas, assumida como a biodisponibilidade dietética do ferro para a amostra total, foi calculada em 17,2% (**Figura 2**). A exclusão, na análise, de mulheres com dietas vegetarianas ou restritas em carnes não resultou em alteração substancial dessa estimativa.

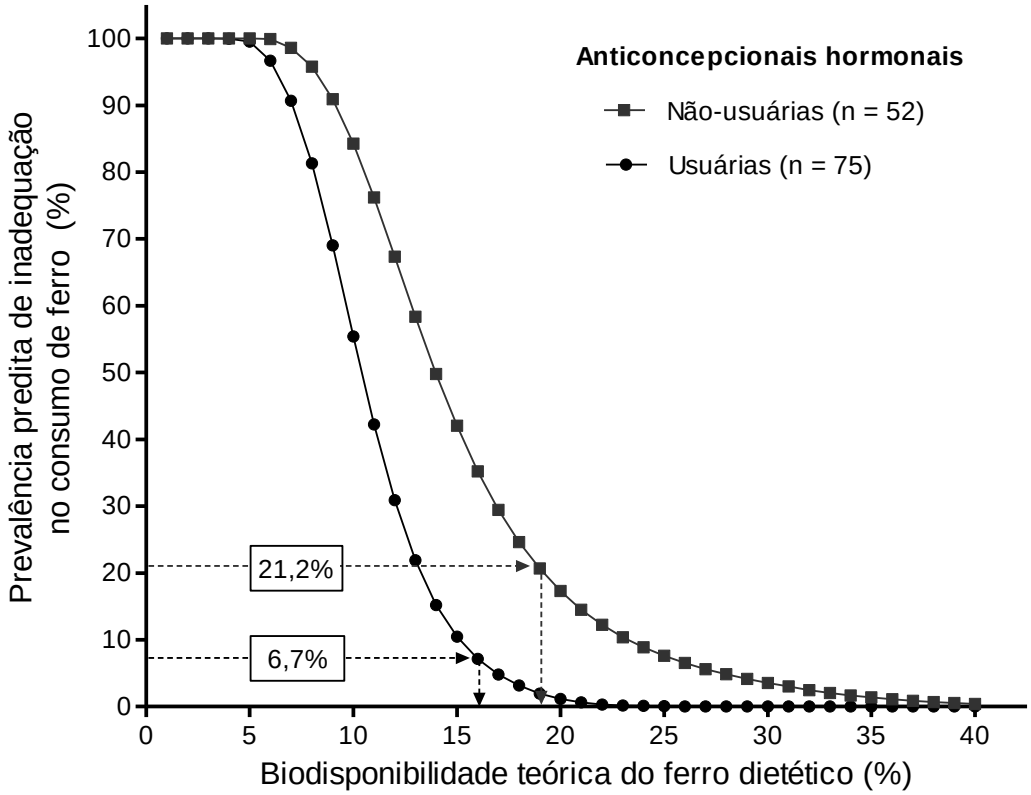


Figura 2. Relação entre a prevalência de inadequação do consumo de ferro total e sua biodisponibilidade dietética entre não usuárias e usuárias de anticoncepcionais hormonais, segundo modelo probabilístico.
As médias de biodisponibilidade dietética de ferro de 16% e 19% foram calculadas para usuárias e não usuárias de anticoncepcionais, respectivamente. A estimativa para a amostra total foi calculada como a média ponderada desses dois valores: [(0,591*16)+(0,409*19)] = 17,2%.

Estimativa da biodisponibilidade dietética do ferro: algoritmos baseados em refeições ou dietas completas

As estimativas de absorção do ferro dietético pelos algoritmos foram obtidas com cálculos que assumiram, para todos os indivíduos, um *status* corporal de ferro equivalente ao limítrofe da adequação (0 mg de reservas de ferro ou ferritina = 15 µg/L). Além de visar à obtenção de estimativas coerentes com o conceito tradicional de biodisponibilidade dietética do ferro (fração absorvível do mineral por indivíduos sem reservas corporais) (IOM, 2001; FAO/WHO, 2001), adotando-se essa estratégia foi possível padronizar o resultado dos diferentes algoritmos, cujos métodos de ajustes e pesos atribuídos para fatores dietéticos (composição química de refeições ou dietas) e fisiológicos (reserva corporal de ferro) são variados.

A **Tabela 2** apresenta os resultados obtidos com os cinco algoritmos testados. Ainda que em 1,7% e 4,1% das refeições avaliadas, os modelos de Hallberg & Hulthén (2000) e de Reddy et al. (2000) tenham quantificado valores de absorção do ferro não heme improvavelmente altos (> 45%), requerendo correção manual, suas estimativas de eficiência de absorção do ferro total (médias de 12,02% e 12,80%, respectivamente) não foram maiores que aquela obtida com o algoritmo de Monsen et al. (1978) (média de 11,57%), também baseado em refeições. Por outro lado, valores de biodisponibilidade significantemente menores foram obtidos com os algoritmos baseados em dietas completas de Armah et al. (2013) e Collings et al. (2013) (médias de 8,91% e 8,51%, respectivamente). Notoriamente, todas as médias de biodisponibilidade estimadas com os cinco algoritmos foram subestimadas entre 25% e 50% quando comparada à média de 17,2% predita pelo modelo probabilístico de aproximação.

Tabela 2. Estimativas de biodisponibilidade dietética do ferro segundo algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Algoritmos	***Ferro biodisponível (mg/dia)***	***Biodisponibilidade (%)***
Monsen et al. 1978	1,26 (0,36) [0,45 – 2,44][a]	11,57 (2,21) [6,54 – 17,95][a]
Hallberg & Hulthén 2000	1,30 (0,42) [0,44 – 2,88][a]	12,02 (3,34) [4,10 – 24,90][a]
Reddy et al. 2000	1,38 (0,48) [0,40 – 3,41][a]	12,80 (3,87) [3,61 – 25,07][a]
Armah et al. 2013	0,96 (0,21) [0,49 – 1,67][b]	8,91 (1,36) [5,62 – 13,33][b]
Collings et al. 2013	0,92 (0,23) [0,49 – 1,84][b]	8,51 (1,04) [4,61 – 11,44][b]

n = 127. Dados são média (desvio padrão). Faixas de valores são apresentadas em

colchetes. Teste não paramétrico de Friedman indica diferença significante entre as diferentes estimativas de ferro biodisponível e de biodisponibilidade (*P* < 0,001 para ambas).
[a,b,c] Numa mesma coluna, letras subscritas iguais indicam que a distribuição dos valores não difere, segundo teste *post hoc* de Dunn.

Correlação entre estimativas da biodisponibilidade dietética do ferro e suas reservas corporais

Houve forte correlação entre valores de ferro biodisponível estimado com os diferentes algoritmos (mg/dia - ajustados pela energia total da dieta), sejam baseados em refeições ou dietas completas. Entretanto, o modelo de Collings et al. (2013), quando comparado com o de Armah et al. (2013), teve mais fracas medidas de associação com os modelos baseados em refeições. Foram altas as correlações entre as estimativas obtidas com os algoritmos de Hallberg & Hulthén (2000) e Reddy et al. (2000) (r = 0,851; *P* < 0,001) e Monsen et al (1978) e Armah et al. (2013) (r = 0,851; *P* < 0,001). Contudo, nenhum dos coeficientes de regressão entre quaisquer das estimativas foi próximo do valor 1 (0,8 ≥ β ≤ 1,2), que indicaria a identidade entre elas (**Tabela 3**).

Tabela 3. Coeficientes de correlação e equações de regressão linear simples entre estimativas obtidas com diferentes algoritmos do ferro biodisponível (mg/dia) na dieta de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Algoritmos	***Monsen et al. 1978***	***Hallberg & Hulthén 2000***	***Reddy et al. 2000***	***Armah et al. 2013***
Hallberg & Hulthén 2000	r = 0,823 y = 1,5x - 0,8			
Reddy et al. 2000	r = 0,718 y = 1,7x - 0,9	r = 0,851 y = 1,2x + 0,0		
Armah et al. 2013	r = 0,850 y = 0,6x + 0,1	r = 0,836 y = 0,4x + 0,4	r = 0,749 y = 0,3x + 0,4	
Collings et al. 2013	r = 0,793 y = 0,5x + 0,1	r = 0,764 y = 0,3x + 0,4	r = 0,694 y = 0,3x + 0,4	r = 0,809 y = 0,8x + 0,1

n = 127. Estimativas de ferro biodisponível (mg/dia) foram ajustadas pela energia, segundo método de resíduos, antes de empregadas nas análises de correlação e regressão. Foi utilizado teste de correlação de *Pearson*. Todos os testes tiveram valores de *P* < 0,001.

Na busca por possíveis variáveis de confusão, foi investigada a associação entre características dietéticas e não dietéticas e os quantis de consumo de ferro biodisponível (mg/dia) estimados pelos diferentes algoritmos (APÊNDICE 9 - **Tabelas suplementares 3 a 5**). Observou-se forte associação negativa entre a adesão a dietas vegetarianas ou restritas em carne com os valores de biodisponibilidade calculados pelos algoritmos de Hallberg & Hulthén (2000), Reddy et al. (2000) e Collings et al. (2013) ($P < 0,01$ para todos), mas não de Monsen et al. (1978) ou Armah et al. (2013) (Tabela suplementar 4). Todos os modelos, contudo, tiveram medidas de biodisponibilidade fortemente associadas com o conteúdo dietético de ferro heme e de tecidos animais (**Tabela 4**). Os valores obtidos com os algoritmos de Hallberg & Hulthén (2000) e de Reddy et al. (2000) foram os únicos não relacionados com o conteúdo dietético de ferro não heme, enquanto foram com os de fitato. Além disso, foi observada associação negativa entre o cálcio e as medidas do primeiro modelo, provavelmente como reflexo da inclusão, em seus cálculos, de efeitos inibitórios deste mineral não só sobre a absorção do ferro não heme, mas também do ferro heme presente nas refeições. As estimativas dos algoritmos de Reddy et al. (2000) e de Collings et al. (2013) foram as únicas que variaram independentemente do conteúdo dietético total de vitamina C, ainda que somente o último modelo dispense dados quantitativos em seus cálculos.

Tabela 4. Características dietéticas selecionadas segundo quantis de consumo de ferro biodisponível (mg/dia) estimado com algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Quantil de consumo (mg/dia)[1]	**Ferro não heme**	**Ferro heme**	**Tecido animal[2]**	**Vitamina C**	**Cálcio**	**Fitato[3]**	**Polifenóis[4]**
	mg/dia	**mg/dia**	**g/dia**	**mg/dia**	**mg/dia**	**mg/dia**	**mg/dia**
Monsen et al. 1978							
< Mediana [0,5 – 1,2]	9,7 (1,3)	0,5 (0,3)	147,3 (72,7)	108,3 (69,2)	847,3 (244,1)	258,4 (67,5)	212,2 (57,0)
≥ Mediana [1,2 – 2,5]	10,7 (1,4)	0,9 (0,4)	189,3 (67,2)	149,2 (87,7)	817,8 (246,0)	255,4 (78,4)	234,2 (99,9)
P teste *t-Student*	**<0,001**	**<0,001**	**0,001**	**0,004**	0,499	0,819	0,134
Tercil 1 [0,5 – 1,1]	9,8 (1,2)	0,5 (0,3)	136,6 (64,7)	90,5 (47,9)	859,8 (262,3)	255,8 (64,1)	213,1 (53,9)
Tercil 2 [1,1 – 1,3]	10,2 (1,6)	0,6 (0,3)	165,2 (72,3)	127,4 (74,6)	833,6 (240,1)	270,3 (86,0)	236,7 (96,5)
Tercil 3 [1,3 – 2,5]	10,5 (1,4)	1,0 (0,4)	204,3 (66,2)	169,7 (95,9)	803,1 (232,3)	244,5 (66,3)	220,2 (91,5)
P para tendência	**0,018**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	0,289	0,475	0,666
Hallberg & Hulthén 2000							
< Mediana [0,5 – 1,2]	10,0 (1,3)	0,5 (0,3)	133,0 (74,8)	118,2 (87,4)	865,8 (248,9)	266,0 (64,6)	222,4 (80,0)
≥ Mediana [1,3 – 2,9]	10,3 (1,5)	0,9 (0,4)	203,3 (51,0)	139,4 (74,2)	799,5 (237,5)	247,9 (79,8)	224,2 (85,7)
P teste *t-Student*	0,257	**<0,001**	**<0,001**	0,142	0,127	0,162	0,906
Tercil 1 [0,5 – 1,1]	10,1 (1,2)	0,4 (0,3)	117,3 (78,2)	116,4 (90,9)	887,6 (264,3)	272,8 (66,6)	222,7 (74,6)
Tercil 2 [1,2 – 1,4]	10,2 (1,7)	0,6 (0,3)	172,2 (54,8)	115,4 (61,9)	828,2 (246,5)	261,3 (84,4)	234,1 (96,1)
Tercil 3 [1,4 – 2,9]	10,2 (1,3)	1,0 (0,4)	217,0 (43,1)	155,2 (83,7)	780,1 (213,5)	236,1 (62,9)	213,1 (76,2)
P para tendência	0,602	**<0,001**	**<0,001**	**0,043**	**0,043**	**0,011**	0,594
Reddy et al. 2000							
< Mediana [0,5 – 1,3]	10,2 (1,6)	0,4 (0,3)	128,4 (74,2)	127,8 (87,5)	870,9 (239,2)	286,8 (74,1)	230,7 (89,6)
≥ Mediana [1,3 – 3,1]	10,2 (1,2)	0,9 (0,4)	207,9 (44,7)	130,0 (75,6)	794,5 (245,6)	227,4 (58,8)	216,0 (75,1)
P teste *t-Student*	0,986	**<0,001**	**<0,001**	0,880	0,078	**<0,001**	0,317
Tercil 1 [0,5 – 1,1]	10,3 (1,7)	0,4 (0,3)	106,6 (74,8)	139,2 (97,1)	872,4 (259,5)	300,4 (78,3)	233,0 (84,6)
Tercil 2 [1,1 – 1,5]	10,1 (1,3)	0,7 (0,3)	176,9 (51,7)	106,0 (59,0)	797,8 (232,3)	248,3 (57,6)	214,5 (86,7)
Tercil 3 [1,6 – 3,1]	10,2 (1,2)	1,0 (0,4)	219,0 (38,4)	141,9 (81,2)	828,9 (241,8)	224,0 (61,4)	222,8 (77,2)

P para tendência	0,730	**<0,001**	**<0,001**	0,893	0,416	**<0,001**	0,574
Armah et al. 2013							
< Mediana [0,5 – 0,9]	9,6 (1,1)	0,5 (0,3)	161,5 (62,6)	101,9 (67,6)	863,8 (254,8)	253,8 (60,0)	215,5 (65,3)
≥ Mediana [0,9 – 1,5]	10,7 (1,4)	0,8 (0,5)	175,7 (82,0)	157,2 (85,5)	799,5 (230,7)	260,1 (84,8)	231,4 (97,4)
P teste *t-Student*	**<0,001**	**<0,001**	0,275	**<0,001**	0,139	0,632	0,284
Tercil 1 [0,5 – 0,9]	9,4 (1,1)	0,5 (0,2)	156,3 (61,5)	95,0 (62,9)	872,6 (248,3)	254,2 (57,5)	223,9 (62,2)
Tercil 2 [0,9 – 1,0]	10,2 (1,2)	0,6 (0,4)	159,7 (78,1)	125,0 (76,8)	817,3 (235,2)	273,9 (79,2)	230,3 (96,2)
Tercil 3 [1,0 – 1,5]	10,8 (1,6)	0,9 (0,5)	189,5 (74,3)	166,1 (87,9)	809,1 (251,4)	241,6 (77,4)	215,3 (85,9)
P para tendência	**<0,001**	**<0,001**	**0,037**	**<0,001**	0,240	0,400	0,637
Collings et al. 2013							
< Mediana [0,6 – 0,9]	9,7 (1,3)	0,5 (0,3)	144,0 (82,3)	129,9 (85,9)	855,5 (244,4)	260,6 (73,6)	221,9 (80,5)
≥ Mediana [0,9 – 1,4]	10,6 (1,4)	0,9 (0,4)	193,3 (51,4)	127,8 (77,2)	808,9 (244,4)	253,1 (72,6)	224,7 (85,3)
P teste *t-Student*	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	0,887	0,286	0,566	0,848
Tercil 1 [0,6 – 0,8]	9,4 (1,2)	0,4 (0,3)	135,4 (84,9)	126,4 (87,7)	844,3 (250,2)	252,8 (64,5)	204,5 (58,5)
Tercil 2 [0,8 – 1,0]	10,2 (1,1)	0,7 (0,3)	169,0 (61,6)	126,7 (76,3)	824,6 (279,2)	254,2 (73,5)	239,5 (95,6)
Tercil 3 [1,0 – 1,4]	10,9 (1,5)	1,0 (0,4)	200,0 (56,3)	133,7 (82,0)	829,0 (201,8)	263,6 (81,0)	224,6 (86,0)
P para tendência	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	0,687	0,778	0,501	0,215

n = 127. Dados são média (desvio padrão).

Todas as estimativas dietéticas foram ajustadas pela energia, segundo método de resíduos, antes de serem analisadas. [1] Faixas de valores de ferro biodisponível (mg/dia) ajustados pela energia são apresentadas em colchetes. [2] Peso de tecido cru (1g = 0,77g de tecido cozido). [3] Fitato-fósforo (1 mg = 3,53 mg de ácido fítico). [4] Equivalente de ácido tânico (1 mg = 1,6 mg de ácido gálico ou ácido clorogênico).

Comparações de médias entre quantis de consumo foram feitas por teste *t-Student* ou ANOVA com contraste polinomial para tendência linear.

Valores brutos e ajustados de ferritina sérica segundo os quantis de consumo de ferro biodisponível (mg/dia) estão apresentadas na **Tabela 5**. Observou-se que, após ajustes por variáveis não dietéticas (idade, IMC, cor de pele, nível de atividade física, uso de anticoncepcionais hormonais e nível de escore do fluxo menstrual), diferenças significantes de 30,5% e 37,4% foram estimadas nas médias de ferritina entre mulheres classificadas nos extremos tercis do consumo de ferro biodisponível calculado com os algoritmos de Hallberg & Hulthén (2000) ($P < 0,05$) e de Collings et al. (2013) ($P < 0,01$), respectivamente. Não obstante, grupos classificados segundo a mediana dos valores estimados por esses dois algoritmos tiveram diferenças de aproximadamente 30% nas concentrações médias do biomarcador ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente). O ajuste adicional dos modelos com uma variável indicadora de vegetariano ou restrição dietética de carnes reduziu a significância destas associações. A diferença das médias entre extremos tercis permaneceu significante para as estimativas do modelo de Collings et al (2013) ($P = 0,021$), mas não de Hallberg & Hulthén (2000) ($P = 0,103$). Isso sugere que importante parte das associações observadas entre a estimativa de biodisponibilidade de ferro e o biomarcador, principalmente em relação ao último modelo, pode ser atribuída a variações dietéticas e bioquímicas ligadas à adoção desse padrão alimentar. Cabe ressaltar, ainda assim, que as diferenças relativas nas médias do biomarcador entre os quantis não foram alteradas substancialmente em testes que consideraram a exclusão de não onívoras. Em nenhum dos modelos testados, houve evidência de efeito interativo entre dieta e uso de anticoncepcionais hormonais sobre os valores do biomarcador (P para interação > 0,05).

Por fim, diferenças nas médias de ferritina entre quantis de consumo dos componentes dietéticos isolados apresentados na Tabela 1, incluindo o ferro total e ferro heme, foram também testadas. Nenhuma associação, entretanto, permaneceu significante após ajustes pelas estimativas de ferro biodisponível. A despeito do insuficiente poder para testes de comparação entre mulheres deficientes e suficientes em ferro, diferenças na distribuição dos quantis de consumo estimado dos componentes dietéticos isolados ou de ferro biodisponível não foram evidentes ($P > 0,05$). Componentes dietéticos isolados também não se mostram relacionados com os outros marcadores hematológicos e bioquímicos estudados. Contudo, observou-se que quantis de ferro biodisponível estimado com o modelo de Hallberg & Hulthén (2000), mas não de Collings et al. (2013), foram associados com os

valores de saturação da transferrina ($P < 0,05$) (APÊNDICE 9 - Tabela suplementar 5), além da ferritina sérica.

Tabela 5. Médias geométricas brutas e ajustadas das concentrações séricas de ferritina (µg/L) segundo quantis de consumo de ferro biodisponível estimado com algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Algoritmo	Mediana		Tercil		
	Abaixo	**Acima**	**1**	**2**	**3**
Monsen et al. 1978					
Médias brutas	34,7 (27,5; 43,8)	38,5 (31,4; 47,3)	37,3 (27,6; 50,4)	32,4 (24,9; 42,1)	40,5 (31,7; 61,6)
Médias ajustadas	33,9 (27,8; 41,5)	39,4 (32,2; 48,0)	36,7 (28,8; 46,8)	31,4 (24,5; 40,1)	42,5 (33,0; 54,6)
Hallberg & Hulthén 2000					
Médias brutas	32,0 (25,6; 40,0)	41,7 (33,8; 51,4)	34,7 (26,5; 45,4)	33,8 (25,1; 45,7)	41,7 (32,7; 53,1)
Médias ajustadas	30,4 (24,9; 37,1)	43,9 (36,0; 53,5)[#]	31,9 (25,0; 40,7)	33,5 (26,3; 42,8)	45,9 (35,8; 58,8)[#]
Reddy et al. 2000					
Médias brutas	34,9 (28,2; 43,1)	38,3 (30,3; 48,0)	35,2 (27,6; 45,0)	33,6 (25,6; 44,0)	41,3 (30,9; 55,3)
Médias ajustadas	33,1 (27,1; 40,4)	40,3 (33,1; 49,1)	31,6 (24,5; 40,6)	34,5 (26,9; 44,2)	44,6 (35,0; 56,9)
Armah et al. 2013					
Médias brutas	33,9 (27,3; 42,2)	39,6 (31,8; 49,3)	31,5 (23,8; 41,7)	37,7 (28,8; 49,3)	41,0 (31,4; 53,3)
Médias ajustadas	33,2 (27,2; 40,5)	40,4 (33,0; 49,6)	30,2 (23,5; 38,8)	38,2 (30,1; 48,5)	42,1 (32,9; 53,9)
Collings et al. 2013					
Médias brutas	32,1 (26,0; 39,6)	41,7 (33,4; 52,2)	29,6 (22,7; 38,7)	37,9 (28,7; 50,3)	43,1 (33,5; 55,6)
Médias ajustadas	30,9 (25,5; 37,6)	43,3 (35,6; 52,7)[#]	27,8 (21,8; 35,5)	39,2 (31,0; 49,4)[#]	44,4 (34,8; 56,7)[##]

n = 127. Dados são média geométrica (intervalo de confiança de 95%).
Valores de ferritina corrigidos pela inflamação foram transformados em seu logaritmo natural antes das análises.
Comparações entre médias cruas segundo quantis de consumo foram feitas com os testes *t-Student* ou ANOVA. No modelo múltiplo, variáveis de ajuste incluíram: idade, IMC, cor de pele, nível de atividade física, uso de anticoncepcionais hormonais e nível de escore do fluxo menstrual..
[#, ##] Indica diferença em relação ao primeiro quantil, segundo modelo de regressão linear múltiplo. [#]$P < 0,05$; [##]$P < 0,01$

6.1.2. Discussão

Por serem ferramentas úteis na avaliação e no planejamento de dietas e ações de saúde pública, uma variedade de modelos de predição da biodisponibilidade de ferro foi desenvolvida nos últimos 40 anos. Entretanto, as estimativas obtidas com cada método têm precisão e acurácia ainda questionáveis e estudos que validem sua utilidade prática são escassos (HUNT, 2010; BEARD et al., 2007; LYNCH, 2005; REDDY, 2005). Neste trabalho, numa amostra de mulheres em presumido balanço estacionário do ferro corporal (necessidade fisiológica e consumo alimentar pouco variáveis há pelo menos 12 meses) (HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 2000; HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 1998), buscamos atestar a concordância de diferentes modelos matemáticos em predizer a biodisponibilidade dietética do mineral a partir de dados de inquéritos alimentares. Além disso, as estimativas obtidas por algoritmos foram testadas quanto à associação com valores de ferritina sérica. Buscamos assim fornecer evidências indiretas da validade desses métodos, assumindo que, após ajuste pelas perdas fisiológicas, as variações nas reservas corporais de ferro são potencialmente preditas por estimativas precisas da sua biodisponibilidade na dieta habitual (HALLBERG, 2000).

Recrutamos para o estudo estudantes com alto nível educacional e utilizamos metodologias confiáveis para coleta (GALANTE, 2007; GALANTE, 2004), controle de qualidade (MCCRORY et al., 2002; WILLET, 1998) e ajuste estatístico (HAUBROCK et al., 2011; WILLET, HOWE & KUSHI, 1997) dos dados dietéticos. Embora a criteriosa seleção das mulheres possa ter limitado a representatividade dos padrões alimentares da população, notamos que o consumo médio de ferro total (10,9 mg/dia) foi semelhante ao estimado para mulheres adultas em levantamento nacional (10,1 mg/dia) (IBGE, 2011). Além disso, o consumo médio de carnes (130,8 g/dia) foi similar ao descrito para paulistanas (130,6 g/dia) (DE CARVALHO et al., 2014), apesar da possível super-representação de vegetarianas entre as universitárias. Semelhanças com a população foram também observadas quanto aos contribuintes alimentares para o consumo total do mineral (41,8% de farináceos e 17,4% de carnes) (VIEIRA et al., 2016).

Além da qualidade dos dados dietéticos, atentamos para a seleção de mulheres sem complicações clínicas, buscamos garantir uma adequada interpretação dos biomarcadores laboratoriais (WHO, 2012) e caracterizamos detalhadamente aspectos nutricionais, sóciodemográficos e do fluxo menstrual das participantes. Entretanto, como possível resultado dos extensivos critérios de seleção amostral, houve relativa suficiência de ferro entre as mulheres estudadas (87,4%), principalmente entre usuárias de anticoncepcionais hormonais (93,3). Esse cenário pode ter reduzido nossa capacidade de captar importantes variações do *status* de ferro associadas com a dieta, visto que seu efeito é mais pronunciado entre indivíduos com baixas reservas do mineral (COLLINGS et al. 2013). Além disso, a baixa prevalência de inadequação do *status* de ferro pode ter elevado o grau de incerteza na estimativa da sua biodisponibilidade dietética por modelagem probabilística (DAINTY et al, 2014).

De fato, observamos uma diferença de 3% nos valores estimados de biodisponibilidade de ferro para usuárias e não usuárias de anticoncepcionais (Figura 1), embora um mesmo *status* de ferro (ferritina = 15 µg/L) tenha sido ajustado no modelo probabilístico. Os dois grupos diferiram quanto ao consumo de ferro total em aproximadamente 1 mg/dia, contudo, é pouco provável que essa diferença tenha tido impacto significante nas estimativas. Além disso, o valor de biodisponibilidade obtida por este modelo (17,2%) foi bastante aproximado do assumido para dietas ocidentais (18%) (FBN, IOM, 2001), o que fornece indícios iniciais de bom desempenho do método.

Suporte adicional para a validade do método probabilístico é sua concordância com modelo semelhante proposto por Hallberg e colaboradores (2000) (HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 2000), que se baseia em curva alternativa de distribuição das necessidades fisiológicas de ferro (HALLBERG & ROSSANDER-HULTÉN, 1991; FAO, 2001). Segundo essa equação, a prevalência de deficiência de ferro estimada para não usuárias de anticoncepcionais (21,2%) seria coerente com uma média de consumo de ferro biodisponível de 28 µg/kg/dia, assumindo-se um balanço estacionário de ferro corporal para todas as mulheres. Essa figura é comparável à calculada a partir das médias do consumo do mineral (10,3 mg/dia) e do peso corporal (59,5 kg) das não usuárias de anticoncepcional, admitindo-se a biodisponibilidade de 17,2% estimada pelo modelo probabilístico de aproximação (30 µg/kg/dia). Entretanto, equação semelhante, baseada nas curvas de

necessidades de usuárias de anticoncepcionais, não está disponível na publicação original deste último modelo (HALLBERG, HULTHÉN & GARBY, 2000).

Estudos epidemiológicos que objetivamente testaram a validade de algoritmos de biodisponibilidade do ferro são escassos. Em estudo com religiosas de conventos situados nas Filipinas, Beard e colaboradores (2007) descrevem que os algoritmos de Monsen et al. (1978), Hallberg & Hulthen (2000) e Reddy et al (2000) subestimaram entre 57% e 66% a eficiência de absorção de ferro daquela mulheres, predita a partir da mudança nas reservas corporais do mineral em resposta à uma intervenção com alimento fortificado (BEARD et al., 2007). Zimmermann e colaboradores (2005), também baseados em um cálculo indireto da absorção de ferro a partir de mudanças no *status* corporal de crianças marroquinas, encontraram uma subestimativa de 50% para a medida obtida com o algoritmo de Reddy et al (2000) (ZIMERMANN et al., 2005). No presente estudo, as estimativas de biodisponibilidade obtidas pelos algoritmos foram comparadas ao modelo probabilístico, julgado como o método menos afetado pelos erros associados com a avaliação do consumo alimentar (DAINTY et al., 2014).

Assim, todas as medidas de biodisponibilidade obtidas por algoritmos foram subestimadas quando comparadas àquela da estratégia probabilística. Ainda que correlacionadas ($0,69 \leq r \leq 0,85$), essas estimativas diferiram da identidade ($0,8 \geq \beta \leq 1,2$) e clara discordância foi encontrada entre médias obtidas com os modelos baseados em refeições (11,6% a 12,80%) (MONSEN et al., 1978; HALLBERG & HÚLTHEN, 2000; REDDY et al., 2000) ou dietas completas (8,5% a 8,9%) (COLLINGS et al., 2013; ARMAH et al., 2013). A exclusão de mulheres vegetarianas ou com restrição dietética de carnes elevaram essas médias de biodisponibilidade entre 0,14 e 0,78 pontos percentuais, não modificando substancialmente os resultados.

Surpreendentemente, os algoritmos baseados em dietas completas de Collings et al. (2013) e Armah et al. (2013), que foram recentemente propostos como alternativas mais acuradas aos modelos baseados em refeições, geraram as mais baixas estimativas de biodisponibilidade de ferro. Esse achado sinaliza um possível exagero no efeito inibitório da absorção do mineral atribuído aos valores de ferritina sérica ou na magnitude dos efeitos atribuídos aos elementos dietéticos empregados em seus cálculos. Há de se considerar, entretanto, que ambos os algoritmos resultaram em valores de biodisponibilidade semelhantes, ainda que mínimas

informações sobre a composição da dieta são utilizadas nos cálculos de Collings et al. (2013).

Nossos resultados discordam dos descritos por Armah e colaboradores (2015) que, utilizando o algoritmo proposto pelos próprios autores, estimaram uma biodisponibilidade de ferro de 15% na dieta norte-americana, embora seu conteúdo estimado de carnes (52 g/dia) e de vitamina C (52 mg/dia) tenha sido menor que o observado na dieta das mulheres do presente estudo (Tabela 1) (ARMAH et al., 2015; ARMAH et al., 2013). Por outro lado, um consumo relativamente alto de fitato foi encontrado entre as mulheres aqui avaliadas (260,2 mg/dia como fitato ou 926,3 mg/dia como ácido fítico), o que pode também ter contribuído para a subestimação observada nos resultado dos algoritmos de Hallberg & Hulthen (2000) e de Reddy et al (2000). Tais valores de fitato foram obtidos de tabelas internacionais de composição de alimentos (APÊNDICE 7) (HALBERG & HULTHEN, 2000; HARLAND & OBERLEAS, 1993; FAO, 1990) e requerem confirmação por análises químicas dos itens consumidos no Brasil. Ainda assim, o conteúdo médio de fitato estimado para as refeições relatadas nos registros alimentares (64,9 mg – Tabela suplementar 2) foi bastante semelhante ao obtido por determinação direta em amostras de refeições planejadas para refletir o hábito alimentar de brasileiros (62,6 mg) (RIBEIRO et al., 2013).

Provavelmente devido a sua complexidade e refinamento, o algoritmo de Hallberg & Hulthén (2000) gerou estimativas de biodisponibilidade dietética de ferro que se mostraram preditoras independentes dos valores de ferritina sérica das mulheres estudadas (Tabela 5). Ainda assim, as estimativas obtidas com o algoritmo de Collings et al (2013), o mais simples dentre todos os modelos testados, supreendentemente tiveram associação relativamente mais forte com o biomarcador. Ainda que tenham diferido quanto à identidade ($\beta = 0,3$), as estimativas dos dois modelos foram correlacionadas entre si ($r = 0,76$). Entretanto, profundas diferenças existem entre suas metodologias de estimação.

O modelo de Hallberg & Hulthén (2000) foi elaborado a partir de ensaios com radioisótopos em refeições e prevê ajustes pelo efeito facilitador ou inibidor de elementos dietéticos por meio de oito equações de correção da absorção do ferro não heme e uma do ferro heme. Além disso, corrige a absorção de ambas as frações de ferro pelos valores de ferritina sérica utilizando equações exponenciais (HALBERG & HULTHEN, 2000). O modelo de Collings et al (2013), por sua vez, foi

gerado a partir de meta-análise de ensaios com radioisótopos ou isótopos estáveis, baseados em dietas completas (período ≥ 1 dia). Ele também emprega equação exponencial para correção dos valores de absorção pela ferritina sérica. Excepcionalmente, este modelo não requer qualquer dado quantitativo da dieta, exceto o conteúdo de ferro não heme. Assim, um valor fixo de absorção foi assumido para a fração de ferro heme (FBN, IOM, 2001). Sua equação é resumida a três correções da biodisponibilidade do ferro não heme em função do tipo de dieta em análise, que deve ser arbitrariamente julgada como ordinária, rica em inibidores ou rica em facilitadores da absorção do ferro (COLLINGS et al., 2013).

Não é surpresa, assim, que foram observadas associações significantes entre o conteúdo dietético de inibidores e facilitadores da absorção do ferro com as estimativas obtidas pelo modelo de Hallberg & Hulthén (2000), mas não de Collings et al. (2013). Ambos as estimativas, entretanto, foram semelhantemente correlacionadas com o conteúdo dietético de ferro heme (Tabela 4). Assim, importantes variações dietéticas possivelmente capturadas pelo algoritmo de Collings et al. (2013), mas não de Hallberg & Hulthén (2000), não são prováveis causas da mais forte associação entre os valores de ferritina observada para as estimativas do primeiro modelo, em relação ao último. Além disso, o ajuste dos modelos por uma variável indicadora de vegetarianismo reduziu a significância da associação de ambos os modelos, contudo a diferença das médias do biomarcador entre extremos tercis permaneceu significante para as estimativas do modelo de Collings et al (2013), mas não de Hallberg & Hulthén (2000).

Por um lado, a diferença dos dois modelos quanto à força de associação com os valores de ferritina pode sugerir que, como de fato ostentado por alguns autores, os algoritmos baseados em refeições geraram estimativas com improvável variação, uma vez que atribuem exagerados efeitos facilitador ou inibidor da dieta sobre a absorção do ferro não heme (COLLINGS et al., 2013; ARMAH et al., 2013 HUNT & ROUGHEAD, 2000; COOK, 1991). Por outro lado, nossos dados sugerem que o algoritmo de Hallberg & Hulthén (2000) foi mais eficiente em discriminar as conhecidas diferenças na biodisponibilidade do ferro entre dietas onívoras e vegetarianas (FBN, IOM, 2001). Parte disso porque suas estimativas foram as únicas associadas com os valores de saturação da transferrina, cuja diferença nas médias entre mulheres onívoras e com declarada restrição dietética de carnes tiveram contraste relativamente mais importante (31,3% vs. 21,8%, P = 0,001) que o

observado para ferritina (38,3 µg/L vs. 21,8 µg/L, *P* = 0,150). Esses achados reiteram as observações de Hunt (2010) que, numa tentativa de validação dos algoritmos de biodisponibilidade utilizando ensaio de absorção de dietas completas onívoras e vegetarianas, apontam os melhores resultados para as estimativas obtidas com o modelo de Hallberg & Hulthén (2000) (HUNT, 2010).

Como descrito por muitos estudos observacionais (FBN, IOM, 2001), estimativas de consumo de ferro total não se mostraram preditoras independentes das concentrações de ferritina entre as mulheres estudadas, o que reforça a importância da estimativa da biodisponibilidade dietética de ferro para a melhor intepretação do papel da dieta no *status* de ferro e nos desfechos de saúde e doença com ele relacionados. A evidência de um forte componente hereditário na variação interindividual da absorção do ferro dietético (ZIMERMANN et al., 2010) sinaliza que identificação dos seus determinantes moleculares melhorará ainda mais o entendimento da relação da dieta com o esses desfechos (Artigo 2 desta tese).

A confirmação dos nossos achados se faz necessária, sobretudo em estudos de base populacional, a fim de esclarecer se os modelos de biodisponibilidade de ferro são úteis na predição do *status* de ferro de indivíduos expostos a múltiplos fatores ambientais que influenciam o balanço corporal do mineral. Nossas condições experimentais, entretanto, nos permitiram evidenciar que, no contexto das dietas avaliadas, medidas quantitativas de biodisponibilidade dietética do ferro calculadas por algoritmos ou por modelagem probabilística são discordantes entre si. Neste cenário, contudo, observou-se que com os algoritmos de Hallberg & Hulthén (2000) e de Collings et al. (2013) foram obtidas estimativas dietéticas mais fortemente relacionadas com as concentrações séricas de ferritina do que aquelas de consumo de ferro total ou de outros nutrientes e de não-nutrientes conhecidos por modificar sua biodisponibilidade.

Esses resultados sugerem que os dois algoritmos acima citados podem ser ferramentas úteis para monitorar e classificar dietas e/ou refeições em relação ao seu conteúdo de ferro biodisponível e/ou aos efeitos esperados sobre o balanço corporal do mineral entre mulheres com hábitos alimentares diversos. Por outro lado, sugerem precaução na interpretação de estudos epidemiológicos que visam o reajuste de referências dietéticas do mineral a partir dos métodos aqui avaliados, pois apresentam precisão e acurácia ainda desconhecidas. Em resumo, reiteramos a importante e a complexa relação da dieta com o balanço corporal de ferro de

mulheres na idade reprodutiva e sinalizamos a necessidade de validação dos modelos atualmente disponíveis para a predição da biodisponibilidade dietética do mineral utilizando inquéritos dietéticos.

6.2 ESTUDO 1 – ARTIGO 2: **Genótipos *TMPRSS6* e *HFE* podem modificar a associação do consumo de ferro com seu *status* corporal: evidências de um estudo transversal com mulheres na idade reprodutiva**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação de variantes do gene *TMPRSS6* e da biodisponibilidade estimada do ferro dietético com variações nos biomarcadores do seu *status* corporal entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. Testou-se a hipótese de que biodisponibilidade dietética de ferro e variantes *TMPRSS6* tem efeito interativo sobre os biomarcadores do mineral.

6.2.1 Resultados

As médias (± desvio padrão) de idade e de índice de massa corporal foram de 27,4 ± 5,1 anos e 22,1 ± 2,4 kg/m^2, respectivamente. Três quartos das mulheres se autodeclararam brancas. Segundo as referências de ingestão do mineral (FNB, IOM, 2001), com o consumo médio observado de 10,9 mg diários de ferro total, cerca de 14,4% das mulheres estariam em risco de inadequação dietética deste mineral. As concentrações de ferritina sérica, ajustadas pela inflamação (WHO, 2012), tiveram média geométrica de 36,6 µg/L, variando de 4 a 198 µg/L, enquanto as médias (± desvio padrão) de saturação da transferrina e de hemoglobina foram de 29,9 ± 11,4% e 13,4 ± 0,8 g/dL, respectivamente. A deficiência de ferro (ferritina < 15 µg/L) e a anemia ferropriva (Hb < 12 g/dL e ferritina < 15 µg/L) estiveram presentes em 12,6% e 3,1% das mulheres. Os três biomarcadores estudados correlacionaram-se moderadamente ($0,34 \leq r \leq 0,38$, $P < 0,001$). Na **Tabela** 6 estão apresentadas suas distribuições, segundo características nutricionais e sociodemográficas.

