

Influência de contraceptivos hormonais sobre indicadores de homeostase de zinco e de turnover ósseo em mulheres adultas jovens

Influence of hormonal contraceptives on indices of zinc homeostasis and bone remodeling in young adult women

Artigo Original

Palavras-chave

Anticoncepcionais orais
Homeostase
Remodelação óssea
Metalotioneína
Cálcio
Paridade

Keywords

Contraceptives, oral
Homeostasis
Bone remodeling
Metallothionein
Calcium
Parity

Resumo

OBJETIVO: Investigar a influência de anticoncepcionais hormonais (ACH) orais em indicadores bioquímicos relacionados à utilização metabólica e distribuição de zinco e ao turnover ósseo em mulheres adultas jovens. **MÉTODOS:** Estudo transversal. Amostras de sangue e urina de não usuárias (-ACH; controle; n=69) e usuárias há pelo menos três meses de contraceptivos hormonais orais (+ACH; n=62) foram coletadas em condições padronizadas. Foram analisados os indicadores de homeostase de zinco e de turnover ósseo em soro ou plasma (zinco total e nas frações de albumina e α_2 -macroglobulina, albumina e atividade de fosfatase alcalina total e de origem óssea), em eritrócitos (zinco e metalotioneína) e em urina (zinco, cálcio e hidroxiprolina). Ingestões habituais de zinco e cálcio foram avaliadas por questionário de frequência de consumo. **RESULTADOS:** A ingestão alimentar de zinco foi semelhante nos grupos e, em média, acima do recomendado, enquanto que a ingestão de cálcio foi similarmente subadequada em +ACH e -ACH. Comparadas às controles, as +ACH apresentaram menores concentrações de zinco em soro, total e ligado à α_2 -macroglobulina (11 e 28,5%, respectivamente, p<0,001); albumina em soro (13%, p<0,001); atividade de fosfatase alcalina em plasma, total e de origem óssea (13 e 18%, respectivamente, p<0,05); metalotioneína em eritrócitos (13%, p<0,01) e zinco urinário (34%, p<0,05). **CONCLUSÕES:** O uso de ACH reduz o zinco sérico, altera a distribuição de zinco nas principais proteínas ligantes do soro com possíveis efeitos na captação tecidual, aumenta a retenção de zinco no organismo e reduz o turnover ósseo. O uso prolongado de ACH poderia levar a menor pico de massa óssea e/ou prejudicar a manutenção de massa óssea em mulheres jovens, principalmente com ingestão marginal de cálcio. Os efeitos de ACH verificados foram mais evidentes nas mulheres <25 anos de idade e nas nulíparas, as quais merecem especial atenção em estudos posteriores.

Abstract

PURPOSE: To investigate the influence of the use of oral hormonal contraceptive agents (OCA) on the biochemical indices related to metabolic zinc utilization and distribution, and to bone turnover in young adult women. **METHODS:** Cross-sectional study. Blood and urine samples from non-users (-OCA; control; n=69) and users of hormonal contraceptives for at least 3 months (+OCA; n=62) were collected under controlled conditions. Indices of zinc homeostasis and of bone turnover were analyzed in serum or plasma (total, albumin-bound and α_2 -macroglobulin-bound zinc, albumin and total and bone alkaline phosphatase activity), in erythrocytes (zinc and metallothionein) and in urine (zinc, calcium and hydroxyproline). The habitual zinc and calcium intakes were evaluated by a food frequency questionnaire. **RESULTS:** Dietary zinc intake was similar in both groups and on average above recommended values, whereas calcium intake was similarly sub-adequate in +OCA and -OCA. Compared to controls, +OCA had lower concentrations of total and α_2 -macroglobulin-bound zinc (11 and 28.5%, respectively, p<0.001), serum albumin (13%, p<0.01), total and bone-specific alkaline phosphatase activity (13 and 18%, respectively, p<0.05), erythrocyte metallothionein (13%, p<0.01), and, urinary zinc (34%, p<0.05). **CONCLUSIONS:** OCA use decreases serum zinc, alters zinc distribution in major serum fractions with possible effects on tissue uptake, enhances zinc retention in the body and decreases bone turnover. Prolonged OCA use may lead to lower peak bone mass and/or to impaired bone mass maintenance in young women, particularly in those with marginal calcium intake. The observed OCA effects were more evident in women younger than 25 years and in nulliparous women, deserving special attention in future studies.

Correspondência

Tania Mara Rodrigues Simões
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Centro
CEP: 37130-000
Alfenas (MG), Brasil

Recebido

16/06/2015

Aceito com modificações

10/07/2015

DOI: 10.1590/S0100-720320150005418

Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos do Departamento de Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

¹Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Departamento de Química do Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

²Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – Alfenas (MG), Brasil.

³Grupo de Investigación Biología de Nutrientes, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico – Barranquilla, Colombia.

⁴Escuela de Nutrición, Universidad de la República – Montevideo, Uruguay.

Conflito de interesses: não há.

Introdução

Com a introdução de agentes contraceptivos hormonais (ACH) no mercado, a partir dos anos 1960, vários efeitos metabólicos têm sido reportados, incluindo os relacionados aos minerais. Estudos observaram, em mulheres usuárias de ACH, mudanças em níveis circulantes de alguns minerais, sugestivas de alterações bioquímicas e metabólicas provocadas pelo uso de tais agentes¹⁻³. Dentre os mais estudados, encontra-se o zinco, cujos níveis circulantes apresentaram-se diminuídos com o uso de ACH⁴⁻⁶, propondo-se que isso poderia refletir uma alteração em proteínas de transporte no plasma e/ou uma redução no estado de zinco tecidual, relacionando-se com alterações em sua absorção, excreção ou *turnover* tecidual, inclusive questionando-se se o requerimento dietético desse mineral estaria aumentado em usuárias de ACH⁶⁻⁸.

Entretanto, a partir da década de 1980, quando os ACH de terceira geração, com mais baixas concentrações de estrógeno e progestágeno, começaram a ser utilizados, os efeitos observados em relação ao zinco começaram a se mostrar controversos, pois alguns estudos não verificaram alteração em seus níveis circulantes como consequência do uso de ACH^{2,3,9}, nem foram encontradas diferenças significativas na concentrações de zinco em cabelo², eritrócitos ou leucócitos¹⁰. Essa controvérsia de resultados, ainda hoje verificada na literatura, provavelmente se deve, entre outros fatores, à grande variedade de tipos e dosagens dos componentes estrogênicos e progestagênicos contidos nos ACH⁷.

