

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA
E DO ADOLESCENTE

HOMERO RABELO PENA

NÍVEIS MATERNOS E NEONATAIS DE VITAMINA D:
INTERFERÊNCIA DA PRÉ-ECLÂMPsia E DA OBESIDADE
GESTACIONAL

RECIFE
2014

HOMERO RABELO PENA

NÍVEIS MATERNOS E NEONATAIS DE VITAMINA D:
INTERFERÊNCIA DA PRÉ-ECLÂMPsia E DA OBESIDADE
GESTACIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Criança e
do Adolescente do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do título de
Mestre em Saúde da Criança e do
Adolescente

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Giselia Alves Pontes da Silva

Recife
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

P397n Pena, Homero Rabelo.
 Níveis maternos e neonatais de vitamina D: interferência da pré-eclâmpsia e da obesidade gestacional / Homero Rabelo Pena. – Recife: O autor, 2014.
 94 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

 Orientadora: Giselia Alves Pontes da Silva.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, 2014.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Deficiência de vitamina D. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Obesidade. 4. Gravidez. 5. Recém-nascido. I. Silva, Giselia Alves Pontes da (Orientadora). II. Título.

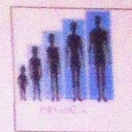
618.92

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-052)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE



Título:

Níveis maternos e neonatais de vitamina D: interferência da
pré-eclâmpsia e da obesidade gestacional.

Nome:

Homero Rabelo Pena

Dissertação aprovada em: 13 de fevereiro de 2014

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira (Membro interno - UFPE).
Presidente

Profª. Drª. Kátia Galeão Brandt (Membro externo - UFPE)

Profª. Drª. Virgínia Resende Silva Weffort (Membro externo - UFTM)

Recife
2014

A Deus, regente da minha vida, alicerce em todos os momentos, de alegria e de dor;

Aos meus pais, Mauro e Vera, pelo amor incondicional que sempre me deram, e a todos que compõem a minha Verdadeira Família, Ana Paula, Janaína e Arthur, por compreenderem as minhas ausências, as quais não foram poucas nesses dois anos; amo todos vocês;

A minha querida avó Beatriz, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo Dr. José Henrique Moura e à Prof.^a Dr.^a Cláudia Marina, por terem sido os primeiros a me estimular a realizar o mestrado;

À Prof.^a Dr.^a Kátia Brandt e à Prof.^a Dr.^a Roseli Sarni, pela semente plantada em 2011, ainda em São Paulo, sobre o tema da minha dissertação;

À Prof.^a Dr.^a Rosemary Amorim e à Prof.^a Dr.^a Sophie Eickmann, que, quando ainda meio perdido quanto à confecção do anteprojeto, souberam me direcionar;

Minha eterna gratidão à Prof.^a Dr.^a Giselia Alves Pontes da Silva, por ter sido orientadora dessa dissertação; não apenas por ter me ensinado a ser Mestre, e as etapas de um estudo científico, mas pelo amadurecimento que alcancei nesses dois anos; meu muito obrigado por ter “mantido o freio de mão acionado”, por me fazer perceber os “limites do possível”, e pela postura crítica que passei a ter em relação aos textos científicos. Hoje entendo a razão de me ter feito analisar tantas vezes os resultados encontrados! No entanto, o meu agradecimento e a minha admiração vão mais além: por sua imensa paciência e disponibilidade, e pela capacidade de me acalmar nos momentos de grande ansiedade, com palavras firmes, mas sempre suaves. Obrigado até por me fazer gostar do sabor e aroma do café. Sim, pois depois de tantas reuniões nos cafés da cidade!

E meu muito obrigado à Prof.^a Dr.^a Giselia Alves, à Prof.^a Dr.^a Luciane Lima, ao Prof. Dr. Ricardo Ximenes e ao Prof. Dr. Pedro Israel, pelos seus ensinamentos nas enriquecedoras aulas de Metodologia da Pesquisa Científica, Metodologia e Didática do Ensino Superior, Bioestatística e Epidemiologia Analítica;

À Prof.^a Dr.^a Marília Lima, Coordenadora da Pós-Graduação em quase todo o período do mestrado, não apenas pelos ensinamentos sobre o programa EPI-INFO, mas pela sua generosidade, por sua solicitude e pelas soluções rápidas, claras e objetivas às minhas dúvidas de estatística;

À Prof.^a Dr.^a Margarida Antunes, pelas importantes sugestões dadas quando da qualificação do projeto;

Meus sinceros agradecimentos às gestantes e recém-nascidos que participaram desse estudo; o consentimento de vocês permitiu a construção do conhecimento hoje apresentado nessa dissertação;

A todos os médicos(as), enfermeiros(as) e técnicos(as) de enfermagem da Triagem Obstétrica, Sala de Parto e Puerpério do Hospital Barão de Lucena (HBL), pela compreensão e pelos esforços doados; sem a ajuda de vocês, não chegaria a nenhum resultado;

À minha amiga, chefe da Pediatria do HBL, Dr.^a Valéria Bezerra, pelas palavras positivas, encorajando-me sempre, e por todo o apoio dado para que pudesse cumprir minha carga horária na Pós-Graduação e no HBL;

À Prof.^a Dr.^a Vera Magalhães e ao Dr. Sérgio Magalhães, e a todos os funcionários do Laboratório Marcelo Magalhães, sempre prestativos na execução das dosagens da vitamina D;

À amiga Ana Maria de Lima Barros, gerente do Laboratório de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do HBL, por todo o esforço doado para a concretização desse trabalho; saudades dos 4 meses em que nos víamos diariamente! Minha gratidão se estende também a todos os funcionários do Laboratório do HBL, em especial à Sr.^a Bete, à Sr.^a Marisa, ao Sr. Rogério e à Sr.^a Valéria. Até na tradicional “marchinha” de carnaval do Laboratório ganhei espaço:

*“...Dr. Homero com sua pesquisa
Sempre com amor e satisfação
Virou o paladino da justiça e da união
Defende o Laboratório com toda garra e opinião!...”*

Ao Prof. Dr. Artur Almeida de Ataíde, revisor da dissertação;

À Sr.^a Inês, do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, um dos maiores exemplos de servidora pública que já tive o prazer de conhecer;

A todas as mestrandas da 27^o turma do Mestrado da POSCA, em especial a Jackeline Diniz e Manuela Torres, novas amigas conquistadas nesses dois anos;

A Janaína, Juliene e Paulo, funcionários da secretaria da pós-graduação, sempre prestativos;

A todos aqueles que foram fundamentais nessa caminhada e que não citei; meu muito obrigado e perdão pelo esquecimento;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por fomentar essa pesquisa.

