

Parte I - Métodos em epidemiologia nutricional

7 - Indicadores bioquímicos na avaliação do estado nutricional

Nádia M. F. Trugo
Alexandre G. Torres

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

TRUGO, NMF., and TORRES, AG. Indicadores bioquímicos na avaliação do estado nutricional. In: KAC, G., SICHIERI, R., and GIGANTE, DP., orgs. *Epidemiologia nutricional* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ/Atheneu, 2007, pp. 127-147. ISBN 978-85-7541-320-3. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Indicadores Bioquímicos na Avaliação do Estado Nutricional

Nádia M. F. Trugo e Alexandre G. Torres

Indicadores bioquímicos, assim como indicadores funcionais e clínicos, que estão relacionados com a ingestão e metabolismo de componentes de alimentos (nutrientes e não-nutrientes) são utilizados na epidemiologia nutricional como biomarcadores de exposição e de estado nutricional. Como o estado nutricional é dinâmico e resulta direta ou indiretamente da ingestão alimentar, os indicadores bioquímicos de estado podem ser usados para representar a exposição recente ou de longo prazo (habitual) a um determinado nutriente. Porém, ao passo que para alguns nutrientes pode-se estabelecer uma associação entre os indicadores bioquímicos de estado nutricional e a ingestão, para muitos nutrientes não existe uma associação clara. Em contrapartida, alguns biomarcadores refletem adequadamente a ingestão de nutrientes, mas não são bons indicadores de estado nutricional. A seleção de indicadores bioquímicos a serem utilizados em estudos de epidemiologia nutricional deve ser feita em função das questões específicas a serem investigadas, uma vez que para cada nutriente pode haver vários indicadores de estado, mas cada um deles pode estar se referindo a diferentes aspectos do metabolismo e utilização pelo organismo daquele nutriente em particular.

Os indicadores bioquímicos representam medidas objetivas de estado nutricional que, diferentemente de métodos de avaliação do consumo alimentar por meio de inquéritos alimentares (capítulos 10 e 11), não estão sujeitos a vieses na entrevista e na obtenção de dados. No entanto, os métodos bioquímicos também apresentam limitações e podem estar sujeitos a erros. A escolha entre os diferentes métodos depende do nutriente cuja exposição será avaliada, mas geralmente a complementação de métodos dietéticos e bioquímicos pode fornecer informações mais completas e abrangentes.

Neste capítulo serão abordados o uso de indicadores bioquímicos na avaliação do estado nutricional e as aplicações de indicadores bioquímicos e de outros biomarcadores relevantes na epidemiologia nutricional.

Indicadores Bioquímicos na Avaliação de Estado Nutricional

Indicadores Bioquímicos Estáticos e Funcionais

A compreensão do significado biológico dos indicadores bioquímicos de estado nutricional depende do conhecimento da função e da utilização (absorção, transporte, metabolismo e excreção) do nutriente no organismo. Os indicadores bioquímicos podem representar diferentes níveis de nutrição, que variam desde um estado

ótimo, quando há amplas reservas no organismo, até um estado de deficiência clinicamente manifesta, quando estão presentes alterações morfológicas e funcionais e sinais e sintomas clínicos característicos da deficiência. O extremo oposto, representado por níveis excessivos ou tóxicos de nutrientes, pode também ser avaliado por indicadores bioquímicos. A evolução da deficiência de nutrientes no organismo até a deficiência clínica passa por níveis intermediários de depleção característicos do estado subadequado, também chamado de marginal ou subclínico.

A velocidade com que ocorre a depleção nutricional e os diferentes níveis de depleção variam para cada nutriente, dependendo dos mecanismos homeostáticos e adaptativos que controlam sua utilização no organismo, do tamanho das reservas, da gravidade do decréscimo da ingestão ou da privação alimentar, do aumento da necessidade por modificação do estado fisiológico (crescimento, gestação, lactação) e de perdas por doenças.

Para alguns nutrientes, há conhecimento suficiente e métodos disponíveis para determinar um ou mais indicadores, correspondentes a um ou mais níveis de estado nutricional, como é o caso do folato e do ferro. No entanto, para vários outros nutrientes isso ainda não é possível, devido a limitações técnicas e/ou de conhecimento. Os níveis de depleção do estado nutricional de ferro e de folato e seus indicadores serão usados adiante como exemplos do uso de indicadores bioquímicos na avaliação do estado nutricional.

Vantagens importantes do uso de indicadores bioquímicos na avaliação da exposição e do estado nutricional são a possibilidade de determinar efeitos da exposição ao nutriente a curto, médio e longo prazos e a detecção de estados marginais em um ou mais estágios de depleção. Os estados nutricionais marginais são geralmente mais prevalentes do que estados de deficiência clínica e podem estar relacionados com uma série de alterações funcionais que representam uma situação desvantajosa para o organismo. Além disso, a capacidade de alguns indicadores para identificar estados marginais contribui para o entendimento de sua participação no desenvolvimento de doenças crônicas. A combinação de dois ou mais indicadores bioquímicos é desejável para a avaliação do estado nutricional e fornece informações mais completas e precisas.

Os indicadores bioquímicos de estado nutricional podem ser classificados como “estáticos” ou “funcionais” (Solomons, 2003). Na avaliação de estado de um determinado nutriente no organismo, os indicadores bioquímicos funcionais e estáticos podem representar um mesmo nível ou diferentes níveis de estado nutricional.

Os indicadores bioquímicos estáticos compreendem a avaliação quantitativa do teor de um nutriente, de seus metabólitos ou de outros componentes relacionados (proteínas de reserva ou de transporte, complexos macromoleculares), os quais representam adequadamente concentrações teciduais ou reservas do nutriente no organismo (Fidanza, 1999). Esses indicadores são determinados em amostras de sangue (sangue integral, plasma ou soro, eritrócitos, leucócitos, plaquetas), principalmente, e também em urina, unhas, cabelos e outros tecidos, como, por exemplo, o tecido adiposo. A escolha do tipo de amostra depende da informação que se pretende obter (estado recente ou de longo prazo, reservas, *pool* disponível para troca, entre outros) e também do nutriente de interesse, pois o mesmo tipo de amostra pode não fornecer a mesma informação para diferentes nutrientes.

Os indicadores funcionais representam uma categoria mais ampla, que inclui as funções bioquímicas de um nutriente e funções comportamentais e fisiológicas do organismo, as quais não só dependem da disponibilidade adequada do nutriente, mas resultam de uma integração mais abrangente de processos homeostáticos, de sistemas e de distribuição do nutriente no organismo como um todo. Podem ser classificados de acordo com o sistema que está sendo avaliado (hemodinâmica, integridade estrutural, transporte, imunidade, funcionamento do sistema nervoso, biologia reprodutiva, capacidade física) ou por tipo de teste (testes *in vivo* e *in vitro* de funções, respostas induzidas e testes de sobrecarga, atividades e respostas espontâneas de órgãos e tecidos, testes de desempenho) (Solomons, 2003).

Alguns indicadores funcionais, assim como os indicadores bioquímicos estáticos, requerem análises bioquímicas em amostras biológicas e, portanto, podem ser classificados como indicadores bioquímicos funcionais.

Grande parte dos indicadores funcionais é de indicadores não bioquímicos, não invasivos, o que representa uma grande vantagem em relação aos testes bioquímicos estáticos e funcionais, que, na sua maioria, dependem da obtenção de amostras de sangue. Contudo, os indicadores funcionais não bioquímicos podem apresentar várias limitações, tais como baixa especificidade, maior dificuldade em estabelecer faixas de normalidade, dificuldade de interpretação e maior influência de variáveis de confusão (Fidanza, 1999). Neste capítulo, serão abordados somente os indicadores funcionais bioquímicos, os quais refletem a integridade de um sistema bioquímico ou processo fisiológico que é dependente do nutriente de interesse. Os testes bioquímicos funcionais geralmente envolvem a determinação de atividade de enzimas e de metabólitos que participam das vias nas quais o nutriente desempenha alguma função. Testes bioquímicos funcionais baseados em técnicas de biologia molecular poderão constituir uma nova abordagem com potencial para aplicação na avaliação do estado nutricional, como, por exemplo, expressão de enzimas ou proteínas dependente de nutrientes, expressão de proteínas reguladoras da homeostasia e modulação nutricional de elementos reguladores da expressão gênica (Solomons, 2003).

Uma das principais dificuldades do uso de indicadores bioquímicos na avaliação do estado nutricional é a definição das faixas de normalidade para cada indicador. Para alguns indicadores, essas faixas podem estar bem definidas, com base em evidências científicas, ao passo que para a maioria das outras existem definições apenas tentativas. Para muitos, não há consenso. Uma vez conhecida a distribuição dos valores de um indicador para uma população saudável e com estado nutricional adequado, estabelecem-se estatisticamente os pontos de corte para os valores que representem excesso ou deficiência. Esses valores de referência podem ainda variar de acordo com a faixa etária, estado fisiológico, gênero e características genéticas, e ter sido estabelecidos apenas para uma ou algumas dessas situações. A determinação de indicadores bioquímicos e sua aplicação para avaliação do estado nutricional estão em constante evolução, em função do aprofundamento do conhecimento sobre a função e utilização de nutrientes no organismo e do desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos analíticos. Dessa forma, as faixas de normalidade e os pontos de corte estão sujeitos a constantes reavaliações.