Tabela 6. Distribuição de ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina segundo características nutricionais e sociodemográficas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

	n (%)	Ferritina*	Saturação da transferrina	Hemoglobina
		µg/L	%	g/dL
Cor de pele autodeclarada[1]				
Branca	95 (74,8)	39,4 (33,0; 47,1)	30,4 (10,9)	13,4 (0,8)
Parda ou negra	24 (18,9)	27,0 (19,6; 37,1)	28,3 (12,9)	13,2 (0,9)
Amarela	8 (6,3)	37,0 (15,3; 89,5)	29,4 (13,2)	13,3 (0,6)
Anticoncepcionais hormonais				
Não usuária	52 (40,9)	31,6 (24,0; 41,6)	30,1 (12,8)	13,4 (0,9)
Usuária	75 (59,1)	41,0 (34,3; 49,0)	29,8 (10,3)	13,4 (0,8)
Escore de fluxo menstrual[£1,2,3]				
Baixo	44 (34,6)	53,5 (42,3; 67,6)	32,5 (12,0)	13,6 (0,8)
Médio	39 (30,7)	36,1 (28,9; 45,0)	29,6 (10,2)	13,3 (0,6)
Alto	44 (34,6)	25,3 (18,8; 33,9)	27,6 (11,3)	13,2 (1,0)
Nível de atividade física[1]				
Ativo	62 (48,8)	36,8 (28,1; 48,1)	31,7 (10,5)	13,4 (0,7)
Muito ativo	16 (12,6)	24,6 (14,7; 41,3)	27,6 (12,5)	13,3 (0,9)
Insuficientemente ativo	49 (38,6)	40,3 (33,1; 49,1)	28,4 (11,8)	13,4 (0,9)
Tipo de dieta autodeclarada[2,3]				
Onívora	109 (85,8)	38,3 (32,4; 45,2)	31,2 (11,5)	13,4 (0,8)
Vegetariana ou restrita em carnes	18 (14,2	27,8 (18,8; 41,1)	21,8 (6,2)	13,0 (1,0)
Ferro dietético biodisponível[££]				
Baixo	43 (33,9)	34,7 (26,5; 45,4)	27,5 (8,9)	13,2 (0,8)
Médio	42 (33,1)	33,8 (25,1; 45,7)	29,5 (12,0)	13,5 (0,9)
Alto	42 (33,1)	41,7 (32,8; 53,1)	32,7 (12,5)	13,4 (0,7)

n = 127. Dados são média geométrica (IC de 95%) ou média aritmética (DP).
* Valores de ferritina, corrigidos pela inflamação, foram transformados em seu logaritmo natural antes das análises.
** n=126. Modelo não incluiu dados de um *outlier* influente.
[£] Escore expresso como unidades arbitrárias (UA) e classificado segundo distribuição na amostra (Heath et al. 1999): baixo (tercil 1), ≤ 13 UA; médio (tercil 2), 14-21 UA; alto (tercil 3), ≥ 22 UA.

[££] Estimativa de consumo diário (Hallberg & Hulthen, 2000) ajustada pela energia total da dieta e classificada segundo distribuição na amostra: baixo (tercil 1), ≤ 1,1 mg/dia; médio (tercil 2), 1,2-1,4 mg/dia; alto (tercil 3), > 1,4 mg/dia.
[1] Associação significante com concentrações de ferritina sérica ($P < 0,05$) após ajuste por idade, IMC e demais variáveis apresentadas na tabela, segundo modelo de regressão linear ($R^2 = 0,259$; R^2 ajustado = 0,188; $P < 0,001$).
[2] Associação significante com valores de saturação da transferrina ($P < 0,05$) após ajuste por idade, IMC e demais variáveis apresentadas na tabela, segundo modelo de regressão linear ($R^2 = 0,226$; R^2 ajustado = 0,152; $P = 0,001$).
[3] Associação significante com concentrações de hemoglobina ($P < 0,05$) após ajuste por idade, IMC e demais variáveis apresentadas na tabela, segundo modelo de regressão linear ($R^2 = 0,185$; R^2 ajustado = 0,106; $P = 0,009$).

Houve correlação negativa entre níveis estimados de fluxo menstrual e valores de ferritina (β = -40,4%, *P* < 0,001), saturação da transferrina (β = - 2,897, *P* = 0,017) e hemoglobina (β = -0,18 *P* = 0,043). Menores concentrações de ferritina foram também encontradas entre mulheres pardas ou negras, quando comparadas às brancas (β = -44,4%, *P* = 0,018), e entre as fisicamente muito ativas, quando comparadas às ativas (β = -69,0%, *P* = 0,005). Após ajuste dos modelos múltiplos pela prática de vegetarianismo ou de restrição dietética de carnes, a associação entre o consumo estimado de ferro biodisponível e o seu *status* corporal não permaneceu estatisticamente significante. Contudo, foi observada associação entre a adoção desse padrão alimentar e menores valores de saturação da transferrina (β = -8,32, *P* = 0,006) e de hemoglobina (β = -0,45, *P* = 0,045). Além disso, o primeiro biomarcador foi negativamente correlacionado com idade (β = -0,43, *P* = 0,026), enquanto o último foi positivamente associado com IMC (β = 0,09, *P* = 0,003). Em combinação, os indicadores nutricionais, sóciodemográficos e do fluxo menstrual explicaram 18,8%, 15,2% e 10,6% da variação nos valores de ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina, respectivamente (Tabela 6).

As distribuições dos genótipos para os quatro polimorfismos avaliados não diferiram daquelas esperadas para suas respectivas frequências alélicas, segundo Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*P* ≥ 0,200). Os alelos polimórficos das variantes rs855791 ($MT2^{736V}$ – alelo A) e rs4820268 ($MT2^{521D}$ – alelo G) do gene *TMPRSS6* estiveram em forte desequilíbrio de ligação (r^2 = 0,7; D' = 0,91). Suas frequências (0,44 e 0,48) foram maiores que às encontradas nas populações da África (*HapMap* YRI e ASW - 0,11-0,19 e 0,21-0,40, respectivamente), mas comparáveis àquelas de países europeus (*HapMap* CEU e TSI - 0,41-0,46 e 0,48-0,49, respectivamente). Semelhantemente, as frequências dos alelos polimórficos rs1799945 (HFE^{63D} – alelo G) e rs1800562 (HFE^{282Y} – alelo A) (0,15 e 0,01, respectivamente) do gene *HFE* foram comparáveis às da Europa (HapMap CEU e TSI - 0,13-0,18 e 0,03-0,05, respectivamente) e daquelas estimadas por outros estudos no Brasil (LEÃO et al., 2014). A análise de desequilíbrio de ligação indicou que essas duas variantes segregam em haplótipos distintos (r^2 = 0,0, D' = 0,41).

Mulheres deficientes e suficientes em ferro não diferiram quanto às frequências das variantes $MT2^{736V}$ (0,38 *vs.* 0,45, *P* = 0,449), $MT2^{521D}$ (0,38 *vs.* 0,49, *P* = 0,219) ou HFE^{63D} (0,13 *vs.* 0,15, *P* = 0,676), nem de haplótipos *TMPRSS6* (GA, 0,50; AG, 0,42; GG, 0,06; AA, 0,02). Devido ao número pequeno de amostras,

optou-se por analisar a associação do alelo HFE^{63D} com o *status* de ferro das mulheres homozigotas (n = 4) em combinação com aquelas heterozigotas na mesma posição (efeito genético dominante). O alelo HFE^{282Y} foi identificado em apenas quatro mulheres (frequência alélica ~ 1,5%), incluindo uma heterozigota composta com o HFE^{63D}.

As estimativas de consumo de ferro total, incluindo sua fração biodisponível, não diferiram entre mulheres com diferentes genótipos *TMPRSS6* e *HFE* (APÊNDICE 9 - **Tabela suplementar 6)**. Excetuando a tendência de carreadoras dos alelos $MT2^{736V}$ declararem-se mais frequentemente como brancas (P = 0,046) e de carreadoras do HFE^{63D} menos frequentemente como amarelas (P = 0,056), outras caraterísticas sociodemográficas, nutricionais ou de perdas menstruais não foram associadas aos genótipos avaliados (**Tabelas suplementares 7 a 10**). Nos modelos múltiplos (**Tabela 7**), observou-se que tanto as homozigotas, quanto as heterozigotas para o alelo $MT2^{736V}$, apresentaram valores de saturação da transferrina 5 ou 6 pontos percentuais menores que homozigotas para o alelo ancestral ($MT2^{736V}$). Assumindo-se um efeito genético dominante, 4,5% da variância nos valores desse biomarcador foi independentemente explicada por este genótipo (β = -5,4, P = 0,007). Em testes de associação dos haplótipos $MT2^{736V}$ e $MT2^{521D}$ com o *status* de ferro, notou-se que, para os três biomarcadores avaliados, coeficientes de inclinação negativos foram estimados para os haplótipos carreadores do alelo $MT2^{521D}$ (alelo G). Ainda que o haplótipo carreador do $MT2^{736V}$ mas não do $MT2^{521D}$ (AA) não tenha indicado associação inversa com o *status* de ferro, sua frequência foi rara entre as mulheres estudadas (~2%). Associações aparentemente mais significantes acompanharam o alelo $MT2^{736V}$, independentemente da presença do $MT2^{521D}$ (**Tabela suplementar 11**). Esses resultados sugerem mais forte causalidade dos sinais de associação para a primeira variante. Em vista disso, análises posteriores foram restritas aos genótipos HFE^{63D} e $MT2^{736V}$.

Tabela 7. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Ferritina (µg/L)*								
Genótipos	n (%)	Média geométrica (IC 95%)	Modelo co-dominante[1,*]			Modelo dominante[2,*]		
			β (EP)	*P*	% variação explicada	β (EP)	*P*	% variação explicada
TMPRSS6 rs855791								
GG	44 (34,6)	36,4 (27,4; 48,3)	Ref.	-		Ref.	-	
AG	55 (43,3)	35,0 (28,3; 43,4)	-8,0 (13,3)	0,624	< 1,0	-8,0 (15,2)	0,600	< 1,0
AA	28 (22,0)	40,0 (27,6; 58,0)	-7,9 (20,3)	0,698				
TMPRSS6 rs4820268								
AA	38 (29,9)	34,3 (25,1; 46,9)	Ref.	-		Ref.	-	
GA	57 (44,9)	33,3 (27,0; 41,0)	-8,5 (16,7)	0,611	< 1,0	1,3 (15,6)	0,934	< 1,0
GG	32 (25,2)	46,6 (33,7; 64,5)	20,5 (19,7)	0,299				
HFE rs1799945								
CC	93 (73,2)	35,9 (30,0; 42,8)		-		Ref.	-	-
GG + GC	34 (26,8)	38,6 (27,9; 53,3)				7,4 (16,6)	0,655	< 1,0
Saturação da transferrina (%)								
Genótipos	n (%)	Média aritmética (DP)	Modelo co-dominante[1]			Modelo dominante[2]		
			β (EP)	*P*	% variação explicada	β (EP)	*P*	% variação explicada
TMPRSS6 rs855791								
GG	44 (34,6)	32,7 (11,6)	Ref.	-		Ref.	-	
AG	55 (43,3)	28,3 (10,9)	**-5,1 (2,1)**	**0,017**	**3,80**	**-5,4 (2,0)**	**0,007**	**4,50**
AA	28 (22,0)	28,6 (11,4)	**-5,9 (2,6)**	**0,026**				
TMPRSS6 rs4820268								
AA	38 (29,9)	31,9 (12,8)	Ref.	-		Ref.	-	
GA	57 (44,9)	28,9 (10,9)	-4,1 (2,2)	0,068	1,00	-3,6 (2,1)	0,084	1,50
GG	32 (25,2)	29,2 (11,4)	-2,6 (2,6)	0,320				
HFE rs1799945								
CC	93 (73,2)	28,7(10,8)		-		Ref.	-	< 1,0
GG + GC	34 (26,8)	33,2 (12,4)				3,0 (2,2)	0,172	

Hemoglobina(g/dL)								
Genótipos	n (%)	Média aritmética (DP)	Modelo co-dominante[1]			Modelo dominante[2]		
			β (EP)	*P*	% variação explicada	β (EP)	*P*	% variação explicada
TMPRSS6 rs855791								
GG	43 (34,1)	13,5 (0,8)	Ref.	-		Ref.	-	
AG	55 (43,7)	13,3 (0,8)	-0,2 (0,2)	0,270	< 1,0	-0,2 (0,1)	0,188	< 1,0
AA	28 (22,2)	13,3 (0,9)	-0,2 (0,2)	0,222				
TMPRSS6 rs4820268								
AA	38 (29,9)	13,4 (0,9)	Ref.	-		Ref.	-	
GA	56 (44,4)	13,3 (0,7)	-0,1 (0,2)	0,601	< 1,0	-0,1 (0,2)	0,589	< 1,0
GG	32 (25,4)	13,4 (0,9)	-0,1 (0,2)	0,699				
HFE rs1799945								
CC	92 (73,0)	13,4 (0,8)		-		Ref.	-	< 1,0
GG + GC	34 (27,0)	13,4 (0,9)				0,0 (0,2)	0,938	

n = 127.

* Valores de ferritina corrigidos pela inflamação foram transformados em seu logaritmo natural antes das análises. Os coeficientes de inclinação [β (Erro Padrão)] para cada genótipo indicam o efeito estimado nas concentrações de ferritina, expresso em percentual (%), relativo ao genótipo referência.

** n=126. Modelos não incluem dados de um *outlier* influente.

[1] Coeficientes de inclinação [β (Erro Padrão)] indicam os efeitos estimados para os genótipos heterozigoto e homozigoto para o alelo de menor frequência em relação ao genótipo homozigoto para o alelo de maior frequência (referência), segundo modelo de regressão linear ajustado por idade, IMC e demais variáveis apresentadas na Tabela 6.

[2] Coeficientes de inclinação (β IC 95%) indicam o efeito estimado dos genótipos heterozigoto e homozigoto para o alelo de menor frequência combinados em relação ao genótipo homozigoto para o alelo de maior frequência (referência), segundo modelo de regressão linear ajustado por idade, IMC e demais variáveis apresentadas na Tabela 6.

[1,2] A porcentagem da variação explicada pelos genótipos foi calculada como a mudança no coeficiente de determinação (R^2 ajustado) após sua inclusão nos modelos de regressão linear iniciais, apresentados na Tabela 6.

Como apresentado na **Figura 3**, houve evidências de mudança no efeito dos diferentes genótipos *TMPRSS6* e *HFE* sobre o *status* de ferro ao longo dos níveis estimados de sua biodisponibilidade dietética. Entretanto, resultados significantes foram observados somente nos testes com a variante HFE^{63D} (Figura 3 - D e E). Notoriamente, no mais alto nível estimado de ferro dietético biodisponível, carreadoras deste alelo tiveram média 55% maior de ferritina sérica (β = 55,4; *P* = 0,036) e aproximadamente 14 pontos percentuais a mais de saturação da transferrina (β = 13,6; *P* < 0,001) quando comparadas às homozigotas para o alelo ancestral (HFE^{63H}). Por outro lado, uma tendência a associações em direção oposta foi observada com este mesmo polimorfismo entre as mulheres no mais baixo consumo estimado do mineral, principalmente em relação aos valores de saturação da transferrina (β = - 7,1; *P* = 0,045). Essa última associação, entretanto, não se manteve significante após ajuste do modelo pelo efeito do alelo $MT2^{736V}$ (*P* = 0,278).

Os achados sugestivos de modificação do efeito do alelo HFE^{63D} nos diferentes níveis de biodisponibilidade dietética do mineral foram corroborados pela significância estatística de termos de interação entre o genótipo *HFE* e os tercis de biodisponibilidade dietética do mineral sobre os valores de ferritina (*P* = 0,036 – Figura 3 - D), saturação da transferrina *(P* = 0,001 – Figura 1- E) e, mais fracamente, de hemoglobina (*P* = 0,059 – Figura 3 - E). Os modelos de regressão ajustados não só pelas variáveis nutricionais, sociodemográficas e do fluxo menstrual, mas também pelos genótipos do $MT2^{736V}$ e do HFE^{63D}, bem como pela interação deste alelo com o ferro dietético biodisponível, explicaram 20,1%, 28,7% e 11,1% da variabilidade nos valores de ferritina, saturação de transferrina e hemoglobina, respectivamente. Excepcionalmente, um aumento relativo de 53% na habilidade de predição dos valores individuais de saturação da transferrina foi conferido por essas informações adicionais (*P* < 0,001).

A modificação na magnitude e na direção do efeito do alelo HFE^{63D} pela exposição dietética é consistente com uma interação de tipo cruzada ou qualitativa, na qual os efeitos das variáveis genética e ambiental são geralmente considerados insignificantes quando analisados isoladamente (BAYE et al., 2011). Não obstante, a modificação, pelo genótipo, da relação entre o consumo estimado de ferro biodisponível e os biomarcador do *status* de ferro foi também evidente em análises de correlação (**Figura 4**).

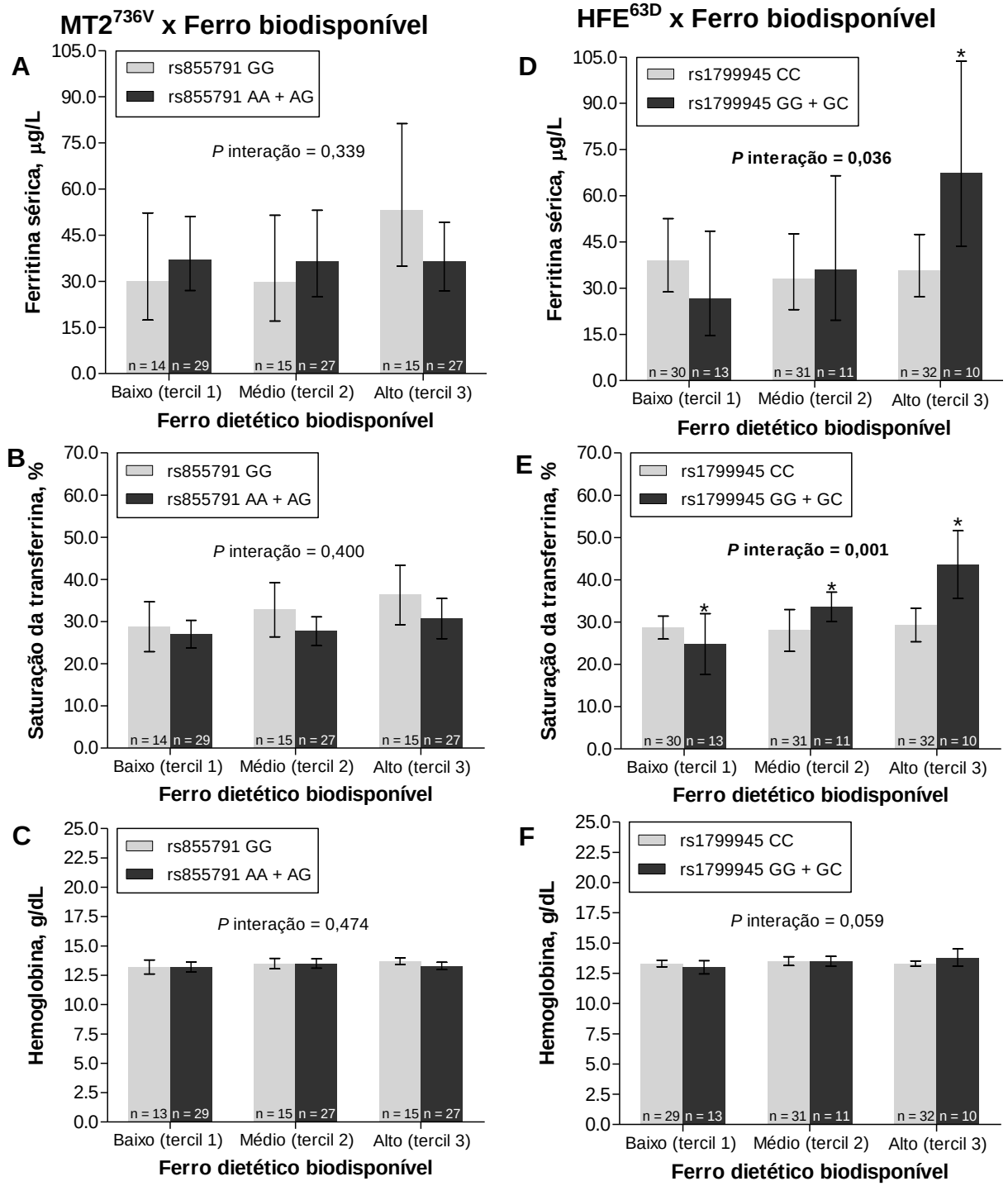


Figura 3. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina (A e D), saturação da transferrina (B e E) e hemoglobina (C e F), segundo conteúdo dietético de ferro biodisponível[1], entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal.

Dados apresentados são média geométrica (IC de 95%) ou média aritmética (DP).

[1]Estimativa de consumo diário (Hallberg & Hulthen, 2000) ajustada pela energia total da dieta e classificada segundo distribuição na amostra: baixo (tercil 1), ≤ 1,1 mg/dia; médio (tercil 2), 1,2-1,4 mg/dia; alto (tercil 3), > 1,4 mg/dia.

* Indica diferença estatisticamente significantemente (P < 0,05) em relação ao genótipo homozigoto para o alelo de maior frequência no mesmo nível estimado de ferro dietético biodisponível.

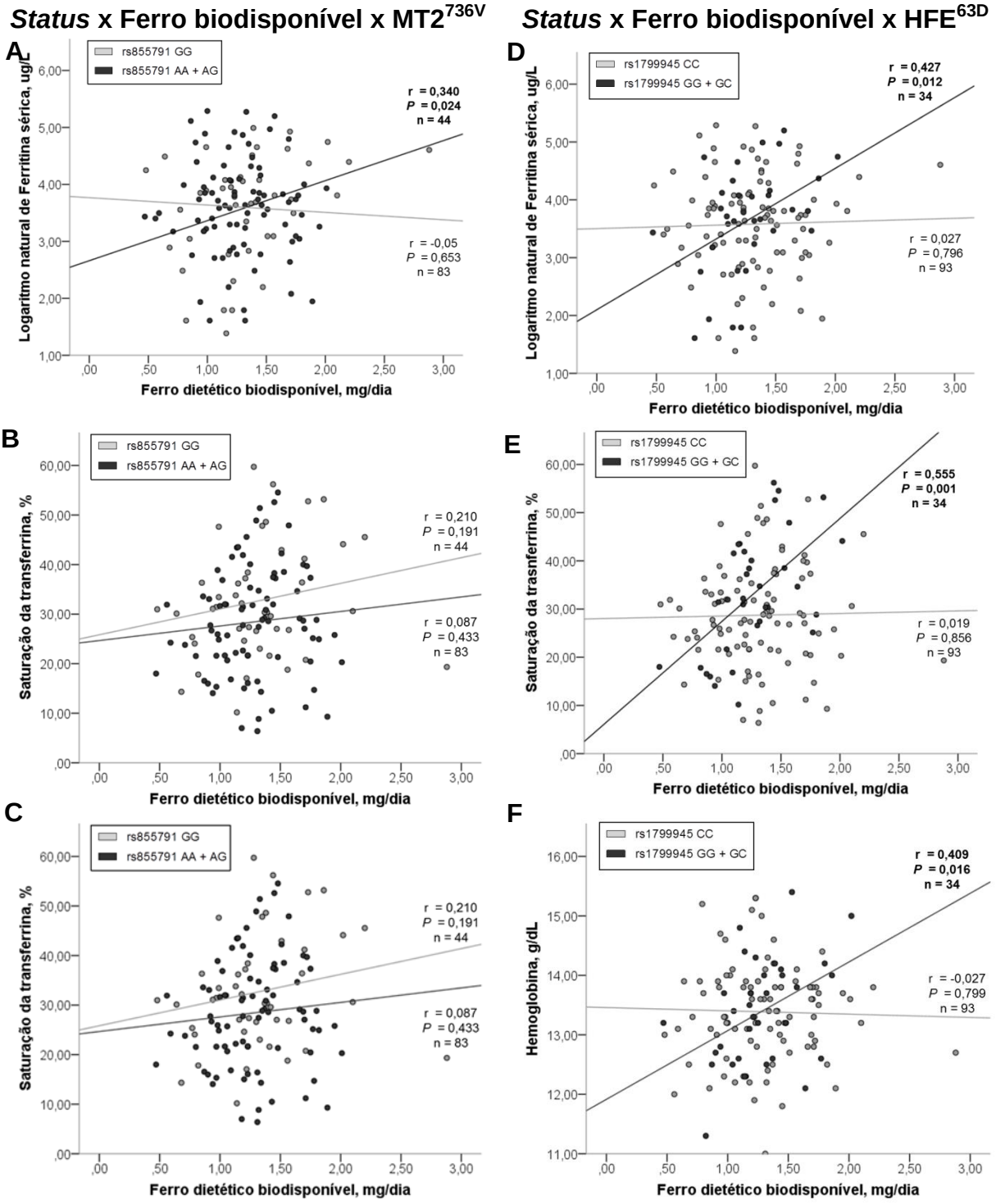


Figura 4. Correlação entre biomarcadores do *status* de ferro e o conteúdo dietético de ferro biodisponível[1], segundo genótipo *TMPRSS6* (A a C) e *HFE* (D a F) entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal.

Foi utilizado teste de correlação de Pearson.

[1]Estimativa de consumo diário (Hallberg & Hulthen, 2000) ajustada pela energia total da dieta.

Assim, uma associação significante entre a dieta e as concentrações de ferritina sérica foi observada no grupo de carreadoras do alelo HFE^{63D} (r = 0,427; *P* = 0,012), mas não entre aquelas com genótipo *HFE* ancestral (HFE^{63H}/HFE^{63H}) (r = 0,027; *P* = 0,796) (Figura 4 – D). O mesmo aconteceu com os valores de saturação da transferrina (r = 0,555, *P* = 0,001 *vs.* r = 0,019, *P* = 0,856 – Figura 4 – E) e de hemoglobina (r = 0,409, *P* = 0,016 *vs.* r = -0,027, *P* = 0,799 – Figura 4 – F). Curiosamente, foram observadas diferenças semelhantes na associação entre dieta e as concentrações de ferritina entre mulheres com genótipo *TMPRSS6* ancestral (r = 0,340 *P* = 0,024) e carreadoras da variante $MT2^{736V}$ (r = -0,05, *P* = 0,653) (Figura 4 - A). Esses resultados sugerem que ambos os alelos HFE^{63D} e $MT2^{736V}$ modificam, em direções opostas, a relação entre o consumo e *status* corporal do mineral.

Em investigações adicionais, buscou-se explorar os efeitos combinados dos genótipos *TMPRSS6* e *HFE*. Devido ao insuficiente poder estatístico para testes de interação SNP-SNP ou SNP-SNP-dieta, foram comparadas as distribuições dos biomarcadores entre mulheres com diferentes categorias genotípicas, definidas segundo a presença ou ausência dos alelos $MT2^{736V}$ e HFE^{63D} (**Tabela 8**). Nesta análise, assim como previamente observado (Tabela 7), nenhum genótipo particular foi associado com valores de ferritina ou hemoglobina e, por sua vez, menores médias de saturação da transferrina acompanharam a presença do alelo $MT2^{736V}$. Entretanto, as diferenças nos valores desse biomarcador, em relação às homozigotas para ambos os alelos ancestrais ($MT2^{736V}$-/HFE^{63D}-), tiveram contraste aparentemente maior na ausência do HFE^{63D} ($MT2^{736V}$+/ HFE^{63D}-; β = -6,8%, *P* = 0,004) do que quando este esteve co-herdado ($MT2^{736V}$+/HFE^{63D}+; β = -1,8%, *P* = 0,529). A significância desta possível interação SNP-SNP não pode ser testada neste modelo, como já comentado.

Ainda, em virtude do pequeno tamanho amostral, o possível papel modificador da disponibilidade dietética de ferro sobre os efeitos genotípicos combinados do *TMPRSS6* e do *HFE* foi testado com um menor nível de discriminação das dietas, para tanto, classificadas segundo a mediana das estimativas no grupo. Adotando essa estratégia, notou-se que o efeito interativo anteriormente observado entre a dieta e o alelo HFE^{63D} sobre as concentrações de ferritina sérica foi evidente, sobretudo, entre as mulheres com o genótipo ancestral do *TMPRSS6* ($MT2^{736V}$-) (**Figura 5**). Essas, quando comparadas às homozigotas para ambos os alelos ancestrais ($MT2^{736V}$-/HFE^{63D}-), tiveram maior ou menor valor

médio do biomarcador na presença do alelo HFE^{63D} ($MT2^{736V}$-/HFE^{63D}+ - médias geométricas de 74,96 µg/L e 12,03 µg/, respectivamente), a depender do nível estimado de exposição ao ferro biodisponível (Figura 5 - A). Embora a evidência de uma interação semelhante não tenha sido clara com os valores de saturação da transferrina ou hemoglobina (Figura 5 – B e C), vale ressaltar que no baixo nível de biodisponibilidade estimada de ferro, as mulheres com o genótipo $MT2^{736V}$-/HFE^{63D}+ tiveram média de ferritina sérica menor que 15 µg/L, sinalizando risco de depleção das reservas de ferro especialmente alto nestas condições.

Não ocorreram alterações na significância dos efeitos genotípicos isolados ou das interações gene-dieta sobre os biomarcadores testados quando foram consideradas análises sem a inclusão de homozigotas para alelo HFE^{63D}, carreadoras do alelo HFE^{282Y} ou daquelas com indícios bioquímicos de inflamação (PCR > 5 mg/L e/ou AGP > 100 mg/dL).

Tabela 8. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* combinados com ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Ferritina (µg/L)*					
Genótipos	n (%)	Média geométrica (IC 95%)	β (EP)[1,]*	*P*	% variação explicada[2]
TMPRSS6 rs855791 / *HFE* rs1799945					
MT2^{736V}- / HFE^{63D}-	32 (25,2)	39,1 (29,0; 52,8)	Ref.	-	< 1,0
MT2^{736V}+ / HFE^{63D}-	61 (48,0)	34,3 (27,4; 42,8)	-22,3 (17,7)	0,211	
MT2^{736V}+ / HFE^{63D}+	22 (17,3)	44,2 (31,7; 61,8)	4,1 (22,3)	0,853	
MT2^{736V}- / HFE^{63D}+	12 (9,4)	30,0 (14,2; 63,4)	-26,3 (27,6)	0,344	
Saturação da transferrina (%)					
Genótipos	n (%)	Média aritmética (DP)	β (EP)[1]	*P*	% variação explicada[2]
TMPRSS6 rs855791 / *HFE* rs1799945					
MT2^{736V}- / HFE^{63D}-	32 (25,2)	32,2 (11,2)	Ref.	-	**5,5**
MT2^{736V}+ / HFE^{63D}-	61 (48,0)	26,9 (10,1)	**- 6,8 (2,3)**	**0,004**	
MT2^{736V}+ / HFE^{63D}+	22 (17,3)	32,8 (12,3)	- 1,8 (2,9)	0,529	
MT2^{736V}- / HFE^{63D}+	12 (9,4)	34,0 (13,2)	-0,1 (3,6)	0,979	
Hemoglobina(g/dL)*					
Genótipos	n (%)	Média aritmética (DP)	β (EP)[1]	*P*	% variação explicada[2]
TMPRSS6 rs855791 / *HFE* rs1799945					
MT2^{736V}- / HFE^{63D}-	31 (24,6)	13,4 (0,7)	Ref.	-	< 1,0
MT2^{736V}+ / HFE^{63D}-	61 (48,4)	13,3 (0,8)	-0,2 (0,2)	0,430	
MT2^{736V}+ / HFE^{63D}+	22 (17,5)	13,3 (0,9)	-0,2 (0,2)	0,228	
MT2^{736V}- / HFE^{63D}+	12 (9,5)	13,5 (1,0)	-0,0 (0,3)	0,940	

n = 127.

* Valores de ferritina corrigidos pela inflamação foram transformados em seu logaritmo natural antes das análises. Os coeficientes de inclinação [β (Erro Padrão)] para cada genótipo indicam o efeito estimado nas concentrações de ferritina, expresso em percentual (%), relativo ao genótipo referência.

** n = 126. Modelos não incluem dados de um *outlier* influente.

[1] Coeficientes de inclinação [β (Erro Padrão)] indicam os efeitos estimados para os genótipos *TMPRSS6* e *HFE* indicados, em

relação ao genótipo duplo homozigoto para os alelos de maior frequência ($MT2^{736A}$ e HFE^{63H}) (referência), segundo modelo de regressão linear ajustado por idade, IMC e demais variáveis apresentadas na Tabela 6.

[2] A porcentagem da variação explicada pelos genótipos foi calculada como a mudança no coeficiente de determinação (R^2 ajustado) após sua inclusão nos modelos de regressão linear iniciais, apresentados na Tabela 6.

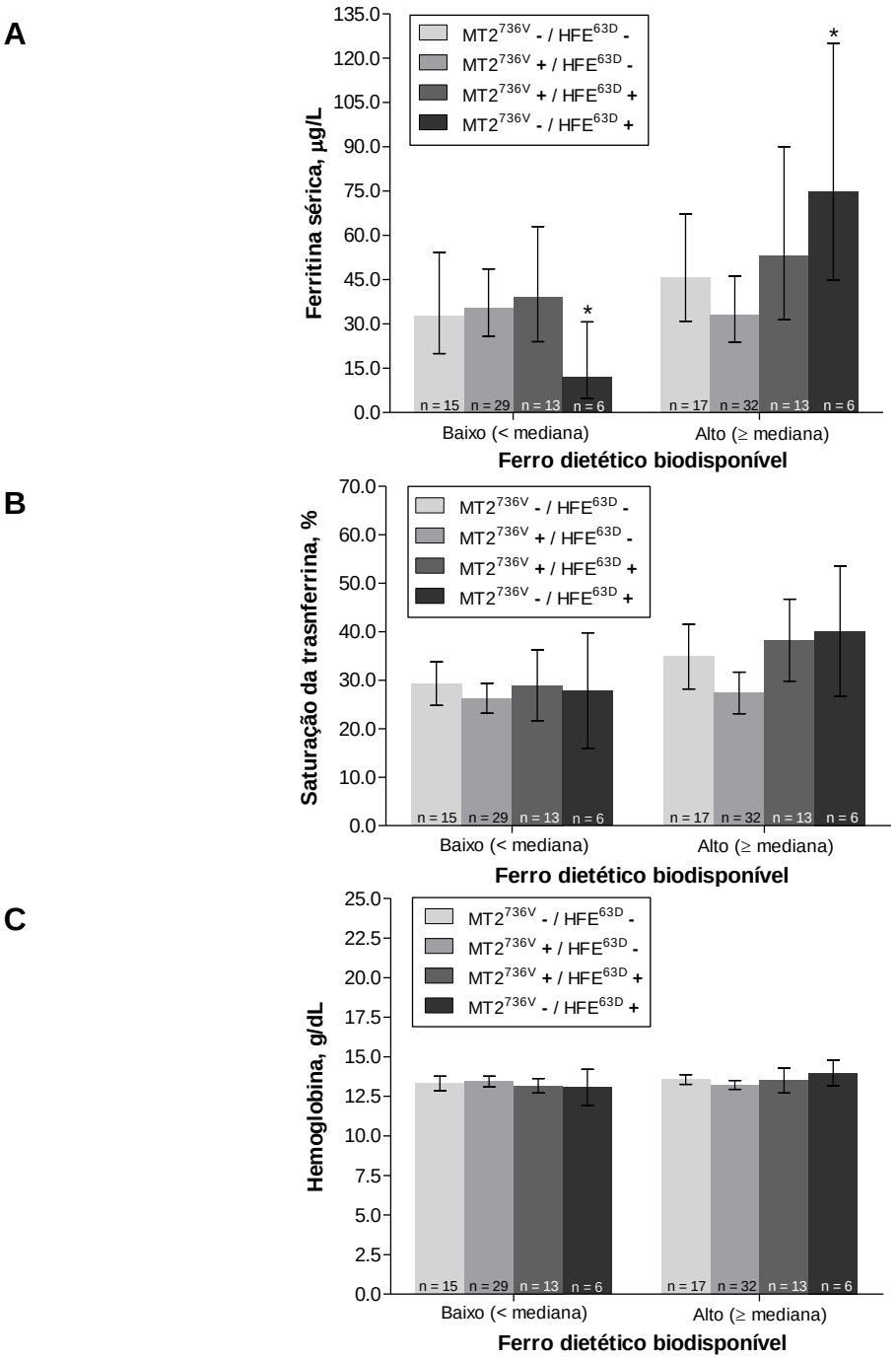


Figura 5. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* combinados com ferritina (A), saturação da transferrina (B) e hemoglobina (C), segundo conteúdo dietético de ferro biodisponível[1], entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal.

Dados apresentados são média geométrica (IC de 95%) ou média aritmética (DP).

[1]Estimativa de consumo diário (Hallberg & Hulthen, 2000) ajustada pela energia total da dieta e classificada segundo distribuição na amostra: baixo (< mediana), < 1,3 mg/dia; alto (≥ mediana), ≥ 1,3 mg/dia.

* Indica diferença estatisticamente significantemente (P < 0,05) em relação ao genótipo duplo homozigoto para os alelos de maior frequência no mesmo nível estimado de ferro dietético biodisponível.

6.2.2 Discussão

Mulheres adultas na idade reprodutiva podem apresentar necessidades dietéticas de ferro duas vezes maiores do que homens ou mulheres na pós-menopausa, sobretudo devido às constantes perdas fisiológicas do mineral com os episódios menstruais (FNB, IOM, 2001). Ainda assim, entre elas, mais de 80% da variação em marcadores do balanço corporal de ferro pode ser atribuída a fatores genéticos e ambientais não relacionados com menstruação ou gestação (WHITFIELD et al., 2003). Sugere-se, assim, que a inadequação do consumo e a variação geneticamente determinada na resposta ao ferro alimentar são determinantes mais importantes da deficiência do mineral que os fatores fisiológicos exclusivos da mulher.

Há no mínimo 20 anos, as variantes HFE^{282Y} e HFE^{63D} são reconhecidas como os mais importantes fatores determinantes da sobrecarga primária de ferro entre europeus (FEDER et al., 1996). No entanto, muito pouco ainda se sabe sobre os determinantes genéticos da deficiência do mineral. Entre mulheres adultas com ascendência europeia, as variantes *HFE,* isoladamente, explicam menos de 10% da herdabilidade total estimada para os valores de saturação da transferrina e de ferritina (~47% para os dois biomarcadores) (WHITFIELD et al., 2000). Estudos que investigaram a modificação no efeito dessas variantes por fatores ambientais foram limitados a grupos populacionais com baixo risco a deficiência de ferro e caracterizaram o consumo de carnes ou de ferro heme como indicadores indiretos da sua biodisponibilidade total (ARANDA et al., 2010; MILWARD et al., 2008; VAN DER A et al., 2006; CADE et al., 2005; GREENWOOD et al., 2005).

A hipótese levantada em nosso estudo foi de que a associação do consumo dietético e o *status* corporal de ferro em mulheres na idade reprodutiva é modificada tanto por variantes funcionais do gene *HFE*, como por variantes do gene *TMPRSS6,* recentemente identificado como importante sensor e regulador do metabolismo deste nutriente (DU et al., 2008). Nós apresentamos evidências de que alelos $MT2^{736V}$ e HFE^{63D} modificam a associação entre a disponibilidade dietética de ferro e as variações do seu *status* corporal. Sugere-se, assim, que essas variantes genéticas sejam potenciais determinantes das diferenças interindividuais na absorção e/ou compartimentalização corporal de ferro entre mulheres adultas da nossa população.

Em ensaios *in vitro*, as mutações HFE^{282Y} e HFE^{63D} promoveram prejuízo no estímulo à produção hepática de hepcidina mediado pela via da BMP-SMAD (WU et al., 2014). A alteração funcional da variante $MT2^{736V}$, por sua vez, relaciona-se com falha na inibição dessa mesma via celular, o que levaria a um aumento desproporcional na produção do hormônio em resposta a suas reservas no organismo (NAI et al., 2011). Essa última alteração, por mecanismos ainda não esclarecidos (GALESLOOT et al., 2013; TRAGLIA et al., 2011; NAI et al., 2011), supostamente promoveria bloqueio na absorção do ferro dietético, reduziria a disponibilidade do mineral na circulação e aumentaria o risco de sua depleção corporal.

Achados prévios de associação do alelo $MT2^{736V}$ com menores valores de saturação da transferrina foram replicados no grupo de mulheres aqui estudadas (CHENG et al., 2014; BENYAMIN et al., 2009). Essa associação foi independente do consumo estimado de ferro, que não foi considerado por outros estudos nos ajustes dos seus modelos (GICHOHI-WAINAINA et al., 2015). O efeito deste alelo sobre o biomarcador (diferença de 20% entre o genótipo homozigoto ancestral e carreador) explicou 4,5% da variabilidade observada nos seus valores, o que se assemelha à estimativa obtida por Benyamin e colaboradores (2014) entre australianas com ascendência europeia (r^2 = 0,04) (BENYAMIN et al., 2009). Considerando a conhecida heterogeneidade genética de brasileiros (LIMA-COSTA et al., 2015), esse achado corrobora os resultados de recente meta-análise que descreve consistência na direção e na magnitude dos efeitos estimados deste alelo sobre o *status* de ferro em populações com diferentes etnias (GICHOHI-WAINAINA et al., 2015).

Na mesma direção do observado com os valores saturação da transferrina, o alelo $MT2^{736V}$ teve efeito não significante de redução nas concentrações de hemoglobina e ferritina (Tabela 7). Contudo, não houve evidência de sua associação com a deficiência de ferro. Esses resultados vão de encontro ao descrito por estudos com mulheres chinesas, entre as quais o alelo $MT2^{736V}$ é apontado como fator de risco independente para a anemia (PEI et al., 2014; AN et al., 2014). Em parte, essas divergências poderiam ser explicadas pelos achados de Pei e colaboradores (2014), que indicam uma ligação evidente deste genótipo *TMPRSS6* com a anemia ferropriva em mulheres com menorragia (perdas menstruais anormalmente altas), mas não entre aquelas com episódios menstruais aparentemente normais (PEI et

al., 2014). No presente estudo, não encontramos evidência de efeito interativo entre o nível estimado de fluxo menstrual e o alelo $MT2^{736V}$ sobre o *status* de ferro das mulheres selecionadas, que foram aparentemente saudáveis e tiveram relato de menstruação regular.