Novos paradigmas sucedem-se, muitas
vezes, em meio a polêmicas acirradas e
irreconciliáveis

Pedro Demo

RESUMO

É alta a prevalência de deficiência de vitamina D entre as gestantes e recém-nascidos (RN) em várias regiões do mundo, em especial na presença de pré-eclâmpsia (PE) ou obesidade (OB). O objetivo deste estudo foi identificar se a presença de PE, com ou sem OB, determina um pior *status* da 25(OH)D, principal forma circulante da vitamina D, no binômio mãe-filho, bem como se há correlação entre os níveis maternos e neonatais dessa vitamina. Realizou-se um estudo de corte transversal, envolvendo 179 gestantes com idade gestacional ≥ 34 semanas, em uma maternidade do Recife, de modo a preencher quatro grupos: PE⁺/OB⁻; PE⁺/OB⁺; PE⁻/OB⁺; PE⁻/OB⁻. Sangue periférico das gestantes e do cordão umbilical dos RN foi colhido para a dosagem da 25(OH)D, realizada por quimioluminescência (LIAISON[®]). A presença de PE determinou uma menor mediana de 25(OH)D no binômio mãe-filho ($p < 0,01$), bem como uma maior deficiência dessa vitamina entre as gestantes ($p < 0,01$) e os seus RN ($p = 0,06$) em relação aos grupos sem PE. A obesidade na gestação conferiu uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D entre as gestantes e os RN, mas esta não foi estatisticamente significativa. Grávidas e neonatos do grupo PE⁺/OB⁺ não apresentaram um pior *status* de vitamina D em relação ao grupo PE⁺/OB⁻. A 25(OH)D dos RN apresentou-se fortemente correlacionada com a das mães ($p = 0,01$), porém, essa correlação foi menor na ocorrência de obesidade materna. Concluímos que gestantes com PE apresentaram uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D, bem como seus neonatos; a presença de obesidade, no entanto, não influenciou de forma significativa. Gestantes obesas transferiram menos 25(OH)D para seus RN.

Palavras-chave: Vitamina D. Deficiência de vitamina D. Pré-eclâmpsia. Obesidade. Gravidez. Recém-nascido.

ABSTRACT

Vitamin D deficiency is highly prevalent amongst pregnant women and newborn infants (NB) in various regions of the world, especially in the presence of pre-eclampsia (PE) or obesity (OB). The aim of this study was to identify whether the presence of PE, with or without OB, determines a poor 25(OH)D status, the major circulating form of vitamin D, in the mother-infant dyad, as well as in the correlation between maternal and neonatal levels of this vitamin. We conducted a cross-sectional study involving 179 pregnant women with a gestational age \geq 34 weeks, at a maternity hospital in Recife, in order to form four separate groups: PE⁺/OB⁻; PE⁺/OB⁺; PE⁻/OB⁺; PE⁻/OB⁻. Peripheral blood from pregnant women and the umbilical cords of newborns was collected to measure the 25(OH)D, analysed by chemiluminescence (LIAISON[®]). The presence of PE determined a lower median level of 25(OH)D in the mother-infant dyad ($p < 0,01$), and a greater deficiency of this vitamin among pregnant women ($p < 0,01$) and their newborn infants ($p = 0,06$) compared with groups without PE. Obesity during pregnancy conferred a greater frequency of 25(OH)D deficiency amongst pregnant women and their newborn infants, but was not statistically significant. Pregnant women and newborns in the PE⁺/OB⁺ group not presented a poorer vitamin D status in relation to the PE⁺/OB⁻ group. The 25(OH)D of NBs was strongly correlated with that of the mothers ($p = 0,01$), however, this correlation was lower in the incidence of maternal obesity. We conclude that women with PE, together with their neonates, presented a higher frequency of 25(OH)D deficiency. However, the presence of obesity was not a significant influence. Obese pregnant women transferred less 25(OH)D to their NBs.

Keywords: Vitamin D. Vitamin D deficiency. Pre-eclampsia. Obesity. Pregnancy. Newborn.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Revisão da literatura

Figura 1 – Modelo proposto para a explicação da gênese da pré-eclâmpsia.....	27
--	----

Métodos

Figura 2 – Organograma do fluxo e da distribuição dos participantes da pesquisa em seus quatro grupos.....	35
--	----

Resultados (artigo original)

Tabela 1 – Características maternas e neonatais expressas em percentual (%), mediana (Md) e intervalo interquartílico, ou em média (\bar{X}) e desvio-padrão.....	55
Tabela 2 – Distribuição do <i>status</i> da vitamina D entre as gestantes e os recém-nascidos.....	56
Figura 1 – Medianas e intervalos interquartílicos da 25(OH)D entre as gestantes (A) e os recém-nascidos (B).....	57
Figura 2 – Correlações entre os níveis maternos e neonatais de 25(OH)D.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D	1,25-dihidroxivitamina D/ Calcitriol
25(OH)D	25-hidroxivitamina D/ Calcidiol
AIG	Adequado para Idade Gestacional
DBP	Proteína Ligadora da Vitamina D
DP	Desvio-Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA	Estados Unidos da América
GIG	Grande para Idade Gestacional
HIF-1-alfa	Fator Indutor de Hipóxia alfa
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G
IFN- γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IMC	Índice de Massa Corpórea
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos - 1
OB	Obesidade
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C Reativa
PE	Pré-Eclâmpsia
PIG	Pequeno para Idade Gestacional
PTH	Paratormônio
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i>
RN	Recém-Nascidos
sFLT-1	Antagonista do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular 1

