

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NUTRIÇÃO
DOUTORAMENTO EM NUTRIÇÃO

ELIZABETH ALVES DE OLIVEIRA

INTERVALIDAÇÃO DE MARCADORES
BIOQUÍMICOS DE CARÊNCIA SUBCLÍNICA DE
VITAMINA A

RECIFE
2004

ELIZABETH ALVES DE OLIVEIRA

INTERVALAÇÃO DE MARCADORES
BIOQUÍMICOS DE CARÊNCIA MARGINAL DE
VITAMINA A

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para
obtenção do **Grau de Doutor em
Nutrição**

RECIFE
2004

Oliveira, Elizabeth Alves de
Intervalidação de marcadores bioquímicos de
carência subclínica de vitamina A / Elizabeth Alves de
Oliveira . - Recife : O Autor, 2004.
80 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (doutorado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Nutrição – Bioquímica. 2. Vitamina A – Carência
subclínica. 3. Marcadores bioquímicos –
Intervalidação. I. Título.

612.39
614.5939

CDU(2ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-007

INTERVALAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE CARÊNCIA SUBCLÍNICA DE VITAMINA A

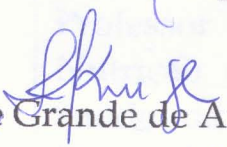
ELIZABETH ALVES DE OLIVEIRA

Aprovação: 17 de dezembro de 2004

Membros da Banca Examinadora:


Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa - Presidente


Florisbela de Arruda Câmara Siqueira Campos


Ilma Kruse Grande de Arruda


Maria Helena Chagas Barreto Lins


Raquel Araújo de Santana

RECIFE
2004

ORIENTADOR

Professor Doutor Hernando Flores

Professor Titular do Departamento de
Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco.

É na busca de amor, que o homem será máximo e é pensando no seu próximo que ele atingirá a felicidade eterna.

Elizabeth Alves de Oliveira

Do Livro: O ser vivo inconsciente poder
ilimitado do homem – da autora

DEDICATÓRIA

Ao meu inesquecível pai José Nabuco Alves Barreto (in memorium), que de forma incalculável me proporcionou as condições de poder hoje galgar mais esta etapa na minha vida.

Aos meus amados filhos Luiz Mário Dantas de Oliveira Filho, Luiz Felipe Alves de Oliveira e Luiz Tiago Alves de Oliveira, que de forma incansável soube superar todas as minhas ausências e corre-corres e que este trabalho fique como um exemplo de dedicação e vitória.

À minha estimada mãe Maria Carmemzita do Amaral Barreto, pela felicidade de estar presente nesta grande realização da minha vida.

À Minha avó paterna Ana Rosa Pereira Barreto (in memoriam), pelos elogios sempre presentes durante toda a minha infância e adolescência.

À minha querida irmã Eliane Campelo Vasconcelos, por todos os incentivos e encorajamento para a concretização realizada.

Ao Douto e Nobre juiz Ivon Viera Lopes pela eterna estima, constante apoio, especial vivência e grande incentivo na concretização desta meta.

Ao ilustre Auritania de Lucena Meira pela profícua amizade, encorajamento e grande estímulo na conclusão deste trabalho.

Aos meus sobrinhos Eliane Maria Campelo Vasconcelos, Francyanne Campelo Vasconcelos e Francisco José Campelo Vasconcelos Segundo, a quem dedico este exemplo de luta.

Ao meu irmão Pierson Correa Barretto, pela força e incentivos prestados na realização deste trabalho.

À minha prima Inalva Baptista do Amaral, pela presença positiva e palavra amiga.

À Minha irmã Eliete Alves Barreto (in memoriam), que muito se orgulharia se aqui presente estivesse.

A todos que não foram citados individualmente, mas que contribuíram de alguma forma nesta imensa realização profissional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus por minha existência;

Ao Professor e amigo Hernando Flores, que mesmo diante de momentos difíceis, tem se esforçado de forma incalculável na orientação e dedicação a este trabalho, transmitindo seus conhecimentos e vivência.

À colega e sempre amiga Zilda Maria Britto Figueirêdo por todos os incentivos e colaboração.

AGRADECIMENTOS

- ↴ À Coordenação da Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco
- ↴ Às professoras Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos, Raquel Araújo de Santana e Maria Helena de Castro Chagas pela atenção, disponibilidade e apoio inegável na condução deste trabalho.
- ↴ Aos Professores Raul Manhães de Castro e Tânia Lúcia Montenegro Stanford, pelo apoio e grande incentivo para que eu pudesse realizar com sucesso este trabalho.
- ↴ Ao professor e amigo Nicácio Henrique da Silva por seu incentivo constante na finalização deste trabalho.
- ↴ À amiga Isinete Muniz Barbosa, sempre paciência e atenciosa durante todos os momentos de realização deste trabalho;
- ↴ À Secretária da Pós Graduação Neci pela constante paciência e palavra amiga e encorajadora.
- ↴ À Bolsista de Iniciação Científica, hoje Nutricionistas Eduila Maria Couto Santos, pela colaboração na parte experimental do estudo;
- ↴ Às crianças pela participação neste estudo e respectivos pais pelo consentimento;

- ↴ Aos professores, estagiários e técnicos do Laboratório de Bioquímica da Nutrição do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio científico e técnico prestado;
- ↴ A Doralice Ferreira da Silva pela atenção dispensada;;
- ↴ Aos meus colegas de pós-graduação pelo companheirismo;
- ↴ A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	14
Abstract	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações Gerais	18
1.2 Justificativa	24
1.3 Objetivo	24
1.4 Metodologia	24
1.4.1 Indivíduos	24
1.4.2. Método.....	25
1.4.2.1 Medida de retinol sérico	25
1.4.2.2 Resposta relativa à dose (RDR) e Resposta sérica de 30 dias (S30DR).....	26
1.4.2.3 Medida de retinol hepático.....	27
1.5 Resultados	27
1.6 Discussão e Conclusão	29
1.7 Referências Bibliográficas	31
2. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	37
2.1 Primeiro Artigo: Revisão da Literatura	38
2.1.1 Marcadores Bioquímicos de Carência Marginal de Vitamina A	39
? Resumo	39
? Abstract	40
? Keywords	40

? Introdução	41
? Métodos Indiretos de reserva Corporal	43
? RBP – Proteína ligadora de retinol	43
? CRBP I e CRBP II	44
? Razão Molar Retinol/RBP	44
? Razão Molar RBP/TTR	45
? Marcadores Bioquímicos	45
? RDR	45
? MRDR	46
? S30DR	47
? RAG	47
? Conclusões	47
? Referências	49
2.2 Segundo Artigo: Artigo Original	55
2.1.1 Intervalidation of Biochemical Markers of Subclinical Deficiency of Vitamin A	56
? Abstract	56
? Introduction	57
? Subjects and Methods	57
? Study population	57
? Methods.....	58
? Measure of serum retinol.....	58

? Relative dose response (RDR) and response seric of 30 days (S30DR)	58
? Measure of hepatic retinol	58
? Results	59
? Discussion	59
? References	60
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
4. ANEXOS	69

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

TABLE 1 – Children's Prevalence with VAD in function of the levels of serum retinol (considering cut-off 1.05 µmol/L and 0,7 µmol/L) and hepatic retinol (<30 µg/g)	63
TABLE 2 – Effect of the oral dose of retinil palmitate in the concentration of serum retinol (medium values), after 5 hours and 720 hours of supplementation	64
TABLE 3.– Children's Prevalence with subclinical VAD in function of +RDR and +S30DR	65
FIGURE 1 – Comparative analysis of the prevalence of VAD in preschool children in function of the seric and hepatic retinol, RDR and S30DR	66

RESUMO

A deficiência de vitamina A (VAD) é um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento, onde representa uma das maiores causas de cegueira evitável em crianças. É estimado que a VAD isolada é responsável por 1,3 a 2,5 milhões de mortes de pré-escolares por ano, no mundo. Diversos marcadores bioquímicos são correntemente recomendados para determinar se a deficiência da vitamina A (VAD) é um problema de saúde pública: retinol sérico e hepático, RDR, S30DR, MRDR, entre outros. De acordo com a intensidade da prevalência a VAD pode ser classificada como leve, moderada e severa. Entretanto, a VAD também pode ser classificada como clínica e subclínica baseado na presença ou ausência de sinais clínicos da deficiência, que aparece na fase mais tardia da doença. A VAD subclínica é detectada com o uso de marcadores envolvidos no metabolismo do retinol. Nosso objetivo foi comparar a prevalência de VAD subclínica em função de alguns marcadores para promover a intervalidação. Amostras de sangue de 2815 crianças com idade variando de 2 a 55 meses foi coletado para analisar a concentração de retinol sérico, a resposta relativa a dose (RDR), a resposta sérica de 30 dias (S30DR), para determinar a prevalência da VAD, em função de cada um desses marcadores. Espécimes necropsiadas de fígado de 91 crianças necropsiadas foi usado para analisar o retinol hepático. A prevalência de crianças na fase subclínica da deficiência foi obtida e seus valores analisados. A prevalência de VAD em função do retinol sérico, do retinol hepático, da RDR e da S30DR foi de 39,0 %, 34,1 %, 39,4 % e 56,7 %, respectivamente. Em nosso estudo, considerando a prevalência de VAD, os

marcadores foram intervalados, revelando os mesmos níveis de importância na definição da VAD como problema de saúde pública, devendo ser utilizados no monitoramento para checar a efetividade dos programas de intervenção. Entre os marcadores analisados o retinol sérico com ponto de corte 1.05 $\mu\text{mol/L}$ é sugerido como eleito em função de ser metodologicamente mais viável.

ABSTRACT

Vitamin A deficiency (VAD) is a currently Public Health Problem mainly in developing countries. This represents one of the main causes of preventable blindness in children. It is estimated that VAD alone is responsible for 2 to 3 million of preschool deaths a year, in the world. Several biochemical markers are currently recommended for determining whether vitamin A deficiency (VAD) is a public health problem: seric and hepatic retinol, RDR, S30DR, MRDR, amongst others. According to the intensity of prevalence VAD can be classified as mild moderate and severe. However, VAD can also be classified as clinical and subclinical based on the presence or absence of clinical signs of deficiency, that appear in the latest phase of the disease. The subclínical VAD is detected with the use of markers involved in the metabolism of the retinol. Our objective was to compare the prevalence of subclinical VAD in function of the some biochemical markers to promote the intervalidation. Samples of blood from children with age varying from 2 to 55 months, were collected to analyse the concentration of serum retinol, the relative dose response (RDR) and serum 30 day dose response (S30DR), to determine the prevalence VAD in function of each one of those markers. Necropsy liver specimens from children with age varying from 8 to 24 months was used for the analysis of the hepatic retinol. The children's prevalence in subclínical fase of the deficiency was obtained and its values analyzed. The prevalência of VAD in function of the serum and hepatic retinol, RDR and S30DR were 39,0%, 34,1%, 39,4% and 56,7%, respectively. In our study, considering the prevalence of VAD, the subclinical markers were intervalidated

revealing the same level of importance in the definition of VAD as a public health problem it must be monitored to check the effectiveness of intervention programmes in order to improve the vitamin A status of the population. Among the markers analyzed the serum retinol with the cut-off 1.05 $\mu\text{mol/L}$ is suggested as the elect in function of being viable methodologically.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A vitamina A (retinol) é essencial à visão e reprodução e regula a diferenciação e crescimento de muitos tipos de células, em animais e no homem (1-3).

No citoplasma o retinol está ligado a proteínas celulares de ligação de retinol (CRBP) tipo I e II, que pertencem a uma família de proteína citosólica que ligam pequenas moléculas hidrofóbicas (4).