Não foram também significantes as diferenças nas médias dos biomarcadores entre grupos classificados segundo o genótipo *TMPRSS6* e tercis de biodisponibilidade dietética de ferro (Figura 4), o que sugere que não haja forte modificação do efeito deste genótipo pela dieta. Ao estudar um grupo de australianas com sobrepeso e submetidas a um plano de emagrecimento por 12 meses com dietas ricas ou pobres em ferro, Cheng e colaboradores concluíram que o tipo de dieta foi fator preponderante para a variação nos valores de ferritina sérica, independentemente do genótipo $MT2^{736V}$ (CHENG et al., 2012). Nossos resultados reiteram a importância relativamente maior da adequação dietética em relação aos efeitos isolados deste alelo na determinação do *status* de ferro. Ainda assim, em análises de correlação, foi observado que, somente entre as mulheres com genótipo *TMPRSS6* ancestral ($MT2^{736A}$/$MT2^{736A}$), houve associação significante entre as estimativas de consumo de ferro biodisponível e as concentrações séricas de ferritina (Figura 5). Deste modo, não descartamos a possibilidade de o alelo $MT2^{736V}$ influenciar o balanço de ferro, principalmente entre mulheres com alta necessidade corporal, pelo menos em parte por mecanismos relacionados com a sua absorção da dieta.

Devido à indisponibilidade das determinações de receptor solúvel de transferrina, não calculamos o índice de ferro corporal total (COOK, FLOWERS & SKIKNE, 2003), um biomarcador sensível que poderia sinalizar efeitos genotípicos pequenos, não capturados pela ferritina ou saturação da transferrina. Ainda assim, nossas observações não indicam um significado clinicamente importante para os efeitos isolados do alelo $MT2^{736V}$ sobre a eritropoese ou a deficiência de ferro das mulheres estudadas. Ainda assim, por se associar independentemente da dieta com reduzida disponibilidade circulante do mineral, acreditamos que o genótipo *TMPRSS6* possa estar relacionado com comprometido *turnover* de ferro entre mulheres com aumentada atividade eritropoética como, por exemplo, as doadoras regulares de sangue e as portadoras de anemias hemolíticas congênitas (POGGIALI et al., 2015; ATHIYARATH et al., 2015a; Artigo 3 desta tese).

A partir dos registros alimentares, foi estimada uma probabilidade de inadequação da ingestão de ferro total (14,4%) bastante aproximada da prevalência de sua deficiência na amostra (12,6%). As estimativas de consumo de ferro biodisponível, mas não as de ferro total, foram significantemente correlacionadas com variações nos seus biomarcadores. A inconsistência na associação entre consumo e *status* de ferro é frequentemente descrita por estudos observacionais (FBN, IOM, 2001) e assim, foi contornada, pelo menos em parte, pela medida da sua biodisponibilidade. Diferenças de aproximadamente 16% nas médias não ajustadas de ferritina e saturação da transferrina foram observadas entre mulheres nos extremos tercis de consumo de ferro biodisponível (Tabela 6). Curiosamente, essas mesmas diferenças foram maiores que 40% entre mulheres com genótipo positivo ou negativo para o alelo HFE^{63D} (Figura 3). Esse achado, levantado após a constatação de que o mesmo alelo não foi preditor independente do *status* do mineral, sugere sua associação com especial sensibilidade às variações do consumo alimentar. Essa interação gene-dieta foi altamente significante e independente do padrão alimentar onívoro ou vegetariano.

De fato, mulheres no mais alto tercil de ferro dietético biodisponível e carreadoras do alelo HFE^{63D} tiveram média de ferritina sérica maior que 60 ug/L, sinalizando repleção total das reservas normais de ferro para a maioria delas, nestas condições (HALLBERG, HULTHEN & GRAMATKOVSK, 1997). Esses dados são consistentes com a recente identificação do HFE^{63D} como determinante genético de adequada resposta à suplementação diária com ferro na anemia da gestação (ATHIYARATH et al., 2015b). Segundo os dados deste estudo indiano, após 20 semanas de suplementação, foi identificada probabilidade 90% maior de recuperação da deficiência de ferro entre as carreadoras do alelo HFE^{63D} quando comparadas às homozigotas para o alelo ancestral (HFE^{63H}/HFE^{63H}) (ATHIYARATH et al., 2015b). Cabe comentar que essa interação *HFE*-dieta não foi identificada entre mulheres de meia idade caracterizadas quanto ao consumo habitual de ferro heme (VAN DER A et al., 2006; CADE et al., 2005; GRENWOOD et al., 2005).

Por outro lado, entre as mulheres classificadas no menor nível de biodisponibilidade dietética de ferro, valores relativamente menores de saturação da transferrina foram associados à presença do alelo HFE^{63D} (Figura 3). Esse quadro, que contrariaria a hipótese de uma melhor eficiência de absorção e mobilização do ferro associada às variantes *HFE*, não se manteve significante após ajuste adicional

do modelo pelo efeito do $MT2^{736V}$, sugerindo possível interação entre os dois genótipos. Não obstante, a presença do primeiro alelo pareceu atenuar a associação do último com os valores deste biomarcador (Tabela 8). O efeito dessa possível interação *HFE-TMPRSS6* foi previamente descrito como determinante da penetrância e da expressividade da sobrecarga de ferro entre pacientes com hemocromatose hereditária (VALLENTI et al., 2012). Alternativamente, os dados de interação HFE-dieta podem sugerir que este genótipo se associa com diferenciados perfis de distribuição compartimental do mineral, a depender do estado de adequação do seu balanço corporal.

Como suporte a essa hipótese, vale notar que, mulheres com estimativa de consumo de ferro biodisponível abaixo da mediana do grupo tiveram média geométrica de ferritina sérica próxima de 30 µg/L (Artigo 1 desta tese). Presumidamente, muitas dessas mulheres apresentariam uma capacidade absortiva de ferro que excederia suas perdas fisiológicas basais quando expostas a uma dieta com alta biodisponibilidade do mineral (HULTHÉN et al., 1995). Sabe-se que, num estado de déficit no balanço corporal de ferro, a indução na queda da produção de hepcidina visa não só à promoção do efluxo de ferro dos enterócitos, mas também daquele presente em hepatócitos e macrófagos, armazenado em moléculas de ferritina (CAMASCHELLA, 2013). Assim, no contexto de uma insuficiente oferta dietética do mineral, postulamos que a depleção das suas reservas celulares poderia ser ainda mais pronunciada entre as mulheres com concentrações geneticamente diminuídas desse hormônio. Essa suposição poderia explicar os inesperados valores diminuídos de ferritina sérica (média geométrica < 15 µg/L) encontrado entre as mulheres com baixa biodisponibilidade dietética de ferro e carreadoras de genótipos previamente associados com reduzida produção de hepcidina ($MT2^{736V}$-/HFE^{63D}+) (WU et al., 2014; NAI et al., 2011) (Figura 5).

Vale ressaltar que, embora a repleção das reservas de ferro não tenha funcionalidade clara em indivíduos com adequado balanço corporal do mineral (FBN, IOM, 2001), é incontestável sua importância para desfechos favoráveis da gestação quando não acompanhada por suficiente suplementação (FAO, 2001). Os resultados do nosso estudo precisam ser elucidados em amostras de maior tamanho e com representatividade da população. Além disso, para melhor interpretação dos dados, faz-se necessária a determinação das concentrações de hepcidina, contornando essa importante limitação do nosso trabalho.

Outra questão a ser esclarecida é a possibilidade de vieses introduzidos pela estrutura genética, que é uma importante causa de associações genéticas espúrias em estudos com populações multiétnicas ou miscigenadas. Esse fenômeno ocorre quando ambas as frequências do desfecho e dos alelos em análise apresentam disparidades entre subgrupos com diferentes origens ancestrais (BARNHOLTZ-SLOAN et al., 2008). Neste tocante, está incluída a possibilidade de casos de α ou β-talassemia estarem presentes na amostra, mesmo após a exclusão de mulheres com alterações hematimétricas. Essas duas condições, relativamente frequentes em nosso meio, são associadas com alterado *status* de ferro (GUIMARÃES et al., 2015; ZIMMERMAN et al., 2008) e estão diferencialmente distribuídas entre subgrupos étnicos da nossa população (OLIVEIRA et al., 2006; BONINI-DOMINGOS, 2004; VIANA-BARACIOLI et al., 2001; RAMALHO et al., 1999).

Nossas análises de associação entre genótipos e fenótipos não foram ajustadas pela estrutura genética, cuja quantificação poderia ser realizada a partir de marcadores informativos de ancestralidade (KOSOY et al., 2009). Entretanto, diante da consistência de nossos achados em relação ao descrito em outras populações, é improvável que vieses desse tipo tenham afetado significantemente a interpretação dos dados. Além disso, todos os modelos de associação foram ajustados pela cor de pele autodeclarada que, apesar de ser uma medida imprecisa e inespecífica da estrutura genética (KAUFMAN, COOPER & MCGEE, 1997), pode capturar parte dos componentes de ancestralidade da nossa população (LIMA-COSTA et al., 2015).

Neste sentido, foi observado que ambas as variantes $MT2^{736V}$ e o HFE^{63D} tiveram frequências diferentemente distribuídas entre as categorias autodeclaradas de cor de pele (Tabela suplementar 2). Essas variações, por sua vez, acompanharam os conhecidos contrastes nas frequências dos dois polimorfismos entre populações europeias, asiáticas e africanas (GICHOHI-WAINAINA et al., 2015; ACTON et al., 2006). Constatamos ainda que mulheres que se autodeclaram como negras ou pardas tiveram média ajustada de ferritina sérica 45% menor que aquelas que se autodeclaram como brancas (Tabela 6). Essa observação corrobora estudos norte americanos que sinalizam indicativos bioquímicos de deficiência do mineral mais pronunciados entre negras, quando comparadas às caucasianas, independentemente de diferenças na dieta ou na exposição a outros fatores de risco ambientais (PFEIFFER et al., 2013; PERRY et al., 1992). Em estudo do nosso grupo, identificamos que a autoclassificação da cor de pele como negra foi preditor

independente de menores concentrações de hemoglobina entre gestantes atendidas por unidades básicas de saúde no município de São Paulo-SP (MACHADO et al., 2016). Na Nova Zelândia, mulheres com etnia asiática foram identificadas com maior probabilidade de apresentar inadequação do *status* de ferro quando comparadas a descendentes de europeus (BECK et al., 2014).

Os dados acima descritos reiteram evidências epidemiológicas de pronunciado contraste intercontinental na prevalência de anemia (PASRICHA et al., 2013) e justificam a associação entre componentes de ancestralidade genética com variações no *status* de ferro em populações com pronunciada miscigenação (LI et al., 2014). Sinaliza-se assim a importância de controlar o efeito da estrutura populacional em estudos de associação genética com biomarcadores deste mineral. Nesse cenário, os resultados deste estudo são úteis como indício inicial de que, em nossa população, a implementação de algoritmos nutrigenéticos que visem a identificação de subgrupos em risco aos desequilíbrios na homeostase de ferro e a personalização de recomendações dietéticas de ferro precisam levar em consideraração o possível papel da miscigenação genética na variabilidade da resposta ao seu consumo alimentar. Além disso, é incontestável que a utilidade prática desses algoritmos dependerá da inclusão de muitos outros fatores genéticos, além dos genótipos avaliados neste estudo, uma vez que seus efeitos isolados e interativos com a dieta explicaram apenas pequena fração da variabilidade total nos biomarcadores do mineral.

Ainda assim, os dois genótipos aqui considerados juntamente com o efeito da interação HFE-dieta foram capazes de melhorar significantemente a predição dos valores de saturação da transferrina. Em meta-análise de GWAS, que incluiu quase 49 mil indivíduos com ascendência europeia, observou-se que, de fato, os alelos HFE^{63D} e $MT2^{736V}$ associam-se muito mais fortemente com valores deste biomarcador do que com a ferritina ou a hemoglobina (BENYAMIN et al., 2014). Diante da possível interação dessas variantes com o grau de exposição dietética ao ferro, nossos resultados indicam que os estudos de associação entre genótipos e o *status* de ferro deveriam considerar as variações na adequação do consumo e da biodisponibilidade do mineral como um importante fator de confusão.

Em resumo, neste estudo, identificamos que o alelo $MT2^{736V}$ do gene *TMPRSS6* foi associado com valores relativamente reduzidos de saturação da transferrina, mas não de ferritina ou de hemoglobina, entre mulheres aparentemente

saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. Nenhum desses biomarcadores foi influenciado pela presença isolada do alelo HFE^{63D}. Entretanto, carreadoras desta variante, quando comparadas às homozigotas para o alelo HFE^{63H} ancestral, tiveram variações nas reservas e no transporte sistêmico de ferro mais fortemente associadas ao seu consumo alimentar. Nossos achados, se confirmados, tem notáveis implicações para a futura elaboração de ações de saúde pública e recomendações dietéticas individualizadas, bem como de terapias nutricionais voltadas à prevenção e ao tratamento de morbidades associadas aos desequilíbrios na homeostase deste mineral.

6.3 ESTUDO 2 – ARTIGO 3: **Efeito diferencial do genótipo *TMPRSS6* sobre *status* de ferro e a eritropoese de mulheres com β-talassemia menor: um estudo piloto**

O objetivo deste trabalho foi avaliar importância relativa de genótipos *TMPRSS6* em predizer variações nos biomarcadores do seu *status* corporal entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e mulheres com diagnóstico de β-talassemia menor. Testou-se a hipótese de que o impacto de variantes deste gene sobre os biomarcadores do mineral é mais pronunciado na β-talassemia menor.

6.3.1 Resultados

Trinta e cinco mulheres com β-talassemia menor foram inicialmente recrutadas para o estudo (PANIZ, 2015). Devido ao histórico de gestação e de transfusão sanguínea recentes e do diagnóstico de sobrecarga de ferro com tratamento quelante, duas mulheres foram excluídas da amostra final. Nas **Tabelas 9 e 10** são apresentadas as características gerais de casos na idade reprodutiva (n = 15) e na pós-menopausa (n = 18) e das suas respectivas controles. Médias (mínimo e máximo) de idade foram de 35 e 58 anos e de índice de massa corporal de 24 e 27 kg/m^2, respectivamente. Características sóciodemográficas e de estilo de vida não diferiram entre os grupos, contudo, houve tendência em mulheres com β-talassemia menor declaram-se mais frequentemente como brancas.

Concentrações de hemoglobina 2,1 a 2,5 g/dL mais baixas e contagens absolutas de reticulócitos 60% a 70% maiores foram associadas à β-talassemia menor (P < 0,01), consistente com o quadro esperado de atividade eritropoética aumentada. A anemia (hemoglobina < 12 g/dL) esteve presente em todos os casos na idade reprodutiva e em 67% dos casos na pós-menopausa. Contudo, o índice de produção de reticulócitos (IPR), um marcador de compensação eritropoética, não diferiu entre os casos e controles, sugerindo a presença de eritropoese ineficaz entre as primeiras.

Tabela 9. Caracterização geral de mulheres na idade reprodutiva com β-talassemia menor e suas controles. São Paulo, 2016.

	Casos (n = 15)[1]	Controles (n = 30)[1]	Diferença ou razão de médias (IC 95%)[2,3,4]	Razão de probabilidades (IC 95%)[5]
Caracterização sóciodemográfica e de estilo de vida				
Idade (anos)	34,9	34,2	-0,1 (-3,5; 1,7)[3]	-
Índice de massa corporal (kg/m2)	24,1	24,9	0,1 (-0.7; 1.0)[3]	-
Escolaridade (anos de estudo)	14,5	15,8	-1,2 (-3,2; 0,8)[3]	-
Cor de pele parda ou negra, n (%)	1 (6,7)	7 (23,3)	-	0,2 (0,0; 2,0)
Tabagismo, n (%)	1 (6,7)	2 (6,7)	-	1,0 (0,1; 12,0)
Consumo de álcool, n (%)	9 (60,0)	21 (70,0)	-	0,7 (0,1; 3,2)
Caracterização obstétrico-ginecológica				
Duração da menstruação (dias)	4,7	4,5	0,0 (-0,2; 0,3)[3]	-
Caracterização hematológica e bioquímica				
Contagem de reticulócitos ($x10^9$/L)	69,1	41,0	**1,6 (1,3; 2,0)[4,##]**	
Índice de produção de reticulócitos (%)	0,7	0,7	0,0 (-0,2; 0,3)[3]	-
Hemoglobina (g/dL)	10,9	13,3	**-2,5 (-3,0; -1,9)[3,##]**	-
Saturação da transferrina (%)	33,0	27,9	1,1 (0,9; 1,4)[4]	-
Ferritina (µg/L)	127,3	70,2	1,5 (0,9; 2,5)[4]	-
< 15 µg/L, n (%)	2 (13,3)	3 (10,0)	-	1,3 (0,2; 10,1)
> 150 µg/L, n (%)	3 (20,0)	4 (13,3)	-	1,7 (0,3; 10,1)
Proteína C reativa ultrassensível (mg/L)	3,7	5,0	0,9 (0,5; 1,6)[4]	-
Caracterização dietética				
Energia total (kcal/dia)	2067,7	1966,4	1,1 (0,9; 1,2)[4]	-
Ferro total (mg/dia)	10,7	9,9	1,1 (0,9; 1,4)[4]	-
Ferro não-heme (mgl/dia)	10,0	9,2	1,1 (0,9; 1,4)[4]	-
Ferro de fortificação (mg/dia)	3,7	3,3	1,2 (0,9; 1,3)[4]	-
Ferro heme (mg/dia)	0,7	0,7	1,1 (0,9; 1,3)[4]	-
Ferro biodisponível (mg/dia)*	1,3	1,3	0,9 (0,8; 1,1)[4]	-
Caracterização genética				
TMPRSS6 rs855791				

Genótipos AA + AG, n (%)	9 (60,0)	18 (60,0)	-	1,0 (0,3; 3,5)
TMPRSS6 rs4820268				
Genótipos GG + GA, n (%)	9 (60,0)	21 (70,0)	-	0,6 (0,2; 2,4)
HFE rs1799945				
Genótipos GG + GC, n (%)	4 (26,7)	9 (30,0)	-	0,8 (0,2; 3,4)

[1] Dados são médias aritmética ou geométrica (variáveis contínuas) ou contagem absoluta e porcentagem (variáveis categóricas).
[2] Estimativas obtidas de modelos de regressão linear misto com efeito aleatório atribuído a uma variável indicadora do pareamento de casos e controles pela idade, IMC e uso de anticoncepcionais.
[3] Diferença apresentada é entre médias aritméticas (variável não transformada). Intervalo de confiança de 95% que inclui o 0 não é estatisticamente significante ($P > 0,05$).
[4] Diferença apresentada é razão de médias geométricas (variável transformada em logaritmo natural). Intervalo de confiança de 95% que inclui o 1 não é estatisticamente significante ($P > 0,05$).
[5] Estimativas de razões de probabilidades para casos em relação aos controles obtidas de modelos de regressão logística condicional com efeito aleatório atribuído à uma variável indicadora do pareamento de casos e controles. Intervalo de confiança de 95% que contém o 1 não é estatisticamente significante ($P > 0,05$).
* Estimado com algoritmo de Hallberg & Hulthén (2000).
[#, ##] Indica significância estatística, segundo modelos de regressão linear misto ou logístico condicional. [#]$P < 0,05$; [##]$P < 0,01$.

Tabela 10. Caracterização geral de mulheres na pós-menopausa com β-talassemia menor e suas controles. São Paulo, 2016.

	Casos (n = 18)[1]	Controles (n = 36)[1]	Diferença ou razão de médias (IC 95%)[2,3,4]	Razão de probabilidades (IC 95%)[5]
Caracterização sóciodemográfica e de estilo de vida				
Idade (anos)	58,4	60,1	-1,0 (-4,0; 2,1)[3]	-
Índice de massa corporal (kg/m2)	27,3	26,7	0,6 (-0,4; 1,6)[3]	-
Escolaridade (anos de estudo)	9,3	10,6	-0,1 (-0,3; 0,1)[3]	-
Cor de pele parda ou negra, n (%)	2 (11,1)	11 (30,6)	-	0,3 (0,1; 1,5)
Tabagismo, n (%)	1 (5,6)	6 (16,7)	-	0,3 (0,1; 2,7)
Consumo de álcool, n (%)	8 (44,4)	14 (38,8)	-	1,3 (0,4; 4)
Caracterização obstétrico-ginecológica				
Tempo de menopausa (anos)	13,4	12,1	1,1 (0,6; 1,5)[4]	-
Caracterização hematológica e bioquímica				
Contagem de reticulócitos ($x10^9$/L)	72,7	46,5	**1,7 (1,2; 2,2)[4,##]**	
Índice de produção de reticulócitos (%)	0,7	0,6	0,1 (-0,1; 0,3)[3]	-
Hemoglobina (g/dL)	11,4	13,4	**-2,1 (-2,9; -1,4)[3,##]**	-
Saturação da transferrina (%)	34,8	28,2	**1,2 (1,0; 1,4)[4,#]**	-
Ferritina (µg/L)	274,6	141,1	**2,0 (1,3; 3,1)[4,##]**	-
> 150 µg/L, n (%)	12 (66,7)	13 (36,1)	**-**	**3,5 (1,1; 11,7)[#]**
Proteína C reativa ultrassensível (mg/L)	2,7	3,2	0,5 (-0,6; 0,7)[3]	-
Caracterização dietética				
Energia total (kcal/dia)	1792,4	1683,1	1,1 (0,9; 1,2)[4]	-
Ferro total (mg/dia)	8,6	7,9	1,1 (0,9; 1,2)[4]	-
Ferro não heme (mg/dia)	8,1	7,3	1,1 (0,9; 1,2)[4]	-
Ferro de fortificação (mg/dia)	2,7	2,4	1,1 (0,9; 1,2)[4]	-
Ferro heme (mg/dia)	0,6	0,5	1,2 (0,7; 2,0)[4]	-
Ferro biodisponível (mg/dia)*	1,2	1,2	1,0 (0,8; 1,1)[4]	-
Caracterização genética				
TMPRSS6 rs855791				
Genótipos AA + AG, n (%)	13 (72,2)	21 (58,3)	-	1,7 (0,5; 6,0)

TMPRSS6 rs4820268				
Genótipos GG + GA, n (%)	13 (72,2)	23 (63,8)	-	1,4 (0,4; 4,7)
HFE rs1799945				
Genótipos GG + GC	10 (55,6)	11 (30,6)	-	2,8 (0,9; 9,1)
HFE rs1799945 / rs1800562				
Genótipo GG + GC / AG, n (%)	10 (55,6)	11 (30,6)	-	2,8 (0,9; 9,1)

[1] Dados são médias aritmética ou geométrica (variáveis contínuas) ou contagem absoluta e porcentagem (variáveis categóricas).
[2] Estimativas obtidas de modelos de regressão linear misto, com efeito aleatório atribuído a uma variável indicadora do pareamento de casos e controles pela idade e IMC.
[3] Diferença apresentada é entre médias aritméticas (variável não transformada). Intervalo de confiança de 95% que inclui o 0 não é estatisticamente significante ($P > 0,05$).
[4] Diferença apresentada é razão de médias geométricas (variável transformada em logaritmo natural). Intervalo de confiança de 95% que inclui o 1 não é estatisticamente significante ($P > 0,05$).
[5] Estimativas de razões de probabilidades para casos em relação aos controles obtidas de modelos de regressão logística condicional com efeito aleatório atribuído à uma variável indicadora do pareamento de casos e controles. Intervalo de confiança de 95% que contém o 1 não é estatisticamente significante ($P > 0,05$).
* Estimado com algoritmo de Hallberg & Hulthén (2000).
[#, ##] Indica significância estatística, segundo modelos de regressão linear ou logístico. [#]$P < 0,05$; [##]$P < 0,01$.

Metade das mulheres na idade reprodutiva fazia uso de anticoncepcionais hormonais. As médias de duração da menstruação e do tempo de menopausa não diferiram entre casos e controles. O mesmo foi observado com as médias de consumo de ferro total e biodisponível (Tabelas 9 e 10). Probabilidades de inadequação no consumo do mineral foram estimadas em 20,7% para mulheres na idade reprodutiva e em menos de 5% para aquelas na pós-menopausa. Embora numericamente distantes, as médias geométricas de ferritina sérica de casos e controles na idade reprodutiva não foram estatisticamente diferentes (127,3 µg/L *vs.* 70,2 µg/L), e os dois grupos não diferiram quanto às estimativas de deficiência de ferro (ferritina < 15 µg/L) (13,3% *vs.* 10,0%) (Tabela 9).

Por outro lado, na pós-menopausa, a β-talassemia menor foi associada com valores duas vezes maiores de ferritina sérica (274,6 µg/L *vs.* 141,1 µg/L $P < 0,01$), 20% maiores de saturação da transferrina (34,8% *vs.* 28,2%, $P < 0,05$) e com probabilidade 3,5 vezes maior de hiperferritinemia (66,7% *vs.* 36,1%, $P < 0,05$) (Tabela 10). Mudanças substanciais nos resultados acima apresentados não foram observadas após exclusão de mulheres com indício de inflamação (PCR > 5 mg/L; 21,2% de casos e 16,7% de controles) ou com histórico de transfusão de sangue (20% de casos e 12% de controles; n ≤ 3 unidades de transfusão). A sobrecarga de ferro clinicamente importante (ferritina > 150 µg/L e saturação da transferrina > 50%) foi encontrada em dois casos de β-talassemia menor (um na idade reprodutiva), além daquele incialmente excluído da amostra.

Pela caracterização molecular do gene *HBB* (β-globina), 22 mulheres foram classificadas como carreadoras de mutações do tipo β^0 (66,7%), 7 do tipo β+ (21,2%) e 4 de mutações não identificadas com a técnica utilizada (12,1%). As mutações CD39 (C>T) (90,0% dos casos β^0) e IVS-1-110 (G>A) (71,4% dos casos β+) foram as mais frequentes. Não houve evidência de associação entre os biomarcadores do *status* de ferro e os tipos de mutações β^0 ou β+ ($P \geq 140$).

Os genótipos *TMPRSS6* e *HFE* estudados estiveram distribuídos conforme Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) ($P \geq 0,200$). Casos e controles não diferiram quanto à frequência das variantes $MT2^{736V}$ (alelo A - 0,38 *vs.* 0,35, $P = 0,731$), $MT2^{521D}$ (alelo G - 0,38 *vs.* 0,41, $P = 0,696$) ou HFE^{63D} (alelo G - 0,23 *vs.* 0,17, $P = 0,241$). Os dois alelos *TMPRSS6* estiveram em forte desequilíbrio de ligação ($r^2 = 0,7$; D'= 0,9) e a distribuição dos seus haplótipos foi semelhante entre os grupos (GA, 0,58; AG 0,34; GG, 0,06; AA, 0,02). A frequência dos alelos $MT2^{736V}$ ou HFE^{63D}

não diferiu entre casos com mutações β^0 ou β^+ (APENDICE 9 - **Tabela suplementar 12**).

A heterozigose para HFE^{282Y} foi identificada em somente uma mulher do grupo controle e em duas com β-talassemia menor. Nessas duas mulheres do grupo caso, também foi encontrada a heterozigose para o alelo HFE^{63D}. A hiperferritinemia esteve presente em ambas as mulheres (ferritina = 450 µg/L e 699 µg/L), contudo, somente uma (na idade reprodutiva) expressava o fenótipo de sobrecarga de ferro (saturação da transferrina = 87,0% e 41,5%, respectivamente). Além dessa mulher, uma segunda mulher, também com hiperferritinemia e elevada saturação da transferrina (pós-menopausa, ferritina = 594,6 µg/L, saturação da transferrina = 61,6%), foi identificada como carreadora do alelo HFE^{63D}, mas não do HFE^{282Y}. Nenhum alelo *HFE*, no entanto, foi identificado no caso de sobrecarga de ferro inicialmente excluído do estudo. Curiosamente, as três mulheres diagnosticadas com hemocromatose eram homozigotas para o alelo ancestral nas posições $MT2^{736V}$ e $MT2^{521D}$. Ainda assim, não houve evidência de associação de nenhum dos alelos investigados com a hiperferritinemia (> 150 µg/L) nos grupos de casos ou controles ($P \geq 200$).

As **Figuras 6 e 7** apresentam a distribuição dos valores de ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina segundo genótipos $MT2^{736V}$ e HFE^{63D}. Na idade reprodutiva (Figura 6), carreadoras do alelo $MT2^{736V}$ apresentaram menores valores de saturação da transferrina que as homozigotas selvagens. Entretanto, o contraste dos valores entre os dois genótipos foi especialmente maior no grupo de casos que entre as controles (Figura 6 – D). Especificamente, no grupo de casos com β-talassemia menor, uma diferença de aproximadamente 50% foi estimada nas médias geométricas da saturação da transferrina entre os dois genótipos (43,6% *vs.* 22,3%), enquanto que, a mesma diferença esteve em torno 20% no grupo controle (30,3% *vs.* 24,0%). Não obstante, em teste com esse biomarcador, uma interação estatisticamente significante foi encontrada entre o genótipo *TMPRSS6* e a β-talassemia menor, independentemente do consumo estimado de ferro biodisponível, idade, IMC e uso de anticoncepcionais hormonais (*P* grupo*genótipo = 0,038 – Figura 6 – D). Entre as mulheres com β-talassemia menor, a associação do $MT2^{736V}$ com o biomarcador permaneceu significante mesmo após a exclusão do caso confirmado de sobrecarga de ferro e de outras quatro mulheres com indício de inflamação ativa (PCR > 5 mg/L) ($P = 0,029$ e $P = 0,034$, respectivamente). Por outro

lado, resultados semelhantes não foram evidenciados com valores de ferritina ou hemoglobina (Figura 6 – A e C) ou entre as mulheres na pós-menopausa (Figura 7).

Variações em parâmetros hematimétricos ou na reticulocitose também não foram associadas com o genótipo *TMPRSS6* entre as mulheres na pós-menopausa. Por outro lado, coerente ao observado com os valores de saturação da transferrina, casos de β-talassemia menor na idade reprodutiva com genótipo positivo para o $MT2^{736V}$, quando comparadas às homozigotas para o alelo selvagem, tiveram valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) significantemente menores (20,3 pg *vs.* 21,9 pg, P = 0,036) e valores de volume corpuscular médio (VCM) tendenciosamente mais baixos (68,9 fl *vs.* 65,3 fl, P= 0,088). Ainda, no grupo de mulheres controle, maiores valores do índice de anisocitose (RDW) foram associados à presença do alelo $MT2^{736V}$ (12,9% *vs.* 13,7%, P = 0,004), o que é indicativo de uma oferta relativamente menor de ferro à medula óssea entre as mulheres na idade reprodutiva carreadoras deste alelo *TMPRSS6*.

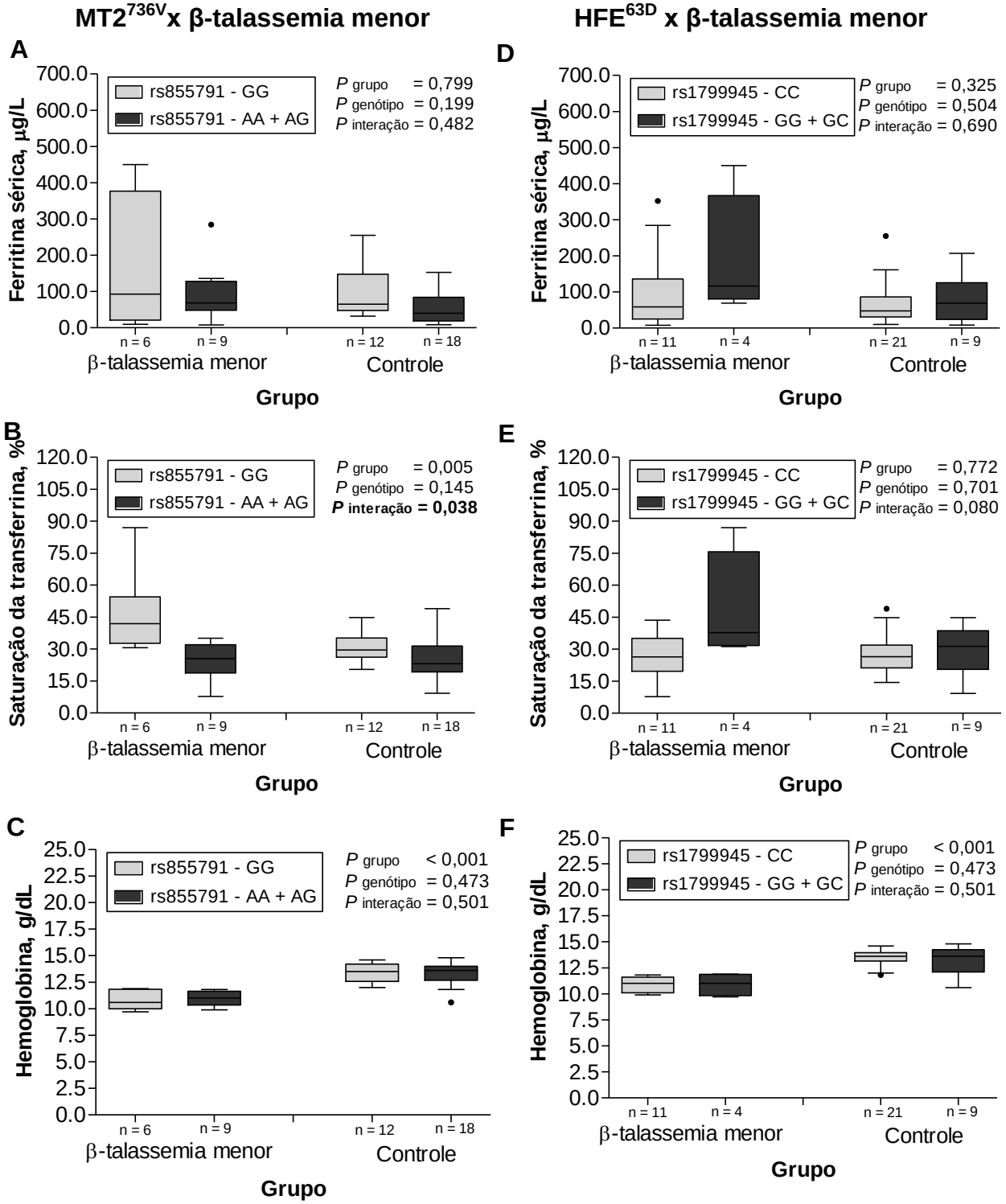


Figura 6. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina (A e D), saturação da transferrina (B e E) e hemoglobina (C e F) entre mulheres na idade reprodutiva com β-talassemia menor e suas controles.
Extremos whiskers nos box-plots representam valores 1,5 vezes maior e menor que o intervalo interquartílico.
Valores de *P* segundo modelo de regressão linear misto ajustado pelo pareamento, cor de pele, uso de anticoncepcionais hormonais, idade, IMC, e estimativa de ferro biodisponível (Hallberg & Hulthen, 2000). Valores de ferritina e de saturação da transferrina foram transformados em logaritmo natural.

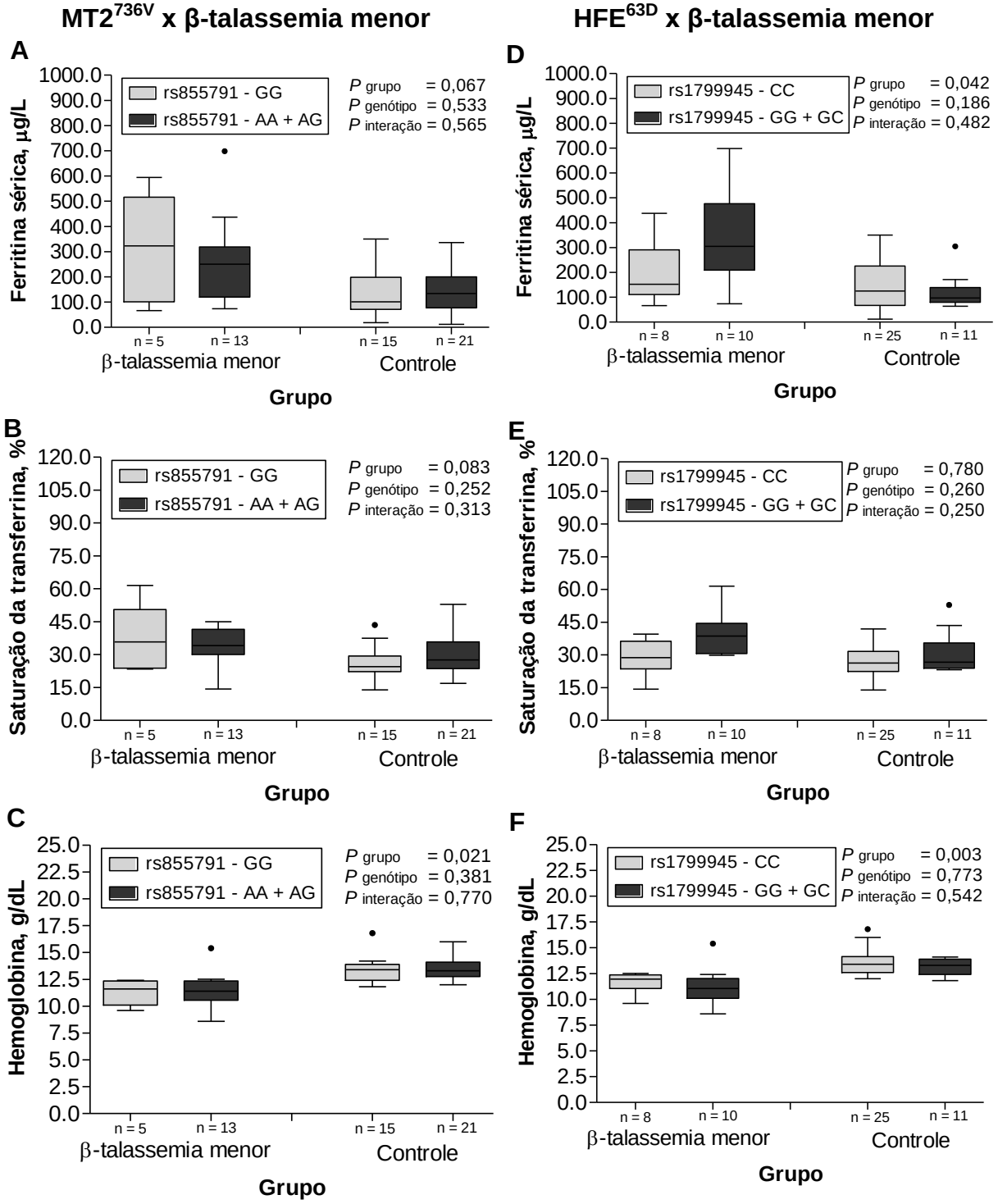


Figura 7. Associação de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* com ferritina (A e D), saturação da transferrina (B e E) e hemoglobina (C e F) entre mulheres na pós-menopausa com β-talassemia menor e suas controles.
Extremos whiskers nos box-plots representam valores 1,5 vezes maior e menor que o intervalo interquartílico.
Valores de *P* segundo modelo de regressão linear misto ajustado pelo pareamento, cor de pele, idade, IMC, e estimativa de ferro biodisponível (Hallberg & Hulthen, 2000). Valores de ferritina e de saturação da transferrina foram transformados em logaritmo natural.

6.3.2 Discussão

A β-talassemia menor é tipicamente assintomática e cursa com leve anemia e eritropoese ineficaz (GUIMARÃES et al., 2015; ZIMERMANN et al., 2008; GREER et al., 2009). Em algumas regiões do mundo, a frequência de mutações responsáveis pela β-talassemia pode chegar a 34% (MAHDIEH & RABBANI, 2016). Assim, seus carreadores representam um importante grupo populacional em risco para inadequações do *status* de ferro e, por consequência, de acentuada expressão do fenótipo associado a essa condição.

No Brasil, não há um dado de base populacional de prevalência de β-talassemia. Maior número de casos é encontrado nas regiões sul e sudeste do país, o que é consistente com as características ancestrais de suas populações (REICHERT et al., 2008; BONINI-DOMINGOS, 2004). Estudos no estado de São Paulo estimam que de 1,3% a 2% da população tem β-talassemia menor e apontam a mutação CD39, originária da região do mediterrâneo, como a mais frequente em nosso meio (ESTEVÃO et al., 2010; BONINI-DOMINGOS, 2004; VIANA-BARACIOLI et al., 2001; RAMALHO et al., 1999).

Sugere-se que o traço β-talassêmico se associe com razão hepcidina/ferritina reduzida (SULOVSKA et al., 2016; JONES et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2015) e valores de absorção de ferro maiores que os esperados para a magnitude das suas reservas corporais (ZIMMERMAN et al., 2008). Além disso, observações clínicas de uma grande heterogeneidade do *status* de ferro, mesmo entre carreadores de uma mesma mutação *HBB*, motivou a investigação de possíveis efeitos sinérgicos entre a β-talassemia menor e genótipos associados com a hemocromatose hereditária (WILSON et al., 2015; ESTEVÃO et al., 2011; MADANI et al., 2011; YAMSRI et al., 2007; GARWAL et al., 2005; MARTINS et al., 2004; MELIS et al., 2002).

Por outro lado, pouco se sabe sobre o papel de fatores genéticos relacionados com a deficiência de ferro nessa condição. Em particular, é postulado que a heterozigose das mutações *HBB* possa ter conferido vantagens seletivas para mulheres, crianças e adolescentes expostos a dietas com baixo conteúdo do mineral (ESTEVÃO et al., 2010; HOORFAR et al., 2008 MEHTA & PANDYA, 1987). No entanto, não há consenso quanto às diferenças na incidência de deficiência ou sobrecarga de ferro entre indivíduos sem hemoglobinopatias e casos com β-talassemia menor (MARUF-UR-RAHMAN et al., 2011; ESTEVÃO et al., 2011;

HOORFAR et al., 2008; PIPERNO et al., 2000; NOBILI et al., 2000; QURESHI et al., 1995; HINCHLIFFE & LILLEYMAN, 1995; GALANELLO et al., 1990; MEHTA & PADNYA, 187; WHITE et al., 1986). Uma limitação comum dos estudos que investigaram essa questão, entretanto, é o desconhecimento das variações nas necessidades e no consumo de ferro entre casos e controles, o que pode dificultar a interpretação dos dados.