Síndrome HELLP Acrônimo que reúne as primeiras letras de
Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th-1	Linfócitos Th-1
Th-2	Linfócitos Th-2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Células T Reguladoras
UVB	Radiação Ultravioleta B
VCM	Volume Corpuscular Médio
VDR	Receptor de Vitamina D
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	Introdução.....	20
2.2	Metabolismo da vitamina D.....	21
2.3	Suficiência em vitamina D: como definir?.....	22
2.4	Gestação normal e importância da vitamina D.....	23
2.5	Ações imunológicas da vitamina D na interface materno-fetal.....	24
2.6	Papel da vitamina D na gênese da pré-eclâmpsia.....	26
2.7	Obesidade na gravidez e vitamina D	29
2.8	Repercussões agudas e a longo prazo dos baixos níveis de vitamina D perinatal no processo saúde-doença.....	31
2.9	Considerações finais.....	32
3	MÉTODOS.....	33
3.1	Local do estudo.....	34
3.2	Desenho e sujeitos do estudo.....	34
3.3	Variáveis do estudo.....	36
3.4	Operacionalização do estudo.....	37
3.5	Cálculo amostral e análise estatística.....	38
3.6	Aspectos éticos.....	39
3.7	Problemas metodológicos.....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Artigo original: “Níveis maternos e neonatais de vitamina D: interferência da pré-eclâmpsia e da obesidade gestacional”	43
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICES.....	73
	Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	74
	Apêndice B – Instrumento de Coleta de Dados: Formulário.....	77
	ANEXOS.....	81
	Anexo A – Parecer do Comitê de Ética.....	82

Anexo B – Avaliação do Estado Nutricional da Gestante de acordo com o Manual do Ministério da Saúde	85
Anexo C – Normas de publicação do <i>European Journal of Nutrition</i>	86

1 APRESENTAÇÃO

1 APRESENTAÇÃO

Há décadas sabe-se da importância da vitamina D na regulação do metabolismo ósseo em todos os estágios da vida humana. Contudo, observa-se nos últimos anos uma mudança de paradigma em relação ao entendimento das funções da vitamina D. Destaca-se a sua participação na resposta imunológica (HEWISON, 2012), incluindo-se a imunossupressão sobre processos inflamatórios na unidade fetoplacentária (LIU et al., 2011).

A influência dessa vitamina sobre a gestação é de tal ordem que pesquisas recentes têm associado baixos níveis da vitamina D com distúrbios inflamatórios próprios da gravidez, como a pré-eclâmpsia (PE) (SHIN et al., 2010; BAKER et al., 2010; BODNAR et al., 2007a).

Um dos fatores de risco para a PE é a existência de comorbidades inflamatórias, como a obesidade pré-gravídica (TROGSTAD et al., 2011; SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005). Tem sido descrito que o aumento do Índice de Massa Corpórea (IMC) correlaciona-se negativamente com a 25(OH)D sérica, que é a principal forma circulante da vitamina D (YOUNG et al., 2009; SANEI; SALEHI-ABARGOUEI; ESMAILZADEH, 2013). Acredita-se que em função da solubilidade dessa vitamina em gordura, o tecido adiposo é capaz de sequestrar parte da 25(OH)D circulante nos indivíduos obesos (YOUNG et al., 2009).

Daí, é possível especular que a ocorrência simultânea de PE e obesidade tenha um maior impacto nos níveis séricos da 25(OH)D das gestantes.

Como a vitamina D no recém-nascido é dependente do *status* da mãe, situações que levem à deficiência de 25(OH)D na gestação podem cursar com inadequação dessa vitamina também no neonato (DROR; ALLEN, 2010). Pesquisadores demonstram preocupação com a possibilidade de os baixos níveis de vitamina D no período perinatal estarem relacionados com o desenvolvimento de doenças futuras, como asma, diabetes tipo 1, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares (KALUDJEROVIC; VIETH, 2010).

Com base nessas premissas, e persuadido da importância das funções não clássicas da vitamina D, mas consciente da complexidade do conhecimento científico que envolve este tema, dos seus limites e, obviamente, dos limites inerentes a uma dissertação de mestrado, resolvi investigar se a PE ou a obesidade gestacional, isoladas ou em conjunto, determinam uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D nas gestantes e nos seus neonatos. Inserido na área de concentração Abordagens Quantitativas em Saúde, e na linha de pesquisa Epidemiologia dos Distúrbios da Nutrição Materna, da Criança e do Adolescente, do

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Pernambuco, desenvolvi o projeto de pesquisa intitulado “Níveis neonatais de vitamina D: interferência da obesidade pré-gestacional e da pré-eclâmpsia”, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Giselia Alves Pontes da Silva. Submetido ao Edital Universal do CNPq, foi aprovado e financiado (número do processo: 473147/2012-2).

Ao identificar grupos com maior frequência de deficiência/ insuficiência de 25(OH)D em nosso meio, espero despertar o interesse de outros pesquisadores, bem como sensibilizar os clínicos, em especial os obstetras e pediatras, a direcionarem melhor sua triagem em relação à avaliação do *status* da vitamina D em seus pacientes.

Partindo da hipótese de que a PE e/ou a obesidade gestacional determinam uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D no binômio mãe-filho, os objetivos dessa dissertação foram: 1. Investigar se grávidas com pré-eclâmpsia, com e sem obesidade, bem como seus recém-nascidos, apresentam uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D em relação às gestantes sem pré-eclâmpsia, com e sem obesidade; e 2. Avaliar a correlação entre os níveis maternos e neonatais da 25(OH)D.