Na análise do status nutricional de uma população, o retinol sérico pode ser utilizado para se obter informação adequada da situação da mesma e, se for o caso, poder se induzir um programa de intervenção. Alterações do status nutricional, que difere da faixa de normalidade podem ser classificadas em função da intensidade, considerando como deficiência leve, moderada e severa. Entretanto, podem ser também classificadas como deficiência subclínica e clínica. Considerando as duas classificações, existem diferentes tipos de testes que podem ser empregados para verificação do status nutricional, como sinais físicos, atividade enzimática, excreção urinária, níveis séricos de nutrientes, estoques corporais, dentre outros. Os sinais visuais são os mais específicos indicadores clínicos de deficiência de vitamina A (VAD). Neste contexto, não somente os níveis séricos de retinol estão inadequados, como também os estoques hepáticos já se encontram comprometidos. Num estágio inicial de diminuição da ingesta de alimentos fontes, contendo a vitamina A, ou precursor adequado, o organismo lança mão de seus estoques hepáticos, não

refletindo, até então, em nenhum dano para o organismo. Nestas condições, os níveis séricos de retinol ainda se mantêm inalterados. À medida que se agrava o não fornecimento para o organismo de alimentos adequados, conseqüentemente os estoques se reduzem de tal forma que se inicia o dano das funções fisiológicas, podendo levar ao estágio máximo da hipovitaminose A, quando os sinais clínicos são mais evidentes. Nesta fase, níveis de retinol sérico se apresentam bastante reduzidos.

Trabalho realizado por Goetghebuer e colaboradores em 1996 (5), com crianças apresentando desnutrição severa calórico protéica, pode concluir que o baixo nível de retinol sérico está parcialmente relacionado com os baixos níveis de sua proteína transportadora (RBP).

Em 1996, a Organização Mundial de Saúde (WHO) (6) recomendou considerar o status de VAD de uma população, quando os níveis de retinol sérico forem abaixo de 0,70 $\mu\text{mol/L}$ (20 $\mu\text{g/dL}$). Para tanto considerando este ponto de corte no estudo de uma população, a VAD é classificada como deficiência leve, moderada e severa quando a prevalência de casos forem de 2-10%, 10-20% e >20%, respectivamente.

Retinol sérico é influenciado por infecções febris e não febris, aumentando também em função da idade (da infância para a maioridade) e quando crianças de diferentes idades são estudadas isto deve ser observado (7,8).

Os ésteres de retinil da dieta são hidrolisados à retinol na luz intestinal e posteriormente absorvidos pelos enterócitos. Antes de fazer parte dos quilomícrons, o retinol é reesterificado, vai ao fígado, onde se converte à retinol novamente, forma a qual se liga às proteínas ligadoras de retinol (RBP) **(9, 10)**. Em adultos nutridos a concentração sérica de RBP é de 1,9-2,4 $\mu\text{mol/L}$ (40-50 $\mu\text{g/ml}$). O valor para crianças é cerca de 60% do valor para adulto. A RBP plasmática humana é codificada por um único gen e é especificamente sintetizada no fígado **(11)**.

Duas proteínas citoplasmáticas ligadoras de retinol, CRBP-I e CRBP-II foram caracterizadas e analisadas por cristalografia de raio X, ressonância nuclear magnética, mutagênese e estudos de ligações por Li e Norris em 1996 **(12)**, mostrando que estas proteínas estão envolvidas na modulação intracelular do metabolismo do retinol. Napoli, 2000 estudou as funções-chaves da CRBP neste metabolismo **(13)**.

Sabendo que o retinol circulante se encontra associado à proteína RBP, que tem uma alta afinidade de ligação pelo retinol, conseqüentemente a razão molar retinol/RBP é 1:1. Na deficiência de vitamina A (VAD), tanto o retinol sérico quanto a RBP diminuem **(14)**.

Diversos outros trabalhos recentemente mostraram a correlação entre a determinação de RBP e transtiretina (TTR) **(15, 16)**. Uma microtécnica foi proposta por Craft, utilizando um método de fluorometria para a determinação de RBP **(17)**. Rosales e

Ross em 1998 **(18)** analisaram a razão molar RBP/TTR no estudo da vitamina A em presença de inflamação. Na resposta de fase aguda (APR), a RBP sérica diminui, como acontece na VAD. Por outro lado, TTR com a qual retinol é também ligado no plasma, diminui na APR, mas não é afetada na VAD. Estudos em animais e em crianças com infecções graves têm mostrado uma diminuição da razão molar RBP/TTR, podendo distinguir VAD na presença de infecções **(18)**. Recentemente, Rosales **(19)** estudou a relação retinol sérico/APR em casos de morbidade por malária.

A concentração de vitamina A hepática pode ser estimada também em amostras de fígado de pacientes necropsiados, como meio de caracterizar o status de vitamina A de uma população **(20 e 21)**. O retinol hepático é um método direto de reserva corporal. Na prática isto tem sido difícil, apenas mais indicado cientificamente. Entretanto, métodos indiretos que avaliam os estoques hepáticos de vitamina A têm ocupado a atenção e se baseiam no fato de que a RBP se acumula no fígado quando o fornecimento alimentar de retinol é diminuído. Uma vez o retinol tornando-se disponível a RBP é liberada na circulação **(22)**. Desta forma, os métodos indiretos auxiliam no diagnóstico da VAD.

Baseado no princípio de que o aumento do fornecimento de vitamina A induz a liberação de RBP hepática é que se fundamentou o teste de resposta relativa à dose (RDR), como também os demais que medem de forma indireta os estoques hepáticos de retinol **(23)**. Em 1984, Flores e colaboradores **(24)** propuseram o teste RDR, a partir

da administração de uma dose oral de 3.15 µmol de vitamina A (3000 UI), com coleta de sangue antes e após 5 horas da administração. Através de um cálculo matemático, $[RDR = (T5 - T0) / T5 \times 100]$ podemos concluir que para valores > 20 % os estoques hepáticos de vitamina A são deficientes. Valores de 20 % estão aproximadamente, equivalentes à reserva hepática de 0,07 µmol/g. A RDR é usada para medir o nível populacional e para o monitoramento da eficácia de programas de intervenção. Tem como desvantagem a necessidade de duas amostras de sangue para a determinação. Este trabalho trouxe como grande contribuição o conhecimento de que, na depleção os níveis de vitamina A hepáticos diminuem continuamente num considerável tempo, antes dos níveis de retinol sérico iniciarem sua diminuição e muito antes ainda das modificações funcionais e estruturais começarem a ocorrer. O teste RDR tem como vantagem o estudo da VAD subclínica.

Uma modificação deste método, baseado na determinação do retinol sérico basal seguida da administração oral de uma dose de 450-1000 mg de retinil éster em solução oleosa e medido novamente o retinol sérico após 5 horas de administração foi proposto, em 1990 por Underwood, (22).

Tanumihardjo e colaboradores em 1990 propuseram o teste MRDR, com a administração do 3,4-didehidroretinol (DHR) (ou 3,4-didehidroretinil acetato), um metabólito da vitamina A, e posteriormente a coleta de uma única amostra de sangue (25). Este metabólito liga-se à RBP e aparece no soro após a dose teste se as reservas hepáticas de vitamina A estiverem baixas. A dose é administrada e após 4-6 horas

coleta-se a amostra de sangue para a determinação de retinol (R) e de dehidroretinol (DHR). A razão molar entre o dehidroretinol e retinol é calculada sendo considerada anormal se $> 0,06$. Estudo recente utilizando doses padrões gradativas de 3,4-dehidroretinol em função da idade, com obtenção das amostras após 4-7 horas da administração foi proposto como refinamento deste teste **(26)**. O teste MRDR apresenta desvantagens devido aos custos elevados das drogas utilizadas e à administração injetável.

A resposta sérica de 30 dias, S30DR é um teste semelhante à RDR, com modificação da dose administrada, que passa a ser maciça, de 200.000 UI e da coleta da segunda amostra de sangue que é feita entre 30-45 dias após a primeira **(24, 27 e 28)**.

Um metabólito da vitamina A, o retinoil beta-glucoronideo (RAG) por apresentar baixa toxicidade com excelente atividade biológica, tem sido utilizado na terapia da acne, com resultados semelhantes a do ácido retinóico **(29)**. Em animais normais, a administração oral de RAG lentamente produz ácido retinóico. Entretanto, em animais com deficiência de vitamina A, o ácido retinóico aparece em altas concentrações no plasma. Trabalho recente de Olson, e colaboradores em 1999 demonstrou haver uma resposta proporcional entre o RAG e o grau de deficiência de vitamina A **(30)**.

1.2 Justificativa

Os testes capazes de revelar as condições dos estoques hepáticos de retinol vêm sendo largamente empregados na definição da VAD subclínica. O diagnóstico precoce desta deficiência nutricional permite a detecção e controle da carência, sendo fundamental para minimizar o agravo à saúde nos grupos de risco. Entretanto reconhece-se sua limitada aplicabilidade, por razões metodológicas e logísticas. Deste modo a identificação de alternativas capazes de contornar as dificuldades desses métodos, torna-se objeto de relevante interesse epidemiológico..

1.3 Objetivo

Intervalar como marcadores bioquímicos de carência subclínica os níveis hepáticos e séricos de retinol, a resposta relativa à dose (RDR) e a Resposta Sérica de 30 Dias (S30DR), de forma a permitir a eleição do indicador mais apropriado às condições logísticas.

1.4 Metodologia

1.4.1 Indivíduos

O estudo foi realizado a partir de banco de dados do Laboratório de Bioquímica da Nutrição criado a partir da avaliação de um total de 2815 crianças, de ambos os sexos e provenientes de creches da região Metropolitana do Recife e cidades do interior de Pernambuco (Vitória de Santo Antão, Caruaru, Vicência, Vicência – Usina

Laranjeiras, Camaragibe). O consentimento pelo responsável de cada criança foi obtido para a participação no estudo, com a concordância e aprovação pelo Comitê de ética. Para o retinol sérico, 2815 crianças foram avaliadas, com idade variando de 2 a 55 meses; para a RDR, 1351, de 9 a 55 meses, S30DR, 1491 de 4 a 43 meses. Para a determinação do retinol hepático foram obtidos fígados de 91 crianças necropsiadas, na faixa etária de 8 a 24 meses, através do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras de necrópsias de fígado utilizadas foram obtidas com a concordância entre este Departamento e as Instituições legais responsáveis pela necrópsia (Instituto de Medicina Legal e Serviço de Verificação de Óbitos de Pernambuco) e com o consentimento do parente responsável antes da retirada das mesmas, conforme Procedimento Padrão dos Órgãos de Anatomia Patológica.

1.4.2 Métodos

1.4.2.1. Retinol sérico.

O retinol sérico foi medido por um sistema HPLC convencional modelo LC-85 detector ultravioleta à 340 nm, a 650-10S detector fluorescente à 335 nm e 475 nm de emissão (slit 10/10 nm), todos da Perkin-Elmer (Überlingen, Germany) (31). O ponto de corte do retinol sérico 1.05 $\mu\text{mol/L}$ foi considerado como indicativo de deficiência de vitamina A subclínica. A análise espectrofotométrica foi também utilizada para um estudo comparativo entre os dois métodos empregados (32).

1.4.2.2. Resposta relativa à dose (RDR) e Resposta sérica de 30 dias (S30DR)

O teste de resposta relativa à dose foi utilizado para detectar a deficiência de vitamina A subclínica (24 e 27). Foi administrado por via oral 3.15 µmol de vitamina A (3000 IU) e amostras de sangue foram coletadas antes e após 5 horas de administração. O plasma foi congelado imediatamente à -20°C para a posterior análise do retinol. Os cálculos para obtenção do valor da RDR seguiram a seguinte fórmula:

$$\text{RDR} = \frac{A_5 - A_0}{A_5} \times 100$$

Valores de RDR >20%, após a administração de vitamina A foram considerados indicativos da existência de depleção nos estoques de vitamina A hepática. No teste S30DR foi utilizado o mesmo princípio do teste da RDR, apenas variando a dose administrada de vitamina A (200.000 IU), uma dose maciça e o tempo de coleta da segunda amostra de sangue (30 dias) para a segunda determinação de retinol sérico, (27). A S30DR é calculada conforme fórmula abaixo.

$$\text{S30DR} = \frac{A_{30} - A_0}{A_{30}} \times 100$$

1.4.2.3 Medida de retinol hepático

Amostras de fígado pesando cerca de 5 g foram coletadas da porção central do lobo direito até no máximo 24 h pós morte. Quando não analisada imediatamente, foram congeladas à -20°C, condição esta satisfatória à estabilidade dos níveis hepáticos de vitamina A (33). Após homegeinização o retinol foi medido espectrofotometricamente (20).