No presente estudo, utilizando pareamento por escore de propensão (AUSTIN, 2011), buscamos balancear a distribuição das necessidades dietéticas de ferro entre casos e controles, a fim de investigar possíveis efeitos diferenciais de genótipos *TMPRSS6* e *HFE* sobre o *status* do mineral na β-talassemia menor. Com essa estratégia, identificamos maiores concentrações de ferritina e saturação da transferrina associadas ao traço β-talassêmico, sobretudo entre mulheres na pós-menopausa. Por outro lado, entre o grupo de casos na idade reprodutiva, encontramos valores 50% menores de saturação da transferrina associados à presença do alelo $MT2^{736V}$, sinalizando um efeito genotípico quase 2,5 vezes maior que o estimado entre as mulheres do grupo controle. Assim, nossos resultados sinalizam que não só fatores genéticos associados à sobrecarga, mas também os associados à deficiência de ferro podem modificar a expressão fenotípica da β-talassemia menor.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou simultaneamente o consumo e o *status* de ferro de carreadoras de β-talassemia no Brasil. Esse é um tema relevante, lembrando que, recentemente, alguns países como Egito (ELHANKIM et al., 2012) e o Camboja (THEARY et al., 2013) relutavam em implantar políticas de fortificação de alimentos com ferro em vista dos possíveis prejuízos dessa intervenção para indivíduos carreadores de hemoglobinopatias (ZIMERMANN et al., 2008). Aqui, igualmente ao levantado por estudos de base populacional (SANTOS et al., 2015; VIEIRA et al., 2015), estimamos que cerca de 30% do consumo total de ferro (aproximadamente 10 mg/dia para mulheres na idade reprodutiva e 8,5 mg/dia para mulheres na pós-menopausa) foi proveniente de farinhas de trigo e milho fortificadas. Não foi identificada diferença na biodisponibilidade dietética de ferro entre casos e controles e uma probabilidade de inadequação de 20% no consumo do mineral foi estimada para as mulheres na idade reprodutiva (FBN, IOM, 2001). Não obstante, casos de deficiência de ferro foram encontrados em ambos os grupos estudados. Esses achados sugerem que,

se de fato a β-talassemia menor é acompanhada por aumento na eficiência de absorção de ferro, sua magnitude não seria grande o suficiente para compensar um consumo inadequado do mineral entre mulheres na idade reprodutiva.

Em contrapartida, entre as mulheres na pós-menopausa, para as quais foi estimada uma baixa prevalência de inadequação no consumo de ferro, médias duas vezes maior de ferritina e 20% maior de saturação da transferrina foram associadas ao traço β-talassêmico (Tabela 10). Embora seja pouco provável que, nesses casos, os valores aumentados de ferritina reflitam exclusivamente as variações das reservas de ferro, é interessante notar que nossos resultados estão em acordo com estimativas de Zimmernan e colaboradores (2008), que indicam uma taxa de absorção do mineral duas vezes maior que o esperado entre mulheres com traço β-talassêmico (ZIMMERMANN et al., 2008).

Em estudo prévio, com casos e controles recrutados de diferentes regiões do país, Oliveira e colaboradores (2006) identificaram maior frequência do alelo HFE^{282Y} associada à β-talassemia menor e sugeriram a possível contribuição desta co-herança para as variações do quadro clínico entre pacientes da nossa população (OLIVEIRA et al., 2006). Esse alelo foi encontrado em heterozigose composta com o HFE^{63D} em dois dos casos aqui estudados, cujos biomarcadores indicavam pronunciada hiperferritinemia (>500 µg/L) ou aumentada saturação da transferrina (>87%). Um caso com sobrecarga de ferro era carreador do alelo HFE^{63D}, mas não do HFE^{282Y}. Nenhuma das duas mutações *HFE* foi identificada em uma mulher que relatou ter sido diagnosticada com a doença e que incialmente foi excluída do estudo. Vale lembrar que as mulheres recrutadas neste estudo não faziam uso abusivo de álcool ou suplementos de ferro e não tinham histórico de poli-transfusão ou diagnóstico de doença hepática (PANIZ, 2015), que são fatores que precipitam a sobrecarga de ferro na β-talassemia menor (PIPERNO et al., 2000).

Na literatura, ainda é controversa a associação da heterozigose do alelo HFE^{63D} com a sobrecarga de ferro de indivíduos β-talassêmicos. Nesse modo de co-herança, o alelo foi associado com variações nos biomarcadores do mineral em pacientes de Portugal (MARTINS et al., 2004) e do Egito (WILSON et al., 2015; MADANI et al., 2015), mas não da Itália (MELIS et al., 2002), Índia (GARWAL et al., 2005) ou Tailândia (YAMSRI et al., 2007). Entre casos brasileiros, Estevão e colaboradores (2011) não identificaram sua associação com valores de ferritina ou

saturação da transferrina, mesmo em análises estratificadas pelo gênero, faixa etária ou tipo de mutação *HBB* carreada pelos indivíduos (ESTEVÃO et al., 2011).

Em nossas análises, nenhuma evidência de associação da hiperferritinemia com o alelo HFE^{63D} foi também encontrada. Sugere-se assim que, tal como atestado entre indivíduos sem hemoglobinopatias (LEÃO et al., 2014; SANTOS et al., 2011; CANÇADO et al., 2006), a genotipagem das variantes HFE^{282Y} e HFE^{63D} pode ser útil, mas não é suficiente para identificar todos os casos de β-talassemia menor em risco para a sobrecarga de ferro em nossa população. Nenhum caso teve indício de dano tecidual associado ao excesso de ferro (ferritina > 1000 µg/L) (BACON et al., 2011). Ainda assim, nossos resultados corroboram o efeito sinérgico da co-herança de hemocromatose e β-talassemia menor (PIPERNO et al., 2000) e sinalizam a participação de outros modificadores do risco para a doença.

Neste sentido, não foi identificada associação do genótipo *TMPRSS6* com o *status* de ferro de casos na pós-menopausa, quando um possível benefício poderia ser conferido pela presença do alelo $MT2^{736V}$ na redução do risco para sobrecarga de ferro (GAN et al., 2012; VALLENTI et al., 2012). Por outro lado, entre as mulheres na idade reprodutiva, valores 20% menores de saturação da transferrina foram encontrados entre as carreadoras desse alelo no grupo controle (Figura 6 - B), replicando resultado previamente obtido com amostra semelhante (Artigo 2 desta tese). Curiosamente, casos que carreavam o alelo $MT2^{736V}$ tiveram média de saturação da transferrina comparável à de mulheres do grupo controle com o mesmo genótipo (22,3% e 24,0%, respectivamente), apesar da aumentada atividade eritropoética associada à β-talassemia menor (Tabela 9). Não obstante, houve indício de eritropoese deficiente em ferro entre as carreadoras do alelo $MT2^{736V}$ com β-talassemia menor, indicada por mais baixos valores de VCM e HCM.

A reduzida disponibilidade circulante de ferro associada à presença do alelo $MT2^{736V}$ não foi acompanhada por valores significantemente reduzidos de ferritina sérica, o que também corrobora a observação de nosso estudo prévio com mulheres aparentemente saudáveis na idade reprodutiva (Artigo 1 desta tese). Isso indica um efeito mais pronunciado do genótipo sobre o compartimento de transporte do mineral na circulação. Como sugerido por alguns autores, a associação do genótipo *TMPRSS6* com esse biomarcador pode ser independente das concentrações séricas de hepcidina (GALESLOOT et al., 2013; TRAGLIA et al., 2011). No entanto, não fizemos a determinação laboratorial desse hormônio, o que poderia sinalizar se a

mesma premissa é válida para indivíduos com β-talassemia menor. Além disso, a disponibilidade desse dado poderia contribuir para o entendimento do mecanismo ligado à aparente amplificação no efeito desse genótipo *TMPRSS6* pela presença do traço β-talassêmico.

Na β-talassemia menor, a associação do alelo $MT2^{736V}$ com agravamento da microcitose e hipocromia foi descrita por estudo com crianças italianas (POGGIALI et al., 2015). No entanto, nós apresentamos, pela primeira vez, as evidências de que o prejuízo no transporte de ferro à medula óssea pode intermediar essa associação. Possivelmente ela seja evidente somente nos indivíduos com altas necessidades fisiológicas de ferro ou com inadequação da ingestão dietética do mineral.

Estudos futuros com maior tamanho amostral precisam confirmar nossos achados. Além disso, seria interessante o recrutamento de casos não selecionados, a partir de triagens populacionais. Cabe ressalvar que, devido à natureza assintomática da β-talassemia menor, casos com expressão fenotípica leve das alterações hematológicas podem não ser usualmente diagnosticados e, portanto, não estar sendo acompanhados por serviços de Hematologia. Se, por um lado, nossos resultados assinalam a relevância clínica do monitoramento do *status* de ferro nesses indivíduos, por outro, podem sugerir que os casos aqui estudados, registrados em ambulatórios de São Paulo - SP e Sorocaba - SP, não sejam representativos da população. No entanto, as médias globais de hemoglobina e ferritina da amostra selecionada (11,2 g/dL e 207,6 µg/L) são comparáveis às descritas para mulheres com β-talassemia menor de São Carlos – SP (11,1 g/dL e 218,3 µg/L) (ESTEVÃO, 2007).

Além disso, em virtude do pequeno tamanho amostral, é possível que a falta de significância observada na diferença de 50% entre as médias de ferritina sérica de casos e controles na idade reprodutiva tenha resultado de insuficiente poder de teste (Tabela 9). Em estudo nacional com 137 mulheres (idades entre 10 e 45 anos), uma mediana 60% maior de ferritina sérica foi associada ao traço β-talassêmico entre mulheres na idade reprodutiva (ESTEVÃO et al., 2010) e contraste semelhante foi descrito entre casos e controles de outros países (HOORFAR et al., 2008; NOBILI et al., 2000). O número limitado de observações pode também ter afetado a acurácia da estimativa de inadequação do consumo de ferro, que foi calculada em quase o dobro da prevalência observada de deficiência do mineral.

Por outro lado, variações inespecíficas nos valores de ferritina podem ter contribuído para a discrepância entre a estimativa de inadequação dietética de ferro e a prevalência de deficiência de ferro. Foi notada alta prevalência de hiperferritinemia, não só entre as mulheres com β-talassemia menor, mas também entre as controles aparentemente saudáveis (Tabelas 9 e 10). Devido ao critério de pareamento, metade das mulheres na idade reprodutiva foi usuária de anticoncepcionais hormonais que, por reduzirem as necessidades fisiológicas de ferro (FBN, IOM, 2001), podem ter contribuído para os aumentados valores do biomarcador. Além disso, quase 60% das mulheres avaliadas tinham sobrepeso (47,5%) ou obesidade (10,1%) que podem, por sua vez, se associar com inflamação crônica de baixo grau e hiperferritinemia (GARTNER et al., 2013; MARTINELLI et al., 2012; ESCOBAR-MORREALE et al., 2005). Além de ajustar os modelos de regressão pelo IMC, eventuais vieses de interpretação dos dados foram considerados com a exclusão de mulheres com concentrações aumentadas de Proteína C reativa (PCR > 5 mg/L). Embora as determinações de Alfa1-Glicoproteína Ácida (AGP) não estivessem disponíveis para a identificação de fases tardias da inflamação (WHO, 2012), as mulheres recrutadas não relataram infecção ou doença sintomática importante nas duas semanas antecedentes à coleta de sangue.

Por fim, apesar de considerado o pareamento de casos e controles pela idade e pelo IMC, outras características sóciodemográficas não foram utilizadas no cálculo do escore de propensão (AUSTIN et al., 2011). Notoriamente, houve tendência à maior frequência de mulheres autodeclaradas como brancas entre casos com β-talassemia menor. Nossos modelos de regressão foram ajustados pela cor da pele autodeclarada, contudo, diante das discussões prévias (Artigo 1 desta tese), não é descartada a possibilidade de variações no grau de miscigenação genética entre indivíduos carreadores ou não da hemoglobinopatia. Essa diferença poderia explicar, em parte, a diferença no efeito genético do alelo $MT2^{736V}$ sobre os valores de saturação da transferrina observados entre casos e controles na idade reprodutiva. Ainda assim, diferenças na distribuição de haplótipos $MT2^{521D}$-$MT2^{736V}$ entre os dois grupos não foram evidentes.

A matriptase-2, o produto gênico do *TMPRSS6,* é considerada peça importante para a intercomunicação entre a eritropoese e o metabolismo de ferro (NAI et al., 2016). Portanto, é razoável considerar que variantes funcionais desse

gene tenham efeitos relativamente mais pronunciados sobre o *status* de ferro em condições de atividade eritropoética aumentada.

Em conclusão, houve indício de eritropoese ineficaz entre mulheres com β-talassemia menor, com implicações sobre o *status* de ferro mais evidentes entre mulheres na pós-menopausa que na idade reprodutiva. Entre essas últimas, a presença da variante $MT2^{736V}$ foi associada com valores relativamente menores de saturação transferrina. Além disso, esse genótipo foi aparentemente relacionado com inadequado *turnover* de ferro frente à aumentada demanda eritropoética dessas mulheres. As implicações clínicas dos nossos resultados precisam ser confirmadas em estudo com maior tamanho amostral. Ainda assim, sinalizam a importância de monitorar o risco genético e nutricional de mulheres com β-talassemia menor não só quanto à sobrecarga de ferro, mas também à deficiência do mineral, nos diferentes ciclos da vida.

CONCLUSÕES

- Entre mulheres na idade reprodutiva aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal, medidas de biodisponibilidade dietética do mineral obtidas por algoritmos ou por modelagem probabilística foram discordantes entre si. No entanto, foi encontrada associação entre valores de ferritina sérica e quantis de consumo de ferro biodisponível calculado com os algoritmos de Hallberg & Hulthén (2000) e de Collings et al. (2013). Sugere-se, assim, bom desempenho desses modelos em classificar dietas e/ou refeições segundo seus conteúdos de ferro biodisponível.
- Nas duas condições de atividade eritropoética estudadas, nenhuma das variantes dos genes *TMPRSS6* e *HFE* tiveram impacto sobre as reservas corporais de ferro mais relevantes que o estimado para a adequação no consumo do mineral. Entretanto, no grupo de mulheres saudáveis na idade reprodutiva, a presença da variante HFE^{63D} modificou a associação entre a biodisponibilidade de ferro e seus biomarcadores, sugerindo potencial utilidade deste genótipo *HFE* como marcador preditivo de resposta diferencial à dieta.
- Nas duas condições de atividade eritropoética estudadas, a variante $MT2^{736V}$ foi associada com reduzida disponibilidade circulante de ferro entre as mulheres na idade reprodutiva, independentemente do consumo alimentar do mineral. Entre aquelas com β-talassemia menor, também houve indício de associação desse alelo com acentuada alteração em parâmetros hematimétricos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- A validação dos métodos de estimativa da biodisponibilidade de ferro pode ser obtida por estudos de absorção de dietas completas em longo prazo (HUNT, 2010; HUNT & ROUGHEAD, 2000).
- Dados desse mesmo estudo podem ser utilizados para a investigação de determinantes genéticos da absorção do ferro, como já testado, por exemplo, com o genótipo *HFE* (YE et al., 2015).
- As associações do *status* de ferro com genótipos *TMPRSS6* e *HFE,* bem como de outros genes sabidamente relacionados com o metabolismo do ferro (*TRF2*, *HAMP* e *FPN*, por exemplo – EURECCA, 2011), devem ser investigadas por estudo com amostra de grande tamanho e, preferencialmente, representativa da população;
- A quantificação da miscigenação genética e de sua associação com os biomarcadores do mineral devem ser consideradas ao se avaliar indivíduos da nossa população (KOSOY et al., 2009; LIMA-COSTA et al.,. 2015; LI et al., 2014);
- Recomenda-se a determinação de biomarcadores sensíveis do *status* de ferro, como o receptor solúvel de transferrina e ferro corporal total (COOK, FLOWERS & SKIKNE, 2003), bem como a determinação das concentrações circulantes de hepcidina (GALESLOOT et al., 2013; TRAGLIA et al., 2011);
- Estudo que avalie a relação entre fatores genéticos, consumo alimentar e *status* corporal de ferro entre indivíduo com traço β-talassêmico deve considerar amostra com suficiente poder para testes de associação e que inclua não somente mulheres adultas, mas também homens e crianças, a fim de identificar e quantificar os potenciais riscos de desequilíbrios no *status* de ferro associados com essa condição;
- A investigação dessas mesmas relações em indivíduos carreadores de outras doenças hereditárias relativamente comuns em nossa população e também associadas com aumentada atividade eritropoética, como a esferocitose hereditária e a α-talassemia (GUIMARÂES et al., 2015; ROCHA et al., 2011), também contribuirão nesse sentido.

REFERÊNCIAS

ABEP. Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. Critérios de classificação econômica Brasil. [Acesso em novembro de 2014]. Disponível em: <http://www.abep.org/criterio-brasil>.

ACHTSCHIN, C.G. **Sobrecarga de ferro em ratos sadios.** 2010. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ACTON, R.T.; BARTON, J.C.; SNIVELY, B.M.; MCLAREN, C.E.; ADAMS, P.C.; HARRIS, E.L.; et al. Geographic and racial/ethnic differences in HFE mutation frequencies in the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. **Ethnicity & Disease**, v. 16, n. 4, p. 815-821, 2006.

ADAMS, P.C.; BARTON, J.C. A diagnostic approach to hyperferritinemia with a non-elevated transferrin saturation. **Journal of Hepatology**, v.55, n.2, p.453-8, 2011.

ALAOFÈA, H.; ZEEB, J.; O'BRIEN, H.T. Dietary iron and iron deficiency anemia among adolescent girls from Benin. **Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique**, v.55, n.3, p.187-196, 2007.

AN, P.; WU, Q.; WANG, H.; GUAN, Y.; MU, M.; LIAO, Y.; et al. TMPRSS6, but not TF, TFR2 or BMP2 variants are associated with increased risk of iron-deficiency anemia. **Human Molecular Genetics**, v.21, n.9, p.2124-2131, 2012.

ANDREWS, N.C. Genes determining blood cell traits. **Nature Genetics**, v.41, p.1161-1162, 2009.

ARANDA, N.; VITERI, F.E.; MONTSERRAT, C.; ARIJA, V. Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life style factors on iron status in general Mediterranean population from Tarragona, Spain. **Annals of Hematology**, v.89, n.8, p.767-773, 2010.

ARAÚJO, M.O.D. GUERRA, T. M. M. **Alimentos "Per Capita".** 2. Ed. Natal: Editora Universitária – UFRN, 1995.

ARMAH, S.M.; CARRIQUIRY, A.L.; REDDY, M.B. Total Iron Bioavailability from the US Diet Is Lower Than the Current Estimate. **Journal of Nutrition**, v.145, n.11, p.2617-21, 2015.

ARMAH SM, CARRIQUIRY A, SULLIVAN D, COOK JD, REDDY MB. A complete diet-based algorithm for predicting nonheme iron absorption in adults. **Journal of Nutrition**, v.143, n.7, p.1136-1140, 2013.

ARMAH, S.M.; CARRIQUIRY, A.; SULLIVAN, D.; COOK, J.D.; REDDY, M.B. A complete diet-based algorithm for predicting nonheme iron absorption in adults. **The Journal of Nutrition**¸ v.143, n.7, p.1136-40, 2013.

ASSUNÇÃO, M.C.F.; SANTOS, I.S.; BARROS, A.J.D.; GIGANTE, D.P.; VICTORA, C.G. Flour fortification with iron hás no impacto on anaemia in urban Brazilian children. **Public Health Nutrition**, v.15, n.10, p.1796-1801, 2012.

ATHIYARATH, R.; GEORGE, B.; ABRAHAM, A.; VISWABANDYA, A,; SRIVASTAVA, A.; EDISON, E.S. Genetic modifiers of secondary iron overload in beta thalassemia major. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 54, n. 3, p. 242-243, 2015a.

ATHIYARATH, R.; SHAKTIVEL, K.; ABRAHAM, V.; SINGH, D.; BONDU, J.D.; CHAPLA, A.; et al. Association of genetic variants with response to iron supplements in pregnancy. **Genes & Nutrition**, v.10, n.4, p.474, 2015b.

AUSTIN, P.C. An Introduction to Propensity Score Methods for Reducing the Effects of Confounding in ObservationalStudies. **Multivariate Behavioral Research**, v.46, n.3, p.399-424, 2011.

BACON, B.R.; ADAMS, P.C.; KOWDLEY, K.V.; POWELL, L.W.; TAVILL, A.S. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v.54, n.1, p.328-4, 2011.

BARRETT, J.C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v.21, n.2, p.263–255, 2005.

BARNHOLTZ-SLOAN, J.S.; MCEVOY, B.; SHRIVER, M.D.; REBBECK, T.R. Ancestry estimation and correction for population stratification in molecular epidemiologic association studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 3, p. 471-477, 2008.

BEARD, J.L.; MURRAY-KOLB, L.E.; HAAS, J.D.; LAWRENCE, F. Iron absorption prediction equations lack agreement and underestimate iron absorption. **Journal of Nutrition**, v.137, n.7, p.1741-6, 2007.

BECK, K.L.; CONLON, C.A.; KRUGER, R.; HEATH, A.L.; MATTHYS, C.; COAD, J.; JONES, B.; STONEHOUSE, W. Blood donation, being Asian, and a history of iron deficiency are stronger predictors of iron deficiency than dietary patterns in premenopausal women. **Biomed Research International**, doi: 10.1155/2014/652860, 2014.

BEGUIN, Y.; STRAY, S.M.; CAZZOLA, M.; HUEBERS, H.A.; FINCH, C.A. Ferrokinetic measurement of erythropoiesis. **Acta Haematologica**¸ v.79, n.3, p.121-6, 1988.

BENYAMIN, B.; FERREIRA, M.A.; WILLEMSEN, G.; GORDON, S.; MIDDELBERG, R.P.; MCEVOY, B.P.; et al. Common variants in TMPRSS6 are associated with iron status and erythrocyte volume. **Nature Genetics**, v.41, n.11, p.1173-1175, 2009(b).

BENYAMIN, B.; ESKO, T.; RIED, J.S.; RADHAKRISHNAN, A.; VERMEULEN, S.H.; TRAGLIA. M.; et al. Novel loci affecting iron homeostasis and their effects in individuals at risk for hemochromatosis. **Nature Communications**, doi: 10.1038/ncomms5926, 2014.

BENYAMIN, B.; MCRAE, A.F.; ZHU, G.; GORDON, S.; HENDERS, A.K.; PALOTIE, A; et al. Variants in TF and HFE explain approximately 40% of genetic variation in serum-transferrin levels. **American Journal of Human Genetics**, v.84, n.1, p.60-65, 2009(a).

BESHLAWY, A.E.; ALARABY, I.; ABDEL KADER, M.S.; AHMED, D.H.; ABDELRAHMAN, H.E. Study of serum hepcidin in hereditary hemolytic anemias. **Hemoglobin**, v.36, n.6, p.555-70, 2012.

BEUTLER, E.; VAN GEET, C.; TE LOO, D.M.; GELBART, T.; CRAIN, K.; TRUKSA, J.; LEE, P.L. Polymorphisms and mutations of human TMPRSS6 in iron deficiency anemia. **Blood cells, molecules and disease**¸ v.44, n.1, p.16-21, 2010.

BHARGAVA, A.; BOUIS, H.E.; SCRIMSHAW, N.S. Dietary intakes and socioeconomic factors are associated with hemoglobin concentration of Bangladeshi women. **The Journal of Nutrition**, v.131, n.3, p.758-764, 2001.

BLACK, A.E. Critical evaluation of energy intake using the Goldeberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A pratical guide to its calculation, use and limitations. **International Journal of Obesity**, v.24, p.1119-1130, 2000.

BLANCO-ROJO, R.; BAEZA-RICHER, C.; LÓPEZ-PARRA, A.M.; PÉREZ-GRANADOS, A.M.; BRICHS, A.; BERTONCINI, S.; et al. Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. **Nutrition Metabolism**, v.8, n.69, p.1-8, 2011.

BLOCK, G.; DRESSER, C.M.; HARTMAN, A.M.; CARROLL, M.D. Nutrient sources in the American diet: quantitative data from the NHANES II survey. I. Vitamins and minerals. **American journal of epidemiology**, v.122, n.1, p.13-26, 1985.

BODNAR, L.M.; COGSWELL, M.E.; MCDONALD, T. Have we forgotten the significance of postpartum iron deficiency? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.193, n.1, p.36-44, 2005.

BOLTON-MAGGS, P.H.; LANGER, J.C.; IOLASCON, A.; TITTENSOR, P.; KING, M.J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. **British Journal of Haematology**, v.156, n.1, p.37-49, 2012.

BONINI-DOMINGOS, C.R.. Talassemia no Brasil: resultados de 20 anos de estudo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia Alimentar para a população brasileira**: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde**. Institui a Comissão Interinstitucional de condução e implementação das ações de fortificação de farinhas de trigo e de milho e seus subprodutos**. Portaria MS/GM nº 14, 03 de janeiro DE 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f851a500474580668c83dc3fbc4c6735/RDR_344_2002.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: fev 2014.

BROEDBAEK, K.; SIERSMA, V.; ANDERSEN, J.T.; PETERSEN, M.; AFZAL, S.; HJELVANG, B.; et al. The association between low-grade inflammation, iron status and nucleic acid oxidation in the elderly. **Free Radical Research**, v.45, n.4, 409-16, 2011.

BUENO, S.; DUCH, C.R.; FIGUEIREDO, M.S. Mutations in the HFE gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**¸v.28, n.4, p.293-295, 2006.

BUSH, W.S.; MOORE, J.H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **PloS Computacional Biology**¸ v.8, n.12, p.1-11, 2012.

CABLE, R.G.; GLYNN, S.A.; KISS, J.E.; MAST, A.E.; STEELE, W.R.; MURPHY, E.L.; et al. Iron deficiency in blood donors: the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. **Transfusion**, v.52, n.4, p.702-711, 2012.

CADE, J.E.; MORETON, J.A.; O'HARA, B.; GREENWOOD, D.C.; MOOR, J.; BURLEY, V.J.; et al. Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. **The American journal of clinical nutrition**, v.82, n.4, p.813-20, 2005.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C.S. Visão atual da hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n. 6, p. 469-475, 2010.

CANÇADO, R.D.; GUGLIELMI, A.C.; VERGUEIRO, C.S.; ROLIM, E.G.; FIGUEIREDO, M.S.; CHIATTONE, C.S. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. **Sao Paulo Medical Journal**, v.124, n.2, p. 55-60, 2006.

CAMASCHELLA C. Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.,** v.2013, p.1-8, 2013.

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. **Genetics in Medicine¸** v.12, p.61-76, 2010.

CHAMBERS, J.C.; ZHANG, W.; LI, Y.; SEHMI, J.; WASS, M.N.; ZABANEH, D.; et al. Genome-wide association study identifies variants in TMPRSS6 associated with hemoglobin levels. **Nature Genetics**, v.41, n.11, p.1170-1172, 2009.

CHEN, Z.; TANG, H.; QAYYUM, R.; SCHICK, U.M.; NALLS, M.A.; HANDSAKER, R. et al. Genome-wide association analysis of red blood cell traits in African Americans: the COGENT Network. **Human molecular genetics**, v.15, n.22, p.2529-38, 2013.

CHENG, H.L.; HANCOCK, D.P.; ROONEY, K.B.; STEINBECK, K.S.; GRIFFIN, H.J.; O'CONNOR, H.T. A candidate gene approach for identifying differential iron responses in young overweight women to an energy-restricted haem iron-rich diet. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.68, n.11, p.1250-2, 2014.

CHIPLONKAR, S.A.; AGTE, V.V. Statistical model for predicting non-heme iron bioavailability from vegetarian meals. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.57, n.7-8, p.434-50, 2006.

COAD, J.; CONLON, C. Iron deficiency in women: assessment, causes and consequences. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.14, n.6, p.625-634, 2011.

COLLINGS, R.; HARVERY, L.J.; HOOPER, L.; HURST, R.; BROWN, T.J.; ANSETT, J.; et al. The absorption of iron from whole diets: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.98, n.1, p.65-81, 2013.

CONWAY, R.E.; POWELL, J.J.; GEISSLER, C.A. A food-group based algorithm to predict non-heme iron absorption. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.58, n.1, p.29-41, 2007.

COOK, J.D.; DASSENKO, S.A.; LYNCH, S.R. Assessment of the role of nonheme-iron availability in iron balance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, n.4, p.717-22, 1991.

COOK, J.D.; FLOWERS, C.H.; SKIKNE, B.S. The quantitative assessment of body iron. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3359-3364, 2003.

CRISPIM, S.P.; GEELEN, A.; SOUVEREIN, O.W.; HULSHOF, P.J., RUPRICH, J., DOFKOVA, M. et al. Biomarker-based evaluation of two 24-h recalls for comparing usual fish, fruit and vegetable intakes across European centers in the EFCOVAL Study. **European Journal of Clinical Nutrition**, s.1, p.S38-47, 2011.

CULLIS, J.O. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. **British Journal of Hematology**, v.154, p. 289-300, 2011.

DAINTY, J.R.; BERRY, R.; LYNCH, S.R.; HARVEY, L.J.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Estimation of dietary iron bioavailability from food iron intake and iron status. **PLoS One**, v.9, n.10, p.e111824, 2014

DATZ, C.; HAAS, T.; RINNER, H.; SANDHOFER, F.; PATSCH, W.; PAULWEBER, B. Heterozygosity for the C282Y mutation in the hemochromatosis gene is associated with increased serum iron, transferrin saturation, and hemoglobin in young women: a protective role against iron deficiency? **Clinical Chemistry**, v. 44, n.12, p.2429-2432, 1998.

DE CARVALHO, A.M.; CÉSAR, C.L.; FISBERG, R.M.; MARCHIONI, D.M. Meat consumption in São Paulo-Brazil: trend in the last decade. **PloS One**. doi: 10.1371/journal.pone.0096667, 2014.

DONOVAN, A.; LIMA, C.A.; PINKUS, J.L.; PINKUS, G.S.; ZON, L.I.; ROBINE, S.; ANDREWS, N.C. The iron exporter ferroportin/SLC40A1 is essential for iron homeostasis. **Cell Metabolism**, v.1, n.3, p.191-200, 2005.

DOS SANTOS, Q.; NILSON, E.A.; VERLY JUNIOR, E.; SICHIERI, R. An evaluation of the effectiveness of the flour iron fortification programme in Brazil. **Public Health Nutrition**, v.18, n.9, p.1670-4, 2015.

DU, S.; ZHAI, F.; WANG, Y.; POPKIN, B.M. Current methods for estimation dietary iron bioavailability do not work in China. **The Journal of Nutrition**, v.130, n.2, p.193-198, 2000.

DU, X.; SHE, E.; GELBART, T.; TRUKSA, J.; LEE, P.; XIA, Y. et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. **Science**, v.320, n.5879, p.1088-92, 2008.

EL BESHLAWY, A.; ALARABY, I.; ABDEL KADER, M.S.; AHMED, D.H.; ABDELRAHMAN, H.E. Study of serum hepcidin in hereditary hemolytic anemias. **Hemoglobine**, v.36, n.6, p.555-70, 2012.

ELHAKIM, N.; LAILLOU, A.; EL NAKEEB, A.; YACOUB, R.; SHEHATA, M. Fortifying baladi bread in Egypt: reaching more than 50 million people through the subsidy program. **Food and Nutrition Bulletin**, v.33 n.4, p.S260-71, 2012.

ELMONEIM, A.A.; ALHOSAINI, A.; SULTAN, S.; FALLATAH, K.; JABRI, G.; et al. Impact of Diet Modification on Serum Ferritin Level in Thalassemia Children. **Annals of Pediatrics & Child Health**, v.3 n.2, p.1055, 2015.

ERLANDSON, M.E.; WALDEN, B.; STERN, G.; HILGARTNER, M.W.; WEHMAN, J.; SMITH, C.H. Studies on congenital hemolytic syndromes, IV. Gastrointestinal Absorption of Iron. **Blood**, v.19, p.359-78, 1962.

ESCOBAR-MORREALE, H.F.; LUQUE-RAMÍREZ, M.; ALVAREZ-BLASCO, F.; BOTELLA-CARRETERO, J.I.; SANCHO, J.; SAN MILLÁN, J.L. Body iron stores are increased in

overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. **Diabetes Care**, v.28, n.8, p.2042-4, 2005.

ESTATIEV, R.; GASCHE, C. Iron sensing and 143ornal143ng. **Gut**, v.61, n.6, p.933-952, 2010.

ESTEVÃO, I. F. **Frequência dos mutantes C282Y e H63D do gene HFE e sua influência no metabolismo do ferro e na expressão da beta talassemia heterozigota**. 2007. 114 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/92482>.

ESTEVÃO, I.F.; PEITL JUNIOR P.; BONINI-DOMINGOS C.R. Serum ferritin and transferrin saturation levels in β^0 and β(+) thalassemia patients. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.2, p.632-9, 2011.

ESTEVÀO, I.F.; SOUZA, M.C.; MANZATO, A.J.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Valores de ferritina sérica em beta talassemia heterozigota. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.2, n.2, p.171-172, 2010.

EURRECA – European 143ornal143ng143ente recommendations aligned. **Polymorphisms and Metabolism**. Report, 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Human Vitamin and Mineral Requirements** .Geneva: World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations; 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Roots, tubers, plantains and bananas in human nutrition**. Roma, 1990.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; COLLINGS, R. Estimating the bioavailability factors needed for setting dietary reference values. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.80, n.4-5, p.249-256, 2010.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; GUILE, G.R.; VALDES, A.M.; WAWER, A.A.; HURST, R.; SKINNER, J.; et al. The contribution of diet and genotype to iron status in women: a classical twin study. **PLoS One**, v.8, n.12, p.e83047, 2013.

FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.; BASAVA, A. et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature Genetics**¸v.13, n.4, p.399-408, 1996.

FERREIRA, M.A.R.; HOTTENGA, J.J.; WARRINGTON, N.M.; MEDLAND, S.E.; WILLEMSEN, G.; LAWRENCE, R.W. et al. Sequence Variants in Three Loci Influence Monocyte Counts and Erythrocyte Volume. **American journal of human genetics**¸ v.85, n.5, p.745-749, 2009.

FINBERG, K.E.; HEENEY, M.M.; CAMPAGNA, D.R.; AYDINOK, Y.; PEARSON, H.A.; HARTMAN, K.R. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). **Nature Genetics**, v.40, n.5, p.569-71, 2008.

FINCH, C.A.; DEUBELBEISS, K.; COOK, J.D.; ESCHBACH, J.W.; HARKER, L.A.; FUNK, D.D. Ferrokinetics in man. **Medicine**, v.49, n.1, p.17-53, 1970.

FISBERG, R.M.; VILLAR, B.S. **Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares**: manual elaborado para auxiliar o processamento de inquéritos alimentares. São Paulo (SP): Signus; 2002.

FLEMING, D.J.; JACQUES, P.F.; DALLAL, G.E.; TUCKER, K.L.; WILSON, P.W.; WOOD, R,J. Dietary determinants of iron stores in a free-living elderly population: The Framingham Heart Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, n.4, p.722-733, 1998.

FBN - FOOD AND NUTRITION BOARD, INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Washington D.C.: National Academy Press, cap. 9, p. 290-393, 2001.

FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; DARSHAN, D.; BADRICK, A.C.; MCLAREN, G.D.; ANDERSON, G.J. Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression. **British journal of haematology**, v.157, n.5, p.615-26, 2012.

FRITZ, J.C.; PLA, G.W.; HARRISON, B.N.; CLARK, G.A.; SMITH, E.A. Measurement of the bioavailability of iron, using the rat hemoglobin repletion test. **Journal – Association of Official Analytical Chemists**, v.61, n.3, p.709-14, 1978.

FUNG, E.B.; XU, Y.; TRACHTENBERG, F.; ODAME, I.; KWIATKOWSKI, J.L.; NEUFELD, E.J. et al. Inadequate dietary intake in patients with thalassemia. **Journal of The Academy of Nutrition and Dietetics**, v.112, n.7, p.980-990, 2012.

GAC – **Grupo de Pesquisa de Avaliação do Consumo Alimentar**: *site*. Disponível em: http://www.gac-usp.com.br/, acesso em: jan 2014.

GALANELLO, R.; TURCO, M.P.; BARELLA, S.; GIAGU, N.; DESSÌ, C.; CORNACCHIA, G.; et al. Iron stores and iron deficiency anemia in children heterozygous for beta-thalassemia. **Haematologica**, v.75, n.4, p.319-22, 1990.

GALANTE, A.P. **Desenvolvimento e validação de um método computadorizado para avaliação do consumo alimentar, preenchido por indivíduos adultos utilizando a Web.** 114 p. Tese [Doutorado] – Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2007.

GALANTE, A.P.; COLLI, C. **Sistema computadorizado on-line Nutriquanti**, 2007. Disponível em: <http://www.nutriquanti.com.br/nutri/>.

GALANTE, A.P.. **Validade relativa de um questionário semiquantitativo de freqüência alimentar on-line para estimar ingestão de cálcio e ferro**. 2004. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) - Nutrição Humana Aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004

GALESLOOT, T.E.; GEURTS-MOESPOT, A.J.; HEIJER, M.; SWEEP, F.G.J., FLEMING, R.E.; KIEMENEY, L.A.L.M.; et al. Associations of common variants in *HFE* and *TMPRSS6* with iron parameters are independent of serum hepcidin in a general population: a replication study. **Journal of Medical Genetics**, v.50, p.593-598, 2013.

GALLAGHER, P.G. Abnormalities of the erythrocyte membrane. **Pediatric clinics of North America**, v.60, n.6, p.1349-62, 2013.

GAN, W.; GUAN, Y.; WU, Q.; AN, P.; ZHU, J.; LU, L.; et al. Association of TMPRSS6 polymorphisms with ferritin, hemoglobin, and type 2 diabetes risk in a Chinese Han population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.95, n.3, p.626-632, 2012.

GANESH, S.K.; ZAKAI, N.A.; VAN ROOIJ, F.J.; SORANZO, N.; SMITH, A.V.; NALLS, M.A.; et al. Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. **Nature Genetics**, v.41, n.11, p.1191-1198, 2009.

GANZ, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. **Blood**, v.117, n.17, p.4425-33, 2011.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. **Cold Spring Harbor perspective in medicine**, v.2, n.5, p.1-13, 2012.

GARDENGHI, S.; MARONGIU, M.F.; RAMOS, P.; GUY, E.; BREDA, L.; CHADBURN, A. et al. Ineffective erythropoiesis in β-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. **Blood**, v.109, n.11, p.5027-35, 2007.

GAREWAL, G.; DAS, R.; AHLUWALIA, J.; MARWAHA, R.K. Prevalence of the H63D mutation of the HFE in north India: its presence does not cause iron overload in betathalassemia trait. **European journal of haematology**¸ v.74, n.4, p.333-6, 2005.

GARTNER, A.; BERGER, J.; BOUR, A. EL Ati, J.; TRAISSAC, P.; LANDAIS, E.; et al. Assessment of iron deficiency in the context of the obesity epidemic: importance of correcting serum ferritin concentrations for inflammation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.98, n.3, p.821-6, 2013.

GICHOHI-WAINAINA, W.N.; TOWERS, G.W.; SWINKELS, D.W.; ZIMMERMANN, M.B.; FESKENS. E.J.; MELSE-BOONSTRA, A. Inter-ethnic differences in genetic variants within the transmembrane protease, serine 6 (TMPRSS6) gene associated with iron status indicators: a systematic review with meta-analyses. **Genes & Nutrition**, v. 10, n. 1, p.442, 2015.

GREENWOOD, D.C.; CADE, J.E.; MORETON, J.A.; O'HARA, B.; BURLEY, V.J.; RANDERSON-MOOR, J.A.; et al. HFE genotype modifies the influence of heme iron intake on iron status. **Epidemiology**, v.16, n.6, p.802-5, 2005.

GREER, J.P.; FOESTER, J.; RODGERS, G.M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D.A.; JR MEANS, R.T. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 20ª Edição. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009.

HALLBERG, L. New tools in studies on iron nutrition principles, applications and consequences. **Scandinavian Journal of Nutrition**, v.44, p.150-4, 2000.

HALBERG, L.; HULTHÉN, L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.5, p.1147-1160, 2000.

HALLBERG, L.; HULTHÉN, L.; GARBY, L. Iron stores and haemoglobin iron deficits in menstruating women. Calculations based on variations in iron requirements and bioavailability of dietary iron. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.54, n.8, p.650-7, 2000.

HALLBERG, L.; HULTHÉN, L.; GARBY, L. Iron stores in man in relation to diet and iron requirements. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.52, n.9, p.623-31, 1998.

HALLBERG, L.; HULTÉN, L.; GRAMATKOVSKI, E. Iron absorption from the whole diet in men: how effective is the regulation of iron absorption? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.66, n.2, p.347-56, 1997.

HALLBERG, L.; ROSSANDER-HULTÉN, L. Iron requirements in menstruating women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 6, p.1047-1058, 1991.