A dissertação é apresentada na forma de um capítulo de revisão da literatura, um capítulo de métodos, um artigo original, e as considerações finais. O artigo original será submetido ao periódico *European Journal of Nutrition*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Introdução

A vitamina D foi identificada no início do século passado e reconhecida como importante elemento na prevenção e no tratamento do raquitismo. Sua participação vital no metabolismo ósseo foi, por décadas, a sua única função conhecida no organismo (CHRISTAKOS et al., 2010). No entanto, sua forma ativa, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, vem assumindo uma importância biológica e clínica cada vez maior, muito em função da já referida mudança de paradigma, sendo hoje considerada um hormônio esteroide, capaz de agir em um receptor específico (VDR), encontrado em pelo menos 36 tipos diferentes de células (NORMAN, 2008).

Estudos recentes mostram um papel significativo da vitamina D na regulação do sistema imunológico (ação imunomoduladora) (JEFFERY et al., 2009; SHIN et al., 2010), e sua deficiência está sendo associada a doenças inflamatórias, como por exemplo, a pré-eclâmpsia (BODNAR et al., 2007a; BAKER et al., 2010).

Outra condição, a obesidade, representa um importante fator de risco para a deficiência de vitamina D, explicado em parte pelo sequestro dessa vitamina lipossolúvel pelo próprio tecido adiposo (YOUNG et al., 2009). Caracterizada por um *status* pró-inflamatório sistêmico, a obesidade, além de aumentar a chance de ocorrência da pré-eclâmpsia (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005), guarda com esta entidade clínica outra semelhança: uma forte associação com baixos níveis de vitamina D (BODNAR et al., 2007b). A presença isolada ou conjunta dessas duas desordens poderá resultar na deficiência de vitamina D tanto nas gestantes quanto em seus RN, visto que os fetos são dependentes do *status* materno (DROR; ALLEN, 2010).

Assim, esta revisão tem por objetivo analisar o metabolismo e o papel da vitamina D no curso de uma gravidez normal, bem como relatar as evidências científicas que mostram que a PE e a obesidade estão associadas a baixos níveis de vitamina D nas gestantes e os malefícios a curto e a longo prazo para seus filhos.

2.2 Metabolismo da vitamina D

A vitamina D é um “complexo” formado por dois componentes: ergocalciferol (D2) e colecalciferol (D3), sendo o primeiro obtido a partir de alimentos vegetais, e o segundo, a partir de alimentos de origem animal, ou através de produção endógena (ANDERSON; MAY; MORRIS, 2003; MURGUÍA-PENICHE, 2013). Na pele, a vitamina D3 é sintetizada a partir de um precursor, a 7-deidrocolesterol, desde que haja a exposição aos raios ultravioleta (UVB), numa variação de onda entre 280 e 315 nm (NORVAL; BJORN; GRUIJL, 2010). Situações como a poluição das grandes cidades, estação do ano (inverno), horário do dia (antes das 10:00 e após às 15:00), elevada latitude, pigmentação mais escura da pele, protetor/bloqueador solar, são determinantes para uma menor produção de colecalciferol (HOLICK; HOSSEIN-NEZHAD, 2013).

Após sua síntese, o colecalciferol liga-se a uma proteína (α -2 globulina) que a transporta até o fígado. Essa proteína, chamada de proteína transportadora de vitamina D (DBP), não sofre alteração mediante um processo inflamatório, sendo considerada um reagente neutro da fase aguda, diferente de outras proteínas como a albumina e a ferritina (GUHA et al., 1995). Atualmente já se conhecem alguns polimorfismos genéticos na DBP, os quais são responsáveis por uma maior ou menor capacidade de transporte da vitamina D nos indivíduos (LAURIDSEN et al., 2005; CHUN, 2012).

No fígado, tanto a vitamina D3 quanto a vitamina D2 sofrem a primeira hidroxilação, sendo convertidas em 25-hidroxivitamina D ou calcidiol [25(OH)D], que é a principal forma circulante da vitamina D, com uma meia-vida de 2 a 3 semanas (TSIARAS; WEINSTOCK, 2011). Nos túbulos proximais dos rins, ocorre uma segunda hidroxilação, convertendo-se o calcidiol em 1,25-dihidroxivitamina D ou calcitriol [1,25(OH)₂D], que é a forma biologicamente ativa deste hormônio (CHRISTAKOS et al., 2013). A responsável por essa conversão é a 1- α -hidroxilase renal. Porém, os rins não são os únicos locais em que esta enzima se faz presente, já sendo encontrada em pelo menos outros nove órgãos, como a placenta (NORMAN, 2008).

Classicamente, a 1,25(OH)₂D mantém os níveis séricos de cálcio adequados no organismo, seja permitindo a absorção deste íon na luz intestinal ou pela reabsorção nos túbulos distais dos rins, atuando assim como um regulador endócrino da homeostase óssea (PREMAOR; FURLANETTO, 2006). Estudos mostram que a forma D3 é mais eficaz para tal função (NORMAN, 2008).

2.3 Suficiência em vitamina D: como definir?

Ainda hoje não há um consenso na comunidade científica sobre os pontos de corte que definam o *status* da vitamina D. Sabe-se que há uma relação inversa entre 25(OH)D e o paratormônio (PTH), e que níveis de calcidiol menores que 30-32 ng/mL são capazes de promover hiperparatireoidismo secundário. Assim, valores acima desses podem ser empregados para definição de suficiência de vitamina D (VIETH; LADAK; WALFISH, 2003).