Exemplos de testes bioquímicos estáticos e funcionais para avaliação do estado nutricional, para diferentes nutrientes, são apresentados na Tabela 1 e no Quadro 1, respectivamente.

Tabela 1 – Principais indicadores bioquímicos estáticos de nutrientes selecionados e seus níveis de referência mais utilizados na avaliação do estado nutricional^a

Nutriente	Indicador (unidade)	Aceitável	Risco moderado de deficiência	Alto risco de deficiência
Vitamina A	Retinol plasma ou soro ($\mu\text{mol/L}$)	> 0,70	0,35-0,70	< 0,35
Vitamina D	25-hidroxicolecalciferol soro (nmol/L)	-	-	< 12,5
Vitamina E	α -tocoferol plasma ou soro ($\mu\text{mol/L}$)	> 16,2	11,6-16,2	< 11,6
	($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ colesterol) ^b	-	-	< 2,2
Tiamina	Tiamina urina ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	> 66	27-66	< 27
Riboflavina	Riboflavina urina ($\mu\text{g}/\text{g}$ creatinina)	> 80	27-80	< 27
Biotina	Biotina plasma (nmol/L)	> 1,0	0,5-1,0	< 0,5
Folato	Folato plasma ou soro (nmol/L) ^c	> 11	6,8-11	< 6,8
	Folato eritrócitos (nmol/L) ^c	> 360	315-360	< 315
Vitamina B ₁₂	Cobalamina plasma ou soro (pmol/L)	> 150	110-150	< 110
	Transcobalamina soro (pmol/L)	-	-	< 15

Tabela 1 – Principais indicadores bioquímicos estáticos de nutrientes selecionados e seus níveis de referência mais utilizados na avaliação do estado nutricional^a (continuação)

Nutriente	Indicador (unidade)	Aceitável	Risco moderado de deficiência	Alto risco de deficiência
Vitamina C	Ácido ascórbico plasma ($\mu\text{mol/L}$)	> 17,0	11,4-17,0	< 11,4
	Ácido ascórbico sangue ($\mu\text{mol/L}$)	> 28	17-28	< 17
Ferro	Ferritina soro ou plasma ($\mu\text{g/L}$)	> 100	< 20	< 12
	Ferro soro ($\mu\text{mol/L}$)	-	< 20,0	< 10,7
	Capacidade total de ligação de ferro soro ($\mu\text{mol/L}$)	-	-	< 71,6
Zinco	Zinco plasma ($\mu\text{mol/L}$)	9-22		< 9,0
Cobre	Cobre soro ou plasma ($\mu\text{mol/L}$)	13-22		
	Ceruloplasmina ($\mu\text{mol/L}$)	2-4		
Selênio	Selênio plasma ($\mu\text{mol/L}$)	0,76-1,52	0,63-0,75	0,25-0,38
	Selênio eritrócitos ($\mu\text{mol/L}$)	1,13-2,41		~ 0,45

Fontes: adaptada de a - Fidanza (1999) e Van den Berg et al. (1993); b - Thurnham et al. (1986); c - Bailey et al. (2001).

Quadro 1 – Exemplos de indicadores bioquímicos funcionais de nutrientes selecionados e classificação de acordo com o tipo de teste utilizado na avaliação do estado nutricional

Tipo de teste	Nutriente	Indicador
Atividades enzimáticas: resposta à adição de co-fatores ^a	Tiamina	Transcetolase em eritrócitos (tiamina pirofosfato)
	Piridoxina	Transaminases em eritrócitos (piridoxal-5-fosfato)
	Riboflavina	Glutatião redutase em eritrócitos (FAD)
	Zinco	Fosfatase alcalina em soro
	Selênio	Glutatião peroxidase em eritrócitos
Metabólitos ou componentes cujos níveis podem ser alterados pela deficiência do nutriente ^b	Folato (também cobalamina e/ou piridoxina)	Aumento da homocisteína em plasma ou soro
	Folato	Aumento da excreção de ácido formiminoglutâmico na urina após teste de sobrecarga com histidina
	Vitamina B ₁₂	Aumento de ácido metilmalônico em plasma (ou soro) e na urina após teste de sobrecarga com valina
Integridade estrutural	Vitamina E, selênio	Fragilidade de eritrócitos (grau de hemólise)
Miscelânea	Folato	Teste de supressão da deoxiuridina em células da medula óssea ou em linfócitos
	Retinol	Dose-resposta relativa; dose-resposta relativa modificada (di-hidroxi retinol)

a - Aumento na atividade *in vitro* acima de um determinado valor de atividade, em relação ao valor inicial, pode ser indicativo de deficiência.

b - Função dependente do nutriente em questão ou relacionada com a regulação homeostática das reservas do nutriente.

Fontes: baseado em Solomons (2003) e Fidanza (2003).

Os pontos de corte relacionados na tabela são aqueles mais utilizados na interpretação do estado nutricional de indivíduos adultos e sobre os quais há maior consenso. Esses valores podem ser diferentes para diferentes faixas etárias e conforme gênero, gestação e lactação, dependendo do nutriente e do indicador. A sensibilidade do indicador e a exatidão de seus valores de referência variam bastante para cada nutriente.

Fatores Relacionados com a Utilização de Métodos Bioquímicos na Avaliação Nutricional

Os métodos bioquímicos para avaliação do estado nutricional são considerados bastante objetivos, pois comparados aos métodos de avaliação de consumo alimentar, principalmente por meio de inquéritos alimentares, não são afetados pela qualidade da informação obtida nas entrevistas.

No entanto, vários fatores podem afetar os indicadores bioquímicos e devem ser identificados e controlados nas análises estatísticas. Esses fatores podem ser biológicos, tais como idade, gênero, características genéticas, estado fisiológico e hormonal, interação metabólica com outros nutrientes, infecções e processos inflamatórios. Podem também ser fatores ambientais/comportamentais, tais como alcoolismo, tabagismo e contaminação ambiental (Hunter, 1998; Potischman, 2003).

Além disso, fatores de natureza técnica relacionados com a coleta, manuseio e análise em laboratório das amostras contribuem para a variabilidade dos resultados obtidos com o uso de indicadores bioquímicos (Hunter, 1998). A redução ou eliminação desses fatores permite não somente o decréscimo da variabilidade como também uma interpretação correta dos resultados, e deve ser alcançada por uma adequada padronização e controle de métodos em todas as etapas, desde a coleta de amostras até a análise laboratorial (Blanck et al., 2003).

A escolha do indicador bioquímico e do método de análise laboratorial deve levar em conta sua 'especificidade', a 'sensibilidade' e a 'representatividade'.

Na avaliação de uma resposta de indicador bioquímico à ingestão de um nutriente e à variação do estado nutricional do indivíduo, a sensibilidade corresponde à capacidade de variação dos níveis do indicador no organismo em função das variações na ingestão e no nível de estado nutricional, respectivamente, ao passo que a especificidade está relacionada com uma resposta específica, ou seja, para aferi-la é preciso que a variação dos níveis do indicador do nutriente no organismo não responda também a outros nutrientes e componentes de alimentos e outros fatores de confusão (Hunter, 1998).

Em termos laboratoriais, a sensibilidade de um método é definida como a modificação da resposta em função da modificação na concentração, na quantidade absoluta ou na propriedade da substância analisada (analito). Métodos sensíveis também apresentam baixos limites de detecção, ou seja, a menor concentração ou quantidade absoluta do analito que pode ser detectada com certeza razoável. A exatidão de um método pode ser definida como a fidedignidade com a qual este mede a quantidade do analito. Já a sua especificidade define a capacidade de análise do analito, especialmente na presença de outros analitos com propriedades químicas semelhantes ou de substâncias que podem nele interferir. A especificidade do método analítico pode afetar tanto sua precisão quanto sua exatidão. Métodos laboratoriais analíticos modernos, com alta sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, estão atualmente disponíveis para a determinação de uma ampla gama de indicadores bioquímicos.

Os valores de referência (faixas de normalidade e pontos de corte) dos indicadores bioquímicos na avaliação do estado nutricional devem ser representativos da população em estudo e deveriam, idealmente, ser estabelecidos para essa população (Hunter, 1998). Entretanto, tal nível de representatividade não é viável na maior parte dos estudos. A avaliação do estado nutricional do indivíduo e de populações muitas vezes é feita por comparação com os valores de referência conhecidos para outras populações que apresentem características o

mais próximas possível daquelas da população em estudo. No caso de populações, pode-se estabelecer o desvio da distribuição em relação à população de referência ou à prevalência de indivíduos cujos valores estão abaixo ou acima dos pontos de corte.

Uma vez definidos o indicador bioquímico e o método analítico laboratorial que serão utilizados, deve-se tomar vários cuidados, desde a coleta de amostras até a análise laboratorial, para evitar degradação do componente a ser medido, interferência de outros compostos e erros analíticos, que irão comprometer os resultados e sua interpretação.