HARLAND, B.F. OBERLEAS , D. **Phytate contents of foods**. In: Spiller, G.A, editor. CRC handbook of dietary fiber in human nutrition. 2. ed. Boca Raton: CRC Press; 1993.

HARTTIG, U.; HAUBROCK, J.; KNÜPPEL, S.; BOEING, H. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. **European journal of clinical nutrition**, s.1, p.S87-91, 2011.

HAUBROCK, J.; NÖTHLINGS, U.; VOLATIER, J.L.; DEKKERS, A.; OCKÉ, M.; HARTTIG, U. et al. Estimating usual food intake distributions by using the multiple source method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. **The journal of nutrition**, v.141, n.5, p.914-20, 2011.

HE, M.; WORKALEMAHU, T.; MANSON, J.E.; HU, F.B.; QI, L. Genetic determinants for body iron store and type 2 diabetes risk in US men and women. **PLoS One**, v.7, n.7, p.e40919, 2012.

HEATH, A.L.; SKEAFF, C.M.; GIBSON, R.S. Validation of a questionnaire method for estimating extent of menstrual blood loss in young adult women. **Journal of trace elements in medicine and biology,** v.12, n.4, p.231-5, 1999.

HEINRICH, H.C.; GABBE, E.E.; OPPITZ, K.H.; WHANG, D.H.; BENDER-GÖTZE, C.; SCHÄFER, K.H.; et al. Absorption of inorganic and food iron in children with heterozygous and homozygous beta-thalassemia. **Zeitschrift für Kinderheilkunde¸** v.115, n.1, p.1-22, 1973.

HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; GALY, B.; CAMASCHELLA, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. **Cell**, v.142, n.1, p.24-38, 2010.

HINCHLIFFE, R.F.; LILLEYMAN, J.S. Frequency of coincident iron deficiency and beta-thalassaemia trait in British Asian children. **Journal of Clinical Pathology**, v.48, n.6, p.594-595, 1995.

HOORFAR, H.; SADRARHAMI, S.; KESHTELI, A.H.; ARDESTANI, S.K.; ATAEI, M.; MOAFI, A. Evaluation of Iron Status by Serum Ferritin Level in Iranian Carriers of beta Thalassemia Minor. **International Journal of Vitamin Nutrition Research**, v.78, n.4/5, p.204-207, 2008.

HULTÉN, L.; GRAMATKOVSKI, E.; GLEERUP, A.; HALLBERG. L. Iron absorption from the whole diet. Relation to meal composition, iron requirements and iron stores. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, n. 11, p. 194-808, 1995.

HUNT, J.R. Algorithms for Iron and Zinc Bioavailability: Are they Accurate? **International Journal of Vitamin Nutrition Research**, v.80, n.4/5, p.257-262, 2010.

HUNT, J.R.; ROUGHEAD, Z.K. Adaptation of iron absorption in men consuming diets with high or low iron bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition, v.71, n.1, p.94-102, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro : IBGE, 2011. Disponível em < http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf> .

INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT. A haplotype map of the human genome. **Nature**, v.437, p.1229-1320, 2005.

IOLASCON, A.; AVVISATI, R.A..; PISCOPO, C. Hereditary spherocytosis. **Transfusion Clinique et Biologique**, v.17, n.3, p.138-42, 2010.

JANKOVIC, L.; EFREMOV, G.D.; JOSIFOVSKA, O.; JURICIC, D.; STOMING, T.A.; KUTLAR, A.; et al. An initiation codon mutation as a cause of a beta-thalassemia. **Hemoglobin**, v.14, n.2, p.169-76, 1990.

JONES, E.; PASRICHA, SR.; ALLEN, A.; EVANS, P.; FISHER, CA.; WRAY K.; et al. Hepcidin is suppressed by erythropoiesis in hemoglobin E β-thalassemia and β-thalassemia trait. **Blood Journal**, v.125, n.5, p.873-80, 2015

KAMATANI, Y.; MATSUDA, K.; OKADA, Y.; KUBO, M.; HOSONO, N.; DAIGO, Y.; et al. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. **Nature Genetics**, v.42, p.210-215, 2010.

KAUFMAN, J.S., COOPER, R.S.; MCGEE, D.L. Socioeconomic status and health in blacks and whites: the problem of residual confounding and the resiliency of race. **Epidemiology**, v. 8, n. 6, p. 621-628, 1997.

KAUTZ, L.; JUNG, G.; VALORE, E.V.; RIVELLA, S.2.; NEMETH, E.; GANZ, T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. **Nature Genitcs**, v.46, n.7, p.678-84, 2014.

KEARNEY, S.L.; NEMETH, E.; NEUFELD, E.J.; THAPA, D.; GANZ, T.; WEINSTEIN, D.A.; et al. Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. **Pediatric blood and cancer**, v.48, n.1, p.57-63, 2007.

KJELDSBERG, C.R.; PERKINS, J. **Practical Diagnosis of Hematologic Disorders**. 5ª Edição. Chicago: ASCP Press; 2010.

KNUTSON, M.D. Into the matrix: regulation of the iron regulatory hormone hepcidin by matriptase-2. **Nutrition Reviews**, v.67, n.5, p.284-288, 2009.

KOLLER, D.L.; IMEL, E.A.; LAI, D.; PADGETT, L.R.; ACTON, D.; GRAY, A.; et al. Genome-wide association study of serum iron phenotypes in premenopausal women of European descent. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.57, p.50-3, 2016.

KOSOY, R.; NASSIR, R.; TIAN, C.; WHITE, P.A.; BUTLER, L.M.; SILVA, G.; et al. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. **Human Mutation**, v. 30, n. 1, p. 69-78, 2009.

KULLO, I.J.; DING, K.; JOUNI, H.; SMITH, C.Y.; CHUTE, C.G. A Genome-Wide Association Study of Red Blood Cell Traits Using the Electronic Medical Record. **PloS One**, v.5, n.9, 2010.

OLIVEIRA, T.M.; SOUZA, F.P.; JARDIM, A.C.; CORDEIRO, J.A.; PINHO, J.R.; SITNIK, R.; et al. HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.12, p.1575-80, 2006.

LAI, M.E.; VACQUER, S.; CARTA, M.P.; SPIGA, A.; COCCO, P.; ABETE, C.; et al. Evidence for a proatherogenic biochemical phenotype in beta thalassemia minor and intermedia. **Acta Haematologica**, v.126, n.2, p.87-94, 2011.

LAI, M.E.; VACQUER, S.; CARTA, M.P.; SPIGA, A.; COCCO, P.; ABETE, C.; DESSÌ, S.; MANDAS, A. Evidence for a proatherogenic biochemical phenotype in beta thalassemia minor and intermedia. **Acta Haematologica**¸v.126, n.2, p.87-94, 2011.

LATUNDE-DADA, G.O.; MCKIE, A.T.; SIMPSON, R.J. Animal models with enhanced erythropoiesis and iron absorption. **Biochemistry et Biophysica acta**, v.1762, n.4, p.414-23, 2006.

LATUNDE-DADA, G.O.; SIMPSON, R.J.; MCKIE, A.T. Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. **The Journal of Nutrition**¸ v.138, n.6, p.991-5, 2008.

LE BLANC, S.; GARRICK, M.D.; ARREDONDO, M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.312, n.12, p.C1780-5, 2012.

LEÃO, G.D.; FREIRE, J.M.; CUNHA FERNANDES, A.L.; MOURA DE OLIVEIRA, T.M.; LEÃO, N.D.; GIL, E.A.; et al. Analysis of HFE genes C282Y, H63D, and S65D in patients with hyperferritinemia from northeastern Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.28, n.3, p.178-85, 2014.

LEE, J.Y.; PARK, J.M.; HONG, J.A.; LEE, D.C.; IM, J.A.; LEE. J.W. Serum Ferritin Is Differentially Associated with Anti-oxidative Status and Insulin Resistance in Healthy Obese and Non-obese Women. **Korean Journal of Family Medicine**, v.33, n.4, p.205-210, 2012.

LEE, P.L.; BARTON, J.C.; KHAW, P.L.; BHATTACHARJEE, S.Y.; BARTON, J.C. Common TMPRSS6 mutations and iron, erythrocyte, and pica phenotypes in 48 women with iron deficiency or depletion. **Blood cells, molecules and disease**¸v.48, n.2, p.124-7, 2012.

LESBORDES-BRION, J.C.; VIATTE, L.; BENNOUN, M.; LOU, D.Q.; RAMEY, G.; HOUBRON, C.; et al. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. **Blood**, v.108, n.4, p.1402-1405, 2006.

LEWONTIN, R.C. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics**, v.49, n.1, p.49-67, 1964.

LI, H.; GINZBURG, Y.Z. Crosstalk between Iron Metabolism and Erythropoiesis. **Advances in Hematology**, v.2010, 2010.

LI, J.; LANGE, L.A.; DUAN, Q.; LU, Y.; SINGLETON, A.B.; ZONDERMAN, A.B. Genome-wide admixture and association study of serum iron, ferritin, transferrin saturation and total

iron binding capacity in African Americans. **Human molecular genetics**¸ pii:ddu454 [Epub ahead of print], 2014.

LIAO, M.; SHI, J.; HUANG, L.; GAO, Y.; TAN, A.; WU, C. et al. Genome-Wide Association Study Identifies Variants in PMS1 Associated with Serum Ferritin in a Chinese Population. **PloS ONE**, v.9, n.8, p.1-7, 2014.

LIMA-COSTA, M.F.; RODRIGUES, L.C.; BARRETO, M.L.; GOUVEIA, M.; HORTA, B.L.; MAMBRINI, J.; et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (TheEpigen Initiative). **Scientific Reports**, v.5, p.9812, 2015.

LIU, J.M.; HANKINSON, S.E.; STAMPFER, M.J., RIFAI, N.; WILLET, W.C.; MA, J. Body iron stores and their determinants in healthy postmenopausal US women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.1160-7, 2003.

LO, K.S.; WILSON, J.G.; LANGE, L.A.; FOLSOM, A.R.; GALARNEAU, G.; GANESH, S.K. et al. Genetic association analysis highlights new loci that modulate hematological trait variation in Caucasians and African Americans. **Human Genetics**, v.129, n.3, p.307-17, 2011.

LYNCH, S. The precision of in vitro methods and algorithms for predicting the bioavailability of dietary iron. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, v.75, n.6, p.436-45, 2005.

LYNCH, S. Why nutritional iron deficiency persists as a worldwide problem. **The journal of nutrition**, v.141, n.4, p.763S-768S, 2011.

MACHADO, E.H.S. DE CARLI, E.; SZARFARC, S.C.; SOUZA, J.M.P.; FUJIMORI, E. COLLI, C. Anemia among pregnant women attending primary healthcare units in the municipality of São Paulo, Brazil: evaluations after the mandatory fortification of wheat and maize flours with iron. **Nutrire**, doi: 10.1186/s41110-016-0020-z, 2016.

MADANI, H.A.; AFIFY, R.A.; ABD EL-AAL, A.A.; SALAMA, N.; RAMY, N. Role of HFE gene mutations on developing iron overload in beta-thalassaemia carriers in Egypt. **Eastern Mediterranean health journal**, v.17, n.6, p.546-51, 2011.

MAHDIEH, N.; RABBANI, B. Beta thalassemia in 31,734 cases with HBB gene mutations: Pathogenic and structural analysis of the common mutations; Iran as the crossroads of the Middle East. **Blood Reviews**, v.30, n.6, p.493-508, 2016.

MARIANI, M.; BARCELLINI, W.; VERCELLATI, C.; MARCELLO, A.P.; FERMO, E.; PEDOTTI, P.; et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. **Haematologica**, v.93, n.9, p.1310-7, 2008.

MARIANI, R.; TROMBINI, P.; POZZI, M.; PIPERNO, A. Iron Metabolism in Thalassemia and Sickle Cell Disease. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.1, n.1, 2009.

MARTINELLI, N.; TRAGLIA, M.; CAMPOSTRINI, N.; BIINO, G.; CORBELLA, M.; SALA, C.; BUSTI, F.; MASCIULLO, C.; MANNA, D.; PREVITALI, S.; CASTAGNA, A.; PISTIS, G.; OLIVIERI, O.; TONIOLO, D.; CAMASCHELLA, C.; GIRELLI, D. Increased serum hepcidin

levels in subjects with the metabolic syndrome: a population study. **PLoS One**, v. 7, n.10, p. e48250, 2012.

MARTINS, R.; PICANÇO, I.; FONSECA, A.; FERREIRA, L.; RODRIGUES, O.; COELHO, M. et al. The role of HFE mutations on iron metabolism in beta-thalassemia carriers. **Journal of human genetics**, v.49, n.12, p.651-5, 2004.

MARUF-UR-RAHMAN, M.; KIRTANIA, K.; RAHMAN, M.M.; SULTANA, N.; RAHMAN, M.S.; AHMED, S. Iron Status In Beta Thalassaemia Trait In Adult. **Journal of Dhaka National Medical College and Hospital**¸v.17, n.02, p.21-24, 2011.

MATSUDO, S. M. M.; ARAUJO, T.; MATSUDO, V.; ANDRADE, D.; ANDRADE, E.; OLIVEIRA, L.C.; et al. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. **Rev Bra Ativ Fís e Saúde**, v.6, n.2, p.5-18, 2001.

MCCRORY, M.A.; HAJDUK, C.L.; ROBERTS, S.B. Procedures for screening out inaccurate reports of dietary energy intake. **Public Health Nutrition**, v.5, n.6A, p.873-82, 2002.

MCLAREN, C.E.; GARNER, C.P.; CONSTANTINE, C.C.; MCLACHLAN, S.; VULPE, C.D.; SNIVELY, B.M.; et al. Genome-wide association study identifies genetic loci associated with iron deficiency. **PloS One**, v.31, n.3, p.e17390, 2011.

MELIS, M.A.; CAU, M.; DEIDDA, F.; BARELLA, S.; CAO, A.; GALANELLO, R. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. **Haematologica**, v.87, n.3, p242-5, 2002.

MEHTA, B.C.; PANDYA, B.G. Iron status of beta thalassemia carriers. **American Journal of Hematology**, v.24, n.2, p.137-41, 1987.

MEYRICK, D.; WEBB, J.; COLEB, C. Iron and iron proteins found in the genetic disease, hereditary spherocytosis. **Inorganica Chimica Acta**, v.339, p.481-87, 2002.

MILWARD, E.A.; BAINES, S.K.; KNUIMAN, M.W.; BARTHOLOMEW, H.C.; DIVITINI, M.L.; RAVINE, D.G.; et al. Noncitrus fruits as novel dietary environmental modifiers of iron stores in people with or without HFE gene mutations. **Mayo Clinic Proceedings**, v.83, n.5, p.543-9, 2008.

MITHEN R. Effect of genotype on micronutrient absorption and metabolism: a review of iron, copper, iodine and selenium, and folates. **International Journal of Vitamin Nutrition Research**, v.77, n.3, p.205-16, 2007.

MOHLER, D.N.; WHEBY, M.S. Hemochromatosis heterozygotes may have significant iron overload when they also have hereditary spherocytosis. **The American Journal of the medical sciences**, v.292, n.5, p.320-4, 1986.

MONSEN, E.R.; HALLBERG, L.; LAYRISSE, M.; HEGSTED, D.M.; COOK, J.D.; MERTZ, W.; et al. Estimation of available dietary iron. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.31, n.1, p.134-41, 1978

MONTES-CANO, M.A.; RODRÍGUEZ-MUÑOZ, F.; FRANCO-OSORIO, R.; NÚÑEZ-ROLDÁN, A.; GONZÁLEZ-ESCRIBANO, M.F. Hereditary spherocytosis associated with mutations in HFE gene. **Annals of Hematology**, v.82, n.12, p.769-72, 2003.

MORETTI, D.; VAN DOORN, G.M.; SWINKELS, D.W.; MELSE-BOONSTRA, A. Relevance of dietary iron intake and bioavailability in the management of HFE hemochromatosis: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.98, n.2, p.468-479, 2013.

MORIMOTO, J.M.; MARCHIONI, D.M.L.; CESAR, C.L.G.; FISBERG, R.M. Variância intrapessoal para ajuste da distribuição de nutrientes em estudos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v.45, p.621-625, 2011.

MUCKENTHALER, M.U. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. **Blood**, v.111, n.12, p.5727-33, 2008.

REICHERT, V.C.; DE CASTRO, S.M.; WAGNER, S.C.; DE ALBUQUERQUE, D.M.; HUTZ, M.H.; LEISTNER-SEGAL, S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. Annals of Hematology, v.87, n.5, p.381-4, 2007.

NAI, A.; PAGANI, A.; SILVESTRI, L.; CAMPOSTRINI, N.; CORBELLA, M.; GIRELLI, D.; et al. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidina levels in normal individuals. **Blood**, v.118, n.16, p.4459-4462, 2011.

NEMETH, E.; TUTTLE, M.S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; WARD, D.M.; et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v.306, n.5704, p.2090-3, 2004.

NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; PORTEU, A.; MATIVET, S.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.7, p.4596-601, 2002.

NJAJOU, O.T.; ALIZADEH, B.Z.; AULCHENKO, Y.; ZILLIKENS, M.C.; POLS, H.A.; OOSTRA, B.A.; et al. Heritability of serum iron, ferritin and transferrin saturation in a genetically isolated population, the Erasmus Rucphen Family (ERF) Study. **Human Heredity**, v.61, n.4, p.222-228, 2006.

NOBILIE, B.; PERROTTA, S.; MATARESE, S.M.R.; CONTE, M.L.; GIUDICE, E.M.D. Evaluation of body iron status in Italian carriers of beta-thalassemia trait. **Nutrition Research**, v.21, n.1/2, p.55-60, 2001.

NRC (National Research Council). **Recommended Dietary Allowances**, 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

NYAKERIGA, A.M.; TROYE-BLOMBERG, M.; MWACHARO, J.K.; WAMBUA, S.; WILLIAMS, T.N. Nutritional Iron Status in Children with Alpha+ Thalassemia and the Sickle Cell Trait in a Malaria Endemic Area on the Coast of Kenya. **Haematologica**, v.90, n.4, p.552-4, 2005.

OEXLE, K.; RIED, J.S.; HICKS, A.A.; TANAKA, T.; HAYWARD, C.; BRUEGEL, M.; et al. Novel association to the proproteinconvertase PCSK7 gene locus revealed by 151ornal151ng soluble transferrin receptor (sTfR) levels. **Human Molecular Genetics**, v.20, n.5, p.1042-1047, 2011.

PAK, M.; LOPEZ, M.A.; GABAYAN, V.; GANZ, T.; RIVERA, S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. **Blood**, v.108, n.12, p.3730-5, 2006.

PANIZ, Clóvis. **Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon-γ, TNF-α e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK.** 2015. Tese (Doutorado em Análises

Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

PASRICHA, S.R.; FRAZER, D.M.; BOWDEN, D.K.; ANDERSON, G.J. Transfusion suppresses erythropoiesis and increases hepcidin in adult patients with beta-thalassemia major: a longitudinal study. **Blood**, v.122, n.1, p.124-133, 2013.

PATRINOS, G.P.; GIARDINE, B.; RIEMER, C.; MILLER, W.; CHUI, D.H.; ANAGNOU, N.P.; et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. **Nucleic Acids Research**, v.32 p.537-41, 2004.

PATTERSON, A.J.; BROWN, W.J.; ROBERTS, D.C.K. Dietary ans lifestyle factors influencing iron stores in Australian women: an examination of the role of bio-available dietary iron. **Australian Journal of Nutrition and Dietetics**, v.58, n.2, p.107-113, 2001.

PEI, S.N.; MA, M.C.; YOU, H.L.; FU, H.C.; KUO, C.Y.; RAU, K.M.; WANG, M.C.; LEE, C.T. TMPRSS6 rs855791 polymorphism influences the susceptibility to iron deficiency anemia in women at reproductive age. **International 152ornal of medical science**¸v.11, n.6, p.614-9, 2014.

PERRY, G.S.; BYERS, T.; YIP, R.; MARGEN, S. Iron nutrition does not account for the hemoglobin differences between blacks and whites. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 7, p. 1417-1424, 1992.

PFEIFFER, C.M.; STERNBERG, M.R.; CALDWELL, K.L.; PAN, Y. Race-ethnicity is related to biomarkers of iron and iodine status after adjusting for sociodemographic and lifestyle variables in NHANES 2003-2006. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 6, p. 977S-985S, 2013.

PHILLIPI, S.T. **Tabela de composição de alimentos**: Suporte para decisão nutricional. 2ª ed. Campinas: Manole, 2001.

PICHLER, I.; MINELLI, C.; SANNA, S.; TANAKA, T.; SCHWIENBACHER, C.; NAITZA, S.; et al. Identification of a common variant in the TFR2 gene implicated in the physiological regulation of serum iron levels. **Human Molecular Genetics**, v.20, n.6, p.232-1240, 2011.

PINHEIRO, A.B.V. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PIPERNO, A.; MARIANI, R.; AROSIO, C.; VERGANI, A.; BOSIO, S.; FARGION, S. et al. Haemochromatosis in patients with beta-thalassaemia trait. **British journal of hematology**, v.111, n.3, p.908-14, 2000.

POWELL, J.J.; COOK, W.B.; CHATFIELD, M.; HUTCHINSON, C.; PEREORA, L.L.A.; LOMER, M.C. Iron status is inversely associated with dietary iron intakes in patients with inactive or mildly active inflammatory bowel disease. **Nutrition and Metabolism**, v.10, n.18, p.1-7, 2013.

POGGIALI, E.; ANDREOZZI, F.; NAVA, I.; CONSONNI, D.; GRAZIADEI, G.; CAPPELLINI, M.D. The role of TMPRSS6 polymorphisms in iron deficiency anemia partially responsive to oral iron treatment. **American Journal of Hematology**, v.90, n.4, p.306-9, 2015.

PYNAERT, I.; DE BACQUER, D.; MATTHYS, C.; DELANGHE, J.; TEMMERMAN, M.; DE BACKER, G.; et al. Determinants of ferritin and soluble transferrin receptors as iron status parameters in young adult women. **Public Health Nutrition**, v.12, n.10, p.1775-1782, 2008.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M.A.; BENDER, D.; et al., PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **American Journal of Human Genetic**, v. 81, n. 3, p. 559,575, 2007.

QURESHI, T.Z.; ANWAR, M.; AHMED, S.; AHMED KHAN D.; SALEEM, M. Serum ferritin levels in carriers of beta-thalassaemia trait. **Acta Haematologica**. v.94, n.1, p.7-9, 1995.

RAMALHO, A.S.; SILVA, R.B.P.; TEIXEIRA, R.C.; COMPRI, M.B. Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 3, p. 591-595, 1999.

REDDY, M.B. Algorithms to assess non-heme iron bioavailability. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.75, n.6, p.405-12, 2005.

REDDY, M.B.; HURRELL, R.F.; COOK, J.D. Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.4, p.937-43, 2000.

REICHERT, V.C.; DE CASTRO, S.M.; WAGNER, S.C.; DE ALBUQUERQUE, D.M.; HUTZ, M.H.; LEISTNER-SEGAL, S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. **Annals of Hematology**, v.87, n.5, p.381-4, 2007.

RIBEIRO, M.A.; COMINETTI, C.; KAKAZU, M.H.; SARKIS, J.E.; DAINTY, J.; FOX, T.E.; COZZOLINO, S.M. Zinc absorption in Brazilian subjects fed a healthy meal. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, doi:10.1111/jhn.12119, 2013.

RICKARD, A.P.; CHATFIELD, M.D.; CONWAY, R.E.; STEPHEN, A.M.; POWELL, J.J. An algorithm to assess intestinal iron availability for use in dietary surveys. **The British journal of nutrition**, v.102, n.11, p.1678-1685, 2009.

ROCHA, S.; COSTA, E.; ROCHA-PEREIRA, P.; FERREIRA, F.; CLETO, E.; BARBOT J.; et al. Erythropoiesis *versus* inflammation in Hereditary Spherocytosis clinical outcome. **Clinical Biochemistry,** v.44, p.1137-1143, 2011.

RODRIGUEZ, S.C.; HOTZ, C.; RIVERA, J.A. Bioavailable dietary iron is associated with hemoglobin concentration in Mexican preschool children. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.10, p.2304-2310, 2007.

ROE, M.A.; COLLINGS, R.; DAINTY, J.R.; SWINKELS, D.W.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. **The American journal of clinical nutrition**, v.89, n.4, p.1088-91, 2009.

ROMEU, M.; ARANDA, N.; GIRALT, M.; RIBOT, B.; NOGUES, M.R.; ARIJA, V. Diet, iron biomarkers and oxidative stress in a representative sample of Mediterranean population. **Nutrition Journal**, v.16, n.12, 2013.

ROSSI, E.; OLYNYK, J.K.; CULLEN, D.J.; PAPADOPOULOS, G.; BULSARA, M.; SUMMERVILLE, L.; et al. Compound Heterozygous Hemochromatosis Genotype Predicts Increased Iron and Erythrocyte Indices in Women. **Clinical Chemistry**, v.46, n.2, p.162-166, 2000.

SANTOS, P.C.; CANÇADO, R.D.; PEREIRA, A.C.; SCHETTERT, I.T.; SOARES, R.A.; PAGLIUSI, R.A.; HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; TEIXEIRA, A.C.; FIGUEIREDO, M.S.;

CHIATTONE, C.S.; KRIEGER, J.E.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Hereditary hemochromatosis: mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. **Blood cells, molecules & disease**, v.46, n.4, p. 302-7, 2011.

SANTOS, P.C.; CANÇADO, R.D.; TERADA, C.T.; ROSTELATO, S.; GONZALES, I.; HIRATA, R.D.; et al. HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.1, p.107-114, 2010.

SHARP, P. A. Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.80, n.4-5, p.231-242, 2010.

SORANZO, N.; SPECTOR, T.D.; MANGINO, M.; KÜHNEL, B.; RENDON, A.; TEUMER, A.; et al. A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. **Nature Genetics**, v.41, n.11, p.1182-1190, 2009.

SORENSEN, E.; GRAU, K.; BERG, T.; SIMONSEN, A.C.; ERIKSTRUP, C.; HANSEN, M.B.; et al. A genetic risk factor for low serum ferritin levels in Danish blood donors. **Transfusion**, v.52, n.12, p.2585-2589, 2012.

STAMPF, S. Package ‘nonrandom’. Stratification and matching by the propensity score. [Acesso em novembro de 2015]. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/nonrandom/nonrandom.pdf>.

STOLTZFUS, R.J. Iron interventions for women and children in low-income countries. **The Journal of Nutrition**, v.141, n.4, p.756-762, 2011.

SULOVSKA, L.; HOLUB, D.; ZIDOVA, Z.; DIVOKA, M.; HAJDUCH, M.; MIHAL, V.; et al. Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia,** v.160, n.2, p.231-7, 2016.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Versão II. 2. Ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, São Paulo, 2006.

TANAKA, T.; ROY, C.N.; YAO, W.; MATTEINI, A.; SEMBA, R.D.; ARKING, D.; et al. A genome-wide association analysis of serum iron concentrations. **Blood**, v.115, n.1, p.94-96, 2010.

TANNO, T.; BHANU, N.V.; ONEAL, P.A.; GOH, S.H.; STAKER, P.; LEE, Y.T., et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. **Nature Medicin**, v.13, n.9, p.1096-101, 2007.

TERADA, C.T.; SANTOS, P.C.; CANÇADO, R.D.; ROSTELATO, S.; LOPREATO, F.R.; CHIATTONE, C.S.; et al. Iron deficiency and frequency of HFE C282Y gene mutation in Brazilian blood donors. **Transf Med**, v.19, n.5, p.245-251, 2009.

THEARY, C.; PANAGIDES, D.; LAILLOU, A.; VONTHANAK, S.; KANARATH, C.; CHHORVANN, C.; et al. Fish sauce, soy sauce, and vegetable oil fortification in Cambodia: where do we stand to date? **Food and Nutrition Bulletin**, v.34 n.2, p.S62-71, 2013.

TRAGLIA, M.; GIRELLI. D.; BIINO, G.; CAMPOSTRINI, N.; CORBELLA, M.; SALA, C. et al. Association of HFE and TMPRSS6 genetic variants with iron and erythrocyte parameters is only in part dependent on serum hepcidin concentrations. **Journal of medical genetics,** v.48, n.9, p.629-34, 2011.

TSENG, M.; CHAKRABORTY, H.; ROBINSON, D.T.; MENDEZ, M.; KOHLMEIER, L. Adjustment of Iron Intake for Dietary Enhancers and Inhibitors in Population Studies: Bioavailable Iron in Rural and Urban Residing Russian Women and Children. **The Journal of Nutrition**, v.127, n.8, p.1456-68, 1997.

TSENG, M.; CHAKRABORTY, H.; ROBINSON, D.T.; MENDEZ, M.; KOHLMEIER, L. Adjustment of iron intake for dietary enhancers and inhibitors in population studies: bioavailable iron in rural and urban residing Russian women and children. **The Journal of Nutrition**, v.127, n.8, p.1456-1468, 1997.

TUSSING-HUMPHREYS, L.M.; NEMETH, E.; FANTUZZI, G.; FREELS, S.; GUZMAN, G.; HOLTERMAN, A.X.; BRAUNSCHWEIG, C. Elevated systemic hepcidina and iron depletion in obese premenopausal females. **Obesity**, v.18, n.7, p.1449-1456, 2010.

USDA – **United States Department of Agriculture.** Table of Nutrient Retention Factors, 2014. Disponível em <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>

VALENTI, L.; FRACANZANI, A.L.; RAMETTA, R.; FRAQUELLI, M.; SOVERINI, G.; PELUSI, S.; et al. Effect of the A736V TMPRSS6 polymorphism on the penetrance and clinical expression of hereditary hemochromatosis. **Journal Hepatology**, v.57, n.6, p.1319-1325, 2012.

VAN DER A, D.L.; PEETERS, P.H.; GROBBEE, D.E.; ROEST, M.; VOORBIJ, H.A.; VAN DER SCHOUW, Y.T. HFE genotypes and dietary heme iron: no evidence of strong gene-nutrient interaction on serum ferritin concentrations in middle-aged women. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.16, n. 1, p. 60-68, 2006.

VAN-DER-HARST, P.; ZHANG, W.; LEACH, I.M.; RENDON, A.; VERWEIJ, N.; SEHMI, J. et al. Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. **Nature**, v.492, p.369-375, 2012.

VERLY-JR, E.; CASTRO, M.A. ; FISBERG, R.M. ; MARCHIONI, D.M.L. Precision of Usual Food Intake Estimates According to the Percentage of Individuals with a Second Dietary Measurement. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v.112, p.1015-1020, 2012.

VERMA, S.; GUPTA, R.; KUDESIA, M.; MATHUR, A.; KRISHAN, G.; SINGH, S. Coexisting Iron Deficiency Anemia and Beta Thalassemia Trait: Effect of Iron Therapy on Red Cell Parameters and Hemoglobin Subtypes. **ISRN Hematology**, v.2014, p.1-5, 2014.

VIANA-BARACIOLI, L.M.S.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; PAGLIUSI, R.A.; NAOUM, P.C.. Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, n. 1, p. 31-39, 2001.

VIEIRA, D.A.; STELUTI, J.; VERLY-JR, E.; MARCHIONI, D.M.; FISBERG, R.M. Brazilians' experiences with iron fortification: evidence of effectiveness for reducing inadequate iron intakes with fortified flour policy. **Public Health Nutrition**, doi: https://doi.org/10.1017/S1368980016001981, 2016.

VINKEN, A.G.; BATHALON, G.P.; SAWAYA, A.L.; DALLAL, G.E.; TUCKER, K.L.; ROBERTS, S.B. Equations for predicting the energy requirements of healthy adults aged 18-81y.**The American journal of clinical nutrition**, v.69, n.5, p.920-6, 1999.

WEATHERALL, D. J. The thalassemias: disorders of globin synthesis. In: KAUSHANSKY, K.;LICHTMAN, M., et al (Ed.). **Williams Hematology**. 8a. New York: McGraw-Hill, 2010. Cap. 47, p.675-707.

WEISS, G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis. **Gastroenterology and Hepatology**, v.7, 2010.

WHITE, J.M.; RICHARDS, R.; JELENSKI, G.; BYRNE, M.; ALI, M. Iron state in alpha and beta thalassaemia trait. **Journal of Clinical Pathology**, v.39, n.3, p.256-259, 1986.

WHITFIELD, J.B.; CULLEN, L.M.; JAZWINSKA, E.C.; POWELL, L.W.; HEATH, A.C.; ZHU, G.; et al. Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins. **American Journal of Human Genetics**, v.66, n.4, p.1246-1258, 2000.

WHITFIELD, J.B.; TRELOAR, S.; ZHU, G.; POWELL, L.W.; MARTIN, N.G. Relative importance of female-specific and non-female-specific effectson variation in iron stores between women. **British Journal of Haematology**, v.120, n.5, p.860-6, 2003.

WHO – World Health Organization**. Assessing the iron status of populations**. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 2007.

WHO – World Health Organization. **Guidelines on food fortification with micronutrients** by ALLEN, L.; BENOIST, B.; DARY, O.; HURRELL, R. Geneva: World Health Organization and Food and Agricultutal Organization of the United Nations; 127p., 2006.

WHO – World Health Organization. **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation**. Geneva: World Health Organization, 2000.

WHO – World Health Organization. Report: **Priorities in the assessment of vitamin A and iron status in populations**. Panama City, Panama, 15–17 September 2010. Geneva: World Health Organization, 2012.

WHO – World Health Organization. **Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations**. Geneva: World Health Organization, 2011.

WILLET, W. **Nutritional Epidemiology**. 2ª ed. New York: Oxford University Press, 1998.

WILLETT, W.C.; HOWE, G.R.; KUSHI, L.H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64. n. 4, p. 1220-1228, 1997.

WILSON, M.M.; AL-WAKEEL, H.; SAID, F.; EL-GHAMRAWY, M.; ASSAAD, M.; EL-BESHLAWY, A. Study of the effect of HFE gene mutations on iron overload in Egyptian thalassemia patientsEgyptian. **Journal of Medical Human Genetics**, v.16, n.2, p.129–133, 2015.

WLAZLO, N.; VAN-GREEVENBROEK, M.M.; FERREIRA, I.; JANSEN, E.H.; FESKENS, E.J.; et al. Iron metabolism is prospectively associated with insulin resistance and glucose intolerance over a 7-year follow-up period: the CODAM study. **Acta Diabetologica**, 2014.

WU, C.J.; KRISHNAMURTI, L.; KUTOK, J.L.; BIERNACKI, M.; ROGERS, S.; ZHANG, W.; et al., Evidence for ineffective erythropoiesis in severe sickle cell disease. **Blood**, v.106, n.10, 3639-45, 2005.

WU, X.G.; WANG, Y.; WU, Q.; CHENG, W.H.; LIU, W.; ZHAO, Y.; et al. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. **Blood**, v.124, n.8, p.1335-43, 2014.

YAMSRI, S.; SANCHAISURIYA, K.; FUCHAROEN, S.; FUCHAROEN, G.; JETSRISUPARB, A.; WIANGNON, S.; et al. H63D mutation of the hemochromatosis gene and serum ferritin levels in Thai thalassemia carriers. **Acta Haematologica**¸v.118, n.2, p.99-105, 2007.

YE, K.; CAO, C.; LIN, X.; O'BRIEN, K.O.; GU, Z. Natural selection on HFE in Asian populations contributes to enhanced non-heme iron absorption. **BMC genetics**, doi: 10.1186/s12863-015-0223-y, 2015.

ZANELLA, A.; BAROSI, G.; BERZUINI, A.; COLOMBO, M.B.; QUAGLINI, S.; VOLPES, D.; SIRCHIA, G. Relative iron deficiency in hereditary spherocytosis. **American Journal of Hematology**, v.31, n.2, p.81-6, 1989.

ZANELLA, A.; BIANCHI, P.; IURLO, A.; BOSCHETTI, C.; TAIOLI, E.; VERCELLATI, C.; et al. Iron Status and HFE Genotype in Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency: Study of Italian Cases. **Blood cells, molecules and disease**, v.27, n.3, p.653-61, 2001.

ZARIBAF, F.; ENTEZARI, M.H.; HASSANZADEH, A.; MIRZAIAN, S. Association between dietary iron, iron stores, and serum lipid profile in reproductive age women. **Journal of education and health promotion**, v.21, p.3-15, 2014.

ZIMMERMANN, M.B.; CHAOUKI, N.; HURRELL, R.F. Iron deficiency due to consumption of a habitual diet low in bioavailable iron: a longitudinal cohort study in Moroccan children. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 80; n. 4-5, p. 249-256, 2005.

ZIMMERMANN, M.B.; FUCHAROEN, S.; WINICHAGOON, P.; SIRANKAPRACHA, P.; ZEDER, C.; GOWACHIRAPANT, S.; et. al. Iron metabolism in heterozygotes for hemoglobin E (HbE), alpha-thalassemia 1, or beta-thalassemia and in compound heterozygotes for HbE/beta-thalassemia. **The American journal of clinical nutrition**, v.88, n.4, p.1026-31, 2008.

ZIMMERMANN, M.B.; HARRINGTON, M.; VILLALPANDO, S.; HURRELL, R.F. Nonheme-iron absorption in first-degree relatives is highly correlated: a stable-isotope study in mother-child pairs. **The American journal of clinical nutrition**, v.91, n.3, p.802-7, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(ESTUDO 1)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: "Avaliação de variantes do gene *TMPRSS6* e sua relação com o status do ferro em mulheres saudáveis na idade reprodutiva"

Nome:.....

Doc. De Identidade Nº:..... **Data de Nascimento:**...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefones:.....

Duração da pesquisa: vinte e quatro meses

Prezada senhora,

Meu nome é Célia Colli, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), e juntamente com o nutricionista Eduardo De Carli, convidamos você a participar do nosso estudo em que avaliaremos, em mulheres estudantes da Universidade de São Paulo, a relação que o conteúdo de ferro da dieta tem com a quantidade desse mineral no sangue, e também verificar a influência que algumas características genéticas têm sobre essa relação.

Serão incluídas nesta pesquisa mulheres saudáveis com idades entre 18 e 45 anos, não gestantes, não lactantes e que não apresentem doenças previamente diagnosticadas.

Se você concordar em participar, precisaremos que preencha um questionário que será enviado por *e-mail*. De acordo com as respostas, serão selecionadas as mulheres que atenderem os critérios de inclusão no estudo. Caso você seja selecionada, enviaremos um novo *e-mail* com instruções para que, em três diferentes dias da semana (dois entre segunda e sexta-feira e um do final de semana), você faça o registro *online* de todos os alimentos e bebidas que consumir.

Cumprida esta etapa, avaliaremos a precisão das informações fornecidas e, se o que for relatado nos seus registros alimentares estiver de acordo com as instruções dadas por *e-mail*, nós agendaremos data e horário para que você compareça à FCF/USP, em jejum de 8 horas, para coletarmos amostras de sangue.

Serão colhidos 20 mL de sangue para a realização de exames hematológicos (hemograma, reticulócitos e traço β-talassêmico), do *status* do ferro (ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro, saturação da transferrina, ferritina sérica, receptor solúvel de transferrina e hepcidina), do *status* inflamatório (PCR – proteína C reativa e AGP – Alfa1-glicoproteína Ácida) e para extração de DNA. O DNA coletado será usado para investigar as variações de dois genes que participam do metabolismo do ferro, chamados *TMPRSS6* e *HFE*.

O risco associado a este estudo é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

O seu material genético e sangue serão armazenados no Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e serão mantidos em biorrepositório, sem a identificação de seu nome, pois utilizaremos códigos de identificação. As amostras poderão ser utilizadas em pesquisas futuras sobre dieta e saúde. Se essas pesquisas futuras ocorrerem, o novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, solicitaremos sua permissão para o uso desse material.

A sua participação neste estudo é voluntária, portanto, você não receberá qualquer pagamento por sua participação. Os resultados dos exames de sangue e da avaliação dietética serão enviados a você por *e-mail*. Todos os resultados poderão ser disponibilizados quando você o solicitar. Caso for identificada alguma alteração importante nos exames hematológicos e bioquímicos realizados, você será encaminhada à Dra. Maria Stella Figueiredo (CRM.SP.44403), médica hematologista colaboradora do estudo.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Caso isso ocorrer, você poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da FCF/USP, onde estarão guardados.

Os dados e os resultados obtidos serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates. Eles poderão colaborar para medidas de prevenção da deficiência de ferro na população.

Você receberá duas cópias deste documento (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) sendo que uma ficará com você e outra ficará comigo. Informamos ainda que, caso haja algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizada.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Dra. Célia Colli (tel: 3091-1483; e-mail: cecolli@usp.br) ou com o aluno Eduardo De Carli (tel: 3091-3651; e-mail: edecarli@usp.br).

O Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da FCF/USP fica localizado na Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 14, Cidade Universitária, São Paulo – SP, CEP: 05508-000.