Heaney et al. (2003), *apud* Wagner e Hollis (2010), demonstraram melhor absorção do cálcio intestinal quando os níveis circulantes de 25(OH)D eram maiores que 32ng/mL, em comparação àqueles indivíduos com valores inferiores a 20 ng/mL. Para Bischoff-Ferrari et al. (2004), *apud* Wagner e Hollis (2010), são necessários valores de 25(OH)D acima de 32 ng/mL para maximizar a integridade do esqueleto.

Em 2011, um grupo de pesquisadores lançou uma diretriz (*Endocrine Society Clinical Practice Guidelines*) que foi de encontro às definições do Instituto de Medicina dos EUA (IOM), de 2010. Para a Sociedade de Endocrinologia Norte-Americana, define-se a deficiência em vitamina D por valores abaixo de 20 ng/mL, e a suficiência, por valores maiores ou iguais a 30 ng/mL (HOLICK et al., 2011). Para o IOM, níveis acima de 20 ng/mL são suficientes para otimizar a densidade óssea (HEWISON, 2012).

Contudo, estas diretrizes não distinguiram os pontos de corte da vitamina D nas diversas etapas do ciclo da vida, além de terem sido baseadas em argumentações diferentes: aquela que defende níveis acima de 30 ng/mL levou em consideração as funções clássicas e não clássicas da vitamina D, enquanto aquela que apoia valores de suficiência acima de 20 ng/ml fundamentou-se apenas na ação sobre o metabolismo ósseo (HEWISON, 2012).

Para a Sociedade Americana de Endocrinologia Pediátrica (MISRA et al., 2008) e para o Comitê de Nutrição do ESPGHAN (BRAEGGER et al., 2013), níveis de 25(OH)D maiores ou iguais a 20 ng/mL em crianças são adequados. Para estes departamentos, ainda são insuficientes as evidências atuais acerca de outros benefícios à saúde que a vitamina D possa acarretar, além dos relacionados ao metabolismo ósseo.

Percebe-se, então, que ainda permanecerão, talvez por muito tempo, dúvidas quanto ao melhor ponto de corte para definir valores normais da vitamina D, e somente estudos futuros, com elevado rigor metodológico e com um grande número de participantes, poderão chegar a uma conclusão.

Além disso, deve-se ter um olhar mais criterioso em relação à análise de um único biomarcador, haja vista que a 25(OH)D representa um marcador de exposição, ou seja, de fornecimento da vitamina D aos tecidos, e não necessariamente será o melhor marcador de função, ou seja, aquele que melhor fornece informações sobre a resposta biológica ou sobre o risco de doenças (PRENTICE et al., 2008). Porém, o calcidiol continua sendo o mais empregado entre os pesquisadores e médico clínicos, e, assim, aguardam-se estudos sobre a viabilidade de outros metabólitos da vitamina D, como a fração livre de 25(OH)D (não ligada à DBP), que talvez seja um biomarcador que melhor reflita a função da vitamina D no organismo (PRENTICE et al., 2008).

2.4 Gestação normal e importância da vitamina D

A gestação é caracterizada, desde seu início, por importantes modificações na fisiologia materna, entre elas, alterações hormonais como o aumento significativo da gonadotrofina coriônica humana, da progesterona e dos estrógenos. Além disso, a gravidez normal é marcada por um leve *status* de inflamação sistêmica, podendo-se observar leucocitose e marcadores da fase aguda, presentes desde o primeiro trimestre (BORZYCHOWSKI; SARGENT; REDMAN, 2006; BASU et al., 2011).

No entanto, para que ocorra o reconhecimento materno da unidade fetoplacentária, é necessário, entre outros fatores, um desvio local na produção de citocinas pró-inflamatórias para aquelas da linhagem Th2, predominando, com isso, IL-10 e IL-4 sobre IL-2 e TNF- α , o que torna o ambiente menos inflamatório e mais propício para a correta implantação do trofoblasto (HENNESSY et al., 1999; DROR; ALLEN, 2010). Em especial, a IL-10 (anti-inflamatória) parece funcionar como um fator essencial para uma gravidez bem sucedida (THAXTON; SHARMA, 2010; KALKUNTE et al., 2011). Vencida essa primeira etapa, a interface materno-fetal (endométrio-trofoblasto) será altamente eficiente, exercendo seu papel primordial, que é o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o feto, e, ao mesmo tempo, sendo incapaz de gerar injúrias locais ou sistêmicas para a mãe (HOUSER, 2012).

É necessário também que outras mudanças importantes ocorram na gestação, como aquelas relacionadas ao metabolismo da vitamina D, a fim de se garantir a transferência de cerca de 25 a 30 gramas de cálcio das mães para o adequado crescimento do esqueleto fetal (DROR; ALLEN, 2010). Para tanto, as gestantes necessitarão ampliar em duas ou mais vezes

as concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, com o objetivo de maximizar a absorção do cálcio no intestino (LEWIS et al., 2010; SPECKER, 2012). Além disso, o trofoblasto humano, como tantos outros tecidos, expressa em suas células o receptor de vitamina D, necessário para que o calcitriol possa agir (SHIN et al., 2010).

Na gravidez, a $25(\text{OH})\text{D}$ materna atravessa facilmente a placenta, o que não ocorre com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, de tal sorte que as concentrações da $25(\text{OH})\text{D}$ no sangue do cordão do feto variam de 68 a 108% dos níveis maternos (EVANS et al., 2004 *apud* DROR; ALLEN, 2010). No entanto, a presença da $1-\alpha$ -hidroxilase na placenta e nos rins fetais é capaz de converter a forma inativa da vitamina D, recebida da circulação materna, em seu metabólito ativo, suprimindo a falta de passagem transplacentária da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (KALUDJEROVIC; VIETH, 2010).