Especula-se que, com o surgimento dos ACH contendo baixas dosagens hormonais, os efeitos desses agentes na homeostase de zinco sejam de menor magnitude. Por outro lado, ainda são poucas as evidências de tais efeitos associando-se vários indicadores bioquímicos de zinco incluindo, por exemplo, a metalotioneína (MT) em eritrócitos, indicador de homeostase intracelular do mineral. Concentrações teciduais (principalmente em eritrócitos) de MT — metaloproteína de baixo peso molecular (6 a 7 kD), rica em cisteína e com alta capacidade de ligação ao zinco e outros metais — refletem o estado de zinco em humanos. No entanto, a expressão gênica da MT em diferentes tecidos pode ser afetada, dentre outros fatores, pelo uso de contraceptivos orais¹¹⁻¹³. Uma avaliação mais abrangente de indicadores do zinco poderia, portanto, contribuir para esclarecer o papel dos ACH na utilização desse mineral no organismo, em situações de baixas dosagens de uso de ACH.

Em relação ao *turnover* ósseo, já é bem conhecido que os hormônios sexuais desempenham papel importante na regulação do metabolismo ósseo, tendo os ACH efeitos sobre a saúde óssea. Todavia, não estão suficientemente esclarecidos os efeitos do uso de contracepção hormonal

combinada sobre o alcance do pico de massa óssea, a manutenção da massa óssea na idade adulta e o risco de osteoporose com o avanço da idade¹⁴⁻¹⁹.

Estudo experimental realizado em macacas adultas jovens imaturas esqueléticamente²⁰ verificou que o tratamento por 20 meses com ACH oral trifásico se relacionou com menor ganho de massa e densidade óssea, e acentuadas reduções nos marcadores bioquímicos de síntese óssea (osteocalcina e fosfatase alcalina total) e moderadas reduções naqueles de mobilização óssea (fosfatase ácida e cálcio urinário). É possível, então, que o uso prolongado de ACH em mulheres jovens prejudique o alcance do pico de massa óssea fisiológico, aumentando o risco de osteoporose. O efeito pode ser mais pronunciado se associado a outros fatores de risco, tais como ingestão subadequada de cálcio. Gambacciani et al.²¹, por sua vez, têm reportado que o uso de ACH com baixa dose de etinilestradiol é capaz de prevenir a diminuição de densidade óssea em mulheres na perimenopausa, porém, afirmam que os efeitos ósseos de diferentes doses, tipos e preparações podem variar; acrescentam, ainda, que recentemente tem-se revisado a discussão sobre os possíveis efeitos de esteroides na modulação do metabolismo e densidade ósseos. O presente trabalho objetivou investigar a influência do uso de ACH orais em indicadores bioquímicos relacionados à utilização metabólica e distribuição de zinco e ao *turnover* ósseo em mulheres adultas jovens.

Métodos

Foi realizado um estudo transversal, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil. Sua execução foi realizada após consentimento livre das mulheres voluntárias previamente esclarecidas sobre todos os procedimentos da pesquisa. Todas as voluntárias eram saudáveis, não fumantes e com idade entre 18 e 40 anos. O recrutamento foi feito após entrevista e preenchimento de questionário estruturado constando de dados pessoais, história patológica pregressa, história sobre gestação e lactação, doenças e medicações recentes, tabagismo, uso de suplementos e de anticoncepcional, prática de atividade física e data da última menstruação.

As participantes foram distribuídas em dois grupos: não usuárias de agentes contraceptivos hormonais (-ACH), chamado de controle, e usuárias de contraceptivos hormonais (+ACH). O grupo -ACH foi composto por 69 mulheres não gestantes e não lactantes, com ciclo menstrual regular, que participaram do estudo na fase folicular, período em que os níveis plasmáticos de estrogênio e progesterona encontram-se baixos e estáveis²². O grupo +ACH foi composto por 62 mulheres não lactantes e usuárias há pelo menos 3 meses

de hormônios anticoncepcionais, as quais participaram do estudo entre o 12º e 18º dia após o início da última menstruação, período de níveis circulantes estáveis de estrogênio e progesterona em usuárias de ACH²³.

A ingestão alimentar habitual das voluntárias foi avaliada por questionário de frequência alimentar²⁴, sendo os dados analisados pelo *software The Food Processor* (ESHA Research, Salem, OR) adaptado para alimentos brasileiros¹¹. As amostras de sangue (12 mL) e urina (50 mL) foram obtidas pela manhã e em jejum, por técnicas convencionais e processadas sob condições padronizadas, de acordo com o previamente descrito na literatura^{11,24,25}.

■ Análises laboratoriais

As dosagens hematológicas realizadas foram: hematócrito, hemoglobina, zinco total e nas frações proteicas do soro (zinco-albumina e zinco- α_2 -macroglobulina), albumina sérica, atividade de fosfatase alcalina total e de origem óssea em plasma, além de metalotioneína (MT) e zinco em eritrócitos. As análises urinárias constaram de dosagem de creatinina, zinco, cálcio e hidroxiprolina.

O hematócrito e a hemoglobina foram determinados em amostras de sangue total fresco heparinizado, por técnica capilar convencional e pelo método colorimétrico da cianometahemoglobina utilizando-se kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), respectivamente^{11,25}. O zinco total sérico e na fração zinco-albumina foram medidos por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (Perkin Elmer modelo 3100), cuja metodologia empregada foi a descrita por Giroux, citada por Vargas Zapata et al.²⁴, com a diferença entre os teores de zinco total e zinco-albumina correspondendo àquele de zinco- α_2 -macroglobulina. A albumina sérica foi analisada utilizando-se kit comercial (Biolab, Rio de Janeiro, Brasil), por dosagem colorimétrica baseada na complexação com o verde de bromocresol^{24,25}. A atividade da fosfatase alcalina total e da fosfatase alcalina de origem óssea foram mensuradas em plasma fresco usando *p*-nitrofenilfosfato como substrato, por adaptação do método de Farley et al. apud Kamp et al.¹¹. A determinação de zinco em eritrócitos lisados foi realizada após digestão com ácido nítrico ultrapuro (Suprapur-Merck, Darmstadt, Alemanha) a 105°C por 20 horas e apropriada diluição com água deionizada, com leitura das amostras realizada por EAA²⁶. A mensuração da MT em eritrócitos lisados se deu por adaptação do método de afinidade ¹⁰⁹Cd-hemoglobina, conforme previamente descrito^{24,26}. Os resultados de zinco e de MT em eritrócitos foram expressos por grama de proteína, cujo teor em eritrócitos lisados foi determinado por método de Lowry adaptado por Trugo et al. apud Maia et al.²⁵. Na urina, para normalizar a expressão das concentrações dos demais componentes urinários, a creatinina foi analisada por método colorimétrico baseando-se na reação com o

ácido pícrico¹¹. O teor da excreção urinária de zinco foi avaliado^{11,25} e sua leitura foi realizada por EAA. A concentração de cálcio na urina foi analisada utilizando-se um kit comercial (Biolab, Rio de Janeiro, Brasil)²⁷. A hidroxiprolina urinária foi analisada por método colorimétrico baseado na reação com *p*-dimetilamino benzaldeído²⁸.

■ Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software Statgraphics* (versão 7, Manugistics, Cambridge, MA, USA), incluindo análises descritivas, comparações entre os grupos por teste *t* não pareado e análises de correlação e de variância. Valores de *p*<0,05 foram considerados significativos.

Resultados

As características das mulheres participantes do estudo estão na Tabela 1. As voluntárias de ambos os grupos eram semelhantes em idade, teores de hemoglobina e hematócrito, em média adequados^{9,29}, e índice de massa corporal (IMC), em média dentro dos limites de normalidade para mulheres adultas³⁰. A caracterização quanto ao grupo étnico foi difícil de ser realizada devido à heterogeneidade da população estudada. Todas as voluntárias declararam ser sedentárias. Em relação à paridade, aproximadamente 82 e 71% das mulheres eram nulíparas, nos grupos de não usuárias e usuárias de ACH, respectivamente. Esses percentuais foram semelhantes em mulheres com idade abaixo e acima da mediana (25 anos), em ambos os grupos.

Nenhuma das voluntárias relatou uso de suplementos de vitaminas e minerais nos seis meses anteriores à

Tabela 1. Caracterização das mulheres estudadas, não usuárias e usuárias de anticoncepcionais hormonais

Característica	-ACH	+ACH
	Média±DP n=69	Média±DP n=62
Idade (anos)	26,0±5,4	25±3,6
IMC (kg/m ²)	21,7±2,8	21,5±2,6
Hemoglobina sanguínea (g/L)	132,0±15,0	127,0±17,0
Hematócrito (%)	42,2±2,6	41,4±2,8
Ingestão alimentar		
Energia (kcal/dia)	1.667,0±670,0	1.619,0±650,0
Proteína (g/dia)	99,0±36,0	97,0±48,0
Zinco (mg/dia)	10,7±3,4	10,5±3,8
Cálcio (mg/dia)	800,0±393,0	717,0±314,0
Fósforo (mg/dia)	1.363,0±478,0	1.309,0±544,0
Cálcio/fósforo (mg/mg)	0,6±0,19	0,5±0,16
Ferro (mg/dia)	12,1±4,3	13,0±4,3
Fibras (g/dia)	20,4±13,2	22,8±11,1

-ACH: não usuárias de anticoncepcionais hormonais; +ACH: usuárias de anticoncepcionais hormonais; DP: desvio padrão; IMC: índice de massa corporal.

participação no estudo; todas relataram não fazerem uso rotineiro de medicamentos, exceto ACH no grupo das usuárias. A ingestão habitual dos nutrientes estudados foi semelhante nos dois grupos. A ingestão alimentar de zinco apresentou-se, em média, cerca de 30% acima dos níveis atualmente recomendados (8 mg/dia)³¹, em ambos os grupos. Alimentos de origem animal, fontes nas quais a biodisponibilidade do zinco é maior, contribuíram com cerca de 70% da ingestão total desse nutriente, nos dois grupos estudados.

A ingestão alimentar média de cálcio das -ACH foi 80% e das +ACH, 72% da recomendação atual (1.000 mg/dia)³¹. A contribuição de leite e derivados na ingestão total de cálcio, em média, foi de aproximadamente 55%. A ingestão de fósforo adequada é de 700 mg/dia³¹; em ambos os grupos, a ingestão média foi bem acima das atuais recomendações. A ingestão de ferro foi, em média, 67% (não usuárias) e 72% (usuárias) do recomendado para mulheres³¹. O ferro-heme contido nas carnes contribuiu, nos dois grupos, com cerca de 10% da ingestão total do nutriente. A ingestão habitual média de proteína ultrapassou em mais de 100% das atuais recomendações, e a ingestão de fibras, em média, foi de aproximadamente 82% (-ACH) e 91% (+ACH) do recomendado³¹. A maioria das voluntárias de ambos os grupos relatou ingestão de leve a moderada de alimentos contendo cafeína (café, chás, refrigerantes tipo cola, achocolatados).

A ingestão total alimentar de zinco, cálcio e ferro das mulheres incluídas no estudo correlacionaram-se positiva e significativamente com a ingestão dietética de proteínas ($r=0,9$; $r=0,4$; $r=0,7$, respectivamente; $p<0,001$). O zinco total ingerido correlacionou-se ($p<0,001$) com a ingestão de ferro total ($r=0,7$) e principalmente com a de ferro-heme ($r=0,8$).

Em relação ao período de uso dos anticoncepcionais, a mediana foi de 18 meses, com mínimo de 3 e máximo de 168 meses, sendo que cerca de 60% das +ACH faziam uso de 3 a 24 meses. Quanto ao tipo e composição dos anticoncepcionais utilizados, houve relatos de uso de ACH orais monofásicos e trifásicos. Dentre as +ACH, 22 (35,5%) relataram o uso de contraceptivo contendo 30 µg de etinilestradiol + 75 µg de gestodene/pílula; 7 (11,3%), 30, 40 e 30 µg de etinilestradiol + 50, 75 e 125 µg de levonorgestrel; 5 (8,1%), 20 µg de etinilestradiol + 150 µg de desogestrel; 1 (1,6%), 30 µg de etinilestradiol + 150 µg de desogestrel/pílula; 15 (24,2%), 30 µg de etinilestradiol + 150 µg de levonorgestrel; 1 (1,6%), 50 µg de etinilestradiol + 250 µg de levonorgestrel/pílula; e 11 (17,7%), contendo 35 µg de etinilestradiol + 2.000 µg de acetato de ciproterona. Observou-se, portanto, que os níveis de estrógeno variaram pouco, de 20 a 50 µg por pílula; já os níveis de progestágeno apresentaram maior variação, de 50 a 2.000 µg por pílula. Os teores de estrógeno e de progestágeno presentes nos ACH usados pelas mulheres deste estudo apresentaram uma correlação significativa ($r=0,5$; $p<0,001$).