Os protocolos de coleta, transporte, armazenamento e manuseio das amostras devem ser padronizados. Tais procedimentos devem ser cuidadosamente planejados, levando-se em conta o tipo de amostra (sangue, urina e outros), a estabilidade dos componentes a serem medidos e a interferência de outros compostos (Blanck et al., 2003; Potischman, 2003; Wild et al., 2001). Para alguns nutrientes, como o folato, a vitamina A e os carotenóides, a proteção contra exposição à luz é essencial. Os nutrientes antioxidantes (vitaminas C e E, carotenóides), a vitamina A e os ácidos graxos insaturados são passíveis de degradação por oxidação na presença de oxigênio molecular. Dessa forma, a armazenagem de amostras para análise futura de tais componentes deve ser feita com a presença de um antioxidante (como o BHT e/ou o pirogalol) e em atmosfera de nitrogênio. Para a dosagem de elementos-traço (por exemplo, zinco, selênio, ferro) e ácidos graxos, cujas concentrações em fluidos biológicos é baixa e/ou a possibilidade de contaminação externa é alta, deve-se proceder à lavagem apropriada e escolha adequada do tipo do material a ser utilizado para evitar a contaminação e também a interferência de outros componentes que possam prejudicar a análise. A estabilidade térmica dos componentes a serem medidos (vitaminas, proteínas e enzimas de maneira geral) também deve ser levada em consideração e, portanto, a temperatura na qual as amostras são recolhidas, armazenadas e manuseadas também deve ser adequada. A armazenagem de amostras em baixas temperaturas também reduz a perda de componentes suscetíveis à oxidação. Quando há variação sazonal na disponibilidade de alimentos, as amostras dos casos e dos controles deverão ser obtidas simultaneamente. No caso dos biomarcadores cujas concentrações no sangue ou na urina variam ao longo do dia, as amostras devem ser obtidas pela manhã, após jejum noturno. Em alguns casos, a coleta do volume total de urina produzido durante um período de 24 horas é mais indicada. Quando não for possível adotar esses procedimentos, deve-se controlar o momento da coleta.

Uso de Indicadores Bioquímicos na Avaliação do Estado de Folato e Ferro

Folato

O folato, sob a forma de diferentes coenzimas, atua em reações de transferência de unidades de carbono (metil, formil, metenil), que são essenciais para a metilação de biomoléculas (proteínas, DNA, RNA, fosfolipídios), a síntese de nucleotídeos e a interconversão de aminoácidos (Bailey et al., 2001).

Os estágios sequenciais da deficiência de folato no organismo humano e os diferentes indicadores que podem representar cada um desses estágios já estão bem definidos (Herbert, 1999). No início da depleção, que corresponde a um balanço negativo de folato, porém com reservas teciduais ainda adequadas, há decréscimo da concentração de folato no soro (plasma também é usado). Com a continuidade do balanço negativo, as reservas decrescem e há diminuição da concentração de folato em eritrócitos, que ocorre paralelamente à depleção de folato no fígado, o principal órgão de reserva de folato no organismo. Ambos, folato no plasma e em eritrócitos, são indicadores bioquímicos estáticos. Paralelamente, há aumento da excreção urinária de Formimino-glutamato (Figlu) após uma dose oral de sobrecarga de histidina. O Figlu é um metabólito intermediário da conversão de histidina em glutamato, dependente de folato. Este indicador funcional, no entanto, não é específico para a

deficiência de folato, pois uma percentagem dos pacientes deficientes em vitamina B₁₂ também apresenta elevada excreção de Figlu.

Com o avanço da deficiência, há prejuízos metabólicos e funcionais que podem ser representados por alterações em indicadores funcionais, como a hipersegmentação (aumento do número médio de lobos) dos neutrófilos e valores anormais no teste de supressão da incorporação do uridilato ao DNA pelo timidilato em suspensão ou cultura de células. Esses primeiros estágios são considerados marginais ou subclínicos. Com o agravamento da depleção, pode ocorrer deficiência clínica, que é classicamente caracterizada pela anemia megaloblástica, com o baixo nível de hemoglobina no sangue acompanhado pelo aumento do volume corpuscular médio, devido ao aumento do volume dos eritrócitos (macrocitose). A anemia megaloblástica também ocorre na deficiência de vitamina B₁₂, e suas características hematológicas são indistinguíveis da deficiência de folato. O diagnóstico diferencial deve ser feito por meio dos indicadores bioquímicos específicos para cada uma dessas vitaminas.

As concentrações de folato no soro ou plasma e em eritrócitos são os indicadores mais utilizados para avaliação do estado nutricional quanto ao folato. O folato no soro reflete melhor o balanço de folato a curto prazo (cerca de 1 a 2 dias) e, portanto, flutua mais com a ingestão recente. Entretanto, o folato em eritrócitos reflete a sua disponibilidade para incorporação celular durante a hematopoiese e representa uma integração de sua ingestão por um período mais prolongado, cerca de 120 dias precedentes, o que corresponde à meia-vida dos eritrócitos. Dessa forma, o folato em eritrócitos é considerado um melhor indicador de estado do que o folato no soro, porque é mais representativo do folato nos tecidos (Mason, 2003).

Os pontos de corte classicamente empregados para caracterizar deficiência de folato são as concentrações abaixo de 3 ng/ml (6,8 nmol/L) para folato no soro e de 140 ng/ml (315 nmol/L) para folato em eritrócitos, que são bons preditores do risco de anemia, ao passo que concentrações de 3 a 4,8 ng/ml (11 nmol/L) e de 140 a 160 ng/ml (360 nmol/L), respectivamente, são consideradas deficiência marginal (Bailey et al., 2001). No entanto, há um consenso crescente de que esses pontos de corte provavelmente deverão ser modificados e que indicadores atualmente promissores deverão ser validados, ou que novos indicadores e métodos devem ser desenvolvidos para avaliar o estado de folato (Mason, 2003). Alterações mais sutis no estado de folato têm conseqüências funcionais e clínicas importantes, e o que atualmente se considera como deficiência marginal de folato, que é mais prevalente do que a anemia megaloblástica, pode ser redefinido.

Um indicador funcional para avaliação do estado de folato que atualmente desperta muito interesse é a concentração de homocisteína no soro ou em plasma. Embora seja um indicador sensível, não é um indicador específico para o estado de folato. A elevação da concentração de homocisteína sérica ou plasmática é um indicador não só da depleção de folato como também de vitamina B₁₂ (McKinley, 2000; Selhub, 2006), porque ambos participam como cofatores na reação de remetilação da homocisteína à metionina. O aumento da concentração de homocisteína pode ocorrer antes que as concentrações de folato no plasma e em eritrócitos e a concentração de vitamina B₁₂ no plasma decresçam para os valores considerados indicativos de deficiência (McKinley, 2000; Refsum et al., 2006).

A concentração de homocisteína é inversamente relacionada com a concentração de folato no plasma, mesmo quando os níveis de folato variam em uma faixa considerada adequada (Refsum et al., 2006; Rosa, Pereira & Trugo, 2004). Outros determinantes do aumento da homocisteína, tais como insuficiência renal crônica, hipertensão, consumo elevado de álcool e cafeína, tabagismo, idade (> 65 anos) e estado de vitamina B₆ (Refsum et al., 2006), devem ser controlados quando se pretende avaliar o estado de folato utilizando a concentração de homocisteína. Contudo, faixas normativas de referência e pontos de corte de concentração de homocisteína para caracterizar deficiência de folato não foram ainda claramente estabelecidos. Neste caso, esses parâmetros podem ser diferentes daqueles utilizados para definir hiperhomocisteinemia como fator de risco para doenças cardiovasculares oclusivas.

Polimorfismos nos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato podem influenciar o estado de folato e a concentração de homocisteína plasmática (Refsum et al., 2006; Van der Linden et al., 2006). Uma das mais estudadas é a mutação 677C → T no gene da enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), que catalisa a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, o co-substrato para metilação da homocisteína a metionina pela enzima metionina sintase. Vários estudos mostram que os portadores do genótipo T/T, quando comparados com portadores dos genótipos C/T ou C/C, apresentam menores níveis de folato plasmático e maiores níveis de homocisteína, especialmente em associação com baixos níveis de folato no plasma (Refsum et al., 2006), e apresentam melhores respostas à suplementação ou à ingestão dietética elevada de folato (Fohr et al., 2002; Silaste et al., 2001). Na gestação, o genótipo materno T/T, principalmente quando associado a um estado inadequado de folato e níveis elevados de homocisteína, aumenta o risco de defeitos do tubo neural nos fetos (Van der Linden et al., 2006).

Ferro

A maior parte do ferro corporal exerce papel estrutural e funcional no grupamento heme, que está presente em proteínas envolvidas na ligação e transporte de oxigênio, como a hemoglobina e a mioglobina, e em heme-enzimas que participam de processos integrados de transporte de elétrons. Diversas enzimas não-heme que contêm ferro também participam do transporte de elétrons e de vários processos bioquímicos, tais como regulação gênica e regulação do crescimento e diferenciação celular. Como o ferro é um nutriente essencial, mas é também potencialmente tóxico, complexos processos regulatórios envolvendo diversas proteínas atuam para atender às demandas celulares e evitar o seu acúmulo excessivo (Beard, 2001).

Assim como para o folato, diferentes níveis da deficiência de ferro no organismo e seus respectivos indicadores estão bem definidos. Os três níveis de deficiência de ferro são a depleção das reservas de ferro, a deficiência funcional de ferro e anemia por deficiência de ferro (Hambidge, 2003).

O indicador mais sensível das reservas de ferro é a concentração de ferritina sérica ou plasmática, que é proporcional à quantidade de ferro estocada na ferritina intracelular. Níveis plasmáticos menores que 12 µg de ferritina/L são indicativos de reservas de ferro depletadas. Fatores como presença de infecção, processos inflamatórios e outras doenças causam aumento na concentração de ferritina plasmática, uma vez que a ferritina é uma proteína de fase aguda. Outros indicadores estáticos, como a transferrina e a capacidade total de ligação de ferro no plasma, também se encontram elevados na depleção das reservas de ferro, porém são indicadores menos sensíveis e confiáveis.