O transporte da $25(\text{OH})\text{D}$ pela placenta ainda é mal compreendido. Da década de 1980 (GERTNER et al., 1980) até o início deste século (LAPILLONNE, 2010), acredita-se que ocorra difusão da vitamina D através da placenta, sendo aceita, em parte, a teoria do “hormônio livre”, em que a fração livre dessa vitamina alcançaria o interior das células. No entanto, outros mecanismos de transporte através da placenta podem estar envolvidos, como a endocitose promovida pelos receptores megalina-cubilina, conforme já descrito nas células dos túbulos renais (SHIN et al., 2010).

O calcitriol deve exercer outras funções importantes no começo da gravidez, além da formação do esqueleto fetal, tendo em vista a abundância da enzima $1-\alpha$ -hidroxilase na decídua no primeiro trimestre, sendo sua concentração oito vezes mais alta em relação ao terceiro trimestre de gestação (CHRISTAKOS et al., 2010). Entre tais funções, a participação no sistema imunológico materno parece ter considerável importância, conforme será descrito abaixo.

2.5 Ações imunológicas da vitamina D na interface materno-fetal

Uma variedade de células do sistema imunológico, entre elas, macrófagos, células dendríticas e células T, expressam o receptor intracelular da vitamina D, e todas estas estão presentes na placenta (JEFFERY et al., 2009).

Há mais de trinta anos sabe-se que a placenta converte a $25(\text{OH})\text{D}$ em $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, a qual pode agir de forma autócrina (na placenta) ou parácrina (em células próximas). A

expressão do gene CYP27B1 na decídua humana, responsável pela produção da 1- α -hidroxilase, é um dos fatores determinantes para que se eleve a síntese da 1,25(OH) $_2$ D na placenta (LEWIS et al., 2010). Estudos em ratos que apresentavam desregulação desse gene mostraram aumento das citocinas IL-4, IL-15, IL-18 e IFN γ , provocando uma inflamação generalizada na placenta (LIU et al., 2011).

Jeffery et al. (2009) observaram, *in vitro*, que a forma ativa da vitamina D reduz os níveis de citocinas Th1 (pró-inflamatórias) e aumenta os níveis da IL-10 (ação anti-inflamatória). Há também relatos da participação da vitamina D na inibição da IL-17, a qual atua ativamente em processos inflamatórios e doenças autoimunes (CHRISTAKOS, 2013).

Sabe-se que o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ , IL-6 e TNF- α é prejudicial para a gravidez, seja por levar a uma menor tolerância materna à implantação do trofoblasto, rico em antígenos paternos, seja por estarem envolvidas na gênese de doenças inflamatórias próprias da gestação, como a pré-eclâmpsia (DÍAZ et al., 2009). Estes autores, em um estudo *in vitro*, observaram que a introdução de calcitriol em culturas de trofoblastos foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α .

Amplas revisões analisando a participação da vitamina D no sistema imunológico têm sido feitas pela comunidade científica. Marques et al. (2010), Shin et al. (2010), Hewison (2012), Christakos et al. (2013), entre outros, descreveram a participação dessa vitamina tanto no sistema imunológico inato (estimulando-o) quanto no adaptativo (regulando-o). Em relação a este último, a vitamina D é capaz de inibir citocinas da linhagem Th-1 e promover aquelas da linhagem Th-2, além de estimular quantitativamente e qualitativamente as células T reguladoras (Treg), que suprimem o sistema imunológico (ação imunomoduladora). Porém, todos concluem que muitos estudos *in vivo* necessitam serem feitos para um melhor entendimento dos verdadeiros efeitos do calcitriol sobre esse sistema.

Por outro lado, ganha cada vez mais destaque o papel da IL-10 na interface materno-fetal. Esta participa efetivamente como mediadora do crescimento placentário e do processo de remodelação (papel na angiogênese), inibidora da atividade inflamatória (ação anti-inflamatória), quer por suprimir a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Th-1), quer na indução do HLA-G em trofoblastos (THAXTON; SHARMA, 2010). O HLA-G é um integrante do complexo de histocompatibilidade humana, e desempenha um papel regulador no controle da ativação das células Natural Killer (NK), que têm uma ação de citotoxicidade (ALVES et al., 2007).

Assim, a vitamina D, como promotora da síntese da IL-10, através da estimulação dos linfócitos Th-2, além de reguladora de genes envolvidos na implantação do trofoblasto, como

o Homeobox A10 (HOXA10), pode exercer uma função importante para uma gravidez de êxito (HOLICK; HOSSEIN-NEZHAD, 2013).

2.6 Papel da vitamina D na gênese da pré-eclâmpsia

Podendo ocorrer em 2 a 7% das gestações, principalmente em primigestas, a pré-eclâmpsia é caracterizada pela presença de hipertensão (pressão sistólica ≥ 140 e/ou diastólica ≥ 90 mmHg) após a vigésima semana de gestação, associada a proteinúria (acima de 300 mg em 24 h ou ao menos 1 + em duas amostras de urina) (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005). Formas graves podem evoluir com hemólise, alteração de enzimas hepáticas e plaquetopenia (síndrome HELLP). Segundo Victora et al. (2011), esta entidade representa a principal causa de mortalidade materna no Brasil, respondendo por 23% do total desses óbitos.

A pré-eclâmpsia é uma doença multicausal (BORZYCHOWSKI; SARGENT; REDMAN, 2006; PENNINGTON et al., 2012), e, provavelmente, muitos insultos iniciais devem convergir para a ocorrência desta desordem. O que parece estar bem definido é o incompleto remodelamento vascular uteroplacentário, que pode ocorrer após uma implantação superficial do trofoblasto no endométrio, por provável falha da resposta imunológica materna em tolerar o “enxerto” fetal. Em decorrência desse ambiente hipoxêmico leve, porém persistente, uma resposta inflamatória local e, posteriormente, sistêmica se estabelecerá, ocasionando uma importante disfunção endotelial na segunda metade da gravidez (REDMAN, 2011; TROGSTAD et al., 2011).