Indicadores de homeostase de zinco e de turnover ósseo

Na Tabela 2 são mostrados os indicadores sanguíneos e urinários relacionados a zinco nos dois grupos estudados. Dentre os componentes mensurados em soro, o zinco total foi, em média, significativamente menor, cerca de 11% no grupo de mulheres usuárias de ACH ($p<0,001$), comparado ao grupo controle. Quanto à distribuição de zinco nos principais ligantes séricos, os níveis de zinco- α_2 -macroglobulina das usuárias foram, em média, 28,5% mais baixos ($p<0,01$) do que os das não usuárias. O zinco-albumina foi similar em ambos

Tabela 2. Componentes sanguíneos e urinários relacionados ao zinco e ao turnover ósseo em mulheres não usuárias e usuárias de anticoncepcionais hormonais

Indicadores	-ACH		+ACH	
	n	Média±DP	n	Média±DP
Soro ou plasma sanguíneo				
Zinco total (µmol/L soro) ^a	69	14,8±2,6	61	13,2±2,2
Zinco ligado à albumina (µmol/L soro)	69	9,9±2,5	61	9,6±2,4
Zinco ligado à α_2 -macroglobulina (µmol/L soro) ^b	69	4,9±2,7	61	3,5±2,6
Albumina (g/L soro) ^a	69	46,0±4,0	61	44,0±4,0
Atividade de fosfatase alcalina total (U/L plasma) ^c	49	23,1±6,0	42	20,2±5,0
Atividade de fosfatase alcalina de origem óssea (U/L plasma) ^c	30	15,4±4,4	21	12,7±4,6
Eritrócitos				
Zinco (µmol/g proteína)	42	0,4±0,1	33	0,4±0,1
Metalotioneína (nmol/g proteína) ^b	40	2,3±0,5	27	2,0±0,5
Urina				
Zinco (nmol/mg creatinina) ^c	30	5,3±3,7	21	3,5±2,0
Cálcio (µmol/mmol creatinina)	30	246,0±143,0	21	189,0±123,0
Hidroxirolina (µmol/mmol creatinina)	30	20,9±9,8	21	19,3±6,7

-ACH: não usuárias de anticoncepcionais hormonais; +ACH: usuárias de anticoncepcionais hormonais; DP: desvio padrão; ^a $p<0,001$; ^b $p<0,01$; ^c $p<0,05$ (teste *t* não pareado).

os grupos. Em média, 68 e 32% do zinco sérico total estavam ligados à albumina e à α_2 -macroglobulina, respectivamente, no grupo controle, enquanto os valores foram 74 e 26%, respectivamente, nas usuárias de ACH, sendo a diferença entre os grupos significativa ($p < 0,05$) para ambas as frações proteicas. A albumina sérica, apesar de apresentar valores próximos, foi significativamente menor no grupo das usuárias ($p < 0,001$). Em relação à fosfatase alcalina total (uma zinco-metaloenzima), sua atividade total em plasma mostrou-se, em média, significativamente mais baixa, cerca de 13% no grupo +ACH ($p < 0,05$), comparado com as -ACH.

Níveis totais de zinco em eritrócitos foram semelhantes em não usuárias e usuárias, mas as concentrações de MT em eritrócitos apresentaram-se, em média, significativamente menores, cerca de 13% no grupo +ACH ($p < 0,01$). A excreção urinária de zinco das mulheres usuárias foi menor ($p < 0,05$), comparada ao grupo controle. As +ACH excretaram, em média, 34% menos zinco urinário do que as não usuárias de ACH.

Componentes plasmáticos e urinários relacionados ao *turnover* ósseo também são apresentados na Tabela 2. A atividade de fosfatase alcalina plasmática de origem óssea, utilizada como indicador de formação óssea, foi cerca de 18% menos no grupo +ACH quando comparada às -ACH ($p < 0,05$). No entanto, os níveis de excreção urinária de cálcio e de hidroxiprolina, indicadores de degradação óssea, foram semelhantes nos dois grupos estudados.

Quanto à análise de correlação entre componentes relacionados ao zinco, o zinco sérico total apresentou correlação significativa com o zinco ligado à fração de albumina, tanto no grupo -ACH ($r = 0,5$; $p < 0,001$) como no grupo +ACH ($r = 0,4$; $p < 0,01$). Níveis totais de zinco e albumina em soro correlacionaram-se significativamente, porém, de forma fraca, apenas nas +ACH ($r = 0,3$; $p < 0,05$). Correlações significativas foram observadas entre zinco em eritrócitos e zinco ligado à albumina em ambos os grupos (-ACH: $r = 0,4$; $p < 0,05$; +ACH: $r = 0,5$; $p < 0,01$). Zinco eritrocitário também apresentou correlação significativa positiva com a albumina sérica ($r = 0,6$; $p < 0,001$) e negativa com o zinco ligado à α_2 -macroglobulina ($r = -0,5$; $p < 0,01$) apenas no grupo +ACH.

Níveis de MT e zinco eritrocitários correlacionaram-se significativamente apenas no grupo +ACH ($r = 0,6$; $p < 0,01$). A MT em eritrócitos correlacionou-se com o zinco sérico total somente no grupo controle ($r = 0,4$; $p < 0,05$). No entanto, a MT em eritrócitos correlacionou-se significativamente com o zinco ligado à fração de albumina no soro nos dois grupos estudados (-ACH: $r = 0,4$; $p < 0,02$; +ACH: $r = 0,5$; $p < 0,02$). Houve correlação significativa negativa entre a atividade de fosfatase alcalina total no plasma e os níveis circulantes de zinco ligado à α_2 -macroglobulina, somente no grupo -ACH ($r = -0,3$; $p < 0,05$).

Os níveis urinários de cálcio e de zinco correlacionaram-se significativamente no grupo controle ($r = 0,6$; $p < 0,01$) e a excreção de hidroxiprolina na urina correlacionou-se com a de cálcio apenas no grupo +ACH ($r = 0,4$; $p = 0,06$), porém sem atingir significância. Considerando todas as mulheres do estudo, houve correlação significativa entre zinco e cálcio urinários ($r = 0,5$; $p < 0,001$), entre zinco e hidroxiprolina urinários ($r = 0,3$; $p < 0,05$) e entre zinco urinário e atividade de fosfatase alcalina óssea em plasma ($r = 0,3$; $p < 0,05$).