1.5 Resultados

Considerando o ponto de corte de retinol sérico 1,05 $\mu\text{mol/L}$, a prevalência de crianças com VAD subclínica encontrada foi de 39,0 %. Utilizando o ponto de corte 0,7 $\mu\text{mol/L}$ este valor reduziu para 12,1 % (tabela 1). Para que uma população seja considerada com problema de saúde pública, mais de 20 % de seus indivíduos devem possuir um nível sérico de retinol abaixo de 0,7 $\mu\text{mol/L}$. Estes dados indicam que a população de crianças estudada possui uma severa deficiência de vitamina A, quando considerado o ponto de corte 1,05 $\mu\text{mol/L}$. Este foi o ponto de corte considerado para o estudo da intervalidação com os marcadores de reserva hepática de retinol. A análise do retinol hepático encontrou uma prevalência de 34,1 % de crianças com VAD subclínica (tabela 1).

O aumento médio na concentração sérica de retinol foi observado após 5 horas de administração de 3,15 μmol de retinil palmitato e com 30 dias, após administração da

dose maciça de 200.000 UI (tabela 2). Isto confirma a existência de depleção hepática de retinol, pela elevação do retinol sérico em função do tempo de suplementação.

A administração de 3,15 μmol de retinil palmitato resultou em alteração da concentração de retinol plasmática. Os valores obtidos conforme metodologia descrita por Flores e colaboradores (24) para os marcadores RDR e S30DR (27) indicaram prevalências de 39,4% e 56,7%, respectivamente (tabela 3) para RDR positiva (+RDR) e S30DR positiva (+S30DR) >20%.

A intervalidação entre os marcadores foi realizada através da análise comparativa entre a prevalência de crianças portadoras de VAD subclínica para cada um dos marcadores (figura 1). Conforme pode ser observado, os percentuais foram evidentemente maiores que os normais, com exceção do retinol sérico com ponto de corte 0,7 $\mu\text{mol/L}$. A população de crianças estudada apresentou grau severo de deficiência de vitamina A para qualquer um dos marcadores analisados. Vale a pena salientar que a intervalidação do retinol sérico só foi possível considerando o ponto de corte 1,05 $\mu\text{mol/L}$. Para o ponto de corte 0,7 $\mu\text{mol/L}$ não foi possível haver intervalidação com os demais marcadores de carência subclínica. Estes dados revelam a importância de uma re-análise do ponto de corte hoje considerado pela Organização Mundial de Saúde (WHO) 0,7 $\mu\text{mol/L}$ como ideal para a avaliação do status nutricional de uma população, uma vez que este não é adequado na identificação da VAD subclínica, isto é, na fase ideal para a intervenção com consequente eliminação dos efeitos tardios e irreversíveis da doença, de tamanha importância para a saúde pública.

1.6 Discussão e Conclusão

Diversos autores continuam dando a importância adequada aos estudos sinalizadores de deficiência marginal de vitamina A em populações de crianças pré-escolares, através do uso de marcadores específicos (34-37). Entretanto reconhece-se a limitada aplicabilidade, por razões metodológicas e logísticas. Deste modo, a identificação de alternativas capazes de contornar as dificuldades encontradas na aplicabilidade dos métodos, torna-se objeto de relevante interesse epidemiológico. Neste contexto, a intervalidação de marcadores é tema preponderante na viabilização da escolha adequada do método em função da disponibilidade de aplicação na população a ser estudada.

Nosso estudo pretendeu definir o valor diagnóstico de vários métodos de carência subclínica em creches, onde a carência de vitamina A endêmica é alta, de forma a permitir a identificação de grupos ou populações em risco. Os graus de importância da VAD são definidos pela (WHO) em função de sua prevalência (6).

Em nossos resultados obtivemos prevalência de VAD = 20% quando da análise do retinol sérico e hepático e = 30 % para o RDR e S30DR, enquadrando as crianças estudadas em grau de importância severo da doença para todos os marcadores analisados indistintamente. Esta análise dos dados disponíveis permite o diagnóstico epidemiológico dada à magnitude do problema.

O retinol sérico isolado, empregando o ponto de corte $0,7\mu\text{mol/L}$, não tem sido considerado um teste de escolha para a diagnose da VAD na sua forma marginal, necessitando o uso de múltiplos marcadores existentes (22), capazes de revelar as

condições dos estoques hepáticos de retinol, responsáveis pela definição da VAD a nível subclínico, permitindo o controle da carência, minimizando o agravo à saúde nos grupos de riscos. Porém a limitada aplicabilidade desses métodos (desvantagens) em situações diferentes, devido a razões metodológicas e logísticas, requer a identificação de alternativas capazes de contornar tais dificuldades. Nossos resultados, utilizando o ponto de corte $1,05\mu\text{mol/L}$, possibilitou a intervalação do retinol sérico com a RDR, S30DR e o retinol hepático. Comparando a prevalência de crianças com VAD subclínica, para os testes de RDR, S30DR e retinol hepático (testes que revelam os estoques hepáticos de retinol), pode se observar que considerando a prevalência para os níveis de retinol sérico houve equivalência quando eleito o ponto de corte $1,05\mu\text{mol/L}$. O mesmo não ocorreu para o ponto de corte $0,7\mu\text{mol/L}$. Sendo o retinol sérico o teste de menor ou quase nenhuma desvantagem do ponto de vista metodológico, com a mudança apenas na escolha do ponto de corte a ser definido, nós sugerimos ser o teste de escolha na avaliação do status de VAD subclínica de uma população.

Com isso, nossos dados mostram uma alta correlação entre os marcadores bioquímicos estudados quando analisados entre si, permitindo a intervalação entre eles, confirmando assim a possibilidade de direcionamento na escolha do marcador adequado a ser empregado.

1.7 Bibliografia

1. BLOMHOFF R, GREEN MH, GREEN JB, BERG T, NORUM KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. **Physiol.** 1991, 71(4):951-90
2. McCOLLUM EV, DAVIS M. The necessity of certain lipids in the diet during growth. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, 1917, v. 15, p. 13.
3. OSBORNE TB; MENDEL LB. The influence of butter-fat on growth. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, 1914, v. 16, p. 423.
4. LI E, NORRIS AW. Structure / function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. **Annu Rev Nutr.** 1996;16:205-34
5. GOETGHEBUER T, BRASSEUR D, DRAMAIX M, DEMOL P, DONNEN P, BAHWERE P, DUCHATEAU J, HENNART P. Significance of very low retinol levels during severe protein-energy malnutrition. **J Trop Pediatr.** 1996, 42(3):158-61
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. **Micronutrient Series**, WHO / NUT.10, 1996. Geneva, Switzerland
7. CAMPOS FACS, FLORES H, UNDERWOOD BA. Effect of an infection on vitamin A status of children as measured by the relative dose response (RDR).

American Journal of Clinical Nutrition. 1987, 46:91-4

8. GREGORY JR, COLLINS DL, DAVIES PSW, HUGHES JM, CLARKE PC.
National diet and nutritional survey: children aged 1 1/2 to 4 1/2 years.
Report of the diet and nutritional Survey. 1995;1:HMSO, London
9. BLOMHOFF R, SENOO H, SMELAND S, BJERKNES T, NORUM KR. Cellular uptake of vitamin A. : **Journal of Nutrition Science Vitaminol** (Tokyo). 1992;Spec No:327-30
10. NORUM KR, BLOMHOFF R. Vitamin A absorption, transport, cellular uptake and storage. **American Journal of Clinical Nutrition.** 1992, 56(4):735-44
11. D'ONOFRIO C, COLANTUONI V, CORTESE R. Structure and cell-specific expression of a cloned human retinol binding protein gene: the 5'-flanking region contains hepatoma specific transcriptional signals. **The European Molecular Biology Organization Journal.** 1985, 4(8):1981-9
12. LI E NORIS AW. Structure / function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. **Annual Reviews Nutrition.** 1996, 16:205-34
13. NAPOLI JL. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. **Nutrition Review.** 2000;58:230-6
14. GAMBLE MV, RAMAKRISHNAN R, PALAFOX NA, BRIAND K, BERGLUND L, BLANER WS.. Retinol binding protein as a surrogate measure

for serum retinol: studies in vitamin A-deficient children from the Republic of the Marshall Islands. **American Journal of Clinical Nutrition**. 2001, 73(3):594-601

15. ALMEKINDER J, MANDA W, SOKO D, LAN Y, HOOVER DR, SEMBA RD. Evaluation of plasma retinol-binding protein as a surrogate measure for plasma retinol concentrations. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. 2000, 60(3):199-203.
16. DONNEN P, DRAMAIX M, BRASSEUR D, BITWE R, BISIMWA G, HENNART P. The molar ratio of serum retinol-binding protein (RBP) to transthyretin (TTR) is not useful to assess vitamin A status during infection in hospitalised children. **European Journal of Clinical Nutrition**. 2001 Dec;55(12):1043-7
17. CRAFT N. E. High resolution HPLC method for the simultaneous analysis of carotenoids, retinoids and tocopherols. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**. 1996, 10:527
18. ROSALES FJ, ROSS AC. A low molar ratio of retinol binding protein to transthyretin indicates vitamin A deficiency during inflammation: studies in rats and a posterior analysis of vitamin A-supplemented children with measles. **Journal of Nutrition**. 1998, 128(10):1681-7.
19. ROSALES FJ, TOPPING JD, SMITH JE, SHANKAR AH and ROSS AC. Relation of serum retinol to acute phase proteins and malarial morbidity in

- Papua New Guinea children. **American Journal of Clinical Nutrition**. 2000, 71(6):1582-8.
20. FLORES H & ARAÚJO CR. Liver level of retinol in unselected necropsy specimens a prevalence survey of vitamin A deficiency in Recife, Brazil. **American Journal of Clinical Nutrition** 1984, 40(1):146-52
 21. BLACK DA, HEDUAN E, MITCHELL D. Hepatic stores of retinol and retinyl esters in elderly people. **Age and Ageing** 1988, 17;337-42. .
 22. UNDERWOOD BA. Methods for assessment of vitamin A status. **Journal of Nutrition** 1990, 120 :1459-63.
 23. LOERCH JD, UNDERWOOD BA, LEWIS KC. Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as indicator of hepatic reserves in rats. **Journal of Nutrition** 1979, 109:778-86
 24. FLORES H, CAMPOS F, ARAUJO RC, UNDERWOOD BA. Assessment of marginal vitamin A deficiency in Brazilian children using the relative dose response procedure . **American Journal of Clinical Nutrition** 1984, 40:1281-9.
 25. TANUMIHARDJO SA, KOELLNER PG, OLSON JA. The modified relative-dose-response assay as an indicator of vitamin A status in a population of well-nourished American children. **American Journal of Clinical Nutrition**. 1990, 52:1064-7
 26. TANUMIHARDJO SA, CHENG JC, PERMAESIH D, MUHERDIY

- ANTININGSIH, RUSTAN E, MUHILAL, KARYADI D, OLSON JA.
Refinement of the modified-relative-dose-response test as a method for
assessing vitamin A status in a field setting: experience with Indonesian
children **American Journal of Clinical Nutrition**. 1996, 64:966-71
27. BARRETO, E M F. Resposta sérica a uma dose de vitamina A: um indicador de
carência marginal. **Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em
Bioquímica Departamento de Bioquímica CCB UFPE** como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica
28. FERRAZ IS, DANELUZZI JC, VANNUCCHI H, JORDÃO JR AA, RICCO RG,
CAMPO RADEL, MARTINELLI JR CE, ENGELBERG AAD, BONILHA
LRCM, FLORES H. Detection of vitamin A deficiency in Brazilian preschool
children using the serum 30-day-dose-response test [Advance online
publication (AOP)]. **European Journal of Clinical Nutrition**. 2004, 58:1372-77
29. BARUA AB. Retinoyl beta-glucuronide: a biologically active form of vitamin
A. **Nutrition Review** 1997, 55:259-67
30. OLSON JA. The RAG hydrolysis test: a new method for assessing vitamin A
status. **.Proc XIX IVACG Meeting**, Durban, South Africa 1999;2:97
31. DE RUYTER MGM, LEENHEER AP. Determination of serum retinol (vitamin
A) by high-speed liquid chromatography. **Clinical Chemistry** 1976, 22:1593-5
32. ARAÚJO CRC, FLORES H. Improved spectrophotometric vitamin A assay.
Clinical Chemistry 1978, 24:386