Fatores antiangiogênicos, como sFLT-1 (antagonista do fator de crescimento do endotélio vascular) e a endogлина solúvel, podem estar presentes em níveis circulantes mais abundantes em algumas pacientes com pré-eclâmpsia, assim como o fator indutor de hipóxia (HIF-1-alfa), em detrimento de uma maior concentração do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular). O desequilíbrio dessas substâncias poderá também justificar o pobre remodelamento das artérias espiraladas do útero, e a consequente redução da perfusão para a placenta. O estresse que será ocasionado pela hipóxia subsequente levará à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6, e à diminuição de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005; PENNINGTON et al., 2012).

Quaisquer fatores que aumentem a resposta inflamatória materna, tais como as doenças infecciosas (por exemplo, a doença periodontal), as autoimunes e a própria obesidade, podem predispor as gestantes à pré-eclâmpsia (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005).

A Figura 1 apresenta, de forma sintetizada, um modelo da fisiopatologia da pré-eclâmpsia, envolvendo os mecanismos mencionados acima, além de fatores de risco já bem estabelecidos na literatura.

Considerando-se as funções não clássicas da vitamina D, como a ação moduladora sobre o sistema imunológico, capaz de minimizar a síntese de citocinas pró-inflamatórias, e a possível regulação de processos angiogênicos através do aumento da transcrição do gene responsável pelo VEGF (BODNAR; SIMHAN, 2010), especula-se que níveis adequados desse nutriente no início da gestação sejam capazes de tornar o ambiente uterino mais propício à aceitação do trofoblasto, permitindo sua correta implantação no endométrio. Por outro lado, a deficiência/ insuficiência de calcitriol nos estágios iniciais da gestação pode se constituir em um dos pilares envolvidos na complexa fisiopatologia da pré-eclâmpsia, doença esta inserida entre aquelas de caráter inflamatório.



Figura 1 – Modelo proposto para a explicação da gênese da pré-eclâmpsia (baseado em Pennington et al., 2012). PE= pré-eclâmpsia; HIF-1 ALFA= fator indutor de hipóxia alfa; sFLT-1= receptor do fator de crescimento placentário; DM= diabetes melito; DCV= doença cardiovascular

Corroborando o que foi dito, vários pesquisadores encontraram uma relação inversa entre os níveis de 25(OH)D e a ocorrência de pré-eclâmpsia. Em um estudo caso-controle,

envolvendo 241 gestantes, Baker et al. (2010) encontraram que as concentrações de calcidiol na primeira metade da gravidez foram significativamente menores (aproximadamente 23% mais baixas) naquelas mulheres que desenvolveram pré-eclâmpsia no final da gravidez. Níveis inferiores a 20 ng/mL tiveram, inclusive, maior associação com a gravidade da pré-eclâmpsia.

Bodnar et al. (2007a) também realizaram um estudo caso-controle, com uma amostra representada por 55 casos de pré-eclâmpsia e 219 controles saudáveis, e observaram desfecho semelhante: as concentrações de 25(OH)D no começo da gravidez eram menores naquelas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia (média de 18,2 ng/mL), comparadas ao controle (média de 21,2 ng/mL), sendo estatisticamente significantes. Também houve diferença importante entre os valores encontrados nos recém-nascidos, sendo bem menores naqueles nascidos de mães com pré-eclâmpsia.

Robinson et al. (2010) encontraram menores percentuais de suficiência em 25(OH)D (>32 ng/mL), bem como os maiores de deficiência (<20 ng/mL), entre as gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia em comparação ao grupo controle, sendo estas diferenças estatisticamente significantes. Após a análise de regressão múltipla, observaram que um aumento de 10 ng/mL na 25(OH)D materna reduzia em 63% a chance de se desenvolver pré-eclâmpsia grave.

Em duas revisões, realizadas em 2010 e 2013, os autores concluíram que baixos níveis de vitamina D representam um fator de risco para a ocorrência de pré-eclâmpsia (BODNAR; SIMHAN, 2010; AGHAJAFARI et al., 2013). Por outro lado, Nassar et al. (2011) chamam atenção para o fato de que as evidências empíricas ainda são insuficientes para se afirmar que a deficiência de 25(OH)D no primeiro trimestre da gestação está associada a resultados adversos na gestação, como a pré-eclâmpsia. Recentemente, em um estudo com 1873 gestantes árabes, aquelas com níveis de vitamina D abaixo de 30 ng/mL apresentaram um maior risco de desenvolverem pré-eclâmpsia, com um *odds ratio* de 1.75 (IC 95% 1.16-2.58, $p=0,01$) (BENER; AL-HAMAM; SALEH, 2013).

Percebe-se a necessidade de mais estudos, com um número expressivo de gestantes, a fim de que se chegue a um consenso sobre a real participação da vitamina D na gênese da pré-eclâmpsia.

2.7 Obesidade na gravidez e vitamina D

No mundo, a incidência de obesidade materna aumentou drasticamente nas últimas décadas. No Reino Unido, pelo menos uma entre cinco grávidas está obesa no início da gravidez (ROBERTS et al., 2011). Nos Estados Unidos, 54% das mulheres em idade fértil (20-39 anos) estão obesas ou com sobrepeso (WALSH, 2007). No Brasil, essa situação não é diferente. Dados do Programa de Orçamentos Familiares (POF 2008/2009) do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) mostraram que 48% das mulheres acima de 20 anos, em idade, portanto, reprodutiva, estão com excesso de peso, e que 16,9% estão obesas.

A ocorrência de obesidade na gravidez está relacionada a uma desregulação metabólica, e ocasiona um aumento do risco de pré-eclâmpsia e/ou diabetes gestacional, além de interferir negativamente na programação metabólica do feto, favorecendo tanto a restrição de crescimento intrauterino quanto o excesso de peso ao longo da vida (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005; HEERWAGEN et al., 2010; BASU et al., 2011; ANDERSON et al., 2012). Bodnar et al. (2005) observaram que, comparado ao de mulheres com um IMC de 21, o risco de pré-eclâmpsia dobrava com um IMC de 26, e triplicava quando o IMC era de 30.