No nível da deficiência funcional de ferro, os indicadores clássicos são a saturação da transferrina sérica, que normalmente é de 30-35% e cujo valor abaixo de 15% é indicativo de deficiência, e a concentração de protoporfirina nos eritrócitos, que aumenta devido à insuficiência de ferro para completar a síntese de hemoglobina. Um indicador sensível e específico para a deficiência funcional de ferro é a concentração de receptores de transferrina sérica, que está aumentada quando há suprimento insuficiente de ferro. Esta forma solúvel no plasma é liberada proporcionalmente ao número de receptores de transferrina na membrana celular, o qual aumenta em função da necessidade de ferro intracelular. Contudo, os dados ainda são limitados para estabelecer pontos de corte para este indicador.

O nível correspondente à deficiência clínica de ferro, que é a anemia microcítica e hipocrômica, se caracteriza por baixos níveis de hemoglobina (< 12 g/dL de sangue em adultos), o indicador utilizado para definir anemia, cuja alteração, no entanto, não é específica para a deficiência de ferro. Uma vez que a deficiência de outros nutrientes, como folato, vitamina B₁₂ e proteína, e outros fatores, tais como infecções e inflamações crônicas, hemoglobinopatias e gestação, também afetam a concentração de hemoglobina, outros indicadores de estado, preferencialmente a ferritina, devem ser usados para caracterizar a anemia por deficiência de ferro

(Hambidge, 2003; Hunter, 1998). Outras manifestações da deficiência de ferro são as alterações nos sistemas imune e neural, na regulação térmica e no metabolismo energético, que muitas vezes ocorrem simultaneamente e podem ou não estar associadas à anemia. Algumas dessas alterações podem ser utilizadas como indicadores funcionais do estado de ferro (Beard, 2001).

Aplicações de Indicadores Bioquímicos em Epidemiologia Nutricional

Uso de Biomarcadores na Avaliação da Exposição Nutricional

Os biomarcadores de exposição nutricional podem representar a ingestão de nutrientes ou de componentes alimentares não nutrientes, tais como colesterol, flavonóides e outros compostos fenólicos, que apresentam ação biológica relacionada com o risco e/ou a prevenção de doenças (Wild et al., 2001). Nesse contexto, os indicadores bioquímicos de estado nutricional podem ser usados como biomarcadores de ingestão de nutrientes, através do consumo habitual de alimentos e/ou uso de suplementos, e para a validação de instrumentos de avaliação de ingestão dietética. Além disso, os biomarcadores de exposição podem ser usados em estudos para avaliar a resposta à intervenção nutricional. Em muitos casos, os biomarcadores são uma alternativa importante aos métodos de avaliação de consumo alimentar quando sua medida por tais métodos é difícil ou impossível (Potischman, 2003). É o que acontece, por exemplo, quando há grande variação dos teores de um componente no mesmo alimento, dependendo das características de plantio, processamento, armazenamento e preparo, e quando há pouca fidelidade no relato de consumo e dificuldade em estabelecer porções consumidas.

Os biomarcadores, sejam eles indicadores de estado nutricional ou não, são válidos para avaliar a exposição quando apresentam uma relação direta sensível e específica com a ingestão do nutriente ou substância bioativa que estão sendo investigados. Além disso, deve-se considerar se o biomarcador apresenta integração temporal, ou seja, se reflete um efeito cumulativo da dieta, possibilitando avaliar exposição mais prolongada ou de longo prazo (habitual; semanas, meses ou anos), ou se reflete apenas exposição de curto prazo (recente; horas ou dias) (Hunter, 1998; Potischman, 2003).

As principais limitações do uso de biomarcadores de exposição nutricional são: a) a magnitude da correlação entre os níveis do biomarcador em amostras de sangue, urina ou tecidos e a ingestão do nutriente em questão depende do grau de controle homeostático (saturação na absorção, excreção do excesso, controle hormonal) do nutriente, da faixa de ingestão da população estudada, da adaptação metabólica, de características genéticas e da existência de outros determinantes; b) a relação entre a ingestão de um nutriente e seus biomarcadores, muitas vezes representados por seus níveis sanguíneos, raramente é linear e geralmente sofre atenuação de resposta em função do aumento da ingestão, podendo atingir um platô e, portanto, perdendo sensibilidade (Hunter, 1998).

A utilização de indicadores bioquímicos de estado como biomarcadores para avaliação da exposição nutricional será exemplificada neste tópico com nutrientes selecionados pelo seu interesse epidemiológico e pelos contrastes de associações pouco ou muito evidentes que seus indicadores apresentam com a ingestão.

Folato e Ferro

Os indicadores bioquímicos do estado de folato, folato no plasma e folato em eritrócitos refletem adequadamente a exposição, pois respondem bem à suplementação (McKinley, 2000) e à fortificação de alimentos (Pfeiffer et al., 2005), mesmo em indivíduos com estado nutricional adequado, e apresentam boas associações com a ingestão dietética quando esta varia numa faixa ampla (Pfeiffer et al., 2005; Selhub, 2006). Como mencionado

anteriormente, o folato no plasma é mais sensível à ingestão recente e o folato em eritrócitos reflete bem a ingestão habitual (Mason, 2003). O folato no plasma pode ser também um marcador para ingestão de frutas e vegetais em populações que não consomem alimentos fortificados (Brevik et al., 2005). A homocisteína no plasma também responde bem à suplementação e fortificação de alimentos com folato e apresenta associação inversa com a ingestão dietética de folato (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 2005; Selhub, 2006).

Por sua vez, os indicadores bioquímicos do estado de ferro, de maneira geral, embora possam responder bem à suplementação e à fortificação de alimentos em condições adequadas, especialmente em populações com deficiência de ferro, não apresentam boas correlações com a ingestão dietética de ferro (Hunter, 1998). Isso ocorre possivelmente porque muitos fatores dietéticos influenciam sua biodisponibilidade, tais como a forma com que o ferro se encontra nos alimentos (forma heme ou não-heme) e a presença de nutrientes e outros componentes alimentares que dificultam (cobre e manganês, fitatos, polifenóis, ácido oxálico) ou facilitam (vitamina C, ácidos orgânicos, peptídios contendo cisteína) sua absorção (Heath & Fairweather-Tait, 2002). Além disso, alguns indicadores, como o ferro sérico, a saturação da transferrina e a capacidade total de ligação de ferro, apresentam alta variabilidade a curto prazo (minutos e horas) (Hambidge, 2003).

Vitamina A e Carotenóides

A concentração de retinol no plasma ou soro não é um indicador sensível de ingestão nem de estado de vitamina A, uma vez que é homeostaticamente bem regulada em função principalmente da mobilização das reservas hepáticas. Em populações com reservas hepáticas adequadas, o retinol plasmático não apresenta associação com a ingestão de vitamina A e pode apresentar apenas uma fraca associação com o uso de suplementos. Entretanto, em populações cuja ingestão habitual de vitamina A é baixa e que, portanto, possuem pequenas reservas hepáticas e baixos níveis de retinol plasmático, a resposta deste biomarcador ao aumento de ingestão e, principalmente, à suplementação com vitamina A é mais marcante (Solomons, 2001; Thurnham & Northrop-Clewes, 1999).

O retinol plasmático é um indicador importante do estado de vitamina A no organismo quando as reservas hepáticas estão bastante depletadas. Concentrações de retinol no plasma $< 10 \mu\text{g/dL}$ ($0,35 \mu\text{mol/L}$) são consideradas como deficientes, e de 10 a $20 \mu\text{g/dL}$ ($0,7 \mu\text{mol/L}$) como marginais (Van den Berg et al., 1993). No entanto, o decréscimo dos níveis de retinol plasmático não está associado apenas com uma diminuição nas reservas, podendo também ser um reflexo da diminuição na síntese e liberação hepática de proteína ligante de retinol (RBP, do inglês *Retinol Binding Protein*), a proteína transportadora de retinol no plasma, o que pode ocorrer nas deficiências de proteínas e de zinco e em processos infecciosos e trauma (Thurnham & Northrop-Clewes, 1999).

A concentração de retinol no leite materno vem sendo considerada um melhor e mais sensível indicador de estado de vitamina A em nutrizes (Underwood, 1994) e é também mais sensível à ingestão dietética e ao uso de suplementos de vitamina A do que o retinol plasmático (Rice et al., 2000). Sugere-se que concentrações menores que $30 \mu\text{g/dL}$ ($1,1 \mu\text{mol/L}$) de retinol no leite materno seriam insuficientes para atingir níveis adequados de reservas hepáticas de retinol nos lactentes, a fim de evitar deficiência de vitamina A após o desmame (Underwood, 1994).

Outros indicadores bioquímicos utilizados para avaliação de estado de vitamina A, como a proteína ligante de retinol no plasma e testes de dose-resposta relativa (testes funcionais), também não são sensíveis à ingestão dietética e a variações de estado em populações com reservas adequadas, sendo mais importantes para determinar estado e respostas à ingestão e suplementação em populações com reservas depletadas (Bahl et al., 2002). No caso de ingestão excessiva, ou hipervitaminose, a concentração de ésteres de retinila no plasma é um melhor indicador de estado do que o retinol, pois a concentração do primeiro aumenta de forma mais acentuada (Hunter, 1998).