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para investigações futuras que tenham o mesmo objetivo da presente pesquisa? ____SIM ____NÃO

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ____SIM ____NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

_____	_____
Assinatura do sujeito da pesquisa	**Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)**

Assinatura da Testemunha

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13ª – Butantã – São Paulo – CEP 05508-900. Fone: 3091-3622, fone-fax: 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br

APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO DE ELEGIBILIDADE (ESTUDO 1)

QUESTIONÁRIO DE ELEGIBILIDADE

QUESTIONÁRIO

Nos últimos 2 anos, você:

1.1. Esteve grávida ou amamentando? (*1*) SIM (*2*) NÃO

1.2. Teve o ciclo menstrual regular (ciclo de 28±7 dias)? (*1*) SIM (*2*) NÃO

1.3. Doou sangue alguma vez? (*1*) SIM (*2*) NÃO

1.4. Sofreu acidente com perda importante de sangue OU foi submetida à cirurgia de grande porte OU recebeu transfusão de sangue? (*1*) SIM (*2*) NÃO

1.5. Foi alguma vez diagnosticada com parasitose intestinal? (*1*) SIM (*2*) NÃO

Nos últimos 6 meses e atualmente:

1.6. Você fez grandes mudanças nos seus hábitos alimentares (ex.: dieta para emagrecimento, para redução de colesterol, para redução de sal, etc.)? (*1*) SIM (*2*) NÃO

1.7. Qual é seu peso atual?_____kg

1.8. Qual é sua estatura?_____m

1.9. Qual foi seu peso habitual nos últimos 6 meses? _____kg

1.10. Fez/faz uso contínuo de medicamento (exceto anticoncepcionais) ou suplemento vitamínico-mineral? (*1*) SIM (*2*) NÃO

1.11. Fumou/fuma mais de 10 cigarros ao dia? (*1*) SIM (*2*) NÃO

1.12. Ingeria/ingere mais de 2 doses de bebidas alcoólicas por dia? (*1*) SIM (*2*) NÃO

2 Doses = 2 latas de cerveja (350mL cada) OU 2 taças de vinho (90 mL cada) OU 1 *drink* de destilados (whisky, pinga, vodca, etc – 50 mL)

Você tem diagnóstico de alguma doença crônica? (*1*) SIM (*2*) NÃO

Diabetes Mellitus, Hipertensão, Dislipidemia, Sobrecarga de ferro, Talassemia, Doença inflamatória intestinal, Úlcera gástrica, Doença celíaca, Doenças hemorrágicas, Doenças Renais, Doenças Hepáticas (doenças do fígado), Doenças

APÊNDICE 3 – INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DE REGISTROS ALIMENTARES NO SISTEMA NUTRIQUANTI (ESTUDO 1)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DE REGISTROS ALIMENTARES

O que é um registro alimentar?

É um relato de todos os alimentos e/ou bebidas (exceto água pura) consumidos ao longo de um dia, desde a hora que se acorda até a hora que se vai dormir. As quantidades (porções) consumidas são informadas em medidas caseiras (por exemplo: 01 copo, 02 unidades grandes, ½ prato, etc.).

Para o estudo de que você está participando, são necessários três registros alimentares:

a) Dois em dias da semana (por exemplo, um na segunda-feira e outro na quarta-feira)
b) Um em um dia do final de semana (por exemplo, domingo).

Esses registros alimentares serão feitos um após o outro (não necessariamente na ordem apresentada acima), pela *internet*, com o sistema *online* Nutriquanti. Depois de finalizar um dia de registro, você receberá um *e-mail* informando que o sistema está liberado para que faça um novo registro, no dia que achar conveniente. Muita atenção deve ser dada ao dia em que o registro é feito (ver itens a e b)

Os 3 registros alimentares deverão ser finalizados dentro do prazo máximo de 2 semanas após o recebimento do *login* e senha de acesso.

Como fazer os registros alimentares no Nutriquanti?

Há duas possíveis maneiras.

No dia em que deseja fazer o registro alimentar, você pode:

1) após cada refeição (incluindo pequenos lanches), anotar, em papel, **o tipo de refeição** (por exemplo, lanche da manhã), **o(s) alimento(s) e/ou bebida(s)** consumido(s) e **sua(s) quantidade(s)**, para que, em outro horário, você transcreva essas informações no sistema.
2) após cada refeição, acessar o sistema e fazer o registro do que acabou de ser consumido.

Para o acesso ao Nutriquanti, as seguintes ferramentas são necessárias:

- Computador ou dispositivo móvel com sistema iOS, Android ou Blackberry;
- Internet;
- Microsoft Internet Explorer, Firefox, Safari ou Google Chrome.

Basta acessar a página www.zeroonze.com.br/pesquisa/recordatório e fornecer *login* e senha individuais (enviados ao seu *e-mail*).

Ao chegar na interface de registro alimentar, desça até o final da página e clique no botão AJUDA para ler instruções breves e dicas gerais de preenchimento.

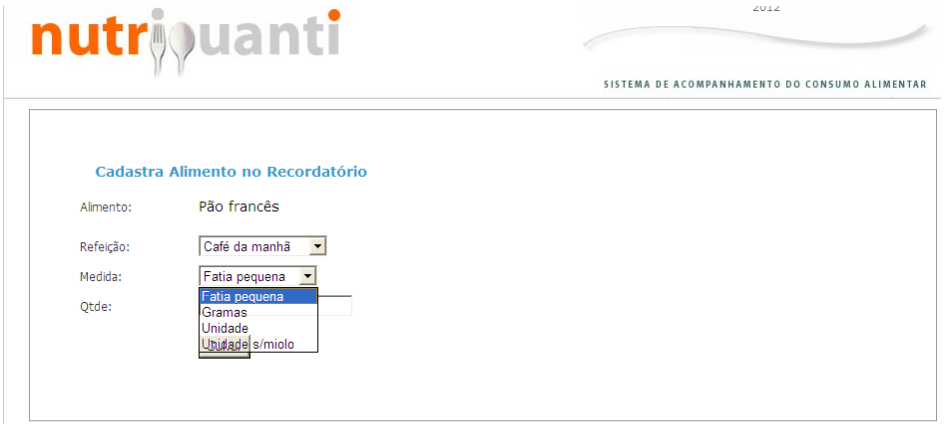
Para iniciar, clique no ícone INSERIR ALIMENTO acima da refeição na qual deseja cadastrar um alimento/receita/bebida. Uma nova página será exibida.

Para buscar o alimento/receita/bebida, você deverá inserir o nome da forma mais simples e conveniente possível, evitando hífens, vírgulas e nomes muito longos ou complexos, podendo até mesmo procurar pela marca do alimento/receita/bebida. Após a digitação, selecione buscar (exemplo da figura abaixo: pão francês).

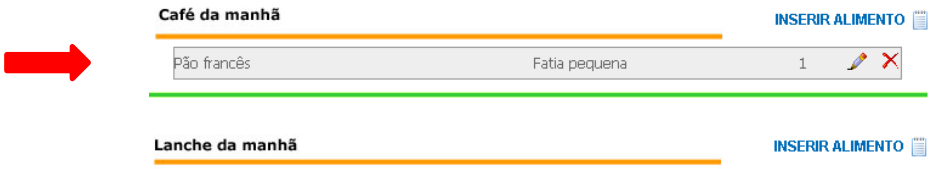
ID	ALIMENTO	GRUPO	ORIGEM	AÇÕES
1462	Pão francês	Pães, tortas e biscoitos salgados	TACO	
2563	Pão francês com manteiga	Pães, tortas e biscoitos salgados	receitas on-line	
4388	Pão francês com manteiga com sal HCor	Cereais e preparações com cereais	receitas on-line	
2436	Pão francês com margarina	Pães, tortas e biscoitos salgados	receitas on-line	
4389	Pão francês com margarina com sal HCor	Cereais e preparações com cereais	receitas on-line	
2694	Pão francês com ovo frito	Sanduíches naturais	receitas on-line	
4113	Pão francês integral	Cereais e preparações com	receitas on-line	

O programa disponibilizará uma lista de opções de alimento/receitas/bebidas que contém a palavra digitada. Ao encontrar o alimento/receita/bebida desejado, selecione .

Em seguida, defina a medida caseira consumida e a sua quantidade (por exemplo: fatia pequena; quantidade 1).



Após este cadastro, o alimento/receita/bebida estará disponível na tela (como mostrado abaixo). Para realizar qualquer alteração, pressione . Se houver a necessidade de excluir o alimento cadastrado pressione .



Repita o processo para cadastrar todos os alimentos/receitas/bebidas em cada refeição do dia. Caso você deseja interromper o registro para continuar mais tarde (quando estiver, por exemplo, registrando o que acabou de ser consumido em cada refeição) clique em Continuar depois e, em outro horário, continue o registro do dia.

No final do cadastro de todos os alimento/receita/bebida consumidos até a última refeição, selecione Finalizar.

IMPORTANTE: NUNCA se esqueça de, no final de cada dia de registro, clicar no botão Finalizar, para que o sistema grave e envie o registro à nossa equipe de nutricionistas. **NUNCA** clique em Finalizar caso você não tenha finalizado todo o registro do dia.

APÊNDICE 4 – INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DE QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA) NO SISTEMA NUTRIQUANTI (ESTUDO 1)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DE QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA) NO SISTEMA NUTRIQUANTI

O que é um QFA?

Consiste em uma série de questões que visam obter informações sobre o consumo usual de alimentos e bebidas de um indivíduo, num período específico pré-determinado.

No QFA que você responderá, pretendemos coletar informações sobre como foi seu consumo habitual de alguns itens alimentares nos últimos 12 meses. Assim, ao responder cada questão, por favor, pense em como foi, em média, o consumo dos alimentos ou bebidas listados, no último ano.

Como responder ao QFA no Nutriquanti?

O preenchimento do QFA é feito em 5 etapas. Em cada etapa, serão exibidas, em tela, 20 questões. Ao ser questionada sobre o seu costume de comer ou beber determinado alimento ou bebida:

1) Pense se o(s) item (itens) em questão foi (foram) ou não consumido(s) no último ano e se este consumo foi frequente (diariamente ou semanalmente) ou eventual (mensalmente ou anualmente).

2) Para alimentos ou bebidas em questão cujo consumo, no último ano, tenha sido igual a zero, assinale a opção ◉ Não . Por outro lado, caso tenha tido algum consumo, clique em ◉ Sim . Um quadro semelhante ao mostrado abaixo será exibido:

1. Este consumo é por dia, semana, mês ou ano?

D	S	M	A
◉	○	○	○

2. Quantas vezes?

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
◉	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Tente estimar uma frequência que reflita, em média, o hábito durante o período. Siga o raciocínio dos exemplos abaixo:

Questão Ex.1: 23. O(a) Sr(a) costuma consumir feijão (carioca, roxo, preto, verde)?

Exemplo de situação 1.1: caso, no último ano, você tenha tido o costume de consumir feijão todos os dias da semana (de segunda a sexta – normalmente no almoço), mas, em geral, não o consumiu em nenhuma das refeições feitas aos finais de semana (sábados e domingos), então, em média, feijão foi consumido 5 vezes por semana.

No questionário, responda que o consumo de feijão foi semanal, S, numa frequência de 5 vezes, 5.

Exemplo de situação 1.2: caso, no último ano, você tenha tido o costume de consumir feijão tanto nos dias de semana quanto nos finais de semana e tanto no almoço quanto no jantar, então, em média, feijão foi consumido 2 vezes por dia.

No questionário, responda que o consumo deste alimento foi diário, D, numa frequência de 2 vezes, 2.

Questão Ex. 2: 15. O(a) Sr(a) costuma consumir café?

Exemplo de situação 2.1: caso, durante os últimos 6 meses, você tenha tido o costume de consumir café todos os dias pelo menos uma vez por dia, então, neste período (que corresponde a metade do ano), você consumiu café diariamente, o que é equivalente a 7 vezes por semana. Contudo, no período anterior a esse (que também corresponde à metade de um ano), você não teve o costume de consumir café. Para estimar uma média de frequência de consumo que reflita o ano todo basta fazer o seguinte cálculo:

> "se 7 vezes por semana foi o consumo durante metade do ano (6 meses), logo, 7 / 2 = 3,5 vezes por semana foi o consumo durante todo o ano"

No questionário, responda que o consumo deste alimento foi semanal, S, numa frequência de 3 ou 4 vezes, 4.

Siga o raciocínio dos exemplos apresentados acima para responder a todas as questões do QFA.

3) À medida que finalizar as respostas das questões em tela, clique em AVANÇAR para prosseguir. Ao finalizar todas as questões, clique em FINALIZAR ao final da página.

APÊNDICE 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(ESTUDO 2)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: Impacto da fortificação compulsória com ferro e ácido fólico em farinhas de trigo e milho na expressão de RNAm dos genes que codificam proteínas associadas ao metabolismo do ácido fólico e ferro e seu papel no estresse oxidativo e na citotoxicidade das células NK"
Nome: _____
Doc de Identidade: _____ Sexo: _____
Data de Nascimento: _____
Endereço: _____ N: _____ Apto: _____
Bairro:_____Cidade:_____
CEP:_____ Telefone: _____
Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e juntamente com os alunos de Doutorado Clóvis Paniz, Eduardo De Carli, Juliano Bertinato, e de mestrado Maylla Rodrigues Lucena, estamos convidando-o (a) a participar do projeto de pesquisa que estamos desenvolvendo em colaboração com a equipe de médicos do Departamento de Hematologia e Oncologia da Escola Paulista de Medicina na UNIFESP e do Ambulatório de Anemias do Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Nesta pesquisa serão incluídos indivíduos em uso de farinhas fortificadas com ácido fólico e ferro (fortificação compulsória). O objetivo desta pesquisa é avaliar os efeito da fortificação compulsória das farinhas com ácido fólico e ferro, uma vez que desde 2004 as industrias de alimentos vem fortificando as farinhas de milho e trigo com estes nutrientes, afim de cumprir uma norma do Ministério da Saúde.

Se você aceitar participar da pesquisa, precisaremos do seu consentimento para coletar amostras de sangue na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP ou na Faculdade de Medicina da UNIFESP e, além disso, precisaremos que você responda a um questionário simples sobre sua alimentação nas últimas 24h. Este questionário será repetido mais duas vezes por telefone em dias posteriores às coletas de sangue.

Em relação à coleta de material, serão colhidos 40 mL de sangue em jejum de 8 horas para a realização do hemograma, dosagem de vitaminas (ácido fólico, vitamina B12 e B6), ferro, ferritina, hepicidina, marcadores inflamatórios

(interleucina-1, 4, 6, 8 e 10), marcadores do estresse oxidativo e testes genéticos (DNA e RNA) para verificar a presença de alterações na expressão de genes, na metilação do DNA e na função de células responsáveis pela defesa do organismo (sistema imune). Os resultados laboratoriais obtidos serão utilizados para compreender melhor os efeitos do ácido fólico e do ferro no seu organismo.

O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Serão avaliadas as expressões de alguns genes do seu DNA (β-globina, interferon-γ, TNF-α, interleucina-8, MTHFR, DHFR, HAMP, BMP6, TMPRSS6, HFE2, SMAD4, ARNT e IL-6), alterações no DNA (metilação, lesões e alterações de sequência – polimorfismos) para verificar o efeito do ácido fólico e do ferro. Será determinada a quantidade de substâncias relacionadas com a defesa do organismo (citocinas), bem como a quantidade de vitaminas. A sua amostra de DNA e sangue serão armazenadas no Laboratório de Hematologia da FCF/USP (biorrepositório), sob minha responsabilidade, e será usado código para identificar a amostra. Caso a amostra seja utilizada para pesquisas futuras, novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e então você será consultado (a) sobre a permissão do uso deste material.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos exames realizados no sangue poderão ser retirados no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP), situado na Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 17, Sala 113. Todos os resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo sem quaisquer penalidades. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do biorrepositório no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos efeitos do tratamento com ácido fólico e também da fortificação de alimentos na população.

Você receberá uma cópia deste termo de consentimento esclarecido (TCLE) e outra cópia assinada por você ficará arquivada em nosso laboratório.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos efeitos da fortificação de alimentos com ácido fólico na população.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3785), ou com os pesquisadores Clovis Paniz (tel: 95361-7329 ou 3091-3785) e Juliano Felix Bertinato (tel: 97962-4240 ou 3091-3785), ou com o Dra. Maria Stella Figueiredo (tel: 2176-7268).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito voluntariamente participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras?__SIM__NÃO
Você quer saber os resultados dos testes genéticos? __SIM__NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

_____ _____
Assinatura do sujeito da pesquisa **Assinatura do pesquisador**
(carimbo ou nome legível)

_____
Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepfcf@usp.br

APÊNDICE 6 – QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO GERAL (ESTUDO 1)

QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO GERAL

Data da coleta de sangue:____/_____/____

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1. Nome:_____

1.2. Idade: _____ **1.2.1. Data de nascimento:**____/_____/____

1.3. Nacionalidade: _____ **1.3.1. Naturalidade:** _____

1.4. Estado Civil: (*1*) Solteira (*2*) Casada (*3*) Divorciada (*4*) Viúva

1.5. Cor da pele: (*1*) Branca (*2*) Negra (*3*) Parda (*4*) Amarela (*5*) Indígena

1.6. País de nascimento do pai: _____ **da mãe:** _____

1.7. Profissão: _____

1.8. Nível de formação atual: (*1*) Graduação (*2*) Especialização (*3*) Mestrado (*4*) Doutorado (*5*) Pós-doutorado

Curso: _____

Faculdade / Instituto: _____

1.9. Endereço: _____

Bairro:_____**Cidade:**_____

Estado:_____**CEP:** _____

E-mails:_____

1.10. Telefones para contato:_____

2. COLETA DE SANGUE

2.1. Horário da coleta de sangue: ___:___hs

2.2. Horário da última refeição no dia anterior à coleta de sangue: ___:___hs

2.3. Quantas horas você dormiu na noite anterior à coleta de sangue? _____horas

2.3.1. Na última noite, seu sono foi como o habitual? (*1*) SIM (0) NÃO

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

3. HISTÓRIA CLÍNICA

3.1. No último mês, você costumou ter algum desses sinais e sintomas?

( ) Fraqueza ( ) Tontura ( ) Suor excessivo ( ) Sonolência
( ) Falta de ar durante esforço ( ) Dores de cabeça ( ) Ansiedade ( ) Insônia
( ) Dificuldade de concentração ( ) Falta de apetite ( ) Queda de cabelo ( ) Palidez
( ) Icterícia (pele amarelada) ( ) Unhas quebradiças ( ) Edema (inchaço) ( ) Azia
( ) Dor estomacal ( ) Refluxo ( ) Prisão de ventre ( ) Diarréia
( ) Presença de sangue nas fezes ( ) Flatulência ( ) Gripes recorrentes ( ) Alergias

Nos últimos 6 meses, você fez uso contínuo de algum medicamento (exceto anticoncepcionais)?

(*1*) SIM (0) NÃO

3.2. No último ano, você fazia uso de medicamento contínuo? (*1*) SIM (0) NÃO

Quais: _____Duração do tratamento:_____ Início do tratamento: _____

Nos últimos 6 meses, você fez uso contínuo de suplemento vitamínico-mineral? (*1*) SIM (0) NÃO

3.3. No último ano, você fazia uso de suplemento vitamínico-mineral? (*1*) SIM (0) NÃO

Quais:_____Tempo de uso:_____ Início do uso: _____

Nos últimos 6 meses, você ingeriu diariamente mais do que 2 doses de álcool? (*1*) SIM (*0*) NÃO

2 Doses = 2 latas de cerveja (350mL cada)
2 taças de vinho (90 mL cada)
1 dose de destilados (whisky, pinga, vodca, etc – 50 mL)

3.4. No último ano, ingeria mais de 2 doses de álcool por dia? (*1*) SIM (*0*) NÃO

Nos últimos 6 meses você fumou diariamente mais de 10 cigarros? (*1*) SIM (*0*) NÃO

3.5. Você é ex- fumante? (*1*) SIM (*0*) NÃO

Por quanto tempo fumou:_____ Nº de cigarros/dia_____ Desde (idade):_____

Nos últimos 2 anos, alguma vez você foi diagnosticada com parasitose intestinal? (*1*) SIM (*0*) NÃO

3.6. Antes dos últimos 2 anos, alguma vez foi diagnosticada com parasitose? (*1*) SIM (*0*) NÃO

3.6.1. Quanto tempo faz desde que tratou a última parasitose intestinal?_____

Você tem diagnóstico de alguma doença crônica?

( ) Obesidade ( ) Diabetes Mellitus ( ) Hipertensão ( ) Dislipidemia ( ) Hemocromatose ( ) Talassemia
( ) Úlcera gástrica ( ) D. celíaca ( ) D. hemorrágicas ( ) D. Renais ( ) D. Hepáticas
( ) D.pancreáticas ( ) D. inflamatória intestinal ( ) Osteoporose ( ) Câncer
( ) Disfunção Hormonal ( ) Outra:_____

Seu pai apresenta/apresentava alguma doença crônica? (*1*) SIM (*0*) NÃO

Quais:_____

Sua mãe apresenta/apresentava alguma doença crônica? (*1*) SIM (*0*) NÃO

Quais:_____

Número de irmãos:_____ **Sexo feminino:**_____ **Sexo masculino:**_____

Algum deles com doença? Quem e qual(is)? _____

4. OBSTÉTRICO-GINECOLÓGICA

4.1. Que idade você tinha quando teve a primeira menstruação?_____

Nos últimos 2 anos, sua menstruação se manteve regular (ciclo de 28±7 dias)? (*1*) SIM (*0*) NÃO

4.2. Quantos dias em média dura sua menstruação? *(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)*

4.3. Qual é em média o intervalo de dias entre uma menstruação e outra? _____DIAS

4.3. Durante o período da menstruação, o fluxo menstrual é mais intenso durante quantos dias? *(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)*

4.3.1 Assinale quais os dias de menstruação o fluxo menstrual é mais intenso?

DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
( )	( )	( )	( )	( )	( )	( )	( )	( )

4.3.2 Nos dias em que o fluxo menstrual é intenso, qual é a quantidade média de absorventes que você utiliza? _____

4.3.3. Nos dias em que o fluxo menstrual é leve, qual é a quantidade média de absorventes que você utiliza? _____

4.4 Assinale abaixo a quantidade (em média) e o(s) tipo(s) de absorvente(s) (externo / interno) que você utiliza em cada dia de menstruação:

Produto	Tipo		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9
Absorvente externo	**Diurno**	**Normal**									
		Super									
	Noturno										
Absorvente interno	**Mini**										
	Normal										
	Grande										

4.5. Numa escala de 1 até 5, onde 1 corresponde a fluxo menstrual pouco intenso e 5 a fluxo menstrual muito intenso, que intensidade você atribui à sua menstruação? (*1*) (*2*) (*3*) (*4*) (*5*)

4.6. Há presença de coágulos na sua menstruação? (*1*) SIM (*0*) NÃO

Nos últimos 2 anos, você esteve grávida ou amamentando? (*1*) SIM (*0*) NÃO

4.7. Antes dos últimos 2 anos, você ficou grávida: (0) Nenhuma vez (*1*) uma (*2*) duas (*3*) três (*4*) quatro (*5*) cinco ou mais vezes

4.7.1. Se sim, quantos partos já teve? (0) Nenhum/não se aplica (*1*) um (*2*) dois (*3*) três (*4*) quatro (*5*) cinco ou mais

4.7.2. Se sim, que tipo de parto: (0) Não se aplica (*1*) Normal (*2*) Cesária

3.7.2. Tempo desde o último parto:_____

3.7.3. Quanto tempo faz desde que parou de amamentar a última vez?_____

4.8. Que método anticoncepcional você usa? (0) Natural (*1*) Oral (*2*) Laqueadura (*3*) DIU (*4*) Camisinha (*5*) Outro:_____

4.8.1. Se você usa anticoncepcional oral, qual?_____ **Há quanto tempo?**_____

4.8.2. Se usa DIU, há quanto tempo?_____

4.9. Alguma vez fez tratamento para engravidar? (*1*) SIM (*0*) NÃO

5. HISTÓRICO DE PERDAS DE SANGUE

Nos últimos 2 anos, você doou sangue alguma vez? (*1*) SIM (*0*) NÃO

5.1. Antes dos últimos 2 anos, quantas vezes você doou sangue? (0) Nenhuma (*1*) uma (*2*) duas (*3*) três (*4*) quatro (*5*) cinco ou mais

5.1.1. Quanto tempo faz desde a sua última doação?_____

Nos últimos 2 anos, você sofreu acidente ou foi submetida a cirurgia com perda importante de sangue? (*1*) SIM (*0*) NÃO

Nos últimos 2 anos, você recebeu transfusão de sangue alguma vez? (*1*) SIM (*0*) NÃO

5.2. Quando foi o último dia de sua menstruação? *(1)* Há menos de 1 semana *(2)* Entre 1 e 2 semanas *(3)* Entre 3 e 4 semanas *(4)* Há mais de 4 semanas

6. HISTÓRICO COMPORTAMENTAL

Nos últimos 6 meses, você fez grandes mudanças nos seus hábitos alimentares? (*1*) SIM (*0*) NÃO

6.1. Antes dos últimos 6 meses, você alguma vez mudou seus hábitos alimentares ou fez dieta para emagrecer ou por qualquer outro motivo?

(*0*) Não (*1*) Sim, para emagrecer (*2*) Sim, por orientação médica
(*3*) Sim, para dieta vegetariana ou redução de consumo de carnes (*4*) Sim, para redução de sal
(*5*) Sim, para redução do colesterol (*6*) Sim, para ganho de peso
( ) Outro motivo:_____

6.1.1. Quanto tempo faz desde que mudou seus hábitos alimentares?_____

6.2. Que classificação você dá para sua dieta atual:

(*1*) Onívora (consumo produtos de origem animal e vegetal sem restrições)

(*2*) Ovo-lacto-vegetariana (consumo leite e ovos, mas não consumo nenhum tipo de carne ou peixes)

(*3*) Vegetariana estrita (não consumo nenhum produto de origem animal)

(4) Outra:_____

6.3. Habitualmente, com que frequência (vezes/semana) você faz as seguintes refeições?

6.3.1. Café da manhã:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
6.3.2. Lanche da manhã:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
6.3.3. Almoço:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
6.3.4. Lanche da tarde:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
6.3.5. Jantar:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
6.3.6. Lanche à noite:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)

6.4. Onde você costuma fazer a maior parte das suas refeições?

(*1*) Em casa (*2*) Em restaurantes universitários (*3*) Em restaurantes comerciais (*4*) Padarias

(*5*) Lanchonetes universitárias (*6*) Lanchonetes comerciais ( ) Outro:_____

6. HISTÓRICO COMPORTAMENTAL (cont.)

Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) – Versão 8 curta

As questões a seguir servirão para que saibamos que tipo de atividade física você faz, como parte de seu dia a dia, e o tempo que você gastou para isso na **ÚLTIMA** semana. Essas atividades incluem as que você faz no trabalho, as que você faz para se deslocar na cidade por qualquer motivo ou que são parte de suas atividades em casa.. Por favor, responda cada questão mesmo que você considere que não seja ativa.

Para responder as questões lembre-se que:
Atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal
Atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez:

1ª Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

_____dias por **SEMANA** ( ) Nenhum

Tempo em cada dia?

DIA	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	SÁB	DOM
TEMPO							

2ª Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo, pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal, ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (NÃO INCLUA CAMINHADA).

_____dias por **SEMANA** ( ) Nenhum

Tempo em cada dia?

DIA	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	SÁB	DOM
TEMPO							

6. HISTÓRICO COMPORTAMENTAL (cont.)

3ª Em quantos dias da última semana você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, com por exemplo, correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

_____dias por **SEMANA** ( ) Nenhum

Tempo em cada dia?

DIA	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	SÁB	DOM
TEMPO							

Essas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo o dia, no trabalho, na faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa, visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4ª Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____horas _____minutos

4ªb Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de final de semana**?

_____horas _____minutos

7. QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO

1) **Para responder às questões a seguir, considere a <u>casa de sua família.</u>**

Para aparelhos domésticos em geral deve-se considerar os seguintes casos:

Bem alugado em caráter permanente;

Bem emprestado de outro domicílio há mais de 6 meses;

Bem quebrado há menos de 6 meses.

<u>Não considerar os seguintes casos:</u>

Bem emprestado para outro domicílio há mais de 6 meses;

Bem quebrado há mais de 6 meses;

Bem alugado em caráter eventual;

Bem de propriedade de empregados ou pensionistas

7. QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO (cont.)

POSSSE DE ITENS: Marque com um **"X"** a quantidade de itens de cada equipamento que possui em casa.

	QUANTIDADE DE ITENS				
Televisão em cores: próprio ou emprestado há mais de 6 meses ou quebrado há menos de 6 meses. De uso de empregados, considerar se for adquirido pela família empregadora.	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Rádio: qualquer tipo que seja capaz de sintonizar emissoras. Não considerar rádios de automóveis.	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Banheiro: deve conter vaso sanitário. Considerar somente os banheiros privativos do domicílio. Os banheiros coletivos (que servem a mais de uma habitação) não devem ser considerados.	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Automóvel: não considerar veículos para uso profissional ou para fretes (vans, taxis, *pick up*). Veículos de uso misto (lazer e profissional) não devem ser considerados.	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Empregada mensalista: Não se refere a regime de salário, mas se trabalha pelo menos 5 dias por semana, dormir ou não no emprego. Considerar babás, motoristas, copeiras, cozinheiras, arrumadeiras.	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Máquina de lavar: automáticas ou semi-automáticas. Não considerar tanquinho.	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Videocassete e/ou DVD.	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Geladeira	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	(0)	(1)	(2)	(3)	(4/+)

2) Marque com "X" uma única resposta. Considere o grau de instrução do chefe de família.

(0) Analfabeto/Fundamental 1 Incompleto

(1) Fundamental 1 Completo / Fundamental 2 Incompleto

(2) Fundamental 2 Completo / Médio Incompleto

(3) Médio Completo / Superior Incompleto

(4) Superior completo

7. QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO (cont.)

3) Qual sua situação atual de moradia?

(0) Moro Sozinho;
(1) Com o pai, a mãe ou ambos;
(2) Com o cônjuge;
(3) Em casa de familiares;
(4) Com outras pessoas;
(5) Pensão/Hotel/Pensionato;
(6) República;
(7) Moradia mantida pela família;
(8) Moradia pertencente e/ou mantida pela universidade;
(9) Outras moradias coletivas (religiosa, pública, etc.).

4) Qual a sua situação atual de trabalho?

(0) Bolsita
(1) Trabalha como contratado
(2) Apenas estudando por decisão própria
(3) Fazendo estágio
(4) Desempregado e procurando emprego
(5) Fazendo bico / free lancer
(6) Autônomo
(7) Empresário

5) Qual a renda bruta mensal familiar? (soma da renda bruta referente a salários, aluguéis, pensões, etc...)_____

6) Quantas pessoas, incluindo você, vivem da renda mensal familiar?_____

7) Qual a sua participação na vida econômica de sua família?

(0) Sou sustentado por minha família ou por outras pessoas;
(1) Recebo ajuda financeira da minha família ou de outras pessoas;
(2) Sou responsável apenas pelo meu próprio sustento;
(3) Sou responsável pelo meu sustento e contribuo para o sustento familiar;
(4) Sou o responsável principal pelo sustento familiar.

8. ANTROPOMETRIA

PESO:

1ª tomada:_____m 2ª tomada:_____m 3ª tomada:_____m

Média:_____m

ESTATURA:

1ª tomada:_____m 2ª tomada:_____m 3ª tomada:_____m

Média:_____m

CIRCUNFERÊNCIA DA CINTURA:

1ª tomada:_____cm 2ª tomada:_____cm 3ª tomada:_____cm

Média:_____m

APÊNDICE 7 – CONSTRUÇÃO DE BASE DE DADOS DE FERRO HEME, FITATOS, POLIFENÓIS, FERRO DE FORTIFICAÇÃO MANDATÓRIA DE FARINHAS DE TRIGO E MILHO, CARNES, OVOS E PROTEÍNA DE SOJA EM ALIMENTOS CONSUMIDOS POR ADULTOS DE SÃO PAULO (ESTUDOS 1 E 2)

Para controle de qualidade das avaliações do consumo alimentar em estudos conduzidos pelo Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da FCF/USP, criou-se uma lista das principais referências de composição química de alimentos utilizadas pelo sistema Nutriquanti para calcular o conteúdo de macro e micronutrientes de dietas. Um banco de itens alimentares aparentemente consumidos por adultos de São Paulo foi compilado a partir de alimentos, bebidas e preparações descritos em 473 inquéritos alimentares coletos nos anos de 2013 e 2014 entre adultos com variadas idades e condições socioeconômicas, residentes nos municípios de São Paulo-SP e Sorocaba-SP, participantes de dois estudos em andamento no laboratório.

Um total de 1118 itens alimentares foi selecionado. Destes, 364 foram referentes a preparações elaboradas, cuja composição química foi calculada a partir de ingredientes descrito em de suas receitas padronizadas de publicações nacionais ou de sítios eletrônicos sobre o tema. Mais de 75% dessas receitas foram obtidas das publicações de Pinheiro e colaboradores (2008) ou Fisberg & Villar (2002).

Os demais 754 itens alimentares compilados no banco incluíam os alimentos utilizados para o preparo de receitas, bem como alimentos crus ou preparados cujo conteúdo de macro e micronutrientes foi obtido de tabelas de composição química de alimentos nacionais e internacionais, rótulos comerciais ou de sítios eletrônicos dos fabricantes. As tabelas TACO (2006), USDA (2014) e IBGE (1996) foram utilizadas para atribuir valores de composição química a 44,3, 22,5 e 5,4% dos alimentos do banco, respectivamente.

Para alimentos industrializados específicos, cuja composição de macronutrientes foi obtida de rótulos comerciais ou de referências da *internet* (15% do total de alimentos no banco), dados faltantes de micronutrientes foram imputados a partir de outros alimentos ou preparações similares descritos nas tabelas TACO e USDA. No total, valores zero de ferro total, vitamina C e cálcio foram assumidos para apenas 59 itens alimentares (5,3%) do banco.

O conteúdo de ferro heme, fitato e polifenóis dos alimentos foi obtido de publicações nacionais e internacionais, referenciadas nas Figuras 1, 2 e 3,

respectivamente. Esses valores foram inseridos no sistema Nutriquanti como variáveis de composição química de alimentos adicionais àquelas presentes nas tabelas acima referenciadas.

O conteúdo de ferro heme de carnes foi calculado a partir de valores específicos de porcentagem do ferro total do alimento estimados para carnes de diferentes procedências após processamento por calor úmido ou seco. Foram selecionadas as referências que utilizaram o método de determinação de ferro heme descrito por Hornsey (1956) e modificado por Carpenter & Clark (1995) (SCHONFELDT & HALL, 2011; MISTURA, 2006; KONGKACHUICHAI, NAPATTHALUNG & CHAROENSIRI, 2002; HALBERG & HULTHEN, 2000). Como ilustrado na Figura 1, a maior parte dos alimentos do grupo “Carnes e ovos” teve valores de ferro heme estimado.

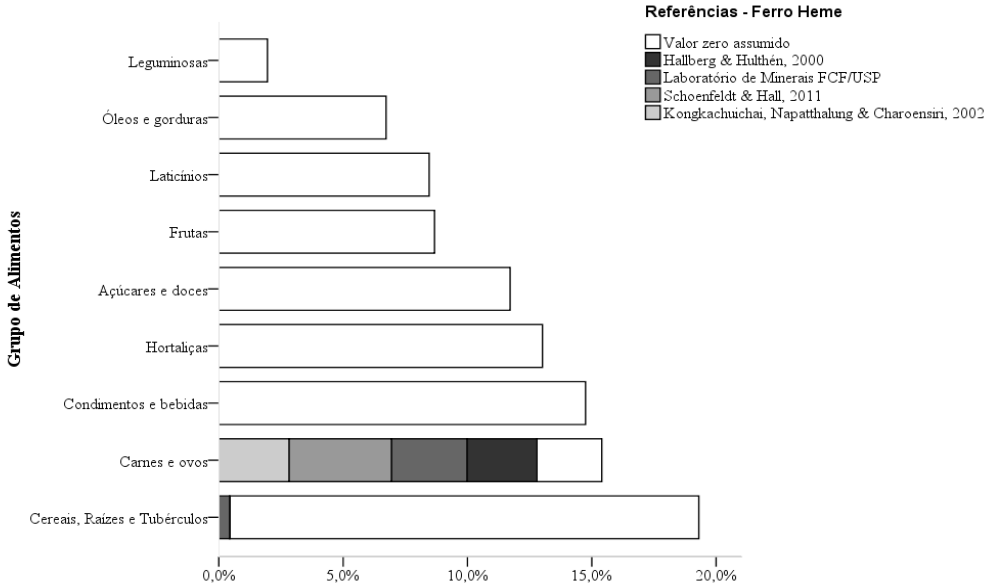


Figura 1. Ferro heme em 754 itens distribuídos em nove grupos de alimentos.

Fitato (inositol hexafosfato) é um composto utilizado por plantas para armazenamento de fósforo. Como ilustrado na Figura 2, todos os alimentos dos grupos “Cereais raízes e tubérculos” e “Leguminosas e Oleaginosas”, bem como a maioria daqueles dos grupos “Hortaliças” e “Frutas”, que são alimentos de origem vegetal, tiveram valores de fitato estimados e inseridos no sistema Nutriquanti. As referências utilizadas foram as que utilizaram o método de resina de troca iônica para determinação de fitato, recomendado pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), ou métodos adaptados deste (HALBERG & HULTHEN, 2000;

HARLAND & OBERLEAS, 1993; MARFO & OKE, 1988 *apud* FAO, 1990). As determinações expressam o conteúdo de inositol fosfato nos alimentos, incluindo compostos contendo menos de seis grupos fosfatos ligados à molécula de inositol. Visto que o grau de ligação do inositol fosfato com o ferro é relacionado com o seu número de grupamentos fostato, valores de inositol fosfato foram expressos como equivalente de inositol hexafosfato pelo fator de conversão (HALBERG & HULTHEN, 2000):

1 mg de inositol fosfato = 5,56 µmol de ácido fítico = 3,53 mg de fitato

Grupamentos galoil presentes na estrutura de compostos polifenólicos (ácido gálico, ácido tânico, ácido clorogênico, entre outros) são apontados como os responsáveis por suas capacidades de ligar e precipitar íons ferro. O conteúdo de polifenóis ligantes de ferro nos alimentos, determinado por método espectrofotométrico desenvolvido por Brune, Hallberg & Skanberg, 1991, foi imputado para algumas bebidas, condimentos, frutas e hortaliças do banco (Figura 3) (HALBERG & HULTHEN, 2000). Os valores foram expressos como equivalentes de ácido tânico.

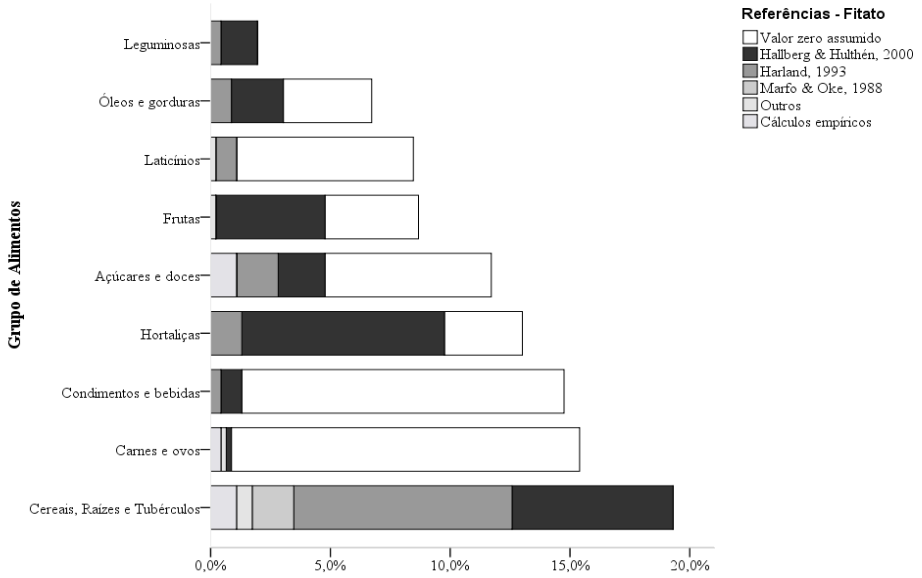


Figura 2. Fitato em 754 itens distribuídos em nove grupos de alimentos.

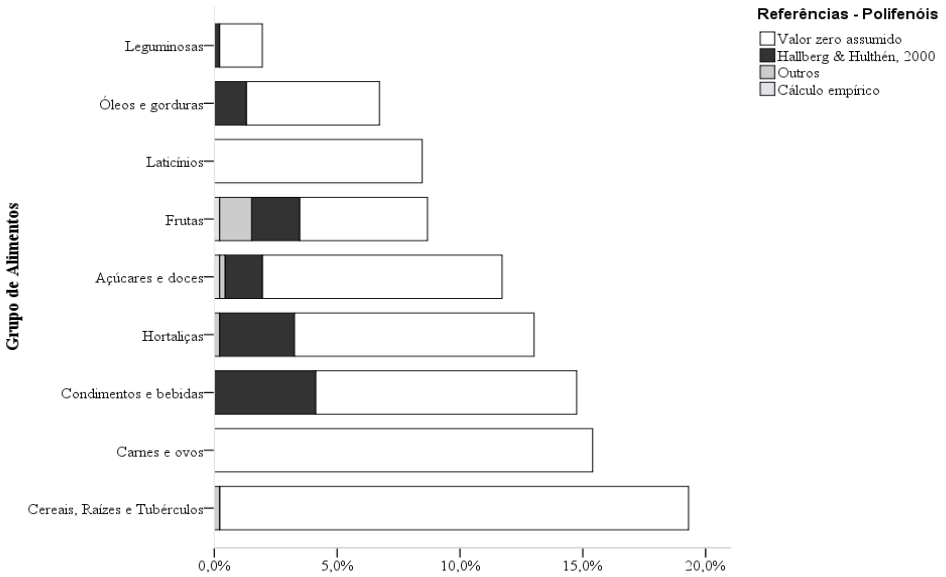


Figura 3. Polifenóis em 754 itens distribuídos em nove grupos de alimentos.