33. BARRETO-LINS MH, CAMPOS FA, AZEVEDO MC, FLORES H.. A re-examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of a standardized meal. **Clinical Chemistry**. 1988, 34(11):2308-10
34. RICE AL, STOLTZFUS RJ, DEFRANCISCO A, KJOLHEDE CL. 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** 2000;71:799-806
35. APGAR J, MAKDANI D, SOWELL AL et al. Reproducibility of relative dose response (RDR) test and serum retinol and retinyl ester concentrations in children after a 2-week interval. **Journal of the American College of Nutrition** 1996;15:450-7
36. WAHED MA, ALVAREZ JO, KHALED MA, MAHALANABIS D, RAHMAN MM, HABTE D. Comparison of the modified relative dose response (MRDR) and the relative dose response (RDR) in the assessment of vitamin A status in malnourished children. **American Journal of Clinical Nutrition** 1995;61:1253-6
37. DE PEE S, YUNIAR Y, WEST CE, MUHILAL. Evaluation of biochemical indicators of vitamin A status in breast-feeding and non-breast-feeding Indonesian women. **American Journal of Clinical Nutrition** 1997;66:160-7

2.0 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

2.1- Primeiro Artigo

Revisão da Literatura

2.1.1 - Marcadores Bioquímicos de Carência Marginal de Vitamina A

**Artigo enviado à Revista Panamericana
de Salud Publica.**

Marcadores Bioquímicos de Carência Marginal de Vitamina A

Elizabeth Alves de Oliveira¹, Hernando Flores², Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos², Zilda Maria Britto Figueirêdo¹, Raquel Araújo de Santana², Maria Helena de Castro Chagas²

¹UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica.

²UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição.

RESUMO

O status de vitamina A (retinol) de uma população pode ser medido através dos níveis de retinol sérico e hepático. O retinol hepático pode ser determinado por método direto e métodos indiretos, que visam à determinação indireta dos estoques hepáticos de retinol. Neste último contexto os marcadores bioquímicos têm tido papel fundamental na diagnose e esclarecimento da carência subclínica de vitamina A, condição esta em que os sinais clínicos ainda não são evidentes. Dentre os marcadores destacamos a Resposta relativa à dose (RDR), Resposta relativa à dose modificada (MRDR) e Resposta sérica de 30 dias (S30DR). Esses testes se fundamentam na indução da liberação hepática da proteína ligadora do retinol (RBP), após a suplementação de vitamina A ou algum metabólito específico da vitamina. Empregando metodologia específica, cada marcador apresenta vantagens e desvantagens quanto às condições logísticas encontradas em cada população estudada. A importância dos marcadores bioquímicos de carência marginal de vitamina A tem sido reforçada por sua grande contribuição na diagnose precoce da deficiência, evitando o aparecimento dos sinais e sintomas clínicos característicos na maioria das vezes irreversíveis.

Palavras-chaves: RDR, MRDR, S30DR, Status de Vitamina A.

ABSTRACT

The status of vitamin A (retinol) of a population can be measured through the levels of seric and hepatic retinol. The hepatic retinol can be determined by direct method, and indirect methods, that seek the indirect observation of the hepatic stocks of retinol. In this last context the biochemical markers have a fundamental paper in the diagnosis and classification of the marginal lack of vitamin A, condition where the clinical signals are not still evident. Amongst the markers highlighted the relative dose response (RDR), modified relative dose response (MRDR) and serum 30 days dose-response (S30DR). These tests are based on the induction of the hepatic release of retinol-binding protein (RBP), after supplementation with vitamin A or some specific metabolites the vitamin. Using specific methodology, each marker presents advantages and disadvantages related to the logistic conditions found in each studied population. The importance of the biochemical markers of marginal vitamin A deficiency has been strengthened for its great contribution in the precocious diagnosis of the deficiency, preventing the appearance the signals and characteristic clinical symptoms most the time irreversible.

Keywords: RDR, MRDR, S30DR, Vitamin A Status

Introdução

A vitamina A (retinol) é indispensável para o desenvolvimento embrionário, crescimento, visão e sobrevivência dos vertebrados¹⁻³. O ácido retinóico, um derivado ativo da vitamina A, tem seu efeito pleiotrópico traduzido por duas famílias de receptores nucleares, o RARs e o RXRs, com seus respectivos isótopos alfa, beta e gama ⁴. No citoplasma, o retinol e o ácido retinóico estão ligados a proteínas celulares de ligação de retinol (CRBP) tipo I e II e proteínas celulares de ligação do ácido retinóico (CRABP tipo I e II) que são altamente conservadas em mamíferos e pertencem a uma família de proteína citosólica que ligam pequenas moléculas hidrofóbicas⁵.

Na análise do status nutricional de uma população, o retinol sérico é utilizado para se obter informação adequada da situação da mesma e, se for o caso, poder se induzir um programa de intervenção. Alterações do status nutricional, que difere da faixa de normalidade podem ser classificadas em função da intensidade, como deficiência leve, moderada e severa. Entretanto, podem ser também classificadas como deficiência subclínica e clínica. Considerando as duas classificações, existem diferentes tipos de testes que podem ser empregados para verificação do status nutricional, como sinais físicos, atividade enzimática, excreção urinária, níveis séricos de nutrientes, estoques corporais, dentre outros. Os sinais visuais são os mais específicos indicadores clínicos de deficiência de vitamina A (VAD). Neste contexto, não somente os níveis séricos de retinol estão inadequados, como também os estoques hepáticos já se encontram comprometidos. Num estágio inicial de diminuição da ingestão de alimentos fontes de vitamina A, ou precursor adequado, o organismo lança mão de seus estoques hepáticos, não refletindo, até então, em

nenhum dano para o organismo. Nestas condições, os níveis séricos de retinol ainda se mantêm inalterados. À medida que se agrava o não fornecimento para o organismo de alimentos adequados, os estoques gradativamente diminuem, de tal forma que se inicia o dano das funções fisiológicas, podendo levar ao estágio máximo da hipovitaminose A, quando os sinais clínicos são mais evidentes. Nesta fase, níveis de retinol sérico se apresentam bastante reduzidos.

Trabalho realizado por Goetghebuer e colaboradores, 1996⁶, com crianças apresentando desnutrição severa calórico protéica, pôde concluir que o baixo nível de retinol sérico pode, pelo menos parcialmente, estar relacionado com os baixos níveis de sua proteína transportadora (RBP).

Em 1996, a Organização Mundial de Saúde (WHO)⁷ recomendou se considerar o status de VAD, quando os valores de retinol sérico forem abaixo de 0,70 $\mu\text{mol/L}$ (20 $\mu\text{g/dL}$). Para tanto observando este ponto de corte no estudo de uma população e considerando a prevalência dos casos entre 2-10%, 10-20% e >20%, a VAD é enquadrada como deficiência leve, moderada e severa, respectivamente. Diferentes níveis de pontos de corte devem ser selecionados para diferentes propostas. Entretanto, tais níveis são arbitrariamente fixados e vários fatores complicadores devem ser considerados.

Retinol sérico é influenciado por infecções febris e não febris, como também aumentam em função da idade (da infância para a maioridade) e quando crianças de diferentes idades são estudadas isto deve ser observado⁸⁻⁹.

O status de vitamina A em uma população é estimado em função de alguns indicadores envolvidos no seu metabolismo. O primeiro procedimento analítico para medir os níveis séricos de retinol foi proposto por Bessey and Lowry, 1946¹⁰. Entretanto os níveis de retinol sérico por estarem sob controle homeostático não

refletem adequadamente seus estoques. Na fase inicial da diminuição do fornecimento de retinol ocorre mobilização dos estoques hepáticos com manutenção dos níveis séricos. Posteriormente, os estoques hepáticos diminuem levando a diminuição dos níveis séricos. Desta forma, o retinol sérico isolado não representa um indicador preciso do status de vitamina A corporal, necessitando se avaliar alguns indicadores de reserva corporal de retinol. Neste caso, o método direto utilizado compreende a determinação da concentração de retinol hepática utilizando fígado de pacientes necropsiados, através do qual é possível se caracterizar o status de vitamina A de uma população^{11,12}. Entretanto, este método é mais indicado em estudos científicos. Métodos indiretos têm ocupado a atenção^{13,14}. Os métodos indiretos de avaliação dos estoques hepáticos de retinol se baseiam no fato de que a proteína transportadora de retinol (RBP) se acumula no fígado quando a oferta alimentar de retinol está diminuída. Uma vez o retinol tornando-se disponível, a RBP é liberada na circulação^{12,15}. Desta forma, os métodos indiretos auxiliam no diagnóstico da carência marginal de retinol através de marcadores bioquímicos específicos.

MÉTODOS INDIRETOS DE RESERVA CORPORAL

RBP – Proteína ligadora de retinol

Os ésteres de retinil da dieta são hidrolisados à retinol na luz intestinal e posteriormente absorvidos pelos enterócitos. Antes de fazer parte dos quilomícrons, o retinol é reesterificado nos enterócitos (resíntese), vai à linfa na forma de quilomícrons, passando à corrente sanguínea e posteriormente ao fígado, onde se converte à retinol novamente, forma a qual se liga às proteínas ligadoras de retinol (RBP)^{16,17}. Em adultos nutridos a concentração sérica de RBP é de 1,9-2,4 $\mu\text{mol/L}$

(40-50 µg/ml). O valor para crianças é cerca de 60% do valor para adulto. A RBP plasmática humana é codificada por um único gen e é especificamente sintetizada no fígado¹⁸.

CRBP I e CRBP II

Duas proteínas citoplasmáticas ligadoras de retinol, CRBP-I e CRBP-II e duas proteínas ligadoras de ácido retinóico, CRABP-I e CRABP-II foram caracterizadas e analisadas por cristalografia de raio X, ressonância nuclear magnética , mutagênese e estudos de ligações por Li e Norris, 1996¹⁹, mostrando que estas proteínas estão envolvidas na modulação intracelular do metabolismo do retinol. Napoli, 2000²⁰ estudou as funções chaves da CRBP neste metabolismo, observando uma participação gênica ativa de CRBP capaz de proteger o retinol hepático, favorecendo o estoque de ésteres de retinil e evitando a predisposição à VAD

RAZÃO MOLAR RETINOL/RBP

Sabendo que o retinol circulante se encontra associado à proteína RBP, que possui uma alta afinidade de ligação com o retinol, por conseguinte, a razão molar retinol/RBP é 1:1. Na deficiência de vitamina A (VAD), tanto o retinol sérico quanto a RBP diminuem²¹.

Diversos outros trabalhos recentemente mostraram a correlação entre a determinação de RBP e retinol séricos²²⁻²³. Uma microtécnica foi proposta por Craft²⁴, utilizando um método de fluorometria para a determinação de RBP.

RAZÃO MOLAR RBP/TTR

Rosales e Ross, 1998²⁵ analisaram a razão molar RBP/transtiretina (TTR) na VAD, em presença de inflamação. Na resposta de fase aguda (APR), a RBP sérica diminui, como acontece na VAD. Por outro lado, TTR, proteína com a qual o retinol também se liga no plasma, diminui na APR, mas não é afetada na VAD. Estudos em animais e em crianças com infecções graves têm mostrado uma diminuição da razão molar RBP/TTR, podendo distinguir VAD na presença de infecções²⁵. Recentemente, Rosales²⁶ estudou esta relação em casos de malária.

MARCADORES BIOQUÍMICOS

A determinação de retinol sérico antes e/ou após a suplementação em condições específicas deu origem aos marcadores bioquímicos, que se baseiam no conceito de que o aumento do fornecimento de vitamina A induz uma liberação de RBP, medindo assim, de forma indireta, os estoques hepáticos de retinol.