Embora não se tenham estabelecido indicadores de estado para carotenóides, a utilização de biomarcadores de ingestão destas substâncias é de interesse crescente, devido à sua ação antioxidante e a outras ações que desempenham no organismo, independentemente do papel de alguns deles como pró-vitamina A. Vários estudos sugerem que os carotenóides desempenham papel protetor contra Doenças Cardiovasculares (DCV), degeneração da mácula e alguns tipos de câncer (Solomons, 2001). Uma vez que os carotenóides são transportados nas lipoproteínas plasmáticas e seus níveis plasmáticos apresentam correlação com os níveis de colesterol, é desejável que as concentrações de carotenóides no plasma sejam também expressas em relação ao colesterol. As concentrações plasmáticas de carotenóides, ao contrário do retinol, não apresentam regulação homeostática estrita e são mais sensíveis à ingestão dietética e, principalmente, de suplementos (Thurnham & Northrop-Clewes, 1999). De maneira geral, as concentrações de carotenóides no plasma e no tecido adiposo são biomarcadores adequados para a ingestão alimentar. Porém, as correlações observadas variam substancialmente, dependendo do carotenóide avaliado (El-Somehy et al., 2002).

O β -caroteno é um dos carotenóides mais estudados. Dentre aqueles com atividade de provitamina A (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina), é o que apresenta maior eficiência de conversão em vitamina A no organismo. Porém, essa conversão apresenta alta variabilidade, mesmo entre indivíduos com estado adequado de vitamina A, e parece ser mais eficiente em indivíduos deficientes em vitamina A (Tang, Dolnikowski & Russel, 2003). A concentração de β -caroteno no plasma é sensível à ingestão e apresenta capacidade de integração temporal por várias semanas, ou seja, reflete a exposição não apenas recente, mas também por períodos mais prolongados. Dependendo da dose e do tempo de suplementação, têm sido relatados aumentos de até vinte vezes na concentração de β -caroteno no plasma de diferentes grupos populacionais (Hunter, 1998; Mayne et al., 1998). A suplementação materna com β -caroteno também aumenta sua concentração no leite (Canfield et al., 1997), que por sua vez apresenta correlação com o β -caroteno no plasma materno (Canfield et al., 1997; Meneses & Trugo, 2005). O β -caroteno no plasma também é sensível à ingestão de alimentos ricos em β -caroteno, mas as respostas são mais discretas do que as observadas para o uso de suplementos, mesmo utilizando-se quantidades equivalentes, o que pode estar relacionado principalmente com a menor biodisponibilidade dos carotenóides na matriz alimentar (Van het Hof et al., 2000). Associações relativamente boas entre concentrações plasmáticas e estimativas de ingestão por vários métodos de avaliação de consumo alimentar têm sido relatadas para o β -caroteno (Hunter, 1998; Thurnham & Northrop-Clewes, 1999).

Vitamina E

A ingestão alimentar qualitativa e quantitativa de vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) é difícil de avaliar com métodos de consumo alimentar, principalmente por meio de inquéritos, devido à dificuldade de relatar e quantificar as suas fontes dietéticas. Os óleos vegetais, especialmente, têm teores e composição de vitamina E que variam amplamente, dependendo do tipo de óleo, do processamento, do tempo de armazenamento e da adição de antioxidantes (Potischman, 2003).

Os tocoferóis são potentes antioxidantes que reduzem a peroxidação lipídica, protegendo e contribuindo para a integridade de membranas celulares, onde apresentam também papel estrutural. O α -tocoferol é a forma mais ativa biologicamente e, além de sua ação antioxidante e estrutural, atua também na transcrição de genes e na inibição da proliferação celular, da agregação de plaquetas e da adesão de monócitos (Morrisey & Sheehy, 1999). A maior abundância relativa de α -tocoferol nas lipoproteínas plasmáticas e nos tecidos, apesar de o γ -tocoferol ser a principal forma de vitamina E nos óleos utilizados na dieta ocidental, é explicada pela maior oxidação do γ -tocoferol no organismo e pela presença no fígado da proteína de transferência de α -tocoferol (α -TTP) que seletivamente o direciona para as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) aí sintetizadas,

em detrimento do γ -tocoferol. Uma outra α -TTP, presente no fígado e em diversos tecidos, é responsável pela distribuição intracelular preferencial de α -tocoferol (Dutta-Roy, 1999). Como os tocoferóis são transportados pelas lipoproteínas, suas vias de captação pelos tecidos estão relacionadas com o metabolismo das lipoproteínas (Mardones & Rigotti, 2004) e seus níveis plasmáticos apresentam correlação com o colesterol e os triacilgliceróis (Morrisey & Sheehy, 1999). Portanto, as concentrações plasmáticas de tocoferóis são também expressas em relação às concentrações desses componentes para evitar distorções devido às variações dos mesmos (Hunter, 1998). O α -tocoferol plasmático é utilizado como indicador bioquímico estático de estado de vitamina E, e níveis menores que 11,6 $\mu\text{mol/L}$ são considerados deficientes, ao passo que níveis maiores que 16,2 $\mu\text{mol/L}$ são considerados adequados (Morrisey & Sheehy, 1999).

Os níveis de α -tocoferol no plasma e em eritrócitos são moderadamente sensíveis à ingestão, respondendo bem a níveis elevados de suplementação, porém apresentando fraca associação com a ingestão dietética quando esta última é avaliada por inquéritos alimentares (El-Sohemy et al., 2001; Hunter, 1998). A vantagem do uso dos níveis em eritrócitos é que não precisam ser corrigidos pelos níveis de lipídios plasmáticos. Correlações significativas do α -tocoferol no plasma com a ingestão têm sido observadas em estudos populacionais somente, ou principalmente, quando usuários de suplementos são incluídos na análise (El-Sohemy et al., 2001; Hunter, 1998). Correlações da ingestão de α -tocoferol com seu conteúdo no tecido adiposo, cujos níveis refletem exposição em prazos bem mais longos (anos) do que no plasma ou eritrócitos, também são fracas e pioram quando são excluídos os indivíduos usuários de suplementos (El-Sohemy et al., 2001; Hunter, 1998).

Há um crescente interesse na avaliação da ingestão e na utilização de γ -tocoferol circulante e nos tecidos como biomarcador de ingestão. Este tocoferol inibe a peroxidação lipídica induzida por peroxinitrito mais efetivamente que o α -tocoferol, protegendo a lipoproteína de baixa densidade (LDL) da oxidação e o endotélio vascular, além de apresentar outros efeitos mais potentes que o α -tocoferol (Devaraj & Traber, 2003). Estudos recentes têm mostrado que, ao contrário do α -tocoferol, os níveis de γ -tocoferol no plasma e no tecido adiposo são bons biomarcadores de ingestão, mesmo excluindo os usuários de suplementos (El-Sohemy et al., 2001). Os níveis de γ -tocoferol e as razões γ -tocoferol/ α -tocoferol no plasma também têm sido sugeridos como possíveis marcadores de riscos nutricionais, pois apresentam associação inversa com escolhas alimentares saudáveis, como, por exemplo, consumo de alimentos ricos em micronutrientes, fibras e lipídios poliinsaturados (Bates, Mishra & Prentice, 2004).

Lipídios e Ácidos Graxos

Há evidências de que a ingestão total de lipídios pode estar associada com o desenvolvimento de doenças crônicas, especialmente alguns tipos de câncer e DCV (Willett, 1998a, 1998b). Entretanto, apesar do esforço de pesquisadores da área, ainda não existe um biomarcador para a ingestão habitual de gordura. Trabalhos recentes indicam que a composição em Ácidos Graxos (AG) de certos compartimentos corporais pode ser dependente da ingestão de gordura total (King, Lemaitre & Kestin, 2006).

King, Lemaitre e Kestin (2006) sugerem que a composição em AG da membrana de eritrócitos e em fosfolipídios e ésteres de colesterol plasmáticos pode ser um biomarcador da ingestão total de lipídios. Entretanto, a validade da composição tecidual em AG como biomarcador da ingestão total de gordura, embora interessante e promissora, necessita de mais estudos para identificar, quantificar e padronizar os efeitos de possíveis variáveis de confusão, como a ingestão de AG individuais, a ingestão total de energia ou o balanço energético e a ingestão de carboidratos em diferentes grupos populacionais. A ausência de biomarcadores para a ingestão de gordura total pode causar certas dificuldades na interpretação de resultados de composição tecidual em AG, pois não se pode afirmar se o principal determinante do conteúdo de certo AG em determinada amostra biológica é a quantidade

relativa (g/100g de AG totais) ou absoluta (mg/dia) deste AG na dieta, ou seja, se a ingestão total de lipídios interfere na resposta-medida (Hunter, 1998). Dessa forma, controlar as análises estatísticas pela ingestão total de gordura é apropriado para aumentar a capacidade de interpretação dos resultados.