As ingestões habituais de zinco e de outros nutrientes e componentes na dieta não afetaram os indicadores de utilização de zinco avaliados. No grupo +ACH, as doses de estrógenos ou progestágeno e a razão progestágeno/estrógeno dos contraceptivos, assim como o período de uso dos mesmos, não afetaram os indicadores de zinco investigados. As ingestões habituais de cálcio e de outros nutrientes não apresentaram relação significativa com os indicadores de *turnover* ósseo avaliados. Nenhum efeito de doses dos hormônios e razão progestágeno/estrógeno das “pílulas” anticoncepcionais, nem o período de uso das mesmas sobre os indicadores de *turnover* ósseo, foi observado no grupo de usuárias.

A influência do uso de ACH sobre indicadores de zinco foi avaliada nas mulheres usuárias agrupadas pela idade de acordo com a mediana do grupo [25 anos] (análise de variância). Em ambos grupos etários (<25 anos e ≥ 25 anos), as usuárias apresentaram concentrações de zinco sérico total ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) e de albumina sérica ($p < 0,05$ para ambos grupos) menores do que as não usuárias. Os níveis de zinco ligado à α_2 -macroglobulina foram significativamente menores ($p < 0,01$) com o uso de ACH, somente nas mulheres ≥ 25 anos. Já a MT em eritrócitos e a excreção urinária de zinco-creatinina mostraram-se menores ($p < 0,05$) com o uso de ACH somente nas mulheres <25 anos.

A influência do uso de ACH sobre indicadores de zinco foi também avaliada nas usuárias quanto à paridade das mulheres [nulíparas e não-nulíparas] (análise de variância). Os níveis de MT em eritrócitos foram menores nas +ACH do que nas -ACH, tanto nas nulíparas quanto nas não nulíparas ($p < 0,05$). As concentrações de zinco total sérico ($p < 0,001$), albumina sérica ($p < 0,01$), zinco ligado à α_2 -macroglobulina ($p < 0,01$) e zinco-creatinina urinário ($p < 0,05$) foram significativamente menores com o uso de ACH, apenas nas mulheres nulíparas.

A idade e a paridade afetaram a influência de ACH na atividade da fosfatase alcalina óssea, e apenas a paridade teve efeito sobre a influência de ACH na excreção urinária de cálcio (análise de variância). A fosfatase alcalina de origem óssea mostrou-se significativamente menor com

o uso de ACH apenas nas mulheres ≥ 25 anos ($p < 0,05$) e nas nulíparas ($p < 0,01$). Com o uso de ACH, o cálcio-creatinina urinário foi menor ($p < 0,05$) nas mulheres nulíparas, e maior ($p < 0,05$) nas não nulíparas.

Discussão

Mulheres em todo o mundo têm utilizado amplamente ACH orais combinados, iniciando o seu uso cada vez mais precocemente, ainda quando adultas jovens ou na adolescência⁶. Seu uso parece afetar a homeostase de zinco e o metabolismo do tecido ósseo, mas os efeitos são ainda controversos¹⁹, principalmente em relação a contraceptivos de baixa dosagem hormonal. É possível que esses efeitos, principalmente no *turnover* ósseo, sejam mais acentuados em mulheres jovens, principalmente no caso de ingestão dietética marginal de cálcio.

No presente trabalho, as mulheres +ACH utilizaram contraceptivos contendo o mesmo estrógeno, etinilestradiol, todas em baixas dosagens, variando apenas o componente progestágeno. O período de uso de ACH foi acima de 3 meses, sendo superior a 12 meses para a maioria das voluntárias e, portanto, considerado como uso prolongado. As mulheres eram todas adultas jovens, com média de idade entre 25 e 26 anos, idade a partir da qual é geralmente alcançado o pico de massa óssea em humanos³². Dessa forma, cerca de metade das mulheres participantes do estudo poderia não ter alcançado ainda a maturidade óssea.

Considerando as atuais recomendações³¹, ambos os grupos apresentaram alta ingestão dietética de zinco, encontrando-se subadequação apenas na ingestão habitual de cálcio. Ressalta-se, no entanto, que houve uma importante contribuição de leite e laticínios (55%), alimentos com maior biodisponibilidade de cálcio, o que pode ter favorecido a eficiência de absorção intestinal desse mineral. A ingestão de fibras dietéticas foi em nível que não exerce efeito importante na absorção de minerais^{31,33}. A alta ingestão de fósforo poderia prejudicar a absorção tanto de zinco quanto de cálcio, principalmente sob a forma de fitatos, além de trazer possíveis prejuízos para a capacidade de manutenção óssea, por efeitos no metabolismo ósseo. Uma razão dietética de cálcio/fósforo $> 0,74$ seria ideal para a manutenção óssea em mulheres adultas, pois pode aumentar a absorção intestinal de cálcio e inibir a perda óssea³³. A alta ingestão proteica observada poderia influenciar negativamente a excreção urinária e o balanço de cálcio, principalmente quando a ingestão desse mineral encontra-se inadequada³³. Tem sido considerado que a relação de ingestão de cálcio/proteína ideal deve ser $\geq 20:1$ (mg cálcio/g proteína)³⁴; no presente trabalho, as não usuárias de ACH apresentaram uma razão de ingestão cálcio:proteína de aproximadamente 8,1:1 (mg/g) e

as +ACH, de 7,4:1 (mg/g), o que poderia prejudicar a manutenção do cálcio no organismo e, conseqüentemente, o metabolismo ósseo.

Demonstraram-se efeitos mensuráveis do uso de ACH orais combinados, de baixa dosagem hormonal, sobre indicadores bioquímicos de utilização de zinco e de *turnover* ósseo nas mulheres estudadas. Os menores níveis de zinco sérico total nas +ACH, comparadas às -ACH, ainda que de pequena magnitude, estão de acordo com o previamente descrito na literatura^{4,5,7,11}, confirmando o efeito de redução dos níveis circulantes de zinco pelo uso de contraceptivos hormonais, tanto em altas como em baixas doses hormonais, embora os mecanismos envolvidos ainda não tenham sido completamente esclarecidos. Tal diminuição tem sido atribuída a uma redução da albumina sérica, à redistribuição de zinco entre os *pools* plasmáticos e teciduais, além de reduzido *turnover* tecidual de zinco explicado em parte pela indução de anabolismo pelo estrogênio sintético que compõe contraceptivos hormonais orais. Uma vez que o zinco é requerido para a síntese proteica, baixas concentrações de zinco sérico em usuárias de ACH poderiam estar relacionadas a uma captação hepática aumentada de zinco, induzida pelos efeitos anabólicos de contraceptivos hormonais¹¹.