RDR

Em 1984, Flores e colaboradores propuseram a determinação do status de vitamina A, determinando os níveis plasmáticos, antes e após 30, 120, e 180 dias da administração de uma dose oral maciça (200,000 UI) de vitamina A¹⁴. O teste de resposta relativa à dose (RDR) tem sido usado para medir o nível populacional e monitoramento da eficácia de programas de intervenção. Este trabalho trouxe como enorme contribuição o conhecimento de que, na depleção os níveis de retinol hepático diminuem continuamente num considerável tempo, antes dos níveis de retinol sérico iniciarem sua diminuição e muito antes ainda das modificações

funcionais e estruturais comecem a ocorrer. O teste RDR tem como vantagem o estudo da VAD subclínica.

Uma modificação deste método foi proposto, em 1990 por Underwood,¹⁵, utilizando a determinação do retinol sérico basal seguida de uma administração via oral de 450-1000 mg de retinil éster em solução oleosa. Posteriormente é medido novamente o retinol sérico, 5 horas após a administração. Aplicando um cálculo matemático é possível concluir que para valores $\leq 20\%$ os estoques hepáticos de retinol são deficientes. Tem sido mostrado que valores de 20% estão aproximadamente equivalentes à reserva hepática de $0,07 \mu\text{mol/g}$. Tem como desvantagem a necessidade de duas amostras de sangue para a determinação.

MRDR

Tanumihardjo e colaboradores, 1990²⁷ propuseram que a administração de 3,4-didehidroretinol (DHR) (ou 3,4-didehidroretinil acetato), um metabólito do retinol, fosse administrado e posteriormente uma única amostra de sangue fosse analisada. Este metabólito liga-se à RBP e aparece no soro após a dose teste se as reservas hepáticas de retinol estiverem reduzidas. A dose é administrada e após 4-6 horas coleta-se a amostra de sangue para a determinação de retinol (R) e de dehidroretinol (DHR). A razão molar entre o dehidroretinol e retinol é calculada sendo considerada anormal se $> 0,06$. Estudo recente utilizando doses padrões gradativas de 3,4-dehidroretinol em função da idade, com obtenção das amostras após 4-7 horas da administração, foi proposto como refinamento deste teste²⁷. Suas desvantagens se devem ao elevado custo benefício e administração injetável da droga.

S30DR

Consiste na coleta de uma amostra de sangue para determinação dos níveis séricos de retinol, imediatamente antes (T0) da suplementação com 200.000 UI de palmitato de retinol administrado por via oral e de uma nova coleta de sangue para a mesma dosagem 30-45 dias após (T1) à referida suplementação. O cálculo do S30DR é feito aplicando a fórmula $(T1 - T0 / T1) * 100$. Resultados > 20 % indicam baixas reservas de retinol hepático^{14,28,29}.

RAG

Um metabólito do retinol, o retinoil beta-glucoronideo (RAG) por apresentar baixa toxicidade com excelente atividade biológica, tem sido utilizado na terapia da acne, com resultados semelhantes a do ácido retinóico³⁰. Em animais normais, a administração oral de RAG lentamente produz ácido retinóico. Entretanto, em animais com deficiência de retinol, o ácido retinóico aparece em altas concentrações no plasma.

CONCLUSÕES

Diversos autores continuam dando a importância adequada aos estudos sinalizadores de deficiência marginal de vitamina A em populações de crianças pré-escolares, através do uso de marcadores específicos³¹⁻³⁴. Entretanto reconhece-se a limitada aplicabilidade em situações de campo diferentes, por razões metodológicas e logísticas. Deste modo, a identificação de alternativas capazes de contornar as dificuldades encontradas na aplicabilidade dos métodos, torna-se objeto de relevante interesse epidemiológico. Neste contexto, a intervalidação de marcadores é tema

preponderante na viabilização da escolha adequada do método em função da disponibilidade de aplicação na população a ser estudada.

Nosso estudo pretendeu definir o valor diagnóstico de vários métodos de carência subclínica em creches, onde a carência de vitamina A endêmica é alta, de forma a permitir a identificação de grupos ou populações em risco. Os graus de importância da VAD são definidos pela (WHO) em função de sua prevalência⁷.

Em nossos resultados obtivemos prevalência de VAD = 20% quando da análise do retinol sérico e hepático e = 30 % para o RDR e S30DR, enquadrando as crianças estudadas em grau de importância severo da doença para todos os marcadores analisados indistintamente. Esta análise dos dados disponíveis permite o diagnóstico epidemiológico dada à magnitude do problema.

O retinol sérico isolado, empregando o ponto de corte $0,7\mu\text{mol/L}$, não tem sido considerado um teste de escolha para a diagnose da VAD na sua forma marginal, necessitando o uso de múltiplos marcadores existentes²¹, capazes de revelar as condições dos estoques hepáticos de retinol, responsáveis pela definição da VAD a nível subclínico, permitindo o controle da carência, minimizando o agravo à saúde nos grupos de riscos. Porém a limitada aplicabilidade desses métodos (desvantagens) em situações diferentes, devido a razões metodológicas e logísticas, requer a identificação de alternativas capazes de contornar tais dificuldades. Nossos resultados, utilizando o ponto de corte $1,05\mu\text{mol/L}$, possibilitou a intervalidação do retinol sérico com a RDR, S30DR e o retinol hepático. Comparando a prevalência de crianças com VAD subclínica, para os testes de RDR, S30DR e retinol hepático (testes que revelam os estoques hepáticos de retinol), pode se observar que considerando a prevalência para os níveis de retinol sérico houve equivalência quando eleito o ponto de corte $1,05\mu\text{mol/L}$. O mesmo não ocorreu para o ponto de

corte 0,7 $\mu\text{mol/L}$. Sendo o retinol sérico o teste de menor ou quase nenhuma desvantagem do ponto de vista metodológico, com a mudança apenas na escolha do ponto de corte a ser definido, nós sugerimos ser o teste de escolha na avaliação do status de VAD subclínica de uma população.

Com isso, nossos dados mostram uma alta correlação entre os marcadores bioquímicos estudados quando analisados entre si, permitindo a intervalidação entre eles, confirmando assim a possibilidade de direcionamento na escolha do marcador adequado a ser empregado.

REFERÊNCIA:

1. Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* 1991 Oct;71(4):951-90
2. Mccollum EV, DAVIS M. The necessity of certain lipids in the diet during growth. *J. Biol. Chem*, Bethesda, 1917, v. 15, p. 13.
3. Osborne TB; Mendel LB. The Influence Of Butter-Fat On Growth. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 1914, v. 16, p. 423.
4. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. 1996, 10(9):940-54
5. Newcomer ME.. Retinoid-binding proteins: structural determinants important for function. *FASEB J*. 1995 9(2):229-39
6. Goetghebuer T, Brasseur D, Dramaix M, DeMol P, Donnen P, Bahwere P,

- Duchateau J, Hennart P. Significance of very low retinol levels during severe protein-energy malnutrition. *J Trop Pediatr*. 1996 Jun;42(3):158-61
7. World Health Organization. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring end evaluating intervention programmes. Micron Ser, WHO/NUT.10, 1996. Geneve, Switzerland
 8. Campos FACS, Flores H, Underwood BA. Effect of an infection on vitamin A status of children as measured by the relative dose response (RDR). *Am J Clin Nutr*. 1987, 46:91-4
 9. Gregory Jr, Collins DI, Davies Psw, Hughes Jm, Clarke Pc. National diet and nutritional survey: children aged 1 1/2 to 4 1/2 years. Report of the diet and nutritional Survey. 1995;1:HMSO, London
 10. Bessey OA, Lowry OH, Brooks MJ, López JA. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J Biol Chem* 1946;166:177-88.
 11. Flores H & Araújo CR. Liver level of retinol in unselected necropsy specimens a prevalence survey of vitamin A deficiency in Recife, Brazil. *Am J Clin Nutr* 1984,40(1):146-52.
 12. Black DA, Heduan E, Mitchell D. Hepatic stores of retinol and retinyl esters in elderly people. *Age Ageing*. 1988 Sep;17(5):337-42.
 13. Loerch JD, Uunderwood BA, Lewis KC. Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as indicator of hepatic reserves in rats. *J. Nut*. 1979, 109:778-86

14. Flores H, Campos F, Araujo RC, Underwood BA. Assessment of marginal vitamin A deficiency in Brazilian children using the relative dose response procedure . Am J Clin Nutr. 1984 Dec;40(6):1281-9.
15. Underwood BA. Methods for assessment of vitamin A status. J Nutr. 1990 Nov;120 Suppl 11:1459-63.
16. Blomhoff R, Senoo H, Smeland S, Bjerknes T, Norum KR. Cellular uptake of vitamin A. : J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1992;Spec No:327-30
17. Norum KR, Blomhoff R. Vitamin A absorption, transport, cellular uptake and storage. Am J Clin Nutr. 1992 Oct;56(4):735-44
18. D'Onofrio C, Colantuoni V, Cortese R. Structure and cell-specific expression of a cloned human retinol binding protein gene: the 5'-flanking region contains hepatoma specific transcriptional signals . EMBO J. 1985 Aug;4(8):1981-9
19. Li E, Norris AW. Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins . Annu Rev Nutr. 1996;16:205-34
20. Napoli JL. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. Nutr Rev. 2000 Aug;58(8):230-6
21. Gamble MV, Ramakrishnan R, Palafox NA, Briand K, Berglund L, Blaner WS.. Retinol binding protein as a surrogate measure for serum retinol: studies in vitamin A-deficient children from the Republic of the Marshall Islands. Am J Clin Nutr. 2001, 73(3):594-601
22. Almekinder J, Manda W, Soko D, Lan Y, Hoover DR, Semba RD. Evaluation

- of plasma retinol-binding protein as a surrogate measure for plasma retinol concentrations. *Scand J Clin Lab Invest.* 2000 May;60(3):199-203
23. Donnen P, Dramaix M, Brasseur D, Bitwe R, Bisimwa G, Hennart P. The molar ratio of serum retinol-binding protein (RBP) to transthyretin (TTR) is not useful to assess vitamin A status during infection in hospitalised children. *Eur J Clin Nutr.* 2001 Dec;55(12):1043-7
24. Craft N. E. High resolution HPLC method for the simultaneous analysis of carotenoids, retinoids and tocopherols. *FASEB J.* 1996;10:527
25. Rosales FJ, Ross AC. A low molar ratio of retinol binding protein to transthyretin indicates vitamin A deficiency during inflammation: studies in rats and a posterior analysis of vitamin A-supplemented children with measles. *J Nutr.* 1998 Oct;128(10):1681-7.
26. Rosales FJ, Topping JD, Smith JE, Shankar AH, Ross AC. Relation of serum retinol to acute phase proteins and malarial morbidity in Papua New Guinea children. *Am J Clin Nutr.* 2000 Jun;71(6):1582-8
27. Tanumihardjo SA, Koellner PG, Olson JA. The modified relative -dose-response assay as an indicator of vitamin A status in a population of well-nourished American children. *Am J Clin Nutr.* 1990 Dec;52(6):1064-7.
28. Barreto, E M F. Resposta sérica a uma dose de vitamina A: um indicador de carência marginal. Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica Departamento do Bioquímica CCB UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

29. Ferraz IS, Daneluzzi JC, Vannucchi H, Jordão JR AA, Ricco RG, Campo Radel, Martinelli JR CE, Engelberg AAD, Bonilha LECM, Flores H. Detection of vitamin A deficiency in Brazilian preschool children using the serum 30-day-dose-response test [Advance online publication (AOP). *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004; 58:1372-77
30. Barua AB. Retinoyl beta-glucuronide: a biologically active form of vitamin A. *Nutr Rev.* 1997 Jul;55(7):259-67.
31. Rice AL, Stoltzfus RJ, DeFrancisco A, KJOLHEDE CL. 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. *Am. J. Clin. Nut.* 2000;71:799-806
32. Apgar J, Makdani D, Sowell AL et al. Reproducibility of relative dose response (RDR) test and serum retinol and retinyl ester concentrations in children after a 2-week interval. *J. Am. Col. Nut.* 1996;15:450-7
33. Wahed MA, Alvarez JO, Khaled MA, Mahalanabis D, Rahman MM, Habte D. Comparison of the modified relative dose response (MRDR) and the relative dose response (RDR) in the assessment of vitamin A status in malnourished children. *Am. J. Clin. Nut.* 1995;61:1253-6
34. De PEE S, Yuniar Y, West CE, Muhilai. Evaluation of biochemical indicators of vitamin A status in breast-feeding and non-breast-feeding Indonesian women. *Am. J. Clin. Nut.* 1997;66:160-7

1 - O presente estudo foi financiado pelo Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq é parte da Monografia do Doutorado de Elizabeth Alves de Oliveira, apresentada e aprovada ao Curso de Doutorado em Nutrição do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

2 – Correspondência e pedidos de separatas devem ser encaminhados à Elizabeth Alves de Oliveira no seguinte endereço eletrônico: **boliver@hotmail.com.br** e **eao@ufpe.br** ou Laboratório de Bioquímica da Nutrição – CCS - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária Recife – Pernambuco – Brasil – CEP 50670-420.