O conteúdo de ferro derivado da fortificação mandatórios de farinhas de trigo e milho em alimentos foi calculado a partir do conteúdo destas farinhas em biscoitos, massas, pães, bolos, cereais matinais e salgadinhos. Utilizou-se, para isto, fichas técnicas de preparações caseiras (FISBERG & VILLAR, 2002; PINHEIRO et al., 2000; ARAÚJO & GUERRA, 1995). Os mesmos valores obtidos para as preparações caseiras foram assumidos para as versões industrializadas dos alimentos. Alimentos contendo farinha de trigo e cujas composições químicas foram derivadas da tabela USDA tiveram valor de ferro total corrigido pela diferença na dosagem da fortificação mandatório com ferro entre o Brasil (0,042 mg de ferro fortificante por grama) e os Estados Unidos (0,044 mg de ferro fortificante por grama). As farinhas de bijú, flocão e farinha de trigo integral não foram consideradas fontes de ferro fortificante, como previsto na legislação (BRASIL, 2002).

Assim como para as farinhas, o conteúdo de carnes, ovos e proteína de soja dos alimentos foi estimado a partir de fichas técnicas de preparação. O conteúdo de carnes foi expresso como gramas de tecido cru para atender a exigência dos algoritmos de estimativa de biodisponibilidade de bioacessibilidade do ferro (HALBERG & HULTHEN, 2000; RICKARD et al., 2009). Para converter o peso de carnes preparadas em equivalentes de tecido cru, foi adotado o fator de conversão proposto por Monsen & Balintfy (1982):

1 g de carne preparada (cozida, frita ou grelhada) = 1,3 g de tecido cru

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M.O.D. GUERRA, T. M. M. **Alimentos "Per Capita".** 2. ed. Natal: Editora Universitária - UFRN, 1995.

BRASIL. **Resolução RDC n. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico.** Brasília.: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2002.

BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKÅNBERG, A.B. Determination of Iron-Binding Phenolic Groups in Foods. **J. Sci. Food Agric**., v. 56, n. 1, p. 128–131, 1991.

CARPENTER, C.E.; CLARK, E. Evaluation of methods used in meat iron analysis and iron content of raw and cooked meats**. J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1824–1827, 1995.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roots, tubers, plantains and bananas in human nutrition. Roma, 1990.

FISBERG, R.M.; VILLAR, B.S. **Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares: manual elaborado para auxiliar o processamento de inquéritos alimentares.** São Paulo (SP): Signus; 2002.

HALLBERG, L.; HULTHÉN, L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. **Am J Clin Nutr,** v. 71, n. 5, p. 1147-1160, 2000.

HARLAND, B.F. OBERLEAS , D. Phytate contents of foods. In: Spiller, G.A, editor. **CRC handbook of dietary fiber in human nutrition**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press; 1993.

HORNSEY, H.C.. The color of cooked curd pork. I. Estimation of the nitric-oxide–heme pigment. **J. Sci. Food Agric**., v. 7, p. 534–540, 1956.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estudo Nacional de Despesa Familiar. Tabela de composição de alimentos. 4. Ed. Rio de Janeiro, 1996.

MISTURA, L.P.F. **Cinética de ruptura do ferro heme em carne bovina (coxão mole – semi membranosus) submetida a diferentes tratamentos térmicos.** Tese [Doutorado] – Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2006.

Monsen, E.R.; Balintfy, J.L. Calculating dietary iron bioavailability: refinement and computerization. **J Am Diet Assoc**., v. 80, n. 4, p. 307-311, 1982.

PINHEIRO, A.B.V. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

R. KONGKACHUICHAI, R.; NAPATTHALUNG, P.; CHAROENSIRI, R. Heme and Nonheme Iron Content of Animal Products Commonly Consumed in Thailand. **J. Food Comp. Anal.,** v.15, n. 4, p. 389–398, 2002.

RICKARD, A. P. et al. An algorithm to assess intestinal iron availability for use in dietary surveys. **Br J Nutr,** v. 102, n. 11, p. 1678-85, 2009.

SCHÖNFELDT, H.C.; HALL' N.G. Determining iron bio-availability with a constant heme iron value **Food Comp. Anal.**, v. 24, n. 4–5, p. 738–740, 2011.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Versão II. 2. ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, São Paulo, 2006.

USDA – United States Department of Agriculture. Table of Nutrient Retention Factors, 2014. Disponível em <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>

APÊNDICE 8 – QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DE PERDAS OU REPOSIÇÃO DE SANGUE, MUDANÇAS ALIMENTARES E HISTÓRIA OBSTÉTRICO-GINECOLÓGICA (ESTUDO 2)

HISTÓRICO DE PERDAS OU REPOSIÇÂO DE SANGUE

1. Nos últimos 2 anos, você doou sangue alguma vez? (*1*) SIM (*0*) NÃO

1.1. Quantas vezes você já doou sangue? (0) Nenhuma (*1*) uma (*2*) duas (*3*) três (*4*) quatro (*5*) cinco ou +

1.1.1. Quanto tempo faz desde a sua última doação de sangue?_____

2. Nos últimos 2 anos, você recebeu transfusão de sangue alguma vez? (*1*) SIM (*0*) NÃO

2.1. Quantas transfusões você já recebeu? (0) Nenhuma (*1*) uma (*2*) duas (*3*) três (*4*) quatro (*5*) cinco ou +

2.1.1. Quanto tempo faz desde a última transfusão de sangue?_____

3. Você já fez tratamento com quelante de ferro (Desferal / Exjade / Ferriprox)?(*1*) SIM (*0*) NÃO

3.1. Se alguma vez já fez este tratamento, há quanto tempo?_____

4. Nos últimos 2 anos, você fez sangria alguma vez? (*1*) SIM (*0*) NÃO

4.1. Quantas vezes já fez sangria? (0) Nenhuma (*1*) uma (*2*) duas (*3*) três (*4*) quatro (*5*) cinco ou +

HISTÓRICO ALIMENTAR

1. Nos últimos 6 meses, você fez mudanças nos seus hábitos alimentares? (*1*) SIM (*0*) NÃO

2. Alguma vez já foi orientado a fazer mudanças nos seus hábitos alimentares?(*0*) Não (*1*) Sim, motivo:_____

3. Alguma vez, por conta própria, você faz mudanças nos seus hábitos alimentares?

(*0*) Não (*1*) Sim, para emagrecer (*2*) Sim, reduzir o consumo de carnes
(*3*) Sim, para redução de sal (*5*) Sim, para redução do colesterol (*6*) Sim, para ganho de peso
( ) Outro motivo:_____

3.1. Se sim, quanto tempo faz desde que mudou seus hábitos alimentares?_____

5.2. Que classificação você dá para sua dieta atual:

(*1*) Onívora (consumo produtos de origem animal e vegetal sem restrições)
(*2*) Ovo-lacto-vegetariana (consumo leite e ovos, mas não consumo nenhum tipo de carne ou peixes)
(*3*) Vegetariana estrita (não consumo nenhum produto de origem animal)
(4) Outra:_____

(PARA MULHERES)

HISTÓRICO OBSTÉTRICO-GINECOLÓGICO

1. Você usa anticoncepcional oral / injetável / adesivos? (*1*) SIM (*0*) NÃO

2.1. Se sim, qual?_____ Há quanto tempo?_____

3. Você usa DIU? (*1*) SIM (*0*) NÃO

4. Nos último ano, sua menstruação se manteve regular (ciclo de 28±7 dias)? (*1*) SIM (*0*) NÃO

4.1 Se sim, quantos dias em média dura sua menstruação?

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)

4.2 Durante o período da menstruação, o fluxo menstrual é mais intenso durante quantos dias?

(1) *(2)* *(3)* *(4)* *(5)* *(6)* *(7)* *(8)* *(9)*

5. Numa escala de 1 até 5, onde 1 corresponde a fluxo menstrual pouco intenso e 5 a fluxo menstrual muito intenso, que intensidade você atribui à sua menstruação?

(1) *(2)* *(3)* *(4)* *(5)*

6. Você já esteve alguma vez grávida? (0) Nunca (*1*) uma (*2*) duas (*3*) três (*4*) quatro (*5*) cinco ou +

6.1. Se sim, há quanto tempo?_____

6.2. Se sim, quantos partos já teve? (0)Nenhum(*1*)um (*2*) dois (*3*) três (*4*) quatro(*5*) cinco ou +

Se sim, que tipo de parto: (0) Não se aplica (*1*) Normal (*2*) Cesária

Tempo desde o último parto:_____

Quanto tempo faz desde que parou de amamentar a última vez?_____

APÊNDICE 9 – MATERIAL SUPLEMENETAR – ARTIGOS 1 E 2

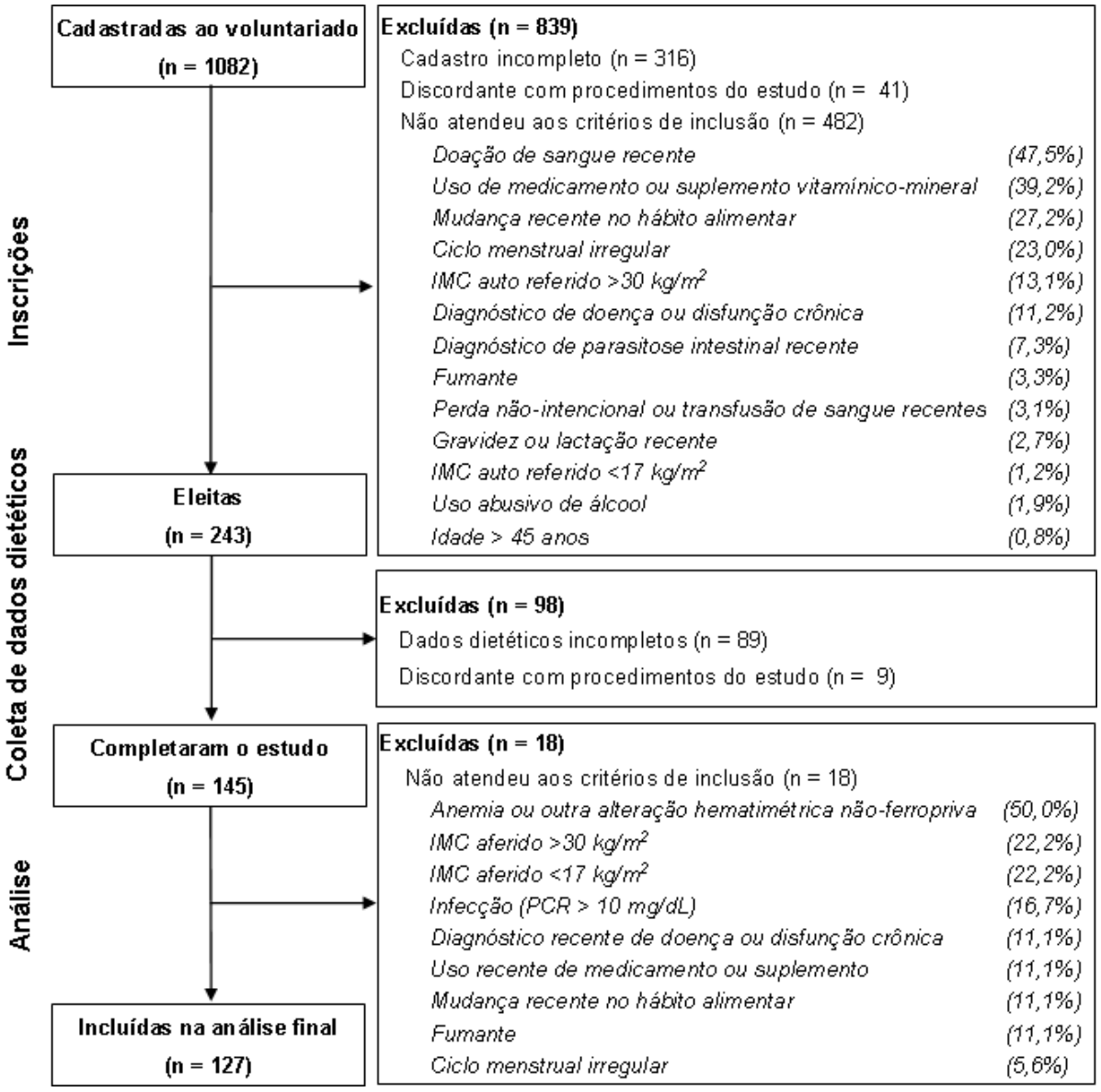


Figura suplementar 1. Fluxograma de seleção das mulheres para o estudo.

Tabela suplementar 1. Contribuição porcentual de grupos alimentares para o total de ferro, vitamina C, cálcio, fitato e polifenóis nas dietas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Grupos de alimentos	Contribuição (%)[1]							
	Ferro total	**Ferro heme**	**Ferro não-heme**	**Ferro de fortificação**	**Vitamina C**	**Cálcio**	**Fitato**	**Polifenóis**
Cereais, raízes e tubérculos	47,9	10,7	50,5	91,4	10,6	26,6	59,3	4,1
Pães, massas e biscoitos	41,8	8,2	44,1	90,3	4,1	23,7	38,8	3,8
Arroz	2,0	0,8	2,1	0,1	0,3	0,7	11,9	0,1
Outros cereais	2,3	1,5	2,3	0,8	0,8	1,0	4,5	0,1
Raízes e tubérculos	1,8	-	1,9	0,2	5,4	1,2	4,0	-
Frutas e Hortaliças	9,3	-	9,9	0,2	78,7	7,8	3,5	31,7
Frutas	4,3	-	4,6	0,1	65,4	3,7	1,7	30,2
Hortaliças	5,0	-	5,3	0,1	13,3	4,2	1,9	1,5
Carnes e ovos	18,8	88,5	14,2	2,1	1,2	4,5	0,7	-
Carne de gado	9,3	57,0	6,0	0,4	0,6	0,6	0,2	-
Carne suína	0,8	4,2	0,6	-	-	0,2	-	-
Frango e aves	3,0	12,2	2,4	0,5	0,1	0,6	0,1	-
Pescados	2,0	5,3	1,8	0,7	0,3	1,3	0,2	-
Carnes processadas	2,4	9,8	1,9	0,6	0,2	1,0	0,1	-
Ovos	1,4	-	1,5	-	-	0,8	-	-
Laticínios	3,6	-	3,8	0,3	1,8	47,5	0,6	3,8
Leite e iogurtes	2,7	-	2,8	0,2	1,8	30,5	0,5	3,8
Queijos e requeijões	0,9	-	1,0	0,1	-	17,0	-	-
Leguminosas e oleaginosas	10,5	-	11,2	0,1	0,5	3,2	28,9	3,8
Feijões e outras leguminosas	8,6	-	9,2	0,1	0,3	2,5	19,4	2,2
Oleaginosas	1,9	-	2,0	-	0,1	0,8	9,5	1,6
Cafés e chás	0,2	-	0,3	-	0,6	0,7	-	30,8
Cafés	0,1	-	0,1	-	-	0,3	-	22,3
Chás	0,1	-	0,2	-	0,6	0,3	-	8,5
Bebidas alcoólicas	0,2	-	0,3	-	0,1	0,3	-	0,6
Doces e bebidas açucaradas	8,5	-	9,1	5,7	5,8	8,8	6,8	24,0

Óleos e gorduras	0,1	-	0,2	-	-	0,2	0,1	-
Condimentos	0,7	-	0,7	0,4	0,7	0,2	0,2	1,1

n = 127. Dados são porcentagens.[1] Fração do nutriente derivada de cada grupo de alimentos em relação ao total consumido em todas as dietas avaliadas.

Tabela suplementar 2. Consumo médio observado de componentes dietéticos selecionados segundo refeições na dieta de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Quantidade média de consumo total diário[1]	**Ferro não heme**	**Ferro heme**	**Tecido animal**	**Vitamina C**	**Cálcio**	**Fitato**	**Polifenóis**
	mg	**mg**	**g[2]**	**mg**	**mg**	**mg[3]**	**mg[4]**
Refeição							
Café da manhã	1,84	0,01	3,90	31,80	247,00	39,17	73,20
Almoço	3,28	0,43	105,42	43,55	146,40	93,30	23,01
Jantar	2,89	0,23	54,90	23,95	207,34	73,47	19,70
Lanches	2,19	0,02	5,54	29,35	212,34	54,00	106,71
Fração média do consumo total diário	**Ferro não heme**	**Ferro heme**	**Tecido animal**	**Vitamina C**	**Cálcio**	**Fitato**	**Polifenóis**
	%	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**
Refeição							
Café da manhã	18,0	0,8	2,3	24,7	32,6	15,1	32,9
Almoço	32,1	62,8	62,1	33,9	17,4	35,9	10,3
Jantar	28,4	33,0	32,3	18,6	24,7	28,3	8,8
Lanches	21,5	3,3	3,3	22,8	25,3	20,8	47,9

n = 127. Dados são médias.

[1]Calculado como o somatório de todas as dietas avaliadas, dividido pelo número de dias (n = 3) e indivíduos (n = 127) avaliados. [2]Peso de tecido cru (1g = 0,77g de tecido cozido). [3] Fitato-fósforo (1 mg = 3,53 mg de ácido fítico). [4] Equivalente de ácido tânico (1 mg = 1,6 mg de ácido gálico ou ácido clorogênico).

Tabela suplementar 3. Características sóciodemográficas segundo quantis de consumo de ferro biodisponível (mg/dia) estimado com algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Quantil de consumo (mg/dia)		**Idade**	**IMC**	**CC**	**Cor de pele[1]**			**Nível socioeconômico[2,*]**		
		anos	**kg/m2**	**cm**	**1 n (%)**	**2 n (%)**	**3 n (%)**	**1 n (%)**	**2 n (%)**	**3 n (%)**
Monsen et al. 1978										
< Mediana	[0,5 – 1,2]	27,2 (5,2)	22,4 (2,4)	76,6 (6,8)	42 (66,7)	15 (23,8)	6 (9,5)	6 (9,7)	41 (66,1)	15 (24,2)
≥ Mediana	[1,2 – 2,5]	27,6 (4,9)	21,7 (2,3)	74,6 (7,2)	53 (82,8)	9 (14,1)	2 (3,1)	9 (14,3)	45 (71,4)	9 (14,3)
Valor de *P*		0,669	0,101	0,101		0,087			0,320	
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	27,0 (4,9)	22,5 (2,5)	77,4 (7,0)	30 (69,8)	9 (20,9)	4 (9,3)	2 (4,8)	29 (69,0)	11 (26,2)
Tercil 2	[1,1 – 1,3]	26,6 (5,4)	21,7 (2,3)	74,4 (6,9)	31 (73,8)	9 (21,4)	2 (4,8)	7 (17,1)	26 (63,4)	8 (19,5)
Tercil 3	[1,3 – 2,5]	28,8 (4,7)	21,9 (2,4)	75,0 (7,1)	34 (81,0)	6 (14,3)	2 (4,8)	6 (14,3)	31 (73,8)	5 (11,9)
Valor de *P*		0,099	0,248	0,124		0,738			0,243	
Hallberg & Hulthén. 2000										
< Mediana	[0,5 – 1,2]	27,3 (5,1)	22,5 (2,4)	77,0 (6,8)	44 (69,8)	15 (23,8)	4 (6,2)	3 (4,9)	46 (75,4)	12 (19,7)
≥ Mediana	[1,3 – 2,9]	27,6 (5,0)	21,6 (2,3)	74,2 (7,1)	51 (79,7)	9 (14,1)	4 (6,2)	12 (18,8)	40 (62,5)	12 (18,8)
Valor de *P*		0,747	**0,032**	**0,024**		0,363			0,056	
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	27,7 (4,9)	22,8 (2,4)	77,8 (6,6)	29 (67,4)	11 (25,6)	3 (7,0)	3 (7,3)	29 (70,7)	9 (22,0)
Tercil 2	[1,2 – 1,4]	26,6 (5,0)	21,8 (2,2)	74,7 (7,2)	33 (78,6)	6 (14,3)	3 (7,1)	3 (7,1)	29 (69,0)	10 (23,8)
Tercil 3	[1,4 – 2,9]	28,0 (5,2)	21,5 (2,5)	74,3 (7,1)	33 (78,6)	7 (16,7)	2 (4,8)	9 (21,4)	28 (66,7)	5 (11,9)
Valor de *P*		0,751	**0,012**	**0,020**		0,686			0,163	
Reddy et al. 2000										
< Mediana	[0,5 – 1,3]	27,4 (5,1)	22,3 (2,5)	76,1 (6,8)	47 (74,6)	11 (17,5)	5 (7,9)	6 (9,7)	42 (67,7)	14 (22,6)
≥ Mediana	[1,3 – 3,1]	27,5 (5,0)	21,9 (2,3)	75,1 (7,4)	48 (75,0)	13 (20,3)	3 (4,7)	9 (14,3)	44 (69,8)	10 (15,9)
Valor de *P*		0,854	0,331	0,437		0,714			0,521	
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	28,1 (4,7)	22,8 (2,4)	77,9 (6,4)	28 (68,3)	9 (22,0)	4 (9,8)	4 (10,0)	28 (70,0)	8 (20,0)

Tercil 2	[1,1 – 1,5]	25,9 (5,0)	21,7 (2,3)	74,2 (7,0)	34 (79,1)	7 (16,3)	2 (4,7)	2 (4,8)	30 (71,4)	10 (23,8)
Tercil 3	[1,6 – 3,1]	28,3 (5,2)	21,8 (2,4)	74,8 (7,3)	33 (76,7)	8 (18,6)	2 (4,7)	9 (20,9)	28 (65,1)	6 (14,0)
Valor de *P*		0,852	0,071	**0,041**		0,760			0,195	
Armah et al. 2013										
< Mediana	[0,5 – 0,9]	26,8 (5,0)	22,2 (2,4)	76,1 (6,8)	44 (67,7)	17 (26,2)	4 (6,2)	8 (12,7)	42 (66,7)	13 (20,6)
≥ Mediana	[0,9 – 1,5]	28,0 (5,1)	21,9 (2,4)	75,1 (7,4)	51 (82,3)	7 (11,3)	4 (6,5)	7 (11,3)	44 (71,0)	11 (17,7)
Valor de *P*		0,183	0,384	0,434		0,093			0,873	
Tercil 1	[0,5 – 0,9]	26,8 (5,0)	22,1 (2,3)	75,8 (6,7)	25 (61,0)	12 (29,3)	4 (9,8)	5 (12,8)	24 (61,5)	10 (25,6)
Tercil 2	[0,9 – 1,0]	27,3 (5,0)	22,4 (2,7)	76,7 (8,3)	36 (81.8)	6 (13,6)	2 (4,5)	5 (11,4)	30 (68,2)	9 (20,5)
Tercil 3	[1,0 – 1,5]	28,1 (5,1)	21,7 (2,1)	74,4 (6,0)	34 (81,0)	6 (14,3)	2 (4,8)	5 (11,9)	32 (76,2)	5 (11,9)
Valor de *P*		0,241	0,482	0,362		0,206			0,607	
Collings et al. 2013										
< Mediana	[0,6 – 0,9]	27,3 (5,1)	22,2 (2,4)	76,0 (7,2)	47 (73,4)	14 (21,9)	3 (4,7)	6 (9,7)	43 (69,4)	13 (21,0)
≥ Mediana	[0,9 – 1,4]	27,6 (5,0)	21,9 (2,4)	75,3 (7,0)	48 (76,2)	10 (15,9)	5 (7,9)	9 (14,3)	43 (68,3)	11 (17,5)
Valor de *P*		0,762	0,451	0,584		0,555			0,684	
Tercil 1	[0,6 – 0,8]	27,1 (5,4)	22,5 (2,6)	76,8 (7,6)	30 (73.2)	9 (22,0)	2 (4,9)	4 (10,0)	26 (65,0)	10 (25,0)
Tercil 2	[0,8 – 1,0]	27,0 (4,9)	21,7 (2,2)	75,0 (6,4)	32 (72,7)	9 (20,5)	3 (6,8)	4 (9,3)	32 (74,4)	7 (16,3)
Tercil 3	[1,0 – 1,4]	28,2 (4,9)	22,1 (2,4)	75,1 (7,2)	33 (78,6)	6 (14,3)	3 (7,1)	7 (16,7)	28 (66,7)	7 (16,7)
Valor de *P*		0,298	0,425	0,268		0,896			0,645	

n = 127. Dados são média (desvio padrão) ou contagem absoluta (porcentagem).
[1] Categorias são: 1 – branca; 2 – parda ou negra; 3 – amarela. [2] Categorias são: 1 – Classe A; 2 – Classe B; 3 – Classe C ou D.
[*] Dado indisponível para duas voluntárias.
Comparações s entre quantis de consumo foram feitas por teste *t-Student* ou ANOVA com contraste polinomial para tendência linear (variáveis contínuas) ou por teste de Qui-quadrado, *Likelihood Ratio* ou exato de Fisher para frequências (variáveis categóricas).
IMC: Índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura;

Tabela suplementar 4. Características de estilo de vida e do fluxo menstrual segundo quantis de consumo de ferro biodisponível (mg/dia) estimado com algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Quantil de consumo (mg/dia)		**Vegetarianismo**	**Nível de atividade física[1]**			**Anticoncepcional**	**Escore de fluxo menstrual[2]**		
		n (%)	**1 n (%)**	**2 n (%)**	**3 n (%)**	**n (%)**	**1 n (%)**	**2 n (%)**	**3 n (%)**
Monsen et al. 1978									
< Mediana	[0,5 – 1,2]	11 (17,5)	24 (38,1)	33 (52,4)	6 (9,5)	36 (57,1)	25 (39,7)	16 (25,4)	22 (34,9)
≥ Mediana	[1,2 – 2,5]	7 (10,9)	25 (39,1)	29 (45,3)	10 (15,6)	39 (60,9)	19 (29,7)	23 (35,9)	22 (34,4)
Valor de *P*		0,292		0,530		0,664		0,356	
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	7 (16,3)	21 (48,8)	18 (41,9)	4 (9,3)	23 (53,5)	15 (34,9)	12 (27,9)	16 (37,2)
Tercil 2	[1,1 – 1,3]	8 (19,0)	15 (35,7)	22 (52,4)	5 (11,9)	22 (52,4)	18 (42,9)	12 (28,6)	12 (28,6)
Tercil 3	[1,3 – 2,5]	3 (7,1)	13 (31,0)	22 (52,4)	7 (16,7)	30 (71,4)	11 (26,2)	15 (35,7)	16 (28,1)
Valor de *P*		0,261		0,481		0,136		0,579	
Hallberg & Hulthén. 2000									
< Mediana	[0,5 – 1,2]	16 (25,4)	29 (46,0)	28 (44,4)	6 (9,5)	33 (52,4)	25 (39,7)	17 (27,0)	21 (33,3)
≥ Mediana	[1,3 – 2,9]	2 (3,1)	20 (31,2)	34 (53,1)	10 (15,6)	42 (65,6)	19 (29,7)	22 (34,4)	23 (35,9)
Valor de *P*		**<0,001**		0,199		0,129		0,462	
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	13 (30,2)	19 (44,2)	21 (48,8)	3 (7,0)	25 (58,1)	17 (39,5)	13 (30,2)	13 (30,2)
Tercil 2	[1,2 – 1,4]	5 (11,9)	17 (40,5)	19 (45,2)	6 (14,3)	21 (50,0)	17 (40,5)	10 (23,8)	15 (35,7)
Tercil 3	[1,4 – 2,9]	0 (0,0)	13 (31,0)	22 (52,4)	7 (16,7)	29 (69,0)	10 (23,8)	16 (38,1)	16 (38,1)
Valor de *P*		**<0,001**		0,563		0,202		0,415	
Reddy et al. 2000									
< Mediana	[0,5 – 1,3]	17 (27,0)	24 (38,1)	31 (29,2)	8 (12,7)	35 (55,6)	26 (41,3)	18 (28,6)	19 (30,2)
≥ Mediana	[1,3 – 3,1]	1 (1,6)	25 (39,1)	31 (48,4)	8 (12,5)	40 (62,5)	18 (28,1)	21 (32,8)	25 (39,1)
Valor de *P*		**<0,001**		0,994		0,426		0,287	
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	13 (31,7)	14 (34,1)	21 (51,2)	6 (14,6)	24 (58,5)	20 (48,8)	12 (29,3)	9 (22,0)
Tercil 2	[1,1 – 1,5]	5 (11,6)	23 (53,5)	16 (37,2)	4 (9,3)	24 (55,8)	12 (27,9)	14 (32,6)	17 (39,5)
Tercil 3	[1,6 – 3,1]	0 (0,0)	12 (27,9)	25 (58,1)	6 (14,0)	27 (62,8)	12 (27,9)	13 (30,2)	18 (41,9)

Valor de *P*		**<0,001**		0,163		0,803		0,170	
Armah et al. 2013									
< Mediana	[0,5 – 0,9]	8 (12,3)	28 (43,1)	33 (50,8)	4 (6,2)	37 (56,9)	24 (36,9)	18 (27,7)	23 (35,3)
≥ Mediana	[0,9 – 1,5]	10 (16,1)	21 (33,9)	29 (46,8)	12 (19,4)	38 (61,3)	20 (32,3)	21 (33,9)	21 (33,9)
Valor de *P*		0,537		0,075		0,617		0,735	
Tercil 1	[0,5 – 0,9]	4 (9,8)	18 (43,9)	21 (51,2)	2 (4,9)	23 (56,1)	16 (39,0)	13 (31,7)	12 (29,3)
Tercil 2	[0,9 – 1,0]	10 (22,7)	17 (38,6)	20 (45,5)	7 (15,9)	22 (50,0)	15 (34,1)	12 (27,3)	17 (38,6)
Tercil 3	[1,0 – 1,5]	4 (9,5)	14 (33,3)	21 (50,0)	7 (16,7)	30 (71,4)	13 (31,0)	14 (33,3)	15 (35,7)
Valor de *P*		0,132		0,457		0,117		0,873	
Collings et al. 2013									
< Mediana	[0,6 – 0,9]	17 (26,6)	23 (35,9)	35 (54,7)	6 (9,4)	35 (54,7)	25 (39,1)	18 (28,1)	21 (32,8)
≥ Mediana	[0,9 – 1,4]	1 (1,6)	26 (41,3)	27 (42,9)	10 (15,9)	40 (63,5)	19 (30,2)	21 (33,3)	23 (36,5)
Valor de *P*		**<0,001**		0,332		0,3013		0,568	
Tercil 1	[0,6 – 0,8]	12 (29,3)	18 (43,9)	19 (46,3)	4 (9,8)	20 (48,8)	18 (43,9)	9 (22,0)	14 (34,1)
Tercil 2	[0,8 – 1,0]	5 (34,6)	18 (40,9)	23 (52,3)	3 (6,8)	25 (56,8)	12 (27,3)	15 (34,1)	17 (38,6)
Tercil 3	[1,0 – 1,4]	1 (2,4)	13 (31,0)	20 (47,6)	9 (21,4)	30 (71,4)	14 (33,3)	15 (35,7)	13 (31,0)
Valor de *P*		**0,002**		0,268		0,103		0,459	

n = 127. Dados são contagem absoluta (porcentagem).

[1] Categorias são: 1 – Insuficientemente ativa; 2 – Ativa; 3 – Muito ativo. [2] Categorias são: 1 – Baixo (≤ 13 unidades); 2 – Médio (14-21 unidades); 3 – Alto (≥ 22 unidades).

Comparações entre quantis de consumo foram feitas por teste Qui-quadrado, *Likelihood Ratio* ou exato de Fisher.

Tabela suplementar 5. Características hematológicas e bioquímicas segundo quantis de consumo de ferro biodisponível (mg/dia) estimado com algoritmos baseados em refeições ou dietas completas de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Quantil de consumo (mg/dia)		**Hemoglobina**	**Saturação da transferrina**	**AGP**	**PCR-us**	**Inflamação[1]**
		g/dL	**%**	**mg/dL**	**mg/L**	**n (%)**
Monsen et al. 1978						
< Mediana	[0,5 – 1,2]	13,4 (0,9)	29,3 (10,2)	68,4 (17,0)	1,5 (1,1; 2,0)	11 (17,5)
≥ Mediana	[1,2 – 2,5]	13,4 (0,8)	30,5 (12,4)	64,6 (18,7)	0,8 (0,6; 1,0)	6 (9,4)
Valor de *P*		0,760	0,547	0,227	**0,002**	0,181
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	13,4 (0,8)	28,9 (10,2)	68,2 (17,9)	1,5 (1,0; 2,1)	7 (16,3)
Tercil 2	[1,1 – 1,3]	13,3 (1,0)	30,6 (12,2)	65,9 (17,2)	0,9 (0,6; 1,3)	7 (16,7)
Tercil 3	[1,3 – 2,5]	13,4 (0,7)	30,3 (11,8)	65,3 (18,8)	1,0 (0,7; 1,4)	3 (7,1)
Valor de *P*		0,980	0,589	0,466	0,153	0,348
Hallberg & Hulthén. 2000						
< Mediana	[0,5 – 1,2]	13,4 (0,9)	27,7 (9,2)	67,9 (16,8)	1,1 (0,9; 1,5)	8 (12,7)
≥ Mediana	[1,3 – 2,9]	13,4 (0,8)	32,1 (12,8)	65,1 (18,9)	1,0 (0,7; 1,4)	9 (14,1)
Valor de *P*		0,602	**0,029**	0,384	0,568	0,821
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	13,2 (0,9)	27,5 (8,9)	68,8 (17,5)	1,2 (0,8; 1,8)	7 (16,3)
Tercil 2	[1,2 – 1,4]	13,5 (0,9)	29,5 (12,1)	67,3 (15,9)	1,2 (0,8; 1,9)	7 (16,7)
Tercil 3	[1,4 – 2,9]	13,4 (0,7)	32,7 (12,5)	63,3 (20,0)	0,8 (0,6; 1,1)	3 (7,1)
Valor de *P*		0,322	**0,035**	0,160	0,141	0,348
Reddy et al. 2000						
< Mediana	[0,5 – 1,3]	13,3 (0,8)	29,2 (10,6)	67,8 (17,4)	1,2 (0,9; 1,7)	9 (14,3)
≥ Mediana	[1,3 – 3,1]	13,5 (0,8)	30,6 (12,1)	65,2 (18,4)	0,9 (0,7; 1,3)	8 (12,5)
Valor de *P*		0,413	0,518	0,411	0,208	0,768
Tercil 1	[0,5 – 1,1]	13,4 (0,8)	27,1 (9,9)	69,3 (18,7)	1,3 (0,9; 1,9)	6 (14,6)
Tercil 2	[1,1 – 1,5]	13,2 (0,9)	30,6 (11,1)	64,8 (14,7)	1,2 (0,9; 1,7)	7 (16,3)

Tercil 3	[1,6 – 3,1]	13,5 (0,8)	31,9 (12,6)	65,5 (20,0)	0,9 (0,6; 1,2)	4 (9,3)
Valor de *P*		0,550	0,051	0,339	0,147	0,611
Armah et al. 2013						
< Mediana	[0,5 – 0,9]	13,3 (0,8)	30,4 (10,2)	67,8 (18,0)	1,3 (0,9; 1,7)	12 (18,5)
≥ Mediana	[0,9 – 1,5]	13,4 (0,9)	29,4 (12,5)	65,1 (17,9)	0,9 (0,7; 1,2)	5 (8,1)
Valor de *P*		0,521	0,627	0,411	0,134	0,085
Tercil 1	[0,5 – 0,9]	13,3 (0,8)	29,3 (8,9)	66,5 (19,6)	1,3 (0,9; 1,9)	8 (19,5)
Tercil 2	[0,9 – 1,0]	13,3 (0,8)	30,8 (12,5)	69,1 (14,9)	1,0 (0,7; 1,4)	5 (11,4)
Tercil 3	[1,0 – 1,5]	13,5 (0,8)	29,6 (12,5)	63,7 (18,9)	1,0 (0,7; 1,5)	4 (9,5)
Valor de *P*		0,382	0,917	0,467	0,448	0,364
Collings et al. 2013						
< Mediana	[0,6 – 0,9]	13,3 (0,9)	28,4 (10,3)	66,6 (17,0)	1,2 (0,9; 1,7)	11 (17,2)
≥ Mediana	[0,9 – 1,4]	13,5 (0,8)	31,4 (12,2)	66,4 (18,9)	1,0 (0,7; 1,3)	6 (9,5)
Valor de *P*		0,108	0,138	0,939	0,239	0,205
Tercil 1	[0,6 – 0,8]	13,2 (0,9)	27,4 (10,0)	67,1 (16,7)	1,1 (0,8; 1,7)	7 (17,1)
Tercil 2	[0,8 – 1,0]	12,4 (0,8)	32,2 (11,2)	67,5 (17,8)	1,1 (0,8; 1,6)	6 (13,6)
Tercil 3	[1,0 – 1,4]	13,5 (0,8)	29,9 (12,4)	64,8 (19,4)	1,0 (0,7; 1,4)	4 (9,5)
Valor de *P*		0,097	0,319	0,547	0,547	0,599

n = 127. Dados são média (desvio padrão) ou contagem absoluta (porcentagem).

[1] Definida como concentrações séricas aumentadas de PCR-us (> 5 mg/L) e/ou AGP (> 100 mg/dL).

Comparações s entre quantis de consumo foram feitas por teste *t-Student* ou ANOVA com contraste polinomial para tendência linear (variáveis contínuas) ou por teste de Qui-quadrado, *Likelihood Ratio* ou exato de Fisher para frequências (variáveis categóricas).

AGP: Alfa1-glicoproteína ácida; PCR-us: Proteína C reativa ultrassensível.

Tabela suplementar 6. Características dietéticas segundo genótipos *TMPRSS6* e *HFE* entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Genótipos	**Energia total**	**Ferro total**	**Ferro heme**	**Ferro biodisponível[1]**	**Nível de ferro biodisponível[1]**		
	kcal/dia	**mg/dia**	**mg/dia**	**mg/dia**	**1 n (%)**	**2 n (%)**	**3 n (%)**
***TMPRSS6* rs855791**							
GG	2015,5 (476,5)	10,9 (2,2)	0,7 (0,5)	1,3 (0,5)	14 (31,8)	15 (34,1)	15 (34,1)
AG	2011,6 (402,3)	10,8 (2,1)	0,7 (0,4)	1,3 (0,4)	19 (34,5)	16 (29,1)	20 (36,4)
AA	2100,4 (444,8)	10,9 (2,5)	0,7 (0,4)	1,2 (0,3)	10 (35,7)	11 (39,3)	7 (25,0)
Valor de *P*	0,650	0,979	0,692	0,781		0,837	
GG	2015,5 (476,5)	10,9 (2,2)	0,7 (0,5)	1,3 (0,5)	14 (31,8)	15 (34,1)	15 (34,1)
AA + AG	2041,5 (416,5)	10,9 (2,2)	0,7 (0,4)	1,3 (0,4)	29 (34,9)	27 (32,5)	27 (32,5)
Valor de *P*	0,750	0,937	0,401	0,632		0,939	
***TMPRSS6* rs4820268**							
AA	2009,6 (503,2)	10,8 (2,4)	0,7 (0,4)	1,3 (0,5)	12 (31,6)	14 (36,8)	12 (31,6)
GA	2038,7 (389,1)	10,9 (2,1)	0,7 (0,4)	1,3 (0,4)	17 (29,8)	17 (29,8)	23 (40,4)
GG	2048,6 (444,7)	10,9 (2,4)	0,6 (0,4)	1,2 (0,4)	14 (43,8)	11 (34,4)	23 (21,9)
Valor de *P*	0,924	0,998	0,326	0,217		0,438	
AA	2009,6 (503,2)	10,8 (2,4)	0,7 (0,4)	1,3 (0,5)	12 (31,6)	14 (36,8)	12 (31,6)
GG + GA	2042,3 (407,5)	10,9 (2,2)	0,7 (0,4)	1,3 (0,4)	31 (34,8)	28 (31,5)	30 (33,7)
Valor de *P*	0,701	0,968	0,459	0,799		0,838	
***HFE* rs1799945**							
CC	2022,9 (458,2)	11,0 (2,4)	0,7 (0,4)	1,3 (0,4)	30 (32,3)	31 (33,3)	32 (34,4)
GG + GC	2058,6 (375,8)	10,5 (1,7)	0,7 (0,4)	1,3 (0,4)	13 (38,2)	11 (32,4)	10 (29,4)
Valor de *P*	0,686	0,245	0,719	0,795		0,795	

n = 127. Dados são média aritmética (DP) ou contagem absoluta (%).

[1]Estimativa de consumo diário (Hallberg & Hulthen, 2000) ajustada pela energia total da dieta e classificada segundo distribuição na amostra: tercil 1, ≤ 1,1 mg/dia; tercil 2, 1,2-1,4 mg/dia; tercil 3, > 1,4 mg/dia.

Comparações s entre genótipos foram feitas por teste *t-Student* ou ANOVA com *post hoc* de Tukey (variáveis contínuas) ou por teste de Qui-quadrado ou *Likelihood Ratio* para frequências (variáveis categóricas).