São poucos os relatos na literatura sobre o efeito de ACH na distribuição de zinco entre as principais proteínas transportadoras no soro^{1,32}. Nossas +ACH apresentaram menos zinco ligado à fração de α_2 -macroglobulina em relação às -ACH, sem alteração do zinco ligado à albumina, diferentemente ao encontrado por Margen e King¹ e Hess et al.³².

Os diferentes percentuais de zinco ligado às frações séricas de albumina e de α_2 -macroglobulina, em nossas voluntárias +ACH e -ACH, sugerem que esses agentes alteram a dinâmica de distribuição de zinco entre os tecidos. O zinco diretamente disponível para captação celular, que é aquele ligado à albumina, não é aparentemente afetado pelo uso de ACH. Houve correlação significativa entre o teor de zinco em eritrócitos e o da fração de zinco ligado à albumina nos dois grupos estudados, consistente com o papel dessa fração sérica no fornecimento de zinco às células. No entanto, o transporte plasmático de zinco de outros tecidos para o fígado, papel proposto mas ainda não comprovado da α_2 -macroglobulina²⁴, estaria diminuído com o uso de ACH, o que poderia limitar o metabolismo hepático nessa situação. O nosso achado de correlação negativa entre o teor de zinco em eritrócitos e o de zinco ligado à fração de α_2 -macroglobulina nas +ACH é consistente com o possível papel da α_2 -macroglobulina na remoção de zinco dos tecidos.

Nossos resultados são consistentes com um efeito contraceptivo hormonal de aumento da retenção de zinco no organismo. Observamos excreção urinária

de zinco bastante menor (33%) nas +ACH comparadas ao grupo controle, com semelhantes ingestões habituais de zinco e de outros componentes da dieta, corroborando os resultados de estudos prévios^{11,32}, porém com ingestões menores de zinco. A influência da utilização de contraceptivos hormonais no aumento da conservação de zinco renal tem sido associada ao efeito anabólico do estrogênio de aumento na captação tecidual de zinco e/ou reduzida liberação de zinco dos tecidos¹¹.

A menor atividade de fosfatase alcalina total em plasma no grupo +ACH, comparado ao grupo controle, é compatível com o achado previamente em usuárias de ACH com menor ingestão de zinco³². Sendo a fosfatase alcalina uma enzima zinco-dependente, sua atividade diminuída poderia resultar de uma maior proporção da forma de apoenzima e/ou de uma diminuição no *turnover* tecidual de zinco sob o efeito de ACH, o que poderia diminuir a disponibilidade de zinco celular para a síntese de proteínas específicas. Nossos resultados de MT em eritrócitos são consistentes com essa hipótese, uma vez que seus níveis também foram menores em mulheres +ACH. No entanto, a concentração de zinco em eritrócitos não sofreu alteração com o uso de ACH, o que já havia sido reportado em estudo utilizando também baixas dosagens hormonais¹¹. A correlação significativa entre os teores de zinco e MT em eritrócitos nas +ACH é consistente com o possível papel regulatório do zinco intracelular nos níveis de MT eritrocitária.

O papel da MT na homeostase de minerais é bem aceito, apesar de que a influência de fatores biológicos e ambientais sobre suas concentrações extra e intracelulares ainda não ter sido totalmente esclarecida¹³. A MT eritrocitária tem sido sugerida como um bom indicador da redistribuição tecidual de zinco²⁴, porém são poucos e contraditórios os estudos que reportam o efeito de ACH na MT em eritrócitos. Estudo recente utilizando mesmo método de dosagem que o nosso verificou que o uso de contraceptivos orais não modificou a concentração de MT eritrocitária¹¹, enquanto outro, empregando método diferente, encontrou níveis de MT em eritrócitos cerca de duas vezes maiores entre mulheres usuárias de contraceptivos orais comparadas com o grupo controle¹³. Além disso, em estudos realizados com gestantes adultas²⁴ ou adolescentes²⁵ no último trimestre de gestação, a MT em eritrócitos apresentou-se levemente aumentada quando comparada a de mulheres controles, provavelmente como resultado das complexas alterações hormonais inerentes à gestação, destacando-se a acentuada elevação de estrogênio em soro²⁴. No entanto, durante o período de uso de ACH, os níveis circulantes de estrogênio têm se mostrado constantes e similares às baixas concentrações encontradas durante a fase folicular²³. É possível, então, que a

manutenção de baixos níveis de estrogênio no soro, com o uso de ACH, provoque o efeito final de redução nos níveis de MT eritrocitária, por mecanismos que ainda não são evidentes em função da complexidade de fatores que afetam a expressão e o *turnover* dessa proteína^{12,13}.

Alguns dos efeitos que observamos com o uso de ACH na homeostase de zinco foram mais evidentes nas mulheres mais jovens e nas mulheres nulíparas. Quando as voluntárias foram agrupadas por faixa etária considerando-se a mediana de idade, a redução de zinco urinário e de níveis de MT em eritrócitos com o uso de ACH ocorreu apenas nas mais jovens (<25 anos). Ao agruparmos as mulheres de acordo com a paridade, a redução do zinco sérico total, do zinco ligado à α_2 -macroglobulina e da excreção urinária de zinco, com o uso de ACH, ocorreu somente naquelas nulíparas. Esses resultados sugerem que são possivelmente as mulheres mais jovens e as que nunca engravidaram, as mais susceptíveis aos efeitos do uso de ACH na homeostase de zinco, o que precisa ser melhor investigado em estudos posteriores. Em suma, o conjunto de resultados dos indicadores de homeostase de zinco no presente estudo sugere que o uso de ACH em mulheres adultas (18 a 40 anos de idade) modifica a distribuição de zinco entre os tecidos, favorecendo sua retenção no organismo e reduzindo seu *turnover* e o de proteínas zinco-dependentes. Tais efeitos parecem mais evidentes em mulheres com menos de 25 anos e em nulíparas. Portanto, o uso de ACH não implicaria em necessidade de suplementação de zinco, corroborando achado prévio¹¹.