2.2- Segundo Artigo

Artigo Original

2.2.1 – Intervalvalidation of Biochemical Markers of Suclinical Dificiency of Vitamin A

Artigo enviado à Revista The American Journal of Clinical Nutrition.

Intervalvalidation of Biochemical Markers of Subclinical Deficiency of Vitamin A

Elizabeth A Oliveira, Hernando Flores, Florisbela A C Campos, Raquel A Santana, Maria Helena C Chagas e Zilda M B Figueirêdo.

¹ From the Department of Nutrition and Biochemistry, University Federal of Pernambuco

² Supported by: CNPq

³ Address reprint requests to E A Oliveira, E-mail: boliver@hotmail.com.br or eao@ufpe.br



ABSTRACT

Background: The marginal deficiency of vitamin A is detected with the use of markers involved in the metabolism of the retinol.

Objective: The objective was to compare the prevalence of subclinical hypovitaminosis A in function of the main biochemical markers with the objective to promote the intervalvalidation among them.

Design: Samples of blood from children with age varying from 2 to 55 months, were collected with the objective of analyzing the concentration of serum retinol, the relative dose response (RDR) and serum 30 day dose response (S30DR), to determine the prevalence of the vitamin deficiency A (VAD) in function of each one of those markers. Liver of children necropsy was used for the analysis of the hepatic retinol. The children's prevalence in the marginal form of the deficiency was obtained and its values analyzed.

Results: The prevalence of VAD in function of the serum and hepatic retinol, RDR and S30DR were 39,0 %, 34,1 %, 39,4 % and 56,7 %, respectively.

Conclusions: In our study, considering the prevalence of VAD, the subclinical markers were intervalvalidated revealing the same level of importance in the definition of VAD as a public health problem that has to be monitored to check the effectiveness of intervention programmes in order to improve the vitamin A status of the population. Among the markers analyzed the serum retinol with the cut-off 1.05 µmol/L is suggested as the elect in function of being viable methodologically.

Key Words: • Serum Retinol • Hepatic retinol • RDR • S30DR • biochemical markers • marginal deficiency of vitamin A • Vitamin A • Intervalvalidation.

INTRODUCTION

Vitamin A deficiency (VAD) is a major Public Health Problem in developing countries where it represents one of the main causes of preventable blindness in children. It is considered that VAD alone is responsible for 1,3 to 2,5 million of preschool deaths a year, in the world (1). Serum retinol is best used for populations when a frequency distribution can provide useful information about the status of a population and about response to an intervention program (2). According to the intensity of prevalence VAD can be classified as mild moderate and severe. However, VAD can also be classified clinical and sub-clinical based on the presence of clinical signs of deficiency, that appear in the latest phase of the disease (3). The irreversible visual signs are specific for the clinical phase. In this phase, the level of serum retinol and the hepatic stocks are depleted (4). The early diagnosis of vitamin A deficiency at the epidemiological level allows the detection and control, being essential to minimize the effects in the risk groups (4,5). Traditionally, clinical signs and symptoms of xerophthalmia were used to identify VAD. However, it is well known that in children with a low vitamin A status, health risk and death from infections are increased, even without clinical signs (6). The definition of VAD hence had to be widened. According to the WHO, VAD is defined as the stage when vitamin A in tissues is depleted to a level at which health consequences occur even in the absence of clinical xerophthalmia (7) When in 1980s it became evident that subclinical VAD was associated with a significant increase in young child mortality, this provided the impetus for research into reliable methods for the assessment of vitamin A status in this phase. Subclinical vitamin A deficiency is much more wide spread, contributing to high morbidity and mortality (8-9). The subclinical status of vitamin A is characterized by the absence of xerophthalmia. Many techniques for assessing sub-clinical vitamin A status have been developed, such as: isotopic dilution (10), the relative dose response (RDR) (4,5,11), and the modified relative dose response (MRDR) (12,13) serum 30 day dose response (S30DR) (5,14,15) and each has its own strength and limitations. Considering the magnitude of the worldwide public health problem of VAD this work intends to intervalidate some biochemical markers of sub-clinical vitamin A deficiency (hepatic and serum retinol, RDR and S30DR), in way to allow the election of the indicator more adapted to the conditions logistics in different situations.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

The study was conducted in children of both sexes attending day care centers of the Metropolitan area of Recife and cities of the country side of Pernambuco (Vitória of Santo Antão, Caruaru, Vicência, Vicência - Usina Laranjeiras, Camaragibe). Informed consent was obtained from a responsible party for the participation of each child in the study. The study was approved by the ethics Committee. The number of children included in the study varied in function of the studied marker. Serum retinol, 2815 children ranging in age from 2 to 55 months; RDR 1351, children ranging in age from 9 to 55 months, S30DR 1491 children

ranging in age from 4 to 43 months. Necropsy liver specimens from 91 children ranging in age from 8 to 24 months ceased of various causes were obtained from the department of Pathological Anatomy of the Federal University of Pernambuco. The necropsy samples of liver used in the study were obtained through an agreement between this Department and Institutions lagally respponsible for the autopsies, where parental consent is obtained before the withdrawal of supplies from the bodies.

Methods

Measure of serum retinol.

Serum was frozen (-20°C) and protect from direct light exposure until analyzed. Serum retinol was determined by a conventional HPLC system model LC-85 ultraviolet detector set at 340 nm (16), The cut-off point of serum retinol concentration <1.05 µmol/L was considered as indicative of marginal vitamin A deficiency. The spectrophotometric analysis was also used for a comparative study among the two methods used (17).

Relative dose response (RDR) and serum 30-day dose-response (S30DR)

The relative dose response test was used to detect the marginal vitamin A deficiency according to Flores e colaboradores, 1984 (5), The RDR procedure is conducted by obtaining a fasting blood (A₀), feeding orally 3.15 µmol of vitamin A (3000 IU) and obtaining a second blood specimen after 5 h (A₅). A single massive oral dose of vitamin A was given after conducting the base-line RDR test. The RDR procedure was repeated at 30, 120 and 180 days (4,5,15). Weight measurements were obtained at each observation and the bloods were analyzed for vitamin A. The RDR e S30DR were calculated according to the following, respectively.

$$\text{RDR} = \frac{A_5 - A_0}{A_5} \times 100$$

$$\text{S30DR} = \frac{A_{30} - A_0}{A_{30}} \times 100$$

An increase in plasma retinol >20% after the administration of vitamin A indicates that liver vitamin A stores are depleted (4).

Measure of hepatic retinol

The samples, weighing around 5 g were collected from the central portion of the right lobe withing 24 h after death. When not analyzed immediately, they specimens were kept in sealed containers at -20°C (18,19). Araújo and Flores in 1978, established these storage conditions as suitable, and that liver vitamin A levels are stably even at room temperature (26 °C) for at

list 36 h (10). The liver samples were homogenized in 50 vol of 50 % glycerol in water, and retinol was assayed spectrophotometrically in extracts of the nonsaponifiable lipids of the homogenates (17).

RESULTS

Considering the cut-off of serum retinol concentration $<1,05 \mu\text{mol/L}$, the marginal VAD prevalence was 39,0%. Using the cut-off $0,7 \mu\text{mol/L}$ this value was reduced to 12,1% (table 1). There is a public health problem when more than 20% of its individuals studied have a level of serum retinol below $0,7 \mu\text{mol/L}$ (7). Our data indicate that the studied population possesses a severe VAD considering the cut-off point $<1,05 \mu\text{mol/L}$. This was the cut-off considered for the study of intervalvalidation with the markers of hepatic store of retinol. The analysis of the hepatic retinol found a prevalence of 34,1% of children with marginal VAD (Table 1). The medium values in the concentration serum retinol was increased after 5 hours of administration of $3,15 \mu\text{mol/L}$ of retinil palmitato and after 30 days after massive dose (Table 2). This confirms the existence of hepatic depletion of retinol, by the magnitude of the rise in serum retinol levels in function of the time of supplementation. The results calculated according Fbres et al (5) for the markers RDR and S30DR indicated children with VAD prevalence of 39,4% and 56,7%, respectively (Table 3). Positive RDR (+RDR) and positive S30DR (+S30DR) when $>20\%$. The intervalvalidation among the studied markers was accomplished through the comparative analysis between the prevalence of children with marginal VAD for each one of the markers (Figure 1). As can be observed, the prevalence of VAD was considerably higher than the values adopted by WHO, except for serum retinol with cut-off $0,7 \mu\text{mol/L}$. The studied population of children presented severe degree of vitamin A deficiency for anyone of the analyzed markers. It is worthwhile to point out that the intervalvalidation of the serum retinol was only possible considering the cut-off $1,05 \mu\text{mol/L}$. For the cut-off $0,7 \mu\text{mol/L}$ it was not possible the intervalvalidation all the markers of marginal VAD. These data reveal the importance of the alteration of the cut-off point $0,7 \mu\text{mol/L}$ considered by the World Health Organization (WHO) as ideal for the evaluation of the nutritional status of a population, once this is not capable to measure the status of a population with marginal VAD, that is, in the ideal phase for the intervention with consequent elimination of the late and irreversible effects of the disease, of highest importance for the public health

DISCUSSION

Several authors continue giving the adequate importance to the studies of subclinical deficiency of vitamin A in children, through the use of specific markets (20-23). However, the limited applicability of them is recognized in different situations, for methodological and logistical reasons. Therefore, the identification of alternatives capable to eliminate the difficulties found in the use of the methods are object of important epidemiological studies. According to Underwood (11) the most reliable assessment of vitamin A nutriture is likely when a combination of methods is used to assessment the subclinical VAD. In this context, with the intervalvalidation of the markers, the choice of the methods will be made in function of

the field conditions available. Our study intended to define the diagnostic value of several methods for evaluation of subclinical VAD in several populations where the prevalence of VAD is high, in order to allow the identification of population groups in risk. The WHO 1996 report recommended the cut-off value of 0.7µmol/L for serum retinol consistent with the presence of the subclinical deficiency status. It proposed the following prevalence below cut-offs to define a public health problem and its level of importance mild (>2-10%), moderate (>10-<20%), and severe (> 20%). For RDR and S30DR the cut-off value is 20% and the prevalence <20% (mild), > 20-<30% (moderate) and >30% (severe) (7). In our results we obtained the prevalence of VAD > 20% using seric and hepatic retinol and prevalence of VAD > 20 % for RDR and S30DR, including the children in severe degree of deficiency for all the markers studied except for the serum retinol with cut-off 0.7µmol/L. The analysis of the available data allows the epidemiological diagnosis given to the magnitude of the problem. Thus, our data shows a high correlation among the biochemical markers studied when compared to each other, allowing the interval validation among them, confirming the possibility choice the marker to be used according to the field conditions. Serum retinol concentration of < 0.7 µmol/L is a well recognized cut-off but 1.05 µmol/L is sometimes proposed as an alternative (24). A serum concentration < 1.05 µmol/L has some potential limitation. Our results obtained with the cut-off 1.05 µmol/L allow the interval validation of serum retinol with RDR, S30DR and hepatic retinol. Comparing the prevalence of children with subclinical VAD using the RDR, S30DR and hepatic retinol it can be observed that there was equivalence only when the cut-off 1.05 µmol/L was considered. The same did not happen for the cut-off 0.7 µmol/L. Serum retinol is the preferred marker for population level assessment of VAD because many laboratories can analyze it, and is the best established biochemical indicator of vitamin A status (24). Moreover, the single blood sample required raises less problem than the two samples required for the RDR and S30DR. Therefore, we suggest the serum retinol as the marker of choice with the cut-off 1.05 µmol/L for the evaluation of the status of subclinical VAD in children populations.