A concentração plasmática de colesterol total, especialmente de colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), está associada com o desenvolvimento de DCV oclusivas (Jones & Kubow, 1999). Contudo, exceto quando a ingestão de colesterol é relativamente baixa se comparada com a dieta ocidental típica, a concentração plasmática de colesterol total e de LDL-C não é determinada pela ingestão deste lipídio. Nessas circunstâncias, seu principal determinante parece ser o metabolismo hepático de colesterol, que, por sua vez, é influenciado pela ingestão de AG saturados, transinsaturados e poliinsaturados (AGPI), especialmente os das séries n-3 e n-6 (Jones & Kubow, 1999). Assim, não existe um biomarcador para a ingestão de colesterol que seja sensível a alterações na sua ingestão para qualquer nível de ingestão e que seja específico, isto é, cuja resposta dependa exclusivamente da ingestão deste lipídio. Entretanto, as concentrações plasmáticas de colesterol total e de LDL-C são biomarcadores clínicos do risco de desenvolvimento de DCV.

Em contraste com a ingestão de gordura total e de colesterol, para os quais não há um biomarcador específico e sensível em amplas faixas de ingestão, para a ingestão de certos AG individuais existem biomarcadores que respondem à ingestão destes nutrientes a curto, médio e longo prazos (Hunter, 1998). Há grande interesse em avaliar a ingestão de diversos AG individuais, como os das séries n-6 e n-3 de AGPI, pois a composição em AG da dieta influencia a composição das membranas celulares e de outros compartimentos corporais de lipídios (Arab, 2003), e possivelmente é um determinante do desenvolvimento de doenças crônicas, tais como DCV, diabetes *mellitus* e câncer, além de influenciar o desenvolvimento neonatal (Gibson & Makrides, 1998; Pontes et al., 2006).

O interesse em biomarcadores de ingestão de AG específicos está muito relacionado com a dificuldade de avaliar qualitativa e quantitativamente a sua ingestão por meio de inquéritos alimentares (Cantwell, 2000). Além das dificuldades inerentes ao uso de inquéritos alimentares, como os vieses nas entrevistas e na obtenção dos dados e a variação à qual está sujeita a composição dos alimentos, há outras dificuldades especialmente importantes para a avaliação da ingestão de AG individuais (Cantwell, 2000). Boa parte da gordura total da dieta ocidental urbana não é visivelmente separável do alimento, porque faz parte da matriz do alimento *in natura* ou porque, quando adicionada durante o processamento industrial ou doméstico, se incorporou à matriz do alimento. Essa característica dos lipídios alimentares torna ainda mais difícil a avaliação de sua ingestão alimentar quando a frequência de alimentação em estabelecimentos comerciais é elevada. Recentemente, Cantwell (2000) fez, por meio de inquéritos alimentares, uma revisão detalhada sobre os fatores que afetam a avaliação da ingestão de AG individuais.

A composição tecidual em AG não sintetizados endogenamente, ou cuja síntese é limitada, é usada como biomarcador de sua exposição (Hunter, 1998). São exemplos: AG da série n-6, 18:2n-6 (óleos vegetais: milho, girassol, algodão e soja), 20:3n-6 e 20:4n-6 (carnes de aves e mamíferos, ovos); AG da série n-3, 18:3n-3 (óleos vegetais: canola, linhaça e soja), 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3 (peixes e óleos de peixes marinhos, algas marinhas); AG trans, especialmente os ácidos eláídico (18:1, Δ^9 trans, gordura vegetal hidrogenada) e transvaccênico (18:1, Δ^11 trans, laticínios); ácido linoleico conjugado (CLA; 18:2, Δ^9 cis, Δ^11 trans e 18:2, Δ^10 trans, Δ^12 cis; produtos de ruminantes); AG de cadeia ímpar, como pentadecanóico (15:0) e heptadecanóico (17:0), ou ramificada (laticínios).

O conteúdo tecidual dos AG não sintetizados endogenamente, mencionados no parágrafo anterior, apresenta associação com sua ingestão ou com a ingestão de suas fontes alimentares principais e, por isso, tem sido usado como biomarcador de exposição em estudos observacionais (Garland et al., 1998; Hunter, 1998) e em estudos experimentais para avaliar a adesão à suplementação com certos AG (Henderson et al., 1992; Hunter, 1998) ou a alguma dieta específica que envolva alterações na ingestão de AG (Hunter, 1998; Tynan et al., 1995). Para os AG sintetizados endogenamente (monoinsaturados ou saturados, de cadeia par, com 16C ou mais), a

validade da composição em AG de amostras biológicas como biomarcador de sua ingestão é questionável.

A validade da composição em AG de amostras biológicas como biomarcador da ingestão destes nutrientes é influenciada por seu metabolismo. O metabolismo de um determinado AG depende de sua estrutura química e do compartimento metabólico onde está localizado. Portanto, estes fatores devem ser considerados quando a composição tecidual nesses nutrientes é usada como biomarcador de sua ingestão. O fígado e o tecido adiposo humanos podem sintetizar AG como o palmítico (16:0), o esteárico (18:0) e o oléico (18:1n-9). Além disso, os AGPI, especialmente os n-6 e n-3, podem ter sua cadeia dessaturada e alongada, resultando na síntese endógena de AG poliinsaturados de 20 e 22 carbonos, tais como 20:3n-6 e 20:4n-6; 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3, a partir dos AG essenciais linoleico (18:2n-6) e α -linolênico (18:3n-3), respectivamente. Portanto, o conteúdo tecidual de 20:4n-6 pode estar associado com a ingestão habitual de 18:2n-6. Por isso, muitas vezes esses AG são considerados em conjunto, como série (n-6 e n-3).

O metabolismo de AG é extremamente competitivo: a maior parte dos AG compete entre si pelas mesmas enzimas e proteínas ligantes. Assim, a ingestão elevada de determinados AG pode prejudicar o estado de outros AG. Alguns exemplos deste tipo de interação metabólica acontecem na conversão de AG essenciais em seus derivados mais insaturados de cadeia mais longa, na conversão de AGPI com 20 carbonos em eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, entre outros) e na incorporação de AG em membranas biológicas, entre outros. Revisões abrangentes sobre o metabolismo de AG estão disponíveis na literatura (Gurr, Harwood & Frayn, 2002; Jones & Kubow, 1999).

As diferentes classes de acil-lipídios (triacilgliceróis, fosfolipídios, ésteres de colesterol e AG não esterificados), assim como diferentes fluidos biológicos (plasma, soro ou leite), células (células ou elementos sanguíneos) ou tecidos corporais (tecido adiposo) podem ser consideradas diferentes compartimentos metabólicos de AG e representam níveis de ingestão de AG em diferentes escalas temporais, de curto, médio e longo prazos (Katan et al., 1997). A renovação (Hunter, 1998; Katan et al., 1997) dos AG componentes dos triacilgliceróis no plasma de jejum (VLDL) é relativamente rápida, com meia-vida de cerca de um a dois dias, e por isso a composição deste compartimento pode ser usada como biomarcador da ingestão recente de AG. A composição dos fosfolipídios e ésteres de colesterol plasmáticos responde mais lentamente à ingestão de AG e apresenta meia-vida de cerca de sete dias. Em seguida, respondem as composições de membranas de eritrócitos e plaquetas, com meia-vida de cerca de trinta dias. O compartimento metabólico mais estável e cujos AG apresentam meia-vida mais longa (cerca de dois anos) entre os já investigados é o tecido adiposo. Assim, a composição em AG do tecido adiposo é considerada o biomarcador da ingestão habitual de AG a longo prazo e o que apresenta associação mais forte com a ingestão de boa parte dos AG (Hunter, 1998). Portanto, a escolha da amostra biológica a ser obtida para determinação da composição em AG deve considerar a escala de tempo segundo a qual se deseja estimar a exposição. Os AG Não Esterificados (AGNE, ou livres) do plasma de jejum são provenientes da hidrólise de triacilgliceróis no tecido adiposo e representam compartimento metabólico de AG disponíveis para captação tecidual no período pós-absortivo. A composição em AGNE não representa um biomarcador de ingestão de AG, embora possa ser usada como ferramenta auxiliar na compreensão do metabolismo e do estado nutricional em AG (Torres et al., 2006).

Além da cinética de renovação dos compartimentos metabólicos de AG, outro aspecto relevante a se considerar na escolha da amostra a ser obtida é a especificidade da resposta de cada compartimento metabólico à ingestão dos AG de interesse. A especificidade da resposta está relacionada com características intrínsecas das vias de síntese e degradação dos lipídios corporais e com o metabolismo das células e/ou tecidos usados. Assim, a resposta das classes de lipídios à ingestão de AG é relativamente específica (Hunter, 1998).

Uso de Biomarcadores na Investigação de Risco de Doenças Crônicas

Os biomarcadores de exposição a nutrientes e compostos bioativos de alimentos (não-nutrientes) podem ser utilizados em investigações de epidemiologia nutricional como alternativas para os inquéritos alimentares ou como fonte de dados complementares ao inquérito (Bingham, 2002; Hunter, 1998). Os biomarcadores contribuem especialmente quando a ingestão do nutriente é de difícil avaliação, como, por exemplo, os AG, a vitamina E ou compostos fenólicos antioxidantes. Entretanto, quando os biomarcadores são avaliados isoladamente, sem dados de ingestão alimentar obtidos de inquéritos, pode ser difícil, ou mesmo impossível, elucidar as associações entre enfermidades e a alimentação habitual (Willett, 1998a), que consistem no principal objetivo comum de investigações de epidemiologia nutricional. Essa limitação está relacionada com as limitações dos próprios biomarcadores, discutidas anteriormente. Contudo, quando usados conjuntamente com inquéritos alimentares, os biomarcadores podem contribuir no desenvolvimento de hipóteses científicas consistentes e melhorar as estimativas da contribuição quantitativa da alimentação habitual para o risco de desenvolvimento de doenças específicas em certos grupos populacionais (Bingham, 2002). Este autor sugere que o uso de biomarcadores deve se tornar rotina na epidemiologia nutricional. Exemplos de biomarcadores de exposição nutricional que podem ser usados para investigar o risco de desenvolvimento de DCV e de osteoporose serão apresentados nesta seção.