As voluntárias do nosso estudo apresentaram ingestão marginal de cálcio e algumas características de composição dietética habitual que poderiam contribuir com o aumento do risco de osteoporose com o avanço da idade^{33,35}, assim como com os efeitos do uso de ACH no metabolismo ósseo¹⁷. Observamos menor atividade de fosfatase alcalina de origem óssea no plasma, da mesma forma que a atividade total dessa enzima, em mulheres +ACH comparadas às -ACH, sem alteração de indicadores de mobilização óssea (cálcio e hidroxiprolina urinários), o que sugere que o uso de ACH reduz o *turnover* ósseo, possivelmente por redução do componente de síntese, o que poderia prejudicar o alcance do pico de massa óssea e/ou a manutenção da massa óssea nas mulheres estudadas. No entanto, os possíveis efeitos na massa óssea somente poderiam ser confirmados através de medição direta da densidade mineral óssea, o que não avaliamos. Além disso, nossos resultados precisam ser analisados com cautela e considerando-se o conjunto de resultados do estudo.

O zinco urinário tem sido considerado como um indicador bioquímico adicional de alterações no metabolismo ósseo³⁵. A menor excreção urinária de zinco encontrada

nas mulheres +ACH parece refletir uma maior retenção de zinco pelos tecidos e também uma provável diminuição da mobilização óssea, como efeito do uso de ACH. As correlações encontradas entre as excreções urinárias de cálcio e hidroxiprolina e entre a atividade de fosfatase alcalina óssea em plasma com o zinco urinário parecem reforçar a relevância da utilização do zinco urinário como indicador de metabolismo ósseo. Considerando a excreção urinária de zinco como indicador de mobilização óssea, observamos que as +ACH apresentaram menores índices, tanto de síntese óssea (atividade de fosfatase alcalina em plasma) quanto de degradação óssea (zinco urinário), o que indicaria redução global de *turnover* ósseo sem afetar necessariamente a densidade óssea.

Os dados da literatura sobre o efeito de ACH no metabolismo e massa ósseas são, em parte, conflitantes. Parece que nas mulheres que já atingiram a maturidade óssea, o uso de ACH beneficia ou não afeta a manutenção de massa óssea, enquanto que nas mulheres mais jovens e também em adolescentes, esqueleticamente imaturas, o uso de ACH poderia prejudicar ou não ter efeitos sobre o alcance do pico de massa óssea^{15,20,21,36,37}. Polatti et al.³⁶ não verificaram, em mulheres de 19 a 22 anos de idade, efeito significativo do uso de ACH contendo estrógeno e progesterógeno em baixas doses na atividade de fosfatase alcalina no soro, na excreção urinária de hidroxiprolina, nem na densidade óssea; no entanto, somente em seu grupo de não usuárias de ACH houve aumento significativo da densidade óssea no período estudado, sugerindo que o uso de ACH previne o alcance do pico de massa óssea nessa faixa etária³⁶.

Quando nossas mulheres foram agrupadas pela idade, naquelas menores de 25 anos o uso de ACH aparentemente diminuiu o *turnover* ósseo, por redução do componente de reabsorção óssea (zinco urinário) sem afetar o componente de formação óssea (atividade de fosfatase alcalina óssea), o que poderia ser interpretado como uma resposta adaptativa no sentido de preservar a massa óssea num período em que ainda predomina a deposição óssea. No entanto, o alcance do pico de massa óssea nessas mulheres poderia ser, mesmo assim, prejudicado pelo uso de ACH, o que somente poderia ser confirmado com a medição direta de densidade óssea.

A paridade também parece afetar as respostas do metabolismo ósseo frente ao uso de ACH em mulheres adultas. Quando as voluntárias foram agrupadas pela paridade, apenas naquelas que nunca engravidaram (nulíparas) o uso de ACH se associou a menores níveis dos indicadores de *turnover* ósseo, tanto de síntese (atividade de fosfatase alcalina óssea) quanto de mobilização óssea (cálcio e zinco urinários), sugerindo preservação de massa óssea nessa situação. Já nas mulheres com relato de gravidez anterior, o uso de ACH associou-se com

maior reabsorção óssea, tal como indicado pela excreção urinária de cálcio. As implicações desses resultados em termos de manutenção de massa óssea necessitam de estudos específicos para esse fim. Considerando-se o conjunto de nossos resultados, sugere-se que o uso de ACH, em mulheres adultas jovens com ingestão subadequada de cálcio, reduz o *turnover* ósseo, podendo a utilização prolongada desses agentes prejudicar o alcance do pico de massa óssea e/ou a manutenção da massa óssea nas mulheres esqueleticamente imaturas, aumentando o risco de osteoporose na menopausa. No entanto, estudos mais conclusivos, incluindo medição direta da densidade óssea e que avaliem fatores como idade, paridade, características da dieta, período de uso e interrupção de uso prolongado de ACH em mulheres adultas jovens tornam-se necessários.

Em conclusão, mulheres adultas jovens com ingestão habitual de zinco acima do recomendado e com ingestão habitual marginal de cálcio, usuárias de ACH, comparadas a não usuárias com características semelhantes, apresentaram menores níveis séricos de zinco total e ligado à α_2 -macroglobulina e albumina, menor atividade de fosfatase alcalina em plasma, menor concentração de MT em eritrócitos e menor excreção urinária de zinco, sugerindo-se que o uso de contraceptivos hormonais orais de baixa dosagem modifica a distribuição de zinco entre os tecidos, favorece a retenção de zinco no organismo e reduz o seu *turnover* e o de proteínas zinco-dependentes. Quanto ao metabolismo ósseo, usuárias de ACH apresentaram menor atividade de fosfatase alcalina de origem óssea no plasma, a qual, associada à menor excreção urinária de zinco, sugere que o uso de ACH reduz o *turnover* ósseo, o que poderia prejudicar o alcance do pico de massa óssea e/ou a manutenção de massa óssea aumentando o risco de osteoporose. Os efeitos de ACH orais combinados de baixa dosagem nos indicadores de homeostase de zinco e de *turnover* ósseo foram mais evidentes nas mulheres com menos de 25 anos e nas nulíparas, as quais merecem especial atenção em estudos posteriores.