REFERENCES

- 1 Humphrey JH, West KP Jr, Sommer A. .Vitamin A deficiency and attributable mortality among under-5-year-olds. *Bull World Health Organ* 1992;70:225-32
- 2 Flores H, Azevedo MN, Campos FA, Barreto-Lins MC, Cavalcanti AA, Salzano AC, Varela RM, Underwood BA. Serum vitamin A distribution curve for children aged 2-6 y known to have adequate vitamin A status: a reference population. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(4):707-11
- 3 Underwood BA and Arthur P. The contribution of vitamin A to public health. *FASEB J.* 1996; 10:1040-48
- 4 Loerch JD, Underwood BA, Lewis KC. Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as indicator of hepatic reserves in rats. *Journal of Nutrition* 1979;109:778-86
- 5 Flores H, Campos F, R, Araujo R C Cirlene and Underwood B A. Assessment of marginal vitamin A deficiency in Brazilian children using the relative dose response

- procedure. The American Journal of Clinical Nutrition 1984;40:1281-89
- 6 Campos FACS, Flores H, Underwood BA. Effect of an infection on vitamin A status of children as measured by the relative dose response (RDR). The American Journal of Clinical Nutrition. 1987, 46:91-4
 - 7 WHO (World Health Organization), 1996. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Micronutrient Serie, WHO/NUT 10. World Health Organization, Geneva, Switzerland
 - 8 Sommer A, Katz J and Tarwotjo I. Increased risk of respiratory disease and diarrhoea in children with pre-existing mild vitamin A deficiency. Am. J. Clin. Nutr. 1984; 40:1090-95
 - 9 Sommer A, Tarwotjo I, Djunnaedi E, West EP, Jr, Loeden AA, Tilden R, Mele L and the Aceh Study Group. Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. Lancet 1986; 1:1169-73
 - 10 Furr HC, Amedee-Manesme O, Clifford AJ, Bergen HR 3rd, Jones AD, Anderson DP, Olson JA. Vitamin A concentrations in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans. Am J Clin Nutr. 1989;49(4):713-6
 - 11 Underwood BA. Methods for assessment of vitamin A status. J Nutr. 1990;120 Suppl 11:1459-63
 - 12 Tanumihardjo SA, Koellner PG, Olson JA. The modified relative-dose-response assay as an indicator of vitamin A status in a population of well-nourished American children. Am J Clin Nutr. 1990;52(6):1064-7
 - 13 Tanumihardjo SA, Cheng JC, Permaesih D, Muherdiy Antiningsih, Rustan E, Muhilal, Karydi D, Olson JA. Refinement of the modified-relative-dose-response test as a method for assessing vitamin A status in a field setting: experience with Indonesian children Am J Clin Nutr. 1996; 64:966-71
 - 14 Barreto, E M F. Resposta sérica a uma dose de vitamina A: um indicador de carência marginal. Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica Departamento de Bioquímica CCB UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica
 - 15 Ferraz IS, Daneluzzi JC, Vannucchi H, Jordão Jr AA, Ricco RG, Campo LA Del, Martinelli Jr CE, Engelberg AAD, Bonilha LRCM, Flores H. Detection of vitamin A deficiency in Brazilian preschool children using the serum 30-day-dose-response test [Advance online publication (AOP). Eur. J. Clin. Nutr.. 2004; 58:1372-77
 - 16 De Ruyter MG, Leenheer AP. Determination of serum retinol (vitamin A) by high-speed liquid chromatography. Clin Chem 1976;22:1593-5
 - 17 Araújo CRC, Flores H. Improved spectrophotometric vitamin A assay. Clin. Chem 1978;24(2):386

- 18 Flores H, Cirlene R C de Araújo. Liver levels of retinol in unselected necropsy specimens: a prevalence survey of vitamin A deficiency in Recife, Brazil. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1984;40:146-52
- 19 Bessey OA, Lowry OH, Brooks MJ, López JA. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J Biol Chem* 1946;166:177-88
- 20 Rice AL, Stoltzfus RJ, deFrancisco A, Kjolhede CL. 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* 2000;71:799-806
- 21 Apgar J, Makdani D, Sowell AL et al. Reproducibility of relative dose response (RDR) test and serum retinol and retinyl ester concentrations in children after a 2-week interval. *Journal of the American College of Nutrition* 1996;15:450-7
- 22 Wahed MA, Alvarez JO, Khaled MA, Mahalanabis D, Rahman MM, Habte D. Comparison of the modified relative dose response (MRDR) and the relative dose response (RDR) in the assessment of vitamin A status in malnourished children. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995;61:1253-6
- 23 de Pee S, Yuniar Y, West CE, Muhilal. Evaluation of biochemical indicators of vitamin A status in breast-feeding and non-breast-feeding Indonesian women. *Am J Clin Nutr* 1997;66:160-7
- 24 de Pee S, Dary O. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J Nutr.* 2002 Sep;132(9 Suppl):2895S-2901S

TABLE 1 – Children's Prevalence with VAD in function of the levels of serum retinol (considering cut-off 1.05 $\mu\text{mol/L}$ and 0,7 $\mu\text{mol/L}$) and hepatic retinol (<30 $\mu\text{g/g}$).

MARKERS	TOTAL CHILDREN	DEFICIENCY CHILDREN		PROBLEM OF PUBLIC HEALTH *
	n	n	[%]	
Seric retinol (< 1,05 $\mu\text{mol/L}$)	2815	1099	[39,0]	SEVERE
Seric retinol (< 0,7 $\mu\text{mol/L}$)	2815	342	[12,1]	MODERATE
Hepatic retinol (<30 $\mu\text{g/g}$)	91	31	[34,1]	SEVERE

* Problem of Pubic Health classified in agreement with the WHO (1996)

TABLE 2. Effect of the oral dose of retinil palmitate in the concentration of serum retinol (medium values), after 5 and 720 hours of supplementation.

TIME h	SERUM RETINOL ($\mu\text{mol/L}$)
	Mean $\pm$ SD
0	1,29 $\pm$ 22,4
5	1,68 $\pm$ 18,2
720	1,78 $\pm$ 17,1

TABLE 3. – Children's Prevalence with subclinical VAD in function of +RDR and +S30DR

MARKERS	TOTAL CHILDREN	CHILDREN DEFICIENCIES		PROBLEM OF PUBLIC HEALTH *
		n	[%]	
RDR (>20 %)	1351	363	39,4	SEVERE
S30DR (> 20 %)	1491	433	56,7	SEVERE

* Problem of Pubic Health classified in agreement with WHO (1996)

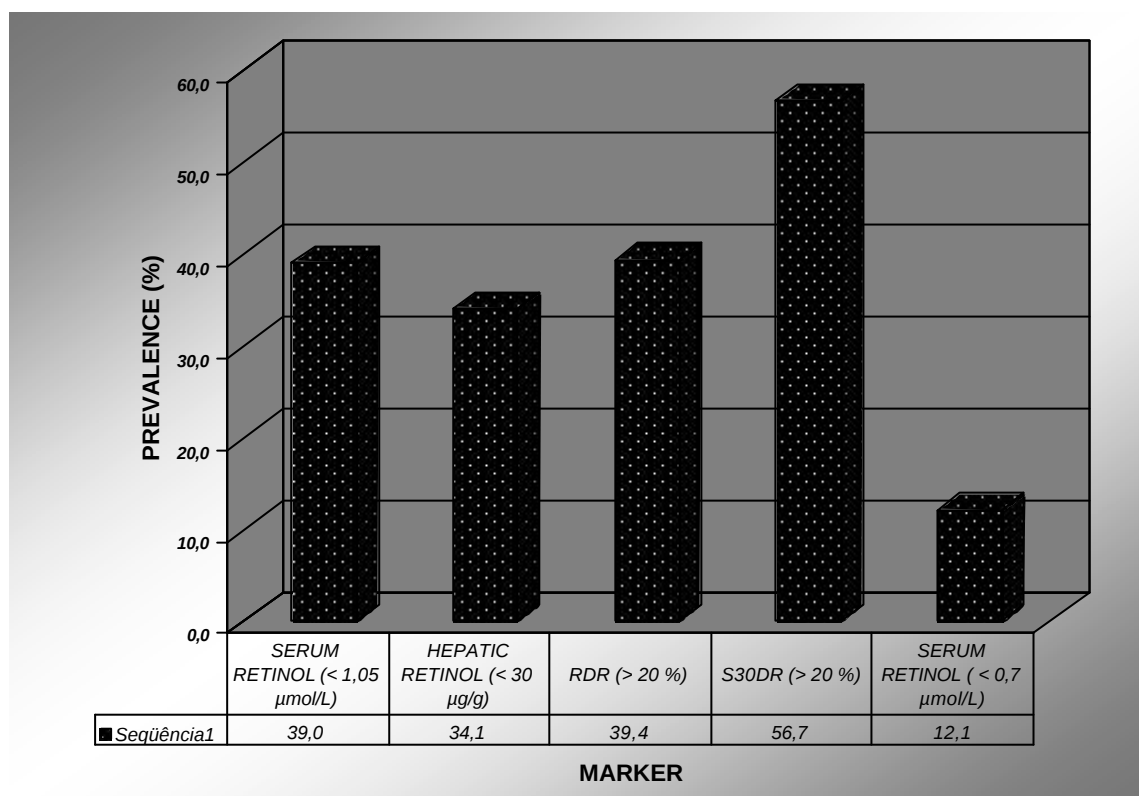


Figura 1 – Comparative analysis of the prevalence of VAD in preschool children in function of the seric and hepatic retinol, RDR and S30DR.

3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados com Ponto de corte 1,05 $\mu\text{mol/L}$, possibilitou a intervalação do retinol sérico com RDR, S30DR, e retinol hepático, podendo ser utilizados, indistintamente, de forma a permitir o controle da VAD com intervenção adequada minimizando o agravo à saúde nos grupos de risco. Não foi evidenciada equivalência para o ponto de corte 0,7 $\mu\text{mol/L}$. Sendo o retinol sérico o teste de menor ou quase nenhuma desvantagem metodológica, sugerimos ser o teste de escolha, utilizando o ponto de corte 1,05 $\mu\text{mol/L}$, na definição do status da VAD subclínica de uma população.

4 - ANEXOS

Recife, 18 de novembro de 2004.

À Revista Panamericana de Salud Pública

Att.: Chefe do Programa de Publicações e Serviços Editoriais

Prezado Sr.,

Estamos enviando, em anexo, manuscrito juntamente com toda documentação relacionada, conforme instruções para a apresentação de manuscritos propostos para publicação, a fim de que o mesmo possa ser analisado e possivelmente aceito para publicação. Trata-se de um trabalho de revisão sobre MARCADORES BIOQUÍMICOS DE CARÊNCIA SUBCLÍNICO DE VITAMINA A. O presente estudo foi financiado pelo Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e fez parte da qualificação do Doutorado de Elizabeth Alves de Oliveira, apresentada e aprovada pelo Curso de Doutorado em Nutrição do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Ficaremos no aguardo de V. Sa. para quaisquer informações adicionais e/ou retorno de nosso pleito. Agradecemos desde já,

Atenciosamente,

Elizabeth Alves de Oliveira

boliver@hotmail.com.br e **eao@ufpe.br**

Laboratório de Bioquímica da Nutrição – CCS - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária Recife – Pernambuco Brasil – CEP 50670-420.

Beth

De: "Beth" <boliver@hotlink.com.br>
Para: <publiper@paho.org>
Enviada em: quinta-feira, 18 de novembro de 2004 14:54
Anexar: A Revista Panamericana de Salud Pública.doc; declaracao de nao ter sido publicado anteriormente.doc; declaracao direitos a OPAS.doc; revisao rev pan amer de dalud final.doc
Assunto: send of manuscript

Recife, November 19 2004.