Tabela suplementar 7. Características sociodemográficas segundo genótipos *TMPRSS6* e *HFE* entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Genótipos	Idade	IMC	CC	Cor de pele[1]			Nível socioeconômico[2,*]		
	anos	kg/m2	cm	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)
***TMPRSS6* rs855791**									
GG	27,8 (5,3)	21,3 (2,6)	74,9 (8,0)	30 (68,2)	13 (29,5)	1 (2,3)	7 (15,9)	26 (59,1)	11 (25,0)
AG	27,2 (5,0)	22,0 (2,4)	75,7 (6,5)	43 (78,2)	9 (16,4)	3 (5,5)	5 (9,3)	40 (74,1)	9 (16,7)
AA	27,3 (4,8)	22,2 (2,2)	76,7 (6,6)	22 (78,6)	2 (7,1)	4 (14,3)	3 (11,1)	20 (74,1)	4 (14,8)
Valor de *P*	0,783	0,924	0,582		0,057			0,546	
GG	27,8 (5,3)	21,3 (2,6)	74,9 (8,0)	30 (68,2)	13 (29,5)	1 (2,3)	7 (15,9)	26 (59,1)	11 (25,0)
AA + AG	27,2 (4,9)	22,1 (2,3)	76,0 (6,5)	65 (78,3)	11 (13,3)	7 (8,4)	8 (9,9)	60 (74,1)	13 (16,0)
Valor de *P*	0,488	0,781	0,384		**0,046**			0,225	
***TMPRSS6* rs4820268**									
AA	27,8 (5,2)	22,0 (2,4)	74,4 (7,3)	26 (68,4)	11 (28,9)	1 (2,6)	7 (18,4)	20 (52,6)	11 (28,9)
GA	27,4 (5,3)	21,7 (2,4)	75,1 (6,8)	44 (77,2)	10 (17,5)	3 (5,3)	4 (7,1)	43 (76,8)	9 (16,1)
GG	27,1 (4,5)	22,8 (2,3)	78,0 (6,9)	25 (78,1)	3 (9,4)	4 (12,5)	4 (12,9)	23 (74,2)	4 (12,9)
Valor de *P*	0,810	0,138	0,078		0,156			0,122	
AA	27,8 (5,2)	22,0 (2,4)	74,4 (7,3)	26 (68,4)	11 (28,9)	1 (2,6)	7 (18,4)	20 (52,6)	11 (28,9)
GG + GA	27,3 (5,0)	22,1 (2,4)	76,2 (6,9)	69 (77,5)	13 (14,6)	7 (7,9)	8 (9,2)	66 (75,9)	13 (14,9)
Valor de *P*	0,554	0,993	0,195		0,114			**0,040**	
***HFE* rs1799945**									
CC	27,7 (5,1)	22,2 (2,4)	75,9 (7,2)	71 (76,3)	14 (15,1)	8 (6,6)	12 (12,9)	63 (67,7)	18 (19,4)
GG + GC	26,7 (4,8)	21,7 (2,5)	74,7 (6,6)	24 (70,6)	10 (29,4)	0 (0,0)	3 (9,4)	23 (71,9)	6 (18,8)
Valor de *P*	0,311	0,320	0,395		0,056			0,851	

n = 127. Dados são média aritmética (DP) ou contagem absoluta (%).
[1] Categorias são: 1 – branca; 2 – parda ou negra; 3 – amarela. [2] Categorias são: 1 – Classe A; 2 – Classe B; 3 – Classe C ou D.
[*] Dado indisponível para duas voluntárias.
Comparações s entre genótipos foram feitas por teste *t-Student* ou ANOVA com *post hoc* de Tukey (variáveis contínuas) ou por teste de Qui-quadrado ou *Likelihood Ratio* para frequências (variáveis categóricas).
IMC: Índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura;

Tabela suplementar 8. Características de estilo de vida e do fluxo menstrual segundo genótipos *TMPRSS6* e *HFE* entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Genótipos	**Vegetarianismo**	**Nível de atividade física[1]**			**Anticoncepcional**	**Escore de fluxo menstrual[2]**		
	n (%)	**1 n (%)**	**2 n (%)**	**3 n (%)**	**n (%)**	**1 n (%)**	**2 n (%)**	**3 n (%)**
***TMPRSS6* rs855791**								
GG	7 (15,9)	17 (38,6)	22 (50,0)	5 (11,4)	25 (56,8)	14 (31,8)	14 (31,8)	16 (36,4)
AG	8 (14,5)	21 (38,2)	28 (50,9)	6 (10,9)	34 (61,8)	15 (27,3)	19 (34,5)	21 (38,2)
AA	3 (10,7)	11 (39,2)	12 (42,9)	5 (17,9)	16 (57,1)	15 (53,6)	6 (21,4)	7 (25,0)
Valor de *P*	0,823		0,900		0,858		0,206	
GG	7 (15,9)	17 (38,6)	22 (50,0)	5 (11,4)	25 (56,8)	14 (31,8)	14 (31,8)	16 (36,4)
AA + AG	11 (13,3)	32 (38,6)	40 (48,2)	11 (13,3)	50 (60,2)	30 (36,1)	25 (30,1)	28 (33,7)
Valor de *P*	0,790		0,951		0,710		0,887	
***TMPRSS6* rs4820268**								
AA	5 (13,2)	15 (39,5)	18 (47,4)	5 (13,2)	21 (55,3)	13 (32,2)	11 (28,9)	14 (36,8)
GA	7 (12,3)	20 (35,1)	31 (54,4)	6 (10,5)	36 (63,2)	16 (28,1)	21 (36,8)	20 (35,1)
GG	6 (18,8)	14 (43,8)	13 (40,6)	5 (15,6)	18 (56,2)	15 (46,9)	7 (21,9)	10 (31,2)
Valor de *P*	0,687		0,797		0,695		0,433	
AA	5 (13,2)	15 (39,5)	18 (47,4)	5 (13,2)	21 (55,3)	13 (32,2)	11 (28,9)	14 (36,8)
GG + GA	13 (14,6)	34 (38,2)	44 (49,4)	11 (12,4)	54 (60,7)	31 (34,8)	28 (31,5)	30 (33,7)
Valor de *P*	1,000		0,976		0,694		0,936	
***HFE* rs1799945**								
CC	15 (16,1)	36 (38,7)	44 (47,3)	13 (14,0)	55 (59,1)	29 (31,2)	31 (33,3)	33 (35,5)
GG + GC	3 (8.8)	13 (38,2)	18 (52,9)	3 (8,8)	20 (58,8)	15 (44,1)	8 (23,5)	11 (32,4)
Valor de *P*	0,395		0,709		1,000		0,358	

n = 127. Dados são contagem absoluta (%).

[1] Categorias são: 1 – Insuficientemente ativa; 2 – Ativa; 3 – Muito ativo. [2] Escore expresso como unidades arbitrárias (UA) e classificado segundo distribuição na amostra (Heath et al. 1999): baixo (tercil 1), ≤ 13 UA; médio (tercil 2), 14-21 UA; alto (tercil 3), ≥ 22 UA. Comparações entre genótipos foram feitas por teste Qui-quadrado, *Likelihood Ratio* ou Exato de Fisher.

Tabela suplementar 9. Características bioquímicas segundo genótipos *TMPRSS6* e *HFE* entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Genótipos	**Ferro sérico**	**CTLF**	**AGP**	**PCR-us**	**Inflamação[1]**
	µg/dL	**µg/dL**	**mg/dL**	**mg/L**	**n (%)**
***TMPRSS6* rs855791**					
GG	108,4 (37,5)	335,6 (50,8)	66,7 (18,0)	1,0 (0,7; 1,5)	4 (9,1)
AG	96,2 (35,4)	349,5 (55,9)	66,8 (16,8)	1,2 (0,9; 1,7)	10 (18,2)
AA	96,0 (35,9)	342,0 (41,3)	65,4 (20,2)	0,9 (0,6; 1,4)	3 (10,7)
Valor de *P*	0,201	0,405	0,939	0,512	0,375
GG	108,4 (37,5)	335,6 (50,8)	66,7 (18,0)	1,0 (0,7; 1,5)	4 (9,1)
AA + AG	96,2 (35,4)	347,0 (51,3)	66,4 (17,9)	1,1 (0,9; 1,4)	13 (15,7)
Valor de *P*	0,073	0,234	0,921	0,584	0,414
***TMPRSS6* rs4820268**					
AA	107,3 (41,8)	341,2 (54,1)	67,6 (17,3)	1,1 (0,7; 1,7)	5 (13,2)
GA	97,4 (34,5)	347,0 (55,6)	65,3 (17,5)	1,1 (0,8; 1,5)	8 (14,0)
GG	97,5 (32,7)	338,2 (39,2)	67,0 (19,6)	1,0 (0,6; 1,5)	4 (12,5)
Valor de *P*	0,385	0,719	0,832	0,843	0,978
AA	107,3 (41,8)	341,2 (54,1)	67,6 (17,3)	1,1 (0,7; 1,7)	5 (13,2)
GG + GA	97,5 (33,7)	343,8 (50,3)	66,0 (18,2)	1,1 (0,8; 1,4)	12 (13,5)
Valor de *P*	0,166	0,789	0,648	0,912	1,000
***HFE* rs1799945**					
CC	97,3 (35,2)	346,4 (51,2)	67,6 (18,1)	1,1 (0,8; 1,4)	12 (12,9)
GG + GC	108,9 (38,8)	333,9 (51,1)	63,4 (17,2)	1,1 (0,8; 1,7)	5 (14,7)
Valor de *P*	0,113	0,224	0,243	0,795	0,774

n = 127. Dados são média geométrica (IC de 95%), média aritmética (DP), ou contagem absoluta (%).
[1] Definida como concentrações séricas aumentadas de PCR-us (> 5 mg/L) e/ou AGP (> 100 mg/dL).
Comparações s entre genótipos foram feitas por teste *t-Student* ou ANOVA com *post hoc* de Tukey (variáveis contínuas) ou por teste de Qui-quadrado, *Likelihood Ratio* ou Exato de Fischer para frequências (variáveis categóricas).
CTLF: Capacidade Total de Ligação do Ferro; AGP: Alfa1-glicoproteína ácida; PCR-us: Proteína C reativa ultrassensível.

Tabela suplementar 10. Características hematológicas segundo genótipos *TMPRSS6* e *HFE* entre mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016.

Genótipos	**Contagem de reticulócitos**	**Hematócrito**	**Contagem de eritrócitos**	**VCM**	**HCM**	**CHCM**
	x10^9/L	%	**x10^6/mm^3**	**fL**	**pg**	**d/dL**
***TMPRSS6* rs855791**						
GG	49 (18)	41,4 (2,2)	4,6 (0,3)	88,8 (4,4)	28,9 (1,5)	32,6 (0,9)
AG	49 (16)	41,0 (2,1)	4,6 (0,3)	87,9 (4,3)	28,5 (1,6)	32,4 (0,8)
AA	51 (23)	41,1 (2,2)	4,7 (0,3)	88,2 (4,0)	28,6 (1,5)	32,4 (0,8)
Valor de *P*	0,805	0,687	0,962	0,572	0,327	0,402
GG	49 (18)	41,4 (2,2)	4,6 (0,3)	88,8 (4,4)	28,9 (1,5)	32,6 (0,9)
AA + AG	49 (18)	41,0 (2,2)	4,6 (0,3)	88,0 (4,1)	28,6 (1,5)	32,4 (0,8)
Valor de *P*	0,893	0,413	0,888	0,307	0,138	0,176
***TMPRSS6* rs4820268**						
AA	49 (17)	41,2 (2,4)	4,7 (0,3)	87,8 (4,6)	28,5 (1,6)	32,5 (1,0)
GA	46 (14)	41,2 (2,0)	4,6 (0,3)	88,3 (4,1)	28,6 (1,5)	32,4 (0,8)
GG	56 (23)	41,0 (2,3)	4,6 (0,3)	88,9 (4,1)	29,0 (1,5)	29,0 (1,5)
Valor de *P*	0,064	0,920	0,525	0,541	0,343	0,456
AA	49 (17)	41,2 (2,4)	4,7 (0,3)	87,8 (4,6)	28,5 (1,6)	32,5 (1,0)
GG + GA	50 (18)	41,1 (2,1)	4,6 (0,3)	88,5(4,1)	28,8 (1,5)	32,5 (0,8)
Valor de *P*	0,763	0,794	0,298	0,380	0,396	0,984
***HFE* rs1799945**						
CC	48 (16)	41,2 (2,0)	4,7 (0,3)	88,3 (4,2)	28,6 (1,5)	32,4 (0,8)
GG + GC	52 (22)	40,9 (2,5)	4,6 (0,4)	88,3 (4,5)	28,8 (1,6)	32,7 (1,0)
Valor de *P*	0,425	0,520	0,263	0,986	0,502	0,126

n = 127. Dados são média aritmética (DP);
Comparações s entre genótipos foram feitas por teste *t-Student* ou ANOVA com *post hoc* de Tukey.
VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela suplementar 11. Associação de haplótipos *TMPRSS6* com ferritina, saturação da transferrina e hemoglobina de mulheres adultas aparentemente saudáveis e em balanço estacionário do ferro corporal. São Paulo, 2016

Ferritina (µg/L)*				
Haplótipo rs855791-rs4820468	n (%)	β[1]	*P*	% variação explicada
GA	128 (50,3)	-7,89	0,647	< 1,0
AG	106 (41,6)	-15,12	0,162	1,5
GG	15 (6,0)	-4,36	0,421	< 1,0
AA	5 (2,1)	8,85	0,099	2,1
Saturação da transferrina (%)				
Haplótipo rs855791-rs4820468	n (%)	β[1]	*P*	% variação explicada
GA	128 (50,3)	1,403	0,508	< 1,0
AG	106 (41,6)	**-3,01**	**0,022**	**4,1**
GG	15 (6,0)	-0,134	0,840	< 1,0
AA	5 (2,1)	0,74	0,262	1,0
Hemoglobina(g/dL)*				
Haplótipo rs855791-rs4820468	n (%)	β[1]	*P*	% variação explicada
GA	128 (50,3)	0,05	0,692	< 1,0
AG	106 (41,6)	-0,06	0,477	< 1,0
GG	15 (6,0)	-0,04	0,307	< 1,0
AA	5 (2,1)	0,05	0,212	1,2

n = 254 fitas de DNA.
* Valores de ferritina corrigidos pela inflamação foram transformados em seu logaritmo natural antes das análises. Os coeficientes de inclinação para cada haplótipo indicam o efeito estimado nas concentrações de ferritina, expresso em percentual (%).
** n = 126. Modelos não incluem dados de um *outlier* influente.
[1] Coeficientes de inclinação indicam os efeitos estimados para os haplótipos *TMPRSS6* sobre valores ajustados dos biomarcadores por idade, IMC e demais variáveis apresentadas na Tabela 1 do Artigo2 desta tese.

Tabela suplementar 12. Frequência de alelos $MT2^{736A}$ e HFE^{63D} segundo classificação fenotípica das mutações *HBB* entre mulheres com β-talassemia heterozigótica. São Paulo, 2016.

Tipo de mutação *HBB*	**Alelo $MT2^{736A}$**		**Alelo HFE^{63D}**	
	Frequência	*P*	Frequência	*P*
Mutação β^0 (n = 22)	0,36		0,25	
Mutação β^+ (n = 7)	0,36	0,752	0,14	0,180
Mutação não classificada (n = 4)	0,50		0,50	

Foi utilizado teste de *Likelihood Ratio.*

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Estudo 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de variantes do gene TMPRSS6 e sua relação com o status do ferro em mulheres saudáveis na idade reprodutiva

Pesquisador: Célia Colli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13914313.7.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 228.946

Data da Relatoria: 25/03/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto é interessante, pois propõe o estudo da interação gene vs. nutriente, neste caso específico para o ferro, mineral importante para o desenvolvimento humano e que normalmente é deficiente em mulheres na fase fértil.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo será avaliar a relação existente entre as variantes MT2736V e MT2521D, a biodisponibilidade estimada do ferro dietético e o status do mineral em mulheres adultas saudáveis, estudantes de graduação e pós-graduação na Universidade de São Paulo, SP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco é mínimo, e trará benefícios, pois o conhecimento obtido poderá ser utilizado para uma eventual prevenção desta deficiência principalmente em mulheres cujo perfil genético seja desfavorável para o aproveitamento do ferro dietético.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Na atualidade, com o maior interesse para o estudo das influências dos genes no aproveitamento dos nutrientes, esta pesquisa poderá contribuir com novos conhecimentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Endereço: Av.Profº Lineu Prestes, nº 580 - Bloco 17 -
Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3785 **Fax:** (11)3091-3677 **E-mail:** cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Recomendações:

Sem novas recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista o parecer e a análise, este CEP considera o projeto aprovado.

SAO PAULO, 25 de Março de 2013

Assinador por:
Cristina Helena dos Reis Serra
(Coordenador)

Endereço: Av.Profº Lineu Prestes, nº 580 - Bloco 17 -
Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3785 **Fax:** (11)3091-3677 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Estudo 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Parecer

Título da Pesquisa:
Impacto da fortificação compulsória com ferro em farinhas de trigo e milho na expressão de RNAm dos genes que codificam proteínas associadas ao metabolismo deste mineral e seu papel no estresse oxidativo

Pesquisador:
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

Instituição Proponente:
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Apresentação do Projeto:
Trata-se de adendo de projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF-USP, intitulado "Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA,na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina", sob parecer número 69/2012 em 25/09/2012 (CAAE 04389512.2.000.0067); pelo CEP da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP sob parecer número 69574 em 08/08/2012; e pelo CEP da Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo sob parecer número 230.882 em 27/03/2013.O projeto inicial encaminhado ao CEP em 2012 tinha como objetivo avaliar o efeito da fortificação com ácido fólico nas farinhas de trigo e milho em indivíduos saudáveis submetidos apenas a fortificação compulsória e em pacientes ou indivíduos submetidos a terapêutica com ácido fólico e fortificação. No projeto inicial, visou-se avaliar se as concentrações séricas de ácido fólico não metabolizado afetam a metilação global, a expressão de RNAm de genes (β-globina, interferon-γ, TNF-α, interleucina-8, MTHFR e DHFR) em leucócitos mononucleares, a citotoxicidade e o número de células NK em indivíduos saudáveis expostos a fortificação compulsória com ácido fólico; e em pacientes com esferocitose hereditária e indivíduos portadores de traço talassêmico β em uso terapêutico desta vitamina e fortificação compulsória. Entretanto, os resultados podem ser decorrentes do fato de que a fortificação compulsória das farinhas de trigo e milho no Brasil é feita não somente com ácido fólico, na concentração de 150 μg, mas também com 4,2 mg de ferro /100 g de farinha. Na tentativa de compreender melhor o efeito desta dupla fortificação, foi proposto o presente adendo, que tem como objetivo avaliar o efeito da fortificação do ferro em conjunto com o ácido fólico em indivíduos expostos apenas à fortificação e naqueles que apresentam aumento da eritropoese/hemopoese. No presente adendo, pretende-se avaliar o efeito da fortificação do ferro na expressão de RNAm de genes que codificam proteínas que regulam o metabolismo do ferro, especialmente a regulação da hepcidina em indivíduos saudáveis e naqueles que apresentam aumento da eritropoese/hemopoese, além de realizar a dosagem dos parâmetros que avaliam o status do ferro e avaliar marcadores do estresse oxidativo. As novas análises serão realizadas em 88 amostras de soro/plasma ou cDNA, os quais estão armazenados em freezer -80C, dos indivíduos já incluídos no estudo, bem como nos demais indivíduos que serão incluídos até atingir o número amostral proposto. As determinações que serão realizadas neste adendo são: 1- parâmetros que avaliam o status do ferro (ferro sérico, ferritina, capacidade total de ligação ao ferro, saturação da transferrina), e em uma submostra (N=200) será determinada a concentração de hepcidina no soro; 2- biodisponibilidade estimada do ferro

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone (11) 3091 3622 - e-mail: cepfcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

dietético 2- expressão de RNAm dos genes da hepcidina (HAMP), BMP6, TMPRSS6, Hemojuvelina (HFE2), SMAD4, fator indutor de hipóxia - HIF (ARNT), interleucina-1, interleucina-6 e interleucina-10; 3- marcadores de estresse oxidativo (malondialdeído, produtos avançados da oxidação proteica, atividade da enzima δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D), relação nitrito/nitrato, FRAP (capacidade antioxidante do plasma), TAC (capacidade antioxidante total), TOS (estado oxidante total) e glutationa peroxidase e superoxido dismutase; 4- avaliação do consumo alimentar referente ao ferro 5 - Genotipagem dos genes TMPRSS6 e HFE.

Objetivo da Pesquisa:
Descrito acima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Serão colhidos 40 mL de sangue em jejum de 8 horas. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
A pesquisa é importante, pois poderá fornecer dados sobre os mecanismos e efeitos da fortificação do ferro em conjunto com o ácido fólico em indivíduos expostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
No presente adendo, está sendo solicitada a inclusão de outros dois centros colaboradores do projeto, tendo em vista a dificuldade de se alcançar o número de participantes da pesquisa proposto. Assim, foram anexadas as cartas de anuência das duas novas instituições participantes (Faculdade de Medicina da PUC – Campus Sorocaba e Hospital das Clínicas da UNICAMP), bem como as cartas de participação dos novos colaboradores. Para a pesquisa é prevista a inclusão de 50 pacientes com esferocitose hereditária, 100 indivíduos com β talassemia menor e 50 pacientes β talassemia intermedia e 400 indivíduos aparentemente saudáveis. Os pacientes que já tiveram suas amostras coletadas no projeto original (n=88) e que estão armazenadas em freezer, não necessitarão de nova coleta, mas receberão novo TCLE, solicitando permissão para os novos exames. Desta forma, 8 novos TCLEs foram apresentados: 1. Para os indivíduos controles já incluídos anteriormente, solicitando a permissão para fazer as novas análises nas amostras já coletadas e mantidas em biorrepositório; 2. Para os indivíduos/pacientes já incluídos com esferocitose hereditária e talassemia provenientes do ambulatório de anemias da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, solicitando a permissão para fazer as novas analises nas amostras já coletadas e mantidas em biorrepositório; 3. Para os indivíduos/pacientes já incluídos com esferocitose hereditária e talassemia provenientes do ambulatório de anemias da UNIFESP, solicitando a permissão para fazer as novas análises nas amostras já coletadas e mantidas e mantida em biorrepositório; 4. Para os indivíduos controles que serão coletados após a aprovação do adendo pelo CEP; 5. Para os indivíduos/pacientes com esferocitose hereditária e talassemia que serão recrutados no ambulatório de anemias da Irmandade santa Casa de Misericórdia de São Paulo após a aprovação do adendo pelo CEP. 6. Para os indivíduos/pacientes com esferocitose hereditária e talassemia que serão recrutados no ambulatório da UNIFESP após a aprovação do adendo pelo CEP. 7. Para os indivíduos/pacientes com esferocitose hereditária e talassemia que serão recrutados no ambulatório de Hematologia da PUC-SP em Sorocaba após a aprovação do adendo pelo CEP. 8. Para os indivíduos/pacientes com talassemia que serão recrutados na seção de hematologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, Campinas-

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone (11) 3091 3622 - e-mail: cepfcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

SP, após a aprovação do adendo pelo CEP. Os TCLE encontram-se sob a forma de convite e contemplam todos os requisitos descritos na Resolução 466/12.

Recomendações:
Recomenda-se a aprovação do adendo relativo ao presente projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Não há.

Situação do Parecer:

Tendo em vista as considerações acima, este CEP entende que o adendo relativo ao presente projeto de pesquisa poderá ser aprovado.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Profa. Dra. Valentina Porta
CEP/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone (11) 3091 3622 - e-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO 2 – FICHA DO ALUNO

29/11/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 8214646/1 - Eduardo De Carli

Email:	edecarli@usp.br
Data de Nascimento:	24/07/1989
Cédula de Identidade:	RG - 7089925395 - RS
Local de Nascimento:	Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Universidade Federal de Pelotas - Rio Grande do Sul - Brasil - 2011

Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Nutrição Experimental
Data de Matricula:	31/08/2012
Inicio da Contagem de Prazo:	07/08/2012
Data Limite para o Depósito:	05/12/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Celia Colli - 31/08/2012 até o presente. Email: cecolli@usp.br
Proficiência em Linguas:	Inglês, Aprovado em 31/08/2012
Prorrogação(ões):	120 dias Periodo de 07/08/2016 até 05/12/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 04/11/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Titulo do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matricula em 31/08/2012 Prorrogação em 30/05/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matricula de Acompanhamento em 18/07/2016
Impresso em: 29/11/2016 19:16:16

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

29/11/2016

9132 - 8214646/1 - Eduardo De Carli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-2/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos (1)	07/08/2012	20/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5736-2/2	Alterações Bioquímicas e Moleculares nas Anemias (1)	14/08/2012	18/09/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5751-1/1	Minerais em Nutrição: Distribuição Compartimental e Mecanismos de Regulação de sua Homeostase	11/09/2012	01/10/2012	30	2	100	A	N	Concluída
HNT5705-5/2	Consumo Alimentar de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	05/03/2013	18/04/2013	60	0	-	-	N	Pré-matrícula Indeferida
EDM5791-5/10	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	28/06/2013	120	8	93	A	N	Concluída
BIO5714-5/1	Genética de Populações (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	21/03/2013	03/07/2013	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	6	95	A	N	Concluída
HNT5732-9/1	Métodos para Avaliação do Consumo Alimentar de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	30/07/2013	12/09/2013	60	4	93	A	N	Concluída
BIO5786-5/1	Variabilidade Biológica no Homo Sapiens: Fatores Genéticos e Ambientais (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	09/09/2013	06/10/2013	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:
1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016
Impresso em: 29/11/2016 19:16:16

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 8214646/1 - Eduardo De Carli

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
49193	Celia Colli	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016
Impresso em: 29/11/2016 19:16:16

ANEXO 3 – CURRÍCULO LATTES

Eduardo De Carli

- **Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/9852815486381516**
- **Última atualização do currículo em 01/12/2016**

Resumo informado pelo autor

Graduado em Nutrição pela Universidade Federal de Pelotas (2011). Foi bolsista PIBIC/CNPq da Faculdade de Nutrição (UFPEL) (2008 - 2010) e Apoio Técnico/CNPq do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP (2012), onde atualmente é aluno de pós-graduação (doutorado) em Ciência dos Alimentos (área de concentração: Nutrição Experimental). **(Texto informado pelo autor)**

Dados pessoais

Nome Eduardo De Carli

Nascimento 24/07/1989 - Tucunduva/RS - Brasil

CPF 022.098.320-80

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Avaliação de variantes do gene TMPRSS6 e sua relação com o status de ferro em condições de eritropoese normal e aumentada
Orientador: Célia Colli
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2007 - 2011 Graduação em Nutrição.
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
Título: Implicações do genótipo UGT1A1 e de fatores comportamentais e dietéticos sobre os níveis séricos de bilirrubina: um estudo em Nutrigenômica com universitários portugueses
Orientador: Ângela Nunes Moreira

Formação complementar

2015 - 2015 Curso de curta duração em Modelos de ANOVA com apoio computacional. (Carga horária: 20h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em Análise de Regressão Múltipla - REG. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Biossegurança em Laboratórios de Saúde Pública. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Equipamentos - Utilização e Monitoramento. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Terapia Gênica e Terapia Celular. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

2008 - 2010 Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Laboratório de Imunologia Aplicada - Centro de Biotecnologia / UFPel

2008 - 2008 Vínculo: Estágio Extra Curricular , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Outras informações:
Laboratório de Biologia Molecular - Centro de Biotecnologia / UFPel

2. Instituto Politécnico de Bragança - IPB

2010 - 2010 Vínculo: Discente , Enquadramento funcional: Discente Intercambista Camões , Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Disciplina cursada: Nutrigenómica

2010 - 2011 Vínculo: Estágio Extra Curricular , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Escola Superior de Saúde (ESA) - Instituto Politécnico de Bragança (IPB)

3. Universidade de São Paulo - USP

2015 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) , Carga horária: 6, Regime: Parcial

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) , Carga horária: 6, Regime: Parcial

2012 - 2012 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Apoio Técnico , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:
Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição - FCF / USP

2012 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição - FCF/USP

Producão

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. doi CARLI, E.; LOBO, A. R.; SALES, C. H.; Teixeira, P.D.S.; SALES, A. L. C. C.; COLLI, C.
Short-Term Dietary Magnesium Restriction Lowers Spleen Iron Concentrations in Growing Rats Fed a High-Fat Diet. Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology. JCR, v.59, p.1298 - 1303, 2014.

2. doi LOBO, A. R.; GAIEVSKI, E. H. S.; CARLI, E.; ALVARES, E. P.; COLLI, C.
Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability in anaemic rats: the effects on iron species distribution, ferroportin-1 expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. British Journal of Nutrition. JCR, v.112, p.1286 - 1295, 2014.

3. doi MACHADO, EDNA HELENA DA SILVA; **DE CARLI, EDUARDO**; SZARFARC, SOPHIA CORNBLUTH; SOUZA, JOSÉ MARIA PACHECO; FUJIMORI, ELIZABETH; COLLI, CÉLIA
Anemia among pregnant women attending primary healthcare units in the municipality of São Paulo, Brazil: evaluations after the mandatory fortification of wheat and maize flours with iron. Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. , v.41, p.http://link.spr - , 2016.

Capítulos de livros publicados

1. **DE CARLI, E.**; TEIXEIRA, P. D. S.; COLLI, C.
Ferro In: Genômica Nutricional.1 ed.Barueri - SP : Manole, 2016, p. 207-216.

2. TEIXEIRIA, P. D. S.; **DE CARLI, E.**; COLLI, C.
Magnésio In: Genômica Nutricional.1 ed.Barueri - SP : Manole, 2016, p. 217-229.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ROMERO, A. B. R.; LIMA, F. S.; **CARLI, E.**; FOCK, R. A.; LOBO, A. R.; COLLI, C.
A 16-WK RESTRICTION OF 90% DIETARY MAGNESIUM REQUIREMENTS IMPAIRED WHOLE BODY INSULIN SENSITIVITY IN RATS FED A HIGH-FAT DIET: PRELIMINARY RESULTS In: 11 SLACA 'Ciência de alimentos: Qualidade de vida e Envelhecimento Saudável', 2015, Campinas.

11 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. , 2015. v.xx. p.00 - xx

2. TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; ROMERO, A. B. R.; LIMA, F. S.; **CARLI, E.**; SA, L. R. M.; PEREIRA, R. M. R.; LOBO, A. R.; COLLI, C.
A 8-WEEK RESTRICTION OF 70% DIETARY MAGNESIUM REQUIREMENTS DID NOT AFFECT THE ENHANCED BODY FAR IN YOUNG ADULT RATS FED A HIGH-FAT DIET In: L SUPFAB, 2015, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2015. v.xx. p.xx - xx

3. PANIZ, C.; BERTINATO, J. F.; LUCENA, M. R.; **CARLI, E.**; AMORIM, P. M. S.; ROEHRS, M.; CARVALHO, J. A. M.; FIGUEIREDO, M. S.; COLLI, C.; SHINOHARA, E. M. G.
HIGH DOSE (5 MG) DAILY FOLIC ACID SUPPLEMENTATION IN HEALTHY BRAZILIAN VOLUNTEERS IS ASSOCIATED WITH REDUCTION ON SERUM IRON AND INCREASE TOTAL IRON BINDING CAPACITY In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2015, São Paulo.
HEMO - Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. , 2015. v.XX. p.00 - 00

4. LOBO, AR; **DE CARLI, E.**; SALES, A. L. C. C.; TEIXEIRIA, P. D. S.; ROMERO, A. B. R.; LIMA, F. S.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C.
BONE MASS AND MICRO-ARCHITECTURE ARE IMPAIRED BY FEEDING GROWING RATS WITH A HIGH-FAT DIET In: Bioavailability 2014, 2014, Foz do Iguaçu.
Nutrire (Supl.). , 2014. v.39. p.17 - 17

5. LOBO, AR; DONATO JR, J.; FURIGO, I. C.; SALES, A. L. C. C.; ROMERO, A. B. R.; TEIXEIRIA, P. D. S.; **DE CARLI, E.**; LIMA, F. S.; COLLI, C.
CHANGES IN MAGNESIUM STATUS IN OBESITY: PRELIMINARY RESULTS USING HIGH-FAT FED RATS AND LEPTIN-DEFICIENT OB/OB MICE In: Bioavailability 2014, 2014, Foz do Iguaçu.
Nutrire (Supl.). , 2014. v.39. p.32 - 32

6. BERTINATO, J. F.; AMORIM, P. M. S.; **DE CARLI, E.**; FIGUEIREDO, M. S.; COLLI, C.; SONATI, M. F.; SANTOS, M. N. N. D.; BLAIA-DAVILA, E.; CANCADO, R.; SHINOHARA, E. M. G.
IRON AND FOLIC ACID STATUS IN B-THALASSEMIA HETEROZYGOTES SUBJECTS AFTER FLOUR FORTIFICATION IN BRAZIL In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2014. v.36. p.8 - 8

7. COLLI, C.; TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; LOBO, AR; **DE CARLI, E.**; SA, L. R. M.; SANTOS, E. W. C. O.; BORELLI, P.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; LIMA, F. S.
IRON STATUS OF RATS FED A MAGNESIUM-RESTRICTED HIGH-FAT DIET In: 15th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (TEMA 15), 2014, Orlando.
Book of Abstracts. , 2014.

8. LOBO, AR; MESQUITA, C. H.; GAIEVSKI, E. H. S.; **DE CARLI, E.**; TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; COLLI, C.
COMPARTMENTAL ANALYSIS FOR IRON DISTRIBUTION IN GROWING RATS FED A HIGH-FAT DIET In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2013. v.49. p.33 - 33

9. TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; LOBO, AR; **DE CARLI, E.**; SILVA, G. B.; BORELLI, P.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C.
DIETARY MAGNESIUM RESTRICTION: CHANGES IN WHOLE-BODY COMPOSITION AND TISSUE MAGNESIUM DISTRIBUTION IN RATS In: 12º Congresso Brasileiro de Alimentação e Nutrição, 2013, Foz do Iguaçu.
Nutrire (Supl.). , 2013. v.38. p.52 - 52

10. **DE CARLI, E.**; LOBO, AR; SALES, C. H.; TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; COLLI, C.
DIETARY MAGNESIUM RESTRICTION IN RATS FED A HIGH-FAT DIET: EFFECTS ON TISSUE IRON CONCENTRATIONS AND FERROPORTIN-1 EXPRESSION In: 10. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA, 2013, Campinas.
CD ROM. , 2013.

11. **DE CARLI, E.**; LOBO, AR; SALES, C. H.; TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; COLLI, C.
DIETARY MAGNESIUM RESTRICTION IN RATS FED A HIGH-FAT DIET: EFFECTS ON TISSUE IRON CONCENTRATIONS AND FERROPORTIN-1 EXPRESSION In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2013. v.49. p.68 - 68

12. TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; LOBO, AR; **DE CARLI, E.**; SANTOS, E. W. C. O.; BORELLI, P.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; LIMA, F. S.; COLLI, C.
DIETARY MAGNESIUM RESTRICTION IN RATS FED A HIGH-FAT DIET: ERYTHROCYTE FRAGILITY ACCOUNTS FOR LOWER SPLEEN IRON In: 10. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA, 2013, Campinas.
CD ROM. , 2013.

13. LOBO, AR; MESQUITA, C. H.; GAIEVSKI, E. H. S.; **DE CARLI, E.**; TEIXEIRIA, P. D. S.; SALES, A. L. C. C.; COLLI, C.
IRON DECOMPARTIMENTALIZATION INDUCED BY HIGH-FAT FEEDING IN RATS: A BIOKINETIC MODEL FOR IRON STATUS ANALYSIS In: 12º Congresso Brasileiro de Alimentação e Nutrição, 2013, Foz do Iguaçu.
Nutrire (Supl.). , 2013. v.38. p.52 - 52

14. LOBO, AR; SALES, A. L. C. C.; SA, L. R. M.; BORELLI, P.; GAIEVSKI, E. H. S.; **CARLI, E.**; TEIXEIRA, P. D.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C.
ANTIBIOTIC ADMINISTRATION IMPROVES WHOLE-BODY INSULIN SENSITIVITY AND ERYTHROCYTE COUNTS WITHOUT AFFECT ADIPOSITY IN RATS FED A HIGH-FAT DIET: PRELIMINARY RESULTS In: XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2012. v.48. p.14 - 14

15. SALES, A. L. C. C.; LOBO, AR; **CARLI, E.**; GAIEVSKI, E. H. S.; TEIXEIRIA, P. D. S.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C.
BONE MINERAL COMPOSITION IS DISRUPTED IN DIET-INDUCED OBESE RATS In: XVI Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), 2012, Havana.
Anais XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición. , 2012.

16. GAIEVSKI, E. H. S.; LOBO, AR; SALES, A. L. C. C.; **CARLI, E.**; BORELLI, P.; CRISMA, A.; NAKAJIMA, K.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C.
FEEDING A HIGH-FAT DIET AFFECTS IRON STATUS OF GROWING RATS In: XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2012. v.48. p.16 - 16

17. LOBO, AR; SALES, A. L. C. C.; **CARLI, E.**; GAIEVSKI, E. H. S.; TEIXEIRA, P. D.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C.
INCREASED ADIPOSITY IS NEGATIVELY ASSOCIATED WITH SERUM OSTEOCALCIN IN WISTAR RATS FED A HIGH-FAT DIET In: XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2012. v.48. p.14 - 14

18. GAIEVSKI, E. H. S.; LOBO, AR; SALES, A. L. C. C.; **CARLI, E.**; BORELLI, P.; CRISMA, A.; NAKAJIMA, K.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C.
IRON STATUS OF RATS FED HIGH-FAT DIETS In: XXVII Reunião Anual da FeSBE, 2012, Águas de Lindóia.
Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. , 2012. v.27. p.115 - 115

19. SEHN, Carla Pohl; **CARLI, E.**; MENDONCA, Marcelo; CASTELLI, Regina Maria; FRANÇA, Rodrigo Corrêa; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo; MOREIRA, Ângela Nunes; ALEIXO, José Antônio Guimarães
CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-FIMA DE SALMONELLA ENTERITIDIS In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2009, PORTO DE GALINHAS.
ANAIS DO 25º CBM. , 2009.

20. NEVES, A. C. B.; JUSTEN, S. K.; MACHADO, P. T.; COSTA, C. S.; **CARLI, E.**; MARMITT, L. P.
CONSUMO DE LANCHES DE FAST FOOD ENTRE ADOLESCENTES DE 14 A 18 ANOS EM ESCOLA PÚBLICA E PRIVADA In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XI ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, I MOSTRA CIENTÍFICA, 2009, PELOTAS.
XVIII CIC, XI ENPOS, I MOSTRA CIENTÍFICA. , 2009.

21. COSTA, C. S.; MARMITT, L. P.; **CARLI, E.**; NEVES, A. C. B.; JUSTEN, S. K.; MACHADO, P. T.
ESTADO NUTRICIONAL E CONSUMO DE FAST FOOD ENTRE ESCOLARES DE 14 A 18 ANOS DE PELOTAS - RS In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XI ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, I MOSTRA CIENTÍFICA, 2009, PELOTAS.
XVIII CIC, XI ENPOS, I MOSTRA CIENTÍFICA. , 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. CONRAD, Neida Lúcia; SEHN, Carla Pohl; **CARLI, E.**; BANDEIRA, Rafaela Oliveira; MENDONCA, Marcelo; DA HORA, Vanusa Pousada; MOREIRA, Ângela Nunes; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo; ALEIXO, José Antônio Guimarães
ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE MEMBRANA EXTERNA DE SALMONELAS NÃO REAGEM COM A PROTEÍNA NATIVA In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XI ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, I MOSTRA CIENTÍFICA, 2009, PELOTAS.
XVIII CIC, XI ENPOS, I MOSTRA CIENTÍFICA. , 2009.

2. BANDEIRA, Rafaela Oliveira; SEHN, Carla Pohl; **CARLI, E.**; CONRAD, Neida Lúcia; MENDONCA, Marcelo; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo; DA HORA, Vanusa Pousada; DELLAGOSTIN, Odir Antônio; ALEIXO, José Antônio Guimarães; MOREIRA, Ângela Nunes
AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNIZAÇÃO GENÉTICA VISANDO A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA A PROTEÍNA OmpX DE Salmonella Enteritidis In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XI ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, I MOSTRA CIENTÍFICA, 2009, PELOTAS.

XVIII CIC, XI ENPOS, I MOSTRA CIENTÍFICA. , 2009.

3. **CARLI, E.**; SEHN, Carla Pohl; CONRAD, Neida Lúcia; BANDEIRA, Rafaela Oliveira; MENDONCA, Marcelo; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo; ALEIXO, José Antônio Guimarães; MOREIRA, Ângela Nunes
CONSTRUÇÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE FORMADA PELA FUSÃO DO GENE fimA DE Salmonella Enteritidis E A SUBUNIDADE B DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL de Escherichia coli In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XI ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, I MOSTRA CIENTÍFICA, 2009, PELOTAS.
XVIII CIC, XI ENPOS, I MOSTRA CIENTÍFICA. , 2009.

4. **CARLI, E.**; CONRAD, Neida Lúcia; SEHN, Carla Pohl; MENDONCA, Marcelo; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo; DA HORA, Vanusa Pousada; DELLAGOSTIN, Odir Antônio; ALEIXO, José Antônio Guimarães; MOREIRA, Ângela Nunes
CLONAGEM DO GENE OmpX DE Salmonella Enteritidis EM PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO EM EUCARIOTOS In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008, PELOTAS.
XVII CIC, X ENPOS. , 2008.

5. CONRAD, Neida Lúcia; **CARLI, E.**; MENDONCA, Marcelo; SEHN, Carla Pohl; MOREIRA, Ângela Nunes; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo; ALEIXO, José Antônio Guimarães
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA A PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA OmpX DE Salmonella In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008, PELOTAS.
XVII CIC, X ENPOS. , 2008.

ANEXO 4 – NORMAS PARA A DEFESA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br