Doenças Cardiovasculares (DCV)

As DCV constituem a principal causa de morte em diversos países industrializados e em áreas urbanas de países em desenvolvimento (Lotufo & Lolio, 2000; Willett, 1998a). Entre os determinantes de DCV, destaca-se a alimentação habitual. A alimentação apresenta associação com o desenvolvimento de DCV através de diversos mecanismos bioquímicos que, em sua maioria, estão relacionados com a formação da placa de ateroma e com a oclusão arterial (Grundy, 1999). A presença de partículas de LDL oxidadas na camada subendotelial e seu reconhecimento por macrófagos dão início a mecanismos bioquímicos complexos que culminam com a formação da placa de ateroma. Dessa forma, índices bioquímicos associados com a elevação da concentração plasmática de LDL-C e com sua susceptibilidade à oxidação têm sido usados como biomarcadores para investigar o risco de desenvolvimento de DCV (Grundy, 1999).

A ingestão de Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGPI) contribui para a redução da concentração plasmática de LDL-C (Harris, 1997), e os ácidos graxos EPA e DHA reduzem o risco de infarto do miocárdio, independentemente da concentração plasmática de lipoproteínas (Breslow, 2006). Portanto, a concentração tecidual de AG das séries n-6 e n-3 pode ser usada como biomarcador para o risco de desenvolvimento de DCV. Há evidências de que o risco de desenvolvimento de DCV é maior entre grupos de indivíduos com menores conteúdos teciduais de EPA e DHA (Harris, Assaad & Poston, 2006).

Apesar da existência de biomarcadores relacionados com a exposição e/ou o metabolismo lipídico que são válidos para o estudo do risco de desenvolvimento de DCV, ainda não foi possível definir pontos de corte. É possível que a dificuldade de definição de pontos de corte para esses biomarcadores esteja associada com diversos fatores, tais como o complexo metabolismo de lipídios, a existência de outras variáveis relacionadas com as DCV que não tenham sido controladas nos estudos e a complexidade das próprias DCV.

Os AGPI constituem um alvo freqüente de espécies reativas, e sua oxidação faz parte do processo de formação da placa de ateroma. Dessa forma, o efeito da ingestão de AGPI sobre a aterosclerose é bimodal, pois em baixos níveis de ingestão a concentração plasmática de LDL-C pode aumentar, mas quando a ingestão de AGPI é elevada pode aumentar a susceptibilidade da LDL à oxidação (Lapointe, Couillard & Lemieux, 2006). Portanto, a associação entre biomarcadores de AGPI n-3 e n-6 com as DCV deve ser considerada conjuntamente com biomarcadores

de componentes pró e antioxidantes, e vice-versa. É possível que essa relação dos AGPI e dos compostos pró e antioxidantes com as DCV seja uma das principais justificativas para a controvérsia na epidemiologia nutricional destas doenças (Willett, 1998a). Diversos trabalhos que investigaram estes componentes isoladamente encontraram resultados inconsistentes (Lapointe, Couillard & Lemieux, 2006; Willett, 1998a). Trabalhos prospectivos futuros, nos quais biomarcadores de AG, anti e pró-oxidantes de alimentos e sua respectiva ingestão sejam determinados, poderão contribuir para a estimativa de pontos de corte para grupos populacionais.

O risco de desenvolvimento de DCV relacionado com o dano oxidativo pode ser investigado com base em biomarcadores de antioxidantes e em dano oxidativo e/ou de fatores que contribuem para a formação de espécies radicais (pró-oxidantes). Entre os biomarcadores de antioxidantes de origem alimentar estão os níveis plasmáticos de vitaminas E e C, carotenóides e compostos fenólicos (Van den Berg et al., 1993). Berg e colaboradores (1993) sugeriram níveis plasmáticos ótimos de antioxidantes que contribuem para a prevenção de doenças crônicas: α -tocoferol > 30 $\mu\text{mol/L}$, ácido ascórbico > 50 $\mu\text{mol/L}$, β -caroteno > 0,4 $\mu\text{mol/L}$ e retinol > 2,5 $\mu\text{mol/L}$. Entre os nutrientes pró-oxidantes, o ferro apresenta papel importante, pois pode participar de reações de geração de espécies reativas de oxigênio. O estado de ferro, medido pela concentração plasmática de ferritina, apresenta associação positiva com a concentração plasmática de LDL oxidada (Ikeda et al., 2006) e com a espessura e a prevalência de placa de ateroma (Wolff et al., 2004).

A associação entre DCV e os biomarcadores relacionados com o estresse oxidativo ainda é motivo de debate. Quando possível, esses biomarcadores devem ser considerados em conjunto e com biomarcadores de AGPI, como discutido anteriormente, para que se alcancem resultados mais conclusivos. Além disso, fatores que sabidamente contribuem para a formação de espécies reativas, como o tabagismo e o consumo de álcool, devem ser controlados. Em ensaios prospectivos controlados de amostragem aleatória, a suplementação com β -caroteno aumentou o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão entre fumantes (Cooper, Eldridge & Peters, 1999).

Além dos biomarcadores de exposição relacionados com a LDL e sua oxidação, diversos estudos prospectivos de coorte e de caso-controle identificaram a hiperhomocisteinemia como um fator de risco independente para DCV oclusivas (McKinley, 2000). Entretanto, ainda é motivo de debate se este aminoácido participa diretamente do mecanismo de formação da placa de ateroma (Selhub, 2006) ou se é o folato, cujo estado nutricional é um dos principais determinantes da homocisteinemia plasmática, que tem efeito protetor (Morrison et al., 1996). Embora não haja um consenso sobre a concentração de homocisteína a partir da qual o risco de desenvolvimento de DCV estaria inequivocamente elevado, sugere-se que 15 $\mu\text{mol/L}$ possa ser usado como ponto de corte para a hiperhomocisteinemia (Refsum et al., 2006). Valores de homocisteinemia superiores a este limite estão associados com risco elevado de desenvolvimento de DCV e de outras doenças crônicas.

Osteoporose

A osteoporose caracteriza-se por uma redução na densidade mineral óssea que reduz a resistência mecânica dos ossos e aumenta o risco de fraturas. Os ossos podem ser vistos como um grande reservatório de cálcio, e a osteoporose resulta da perda crônica de cálcio ósseo, quando o indivíduo permanece em balanço negativo deste mineral por longos períodos. A osteoporose apresenta determinantes genéticos e ambientais, dos quais se destaca a alimentação habitual. A influência da alimentação habitual sobre a densidade óssea manifesta-se principalmente em sua influência sobre o metabolismo ósseo e a homeostase de cálcio. Há evidências de que a ingestão habitual de cálcio, o estado nutricional para vitamina D e possivelmente a ingestão de frutas, hortaliças e proteínas animais podem estar associados com o risco de desenvolvimento de osteoporose (Prentice, 2004). Assim, biomarcadores da exposição nutricional a estes componentes podem contribuir para o estudo da epidemiologia nutricional da osteoporose.

O efeito preventivo da ingestão de frutas e hortaliças sobre o desenvolvimento da osteoporose está relacionado com a alcalinização de fluidos corporais que resulta na redução da reabsorção óssea de cálcio, na alcalinização da urina e na redução da excreção urinária de cálcio. Por sua vez, a ingestão de carnes e grãos aumenta a produção endógena de ácido e tem efeitos inversos, aumentando a perda de cálcio ósseo ao longo do tempo (Prentice, 2004). Ainda não existe um biomarcador válido para a ingestão de alimentos relacionados com o metabolismo ácido-básico, entretanto seu desenvolvimento pode acrescentar informações relevantes em estudos da epidemiologia nutricional da osteoporose.

A concentração sérica de 25-hidroxicolecalciferol [25(OH)D₃] tem sido considerada um marcador bioquímico funcional do estado de vitamina D, e há evidências de que concentrações inferiores a 80 nmol/L estão associadas com redução na eficiência da absorção de cálcio, osteoporose e maior risco de fraturas (Heaney, 2004).

Não há um bom biomarcador de ingestão habitual para o cálcio, pois este mineral está sujeito a eficiente controle homeostático. A concentração de cálcio na urina de 24 horas pode ser usada como biomarcador da ingestão deste mineral, porém deve ser normalizada pela concentração de creatinina na urina e, além disso, pode variar em resposta à ingestão recente de cálcio e sódio (Hunter, 1998).