To the Revista Panamericana of Public Salud

Att.: Boss of the Program of Publications and Editoriais

Dear Sir,

We are sending, enclosed, manuscript together with every related documentation, according to instructions for the presentation of manuscripts proposed for publication, so that the same can be analyzed and possibly I accept for publication. It is a revision work on BIOCHEMICAL MARKERS OF MARGINAL DEFICIENCY OF VITAMIN A. The present study it was financed by the Council of Scientific and Technological Development - CNPq and it was part of the qualification of the Doctorate of Elizabeth Alves of Oliveira, presented and approved by the Course of Doctorate in Nutrition of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco (UFPE). we will be in I await it of V. Sá. for any information additional e/ou return of our case. We thanked at once,

Respectfully,

Elizabeth Alves of Oliveira

boliver@hotlink.com.br and ea@ufpe.br

Laboratory of Biochemistry of the Nutrition - CCS - Federal University of Pernambuco - UFPE - University Campus, s/n, University City Recife - Pernambuco Brasil - ZIP CODE 50670-420.

The documentation is being a correspondent also saw mail

 CORREIOS		RECIBO DE VENDA DE PRODUTOS		SÉRIE	NÚMERO 2232537
UNIDADE DA ECT				INSCRIÇÃO - CNPJ 34.028.316/	
RAZÃO SOCIAL OU DENOMINAÇÃO DO CLIENTE				INSCRIÇÃO - CNPJ	
NOME DO REPRESENTANTE				INSCRIÇÃO - CPF	
QUANTIDADE	DISCRIMINAÇÃO DO PRODUTO			VALOR	
01	CR. LO PRIORIT. RZ			39.75	
	VALOR TOTAL			39.75	
VALOR POR EXTENSO					
ASSINATURA DO EMPREGADO				DATA 17/11/04	

75150060-7

FC0864/35

A6 = 105 x 148 mm

ECT - EMP. BRAS. CORREIOS E TELEGRAFOS

32901224 - ACF MADALENA

AV. VISCONDE DE ALBUQUERQUE, 913 - LOJA - 01

RECIFE - PE - 50610-971

CNPJ 69.952.802/0001-06 - IE ISENTA

DATA: 18/11/2004 HORARIO: 14:59

OPERADOR 103 - VANILDO

ATENDIMENTO NÚMERO: 0022

H

COMPROVANTE DO CLIENTE

RZ371949595 - EXPORTE FACIL DOCUM.PRIORIT. RZ

DEST: PAHO

PAIS: ESTADOS UNIDOS

PESO (gr): 510

PREÇO: 0,00

ADIC: AR 3,15

ANOTAÇÕES:

TOTAL: 1 0,00

VALOR A PAGAR

0,00

A ACF MADALENA AGRADECE A PREFERENCIA!

Beth

De: "Liebstein, Mrs. Liliana (WDC)" <liebstel@paho.org>
Para: <boliver@hotlink.com.br>
Enviada em: sexta-feira, 19 de novembro de 2004 11:36
Assunto: RE: send of manuscript

Dear Dr. Oliveira,
This message is to confirm that we received your manuscript. I'll be sending you more information.
Sincerely,
Liliana Liebstein
Nutrition Program (PUB/E)
HQ/WHO
P-202 974 3646
e-202 974 3656
mailto:liebstel@paho.org

From: Beth [mailto:boliver@hotlink.com.br]
Sent: Thursday, November 18, 2004 12:54 PM
To: *HQ:PUB/PUBLIPER
Subject: send of manuscript

Recife, November 19 2004.

To the Revista Panamericana of Public Salud

Att.: Boss of the Program of Publications and Editoriais

Dear Sir,

We are sending, enclosed, manuscript together with every related documentation, according to instructions for the presentation of manuscripts proposed for publication, so that the same can be analyzed and possibly I accept for publication. It is a revision work on BIOCHEMICAL MARKERS OF MARGINAL DEFICIENCY OF VITAMIN A. The present study it was financed by the Council of Scientific and Technological Development - CNPq and it was part of the qualification of the Doctorate of Elizabeth Alves of Oliveira, presented and approved by the Course of Doctorate in Nutrition of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco (UFPE). we will be in I await it of V. Sá, for any information additional e/ou return of our case. We thanked at once,

Respectfully,

Elizabeth Alves of Oliveira
boliver@hotlink.com.br and eao@ufpe.br
Laboratory of Biochemistry of the Nutrition - CCS - Federal University of Pernambuco - UFPE - University Campus, s/n, University City Recife - Pernambuco Brasil - ZIP CODE 50670-420.

The documentation is being a correspondent also saw mail

19/11/2004



AUTHOR

Elizabeth A. Oliveira, Sra.

[My Manuscripts](#)

[Submit New MS](#)

[Search MSS](#)

[My Contact Info](#)

[Contact MS Office](#)

[Online Journal](#)

[Author Guide](#)

[Instructions for Submitting](#)

[More About File Formats](#)

[More About MS Status](#)

[Copyright Form](#)

My Manuscripts

Sort by MS Number



Sort ▲

Sort ▼

Sorted by **MS Number**

Intervalvalidation of Biochemical Markers of Subclinical Deficiency of Vitamin A

MS # 21339

Journal name: The American Journal of Clinical Nutrition

Version 1

Submitted date: 11/25/2004

MS Status: Hard Copy MS in Transit

Days since submission: 0

Copyright: NA

Beth

De: <ajcn@ucdavis.edu>
Para: <boliver@hotmail.com.br>
Enviada em: quinta-feira, 25 de novembro de 2004 16:38
Assunto: Manuscript Submission (21339 Version 1)

TO: Elizabeth A. Oliveira, Sra., Master
José nabuco Alves Barreto e Maria Carmemzita do
Amaral Barreto RE: Submission of MS #21339 Version 1

Dear Dr. Oliveira,

Rather than mailing your manuscript to us, please send your files as e-mail attachments to ajcn@ucdavis.edu. Our office staff will upload the files to the online manuscript system for you, or inform you if there is a problem with your files.

Sincerely,
D'Ann Finley, PhD
Manuscripts Editor

Editorial Office
The American Journal of Clinical Nutrition
3247 Meyer Hall
One Shields Avenue
Davis, CA 95616-8790
Phone: 1 (530) 752-8363
Fax: 1 (530) 752-8371
E-mail: . ajcn@ucdavis.edu

28/11/2004

Beth

De: <ajcn@ucdavis.edu>
Para: <boliver@hotmail.com.br>
Enviada em: quinta-feira, 25 de novembro de 2004 16:38
Assunto: Manuscript Submission (21339 Version 1)

TO: Elizabeth A. Oliveira, Sra., Master
José nabuco Alves Barreto e Maria Carmemzita do Amaral Barreto
RE: Submission of MS #21339 Version 1

Dear Dr. Oliveira,

Rather than mailing your manuscript to us, please send your files as e-mail attachments to ajcn@ucdavis.edu. Our office staff will upload the files to the online manuscript system for you, or inform you if there is a problem with your files.

Sincerely,
D'Ann Finley, PhD
Manuscripts Editor

Editorial Office
The American Journal of Clinical Nutrition
3247 Meyer Hall
One Shields Avenue
Davis, CA 95616-8790
Phone: 1 (530) 752-8363
Fax: 1 (530) 752-8371
E-mail: ajcn@ucdavis.edu

13/1/2005

Beth

De: "American Journal of Clinical Nutrition" <ajcn@ucdavis.edu>
Para: "Beth" <boliver@hotmail.com.br>
Enviada em: segunda-feira, 29 de novembro de 2004 15:12
Assunto: Re: Manuscript Submission (21339 Version 1)

Dear Dr. Oliveira,

Thank you for sending the file; I have uploaded it and will be passing it along to our Editors very soon.

Regards,

Ms. Zann Gates
Editorial Assistant, AJCN

At 12:08 PM 11/25/2004, you wrote:

>Dear Dr D'Ann Finley, PhD
>Manuscripts Editor
>
>Thanks for having this option to send my manuscript, therefore occurred
>error in the page of web at the moment where I made attachman.Sincerely,
>
>Elizabeth A. Oliveira
>Submission of MS #21339 Version 1
>
>
>
>
>
>----- Original Message -----
>From: <ajcn@ucdavis.edu>
>To: <boliver@hotmail.com.br>
>Sent: Thursday, November 25, 2004 4:38 PM
>Subject: Manuscript Submission (21339 Version 1)
>
>
>TO: Elizabeth A. Oliveira, Sra., Master
> JosÃ© nabuco Alves Barreto e Maria Carmemzita do Amaral Barreto
>RE: Submission of MS #21339 Version 1
>
>Dear Dr. Oliveira,
>
>Rather than mailing your manuscript to us, please send your files as e-mail
>attachments to ajcn@ucdavis.edu. Our office staff will upload the files to
>the online manuscript system for you, or inform you if there is a problem
>with your files.
>
>Sincerely,

13/1/2005

Beth

De: "American Journal of Clinical Nutrition" <ajcn@ucdavis.edu>
Para: "Beth" <boliver@hotlink.com.br>
Enviada em: segunda-feira, 29 de novembro de 2004 15:12
Assunto: Re: Manuscript Submission (21339 Version 1)

Dear Dr. Oliveira,

Thank you for sending the file; I have uploaded it and will be passing it along to our Editors very soon.

Regards,

Ms. Zann Gates
Editorial Assistant, AJCN

At 12:08 PM 11/25/2004, you wrote:

>Dear Dr D'Ann Finley, PhD

>Manuscripts Editor

>

>Thanks for having this option to send my manuscript, therefore occurred
>error in the page of web at the moment where I made attachman.Sincerely,

>

>Elizabeth A. Oliveira

>Submission of MS #21339 Version 1

>

>

>

>

>

>----- Original Message -----

>From: <ajcn@ucdavis.edu>

>To: <boliver@hotlink.com.br>

>Sent: Thursday, November 25, 2004 4:38 PM

>Subject: Manuscript Submission (21339 Version 1)

>

>

>TO: Elizabeth A. Oliveira, Sra., Master

> JosÃ© nabuco Alves Barreto e Maria Carmemzita do Amaral Barreto

>RE: Submission of MS #21339 Version 1

>

>Dear Dr. Oliveira,

>

>Rather than mailing your manuscript to us, please send your files as e-mail
>attachments to ajcn@ucdavis.edu. Our office staff will upload the files to
>the online manuscript system for you, or inform you if there is a problem
>with your files.

>

>Sincerely,

13/1/2005

>D'Ann Finley, PhD
>Manuscripts Editor
>-----
>Editorial Office
>The American Journal of Clinical Nutrition
>3247 Meyer Hall
>One Shields Avenue
>Davis, CA 95616-8790
>Phone: 1 (530) 752-8363
>Fax: 1 (530) 752-8371
>E-mail: ajcn@ucdavis.edu
>

Ms. Zann Gates
Editorial Assistant

Editorial Office
The American Journal of Clinical Nutrition
3247 Meyer Hall
One Shields Avenue
Davis, CA 95616-8790
(530) 752-8363 phone
(530) 752-8371 fax
ajcn@ucdavis.edu

Corresponding Author - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editor Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço: https://www.rapidreview.com/ASCN2/GUTs/gut_id_13_FrameSet.jsp

RAPID REVIEW For Web-Based Review Management Feedback Help Log Off

AUTHOR
Elizabeth A. Oliveira, PhD

My Manuscripts
Submit New MS
Search MSS
My Contact Info
Contact MS Office
Online Journal
Author Guide

 **The American Journal of Clinical Nutrition**

My Manuscripts

Sort by MS Number

Sorted  by **MS Number**

[Intervalation of Biochemical Markers of Subclinical Deficiency of Vitamin A](#)

MS # 21339	Journal name: The American Journal of Clinical Nutrition
Version: 1	Submitted date: 11/29/2004
MS Status: MS being Pre-screened	Days since submission: 1
Copyright: NA	

Instructions for Submitting
More About File Formats
More About MS Status
Copyright Form

Conclude Internet

Inicio HOTLINE - Outlook E... Res Manuscript Subm... PMS Messenger Corresponding Autho... 05/21