Agradecimentos

Aos colaboradores, Dra. Silvana do Couto Jacob, Dra. Kátia Christina Leandro e Jailey M. Gonçalves, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos, Rio de Janeiro (RJ), nas análises realizadas por espectrofotometria de absorção atômica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências

1. Margen S, King JC. Effect of oral contraceptive agents on the metabolism of some trace minerals. *Am J Clin Nutr.* 1975;28(4):392-402.
2. Vir SC, Love AH. Zinc and copper nutriture of women taking oral contraceptives agents. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(8):1479-83.
3. Liukko P, Erkkola R, Pakarinen P, Järnström S, Nantö V, Grönroos M. Trace elements during 2 years' oral contraception with low-estrogen preparations. *Gynecol Obstet Invest.* 1988;25(2):113-7.
4. Schenker JG, Hellerstein S, Jungreis E, Polishuk WZ. Serum copper and zinc levels in patients taking oral contraceptives. *Fertil Steril.* 1971;22(4):229-34.
5. Dorea JG, Ferraz E, Queiroz EF. [Effects of anovulatory steroids on serum levels of zinc and copper]. *Arch Latinam Nutr.* 1982;32(1):101-10. Portuguese.
6. Palmery M, Saraceno A, Vaiarelli A, Carlomagno G. Oral contraceptives and changes in nutritional requirements. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(13):1804-13.
7. Fallah S, Sani FV, Firoozrai M. Effect of contraceptive pill on the selenium and zinc status of healthy subjects. *Contraception.* 2009;80(1):40-3.
8. King JC. Do women using oral contraceptive agents require extra zinc? *J Nutr.* 1987;117(1):217-9.
9. Borja-Magno A, Mujica-Coopman, MF, Pizarro FA, Olivares MG. [Iron, copper and zinc status in relation with the hormonal contraceptive method]. *Rev Chil Nutr.* 2014;41(3):297-303. Spanish.
10. Hinks LJ, Clayton BE, Lloyd RS. Zinc and copper concentrations in leucocytes and erythrocytes in healthy adults and effect of oral contraceptives. *J Clin Pathol.* 1983;36(9):1016-21.
11. Kamp F, Rodrigues TS, Donangelo CM. Effect of oral contraceptive use and zinc supplementation on zinc, iron and copper biochemical indices in young women. *Eur E J Clin Nutr Metab.* 2011;6(6):e253-e258.
12. Gonzalez-Iglesias H, Alvarez L, García M, Petrash C, Sanz-Medel A, Coca-Prados M. Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle. *Metallomics.* 2014;6(2):201-8.
13. Kowalska K, Bizón A, Zalewska M, Milnerowicz H. The influence of biological and environmental factors on metallothionein concentration in the blood. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;29:99-103.
14. Herrmann M, Seibel MJ. The effects of hormonal contraceptives on bone turnover markers and bone health. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72(5):571-83.
15. Elgán C, Samsioe G, Dykes AK. Influence of smoking and oral contraceptives on bone mineral density and bone remodeling in young women: a 2-year study. *Contraception.* 2003;67(6):439-47.
16. Martins SL, Curtis KM, Glasier AF. Combined hormonal contraception and bone health: a systematic review. *Contraception.* 2006;73(5):445-69.
17. Nappi C, Bifulco G, Tommaselli GA, Gargano V, Di Carlo C. Hormonal contraception and bone metabolism: a systematic review. *Contraception.* 2012;86(6):606-21.
18. Sarfati J, de Vernejoul MC. Impact of combined and progestogen-only contraceptives on bone mineral density. *Joint Bone Spine.* 2009;76(2):134-8.
19. Wei S, Winzenberg T, Laslett LL, Venn A, Jones G. Oral contraceptive use and bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2011;9(1):6-11.
20. Register TC, Jayo MJ, Jerome CP. Oral contraceptive treatment inhibits the normal acquisition of bone mineral in skeletally immature young adult female monkeys. *Osteoporos Int.* 1997;7(4):348-53.
21. Gambacciani M, Cappagli B, Lazzarini V, Ciapponi M, Fruzzetti F, Genazzani AR. Longitudinal evaluation of perimenopausal bone loss: effects of different low dose oral contraceptive preparations on bone mineral density. *Maturitas.* 2006;54(2):176-80.
22. Loureiro S, Dias I, Sales D, Alessi I, Simão R, Fermino RC. Effect of different phases of the menstrual cycle on the performance of muscular strength in 10RM. *Rev Bras Med Esporte.* 2011;17(1):22-5.
23. Jacob SW, Francone CA, Lossow WJ. Sistema reprodutor. In: Jacob SW, Francone CA, Lossow WJ, editores. *Anatomia e fisiologia humana.* 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990. p. 498-527.
24. Vargas Zapata CL, Simões TM, Donangelo CM. Erythrocyte metallothionein in relation to other biochemical zinc indices in pregnant and nonpregnant women. *Biol Trace Elem Res.* 1997;57(2):115-24.
25. Maia PA, Figueiredo RC, Anastácio AS, Silveira CL, Donangelo CM. Zinc and copper metabolism in pregnancy and lactation of adolescent women. *Nutrition.* 2007;23(3):248-53.
26. Caulfield LE, Donangelo CM, Chen P, Junco J, Meriardi M, Zavaleta N. Red blood cell metallothionein as an indicator of zinc status during pregnancy. *Nutrition.* 2008;24(11-12):1081-7.
27. Gindler EM, King JD. Rapid colorimetric determination of calcium in biological fluids with methylthymol blue. *Am J Clin Pathol.* 1972;58(4):376-82.
28. Gordeladze JO, Halse J, Djøseland O, Haughen HN. A simple procedure for the determination of hydroxyproline in urine and bone. *Biochem Med.* 1978;20(1):23-30.
29. Lima LM, Oliveira MR, Gomes AP, Siqueira-Batista R, Fontes GG. In: Calixto-Lima L, Reis NT, organizadoras. *Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica.* Rio de Janeiro: Rubio; 2012. p. 2-15.
30. World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO Consultation. WHO Obesity Technical Report Series, 284. Geneva: WHO; 2000.
31. Padovani RM, Amaya-Farfán J, Colugnati FA, Domene SM. [Dietary reference intakes: application of tables in nutritional studies]. *Rev Nutr.* 2006;19(6):741-60. Portuguese.
32. Hess FM, King JC, Margen S. Effect of low intake and oral contraceptive agents on nitrogen utilization and clinical findings in young women. *J Nutr.* 1977;107(12):2219-27.
33. Morais GQ, Burgos MG. [Nutrients impact on bone health: new trends]. *Rev Bras Ortop.* 2007;42(7):189-94. Portuguese.
34. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(3 Suppl):584S-592S.
35. Ribeiro-Alves MA, Trugo LC, Donangelo CM. Use of oral contraceptives blunts the calciuric effect of caffeine in young adult women. *J Nutr.* 2003;133(2):393-8.
36. Polatti F, Perotti F, Filippa N, Gallina D, Nappi RE. Bone mass and long-term monophasic oral contraceptive treatment in young women. *Contraception.* 1995;51(4):221-4.
37. Gai L, Jia Y, Zhang M, Gai P, Wang S, Shi H, et al. Effect of two kinds of different combined oral contraceptives use on bone mineral density in adolescent women. *Contraception.* 2012;86(4):332-6.