Referências

- ARAB, L. Biomarkers of fat and fatty acid intake. *Journal of Nutrition*, 133: 925S-932S, 2003.
- BAHL, R. et al. Vitamin A supplementation of women postpartum and of their infants at immunization alters breast milk retinol and infant vitamin A status. *Journal of Nutrition*, 132: 3.243-3.248, 2002.
- BAILEY, L. et al. Folate. In: BOWMAN, B. A. & RUSSEL, R. M. *Present Knowledge in Nutrition*. 8. ed. Washington: Ilsi Press, 2001.
- BATES, C. J.; MISHRA, G. D. & PRENTICE, A. α -Tocopherol as a possible marker for nutrition-related risk: results from four National Diet and Nutrition Surveys in Britain. *British Journal of Nutrition*, 92: 137-150, 2004.
- BEARD, J. L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *Journal of Nutrition*, 131: 568S-580S, 2001.
- BINGHAM, S. A. Biomarkers in nutritional epidemiology. *Public Health and Nutrition*, 5: 821-827, 2002.
- BLANCK, H. M. et al. Laboratory issues: use of nutritional biomarkers. *Journal of Nutrition*, 133: 888S-894S, 2003.
- BRESLOW, J. L. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83: 1.477S-1.482S, 2006.
- BREVIK, A. et al. Plasma concentration of folate as a biomarker for the intake of fruit and vegetables: the Hordaland Homocysteine Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 434-439, 2005.
- CANFIELD, L. M. et al. β -Carotene in breast milk and serum is increased after a single β -carotene dose. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66: 52-61, 1997.
- CANTWELL, M. M. Assessment of individual fatty acid intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59: 187-191, 2000.
- COOPER, D. A.; ELDRIDGE, A. L. & PETERS, J. C. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutrition Reviews*, 57: 201-214, 1999.

- DEVARAJ, S. & TRABER, M. G. α -Tocopherol, the new vitamin E? *American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 530-531, 2003.
- DUTTA-ROY, A. K. Molecular mechanisms of cellular uptake and intracellular translocation of α -tocopherol: role of tocopherol-binding proteins. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 967-971, 1999.
- EL-SOHEMY, A. et al. Population-based study of α - and α -tocopherol in plasma in adipose tissue as biomarkers of intake in Costa Rican adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 356-363, 2001.
- EL-SOHEMY, A. et al. Individual carotenoid concentrations in adipose tissue and plasma as biomarkers of dietary intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 172-179, 2002.
- FIDANZA, F. Biochemical assessment. In: SADLER, M.; STRAIN, J. J. & CABALLERO, B. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 1. ed. Oxford: Academic Press, 1999. v. 3.
- FIDANZA, F. Importance of measuring nutritional status. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L. C. & FINGLAS, P. M. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2003. v. 7.
- FOHR, I. P. et al. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75: 275-282, 2002.
- GARLAND, M. et al. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67: 25-30, 1998.
- GIBSON, R. A. & MAKRIDES, M. The role of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in neonatal nutrition. *Acta Paediatrica*, 87: 1.017-1.022, 1998.
- GRUNDY, S.M. Nutrition and diet in the management of hyperlipidemia and atherosclerosis. In: SHILS, M. E. et al. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.
- GURR, M.; HARWOOD, J. & FRAYN, K. N. *Lipid Biochemistry*. 5. ed. London: Blakwell Publishing, 2002.
- HAMBIDGE, M. Biomarkers of trace mineral intake and status. *Journal of Nutrition*, 133: 948S-955S, 2003.
- HARRIS, W. S. N-3 Fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65: 1645S-1654S, 1997.
- HARRIS, W. S.; ASSAAD, B. & POSTON, W. C. Tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*, 98: 19I-26I, 2006.
- HEANEY, R. P. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1706S-1709S, 2004.
- HEATH, A. L. M. & FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. In: WORWOOD, M. *Baillière's Best Practice and Research: clinical hematology*, 15: 225-241, 2002.
- HENDERSON, R. A. et al. Effect of fish oil on the fatty acid composition of human milk and maternal and infant erythrocytes. *Lipids*, 27: 863-869, 1992.
- HERBERT, V. Folic acid. In: SHILS, M. E. et al. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

- HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of randomized trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82: 806-812, 2005.
- HUNTER, D. Biochemical indicators of dietary intake. In: WILLETT, W. *Nutritional Epidemiology*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- IKEDA, Y. et al. Association between serum ferritin and circulating oxidized low-density lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Endocrinology Journal*, 53: 665-670, 2006.
- JONES, P. J. H. & KUBOW, S. Lipids, sterols, and their metabolites. In: SHILS, M. E. et al. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.
- KATAN, M. B. et al. Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *Journal of Lipid Research*, 38: 2.012-2.022, 1997.
- KING, I. B.; LEMAITRE, R. N. & KESTIN, M. Effect of a low-fat diet on fatty acid composition in red cells, plasma phospholipids, and cholesterol esters: investigation of a biomarker of total fat intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83: 227-236, 2006.
- LAPOINTE, A.; COUILLARD, C. & LEMIEUX, S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 645-658, 2006.
- LOTUFO, P. A. & LOLIO, C. A. Tendências de evolução da mortalidade por doenças cardiovasculares: o caso do estado de São Paulo. In: MONTEIRO, C. A. *Velhos e Novos Males da Saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças*. 2. ed. São Paulo: Hucitec, Nupens/USP, 2000.
- MARDONES, P. & RIGOTTI, A. Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in α -tocopherol metabolism and potential implications for disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 252-260, 2004.
- MASON, J. B. Biomarkers of nutrient exposure and status in one-carbon (methyl) metabolism. *Journal of Nutrition*, 133: 941S-947S, 2003.
- MAYNE, S. T. et al. Effect of supplemental β -carotene on plasma concentrations of carotenoids, retinol, and α -tocopherol in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68: 642-647, 1998.
- MCKINLEY, M. C. Nutritional aspects and possible pathological mechanisms of hyperhomocysteinaemia: an independent risk factor for vascular disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59: 221-237, 2000.
- MENESES, F. & TRUGO, N. M. F. Retinol, β -carotene and lutein+zeaxanthin in milk of Brazilian nursing women: associations with plasma concentrations and influences of maternal characteristics. *Nutrition Research*, 25: 443-451, 2005.
- MORRISON, H. I. et al. Serum folate and risk of fatal coronary disease. *Journal of the American Medical Association*, 275: 1.893-1.896, 1996.
- MORRISSEY, P. A. & SHEEHY, P. J. A. Optimal nutrition: vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58: 459-468, 1999.
- PFEIFFER, C. M. et al. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82: 442-450, 2005.

- PONTES, P. V. et al. N-6 and n-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids in the erythrocyte membrane of Brazilian preterm and term neonates and their mothers at delivery. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 74: 117-123, 2006.
- POTISCHMAN, N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *Journal of Nutrition*, 133: 875S-880S, 2003.
- PRENTICE, A. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health and Nutrition*, 7: 227-243, 2004.
- REFSUM, H. et al. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *Journal of Nutrition*, 136: 1.731S-1.740S, 2006.
- RICE, A. M. et al. Evaluation of serum retinol, the modified-relative-dose-response ratio, and breast milk vitamin A as indicators of response to postpartum maternal vitamin A supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 799-806, 2000.
- ROSA, G.; PEREIRA, S. E. A. & TRUGO, N. M. F. Longitudinal change in plasma total homocysteine during pregnancy and postpartum in Brazilian women and its relation with folate status and other factors. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74: 95-101, 2004.
- SELHUB, J. The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. *Journal of Nutrition*, 136: 1.726S-1.730S, 2006.
- SILASTE, M. L. et al. Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in healthy women. *Journal of Nutrition*, 131: 2.643-2.647, 2001.
- SOLOMONS, N. W. Vitamin A and carotenoids. In: BOWMAN, B. A. & RUSSEL, R. M. *Present Knowledge in Nutrition*. 8. ed. Washington: Ilsi Press, 2001.
- SOLOMONS, N. W. Functional tests. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L. C. & FINGLAS, P. M. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2003. v. 7.
- TANG, G.; DOLNIKOWSKI, G. G. & RUSSELL, R. M. Short-term (intestinal) and long-term (postintestinal) conversion of β -carotene to retinol in adults as assessed by a stable-isotope reference method. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 259-266, 2003.
- THURNHAM, D. I. & NORTHROP-CLEWES, C. A. Optimal nutrition: vitamin A and carotenoids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58: 449-457, 1999.
- THURNHAM, D. L. et al. The use of different lipids to express serum tocopherol-lipid ratios for the measurement of vitamin E status. *Analytical and Clinical Biochemistry*, 23: 514-520, 1986.
- TORRES, A. G. et al. Polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in breast milk are associated with plasma non-esterified and erythrocyte membrane fatty acid composition in lactating women. *British Journal of Nutrition*, 95: 517-524, 2006.
- TYNAN, M. B. et al. Erythrocyte membrane fatty acid composition as a marker of dietary compliance in hyperlipidaemic subjects. *Atherosclerosis*, 117: 245-252, 1995.
- UNDERWOOD, B. A. Hypovitaminosis A: international programmatic issues. *Journal of Nutrition*, 124: 1.467S-1.472S, 1994.

- VAN DEN BERG, H. et al. Flair Concerted Action n. 10 status paper. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 63: 247-316, 1993.
- VAN DER LINDEN, I. J. M. et al. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65: 204-215, 2006.
- VAN HET HOF, K. H. et al. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 130: 503-506, 2000.
- WILD, C. P. et al. A critical evaluation of the application of biomarkers in epidemiological studies on diet and health. *British Journal of Nutrition*, 86: S37-S53, 2001.
- WILLET, W. Diet and coronary heart disease. In: WILLET, W. *Nutritional Epidemiology*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1998a.
- WILLET, W. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. *Seminars in Cancer Biology*, 8: 245-253, 1998b.
- WOLFE, B. et al. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the Study of Health in Pomerania (Ship). *Stroke*, 35: 453-457, 2004.