A obesidade não é uma doença única, mas um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas (KOPELMAN, 2000). Mulheres grávidas obesas desenvolvem o que atualmente se denomina “inflamação metabólica”, caracterizada por resistência insulínica e resposta inflamatória sistêmica e placentária de baixo grau (BASU et al., 2011).

O *status* inflamatório da grávida obesa é marcado, entre outros aspectos, por um acúmulo de macrófagos na placenta, cerca de 2 a 3 vezes maior quando comparado com gestantes não obesas (CHALLIER et al., 2008). Roberts et al. (2011) encontraram uma expressão significativamente maior dos genes de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e MCP-1) na placenta de gestantes obesas.

Um achado frequente em relação à obesidade é o encontro de uma relação inversa entre o IMC e os níveis de vitamina D. Segundo alguns pesquisadores, o que acontece é uma diminuição da biodisponibilidade da 25(OH)D circulante, pelo fato de o tecido adiposo sequestrá-la, haja vista a solubilidade dessa vitamina em gordura (WORTSMAN et al., 2000; YOUNG et al., 2009; EARTHMAN et al., 2012).

Wortsman et al. (2000) dosaram o colecalciferol 24 h após a exposição à radiação UVB em indivíduos magros e obesos, e observaram que o aumento sérico da 25(OH)D foi 57%

inferior nos obesos em relação aos não-obesos. Bellia et al. (2013) encontraram níveis de 25(OH)D no soro de indivíduos obesos, inversamente associados a marcadores inflamatórios, como PCR, IL-6 e TNF- α .

Independentemente de como ocorra essa redução dos níveis da vitamina D entre os indivíduos obesos, uma vez havendo-a, estes podem desenvolver um hiperparatireoidismo secundário, o que faz aumentar os níveis da 1,25(OH)₂D através da ação do PTH sobre os rins, e, com isso, um *feedback* negativo levará a uma diminuição na síntese hepática da 25(OH)D, baixando ainda mais seus níveis séricos (SCHUCH; GARCIA; MARTINI, 2009).

Bodnar et al. (2007b) observaram, num estudo de coorte, diferenças significativas nos níveis de 25(OH)D, tanto no início da gravidez quanto no final, entre grávidas obesas e não-obesas, sendo um IMC alto associado a uma maior chance de deficiência de vitamina D. Jami et al. (2013) não encontraram diferenças significativas entre os níveis de vitamina D das gestantes, de acordo com a estratificação do IMC pré-gravídico, porém, no sangue de cordão, a 25(OH)D foi maior em recém-nascidos de mães com peso normal ($p=0,02$). Assim, mulheres obesas transferem menos 25(OH)D para a prole em relação àquelas com um IMC abaixo de 25. Os autores não conseguiram explicar o porquê desses achados, porém, concluem que mulheres obesas necessitam de uma suplementação de vitamina D maior, para proporcionar a seus fetos níveis suficientes dessa mesma vitamina.

Em outro estudo envolvendo mulheres em idade reprodutiva, os pesquisadores encontraram níveis significativamente mais baixos de vitamina D entre as mulheres obesas, porém, altas concentrações da DBP (KARISSON et al., 2013). Transpondo-se esses achados para as gestantes obesas, pode-se levantar a possibilidade de que, apesar de os níveis de DBP estarem mais elevados, a DBP transporte menos 25(OH)D, talvez pelo sequestro da vitamina D no tecido adiposo, e, conseqüentemente, ao chegar à placenta, “entregaria” ela uma menor quantidade de vitamina D, ocorrendo, assim, uma menor transferência para o feto.

Enfim, percebe-se que a obesidade e a pré-eclâmpsia guardam algumas semelhanças, entre as quais, o fato de serem caracterizadas por um *status* inflamatório e por uma maior chance de níveis inadequados de vitamina D. Talvez, a associação dessas duas situações clínicas possa resultar em um importante fator de risco para a deficiência da 25(OH)D nas gestantes e em seus neonatos.

2.8 Repercussões agudas e a longo prazo dos baixos níveis de vitamina D perinatal no processo saúde-doença

Sabe-se que a concentração da 25(OH)D fetal é totalmente dependente da transferência transplacentária, e que baixas concentrações nas gestantes repercutirão negativamente nos níveis fetais (DROR; ALLEN, 2010). Deficiência de vitamina D no período intrauterino pode se correlacionar de forma inversa com a restrição de crescimento fetal (BODNAR; SIMHAN, 2010), além de levar a osteopenia, craniotabes, hipocalcemia e tetania (BASILE et al., 2007).

O *status* da vitamina D materna pode influenciar o conteúdo mineral ósseo dos recém-nascidos ao longo dos primeiros meses de vida (SHAW; MUGHAL, 2013). Os baixos níveis dessa vitamina promovem aumento da reabsorção óssea, que, em última instância, poderá culminar com o raquitismo.

Além disso, emergem cada vez mais estudos sobre a interferência da deficiência da 25(OH)D no período perinatal como um dos fatores de risco de muitas doenças no decorrer da vida, como diabetes tipo 1, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla e câncer de mama, próstata e cólon (KALUDJEROVIC; VIETH, 2010; MARSHALL; MEHTA; PETROVA, 2012; PRINCIPI et al., 2013). Isso porque a deficiência dessa vitamina parece alterar a expressão de genes específicos, agindo negativamente na programação metabólica de forma precoce, ou seja, na vida fetal e no primeiro ano de vida.

Camargo et al. (2011) demonstraram que os níveis da 25(OH)D no cordão umbilical tiveram associação inversa com o risco de infecção respiratória aos três meses de idade, e com a sibilância aos 15, 36 e 60 meses de vida. Igualmente, Mohamed e Al-Shehri (2013) observaram maior associação de infecções respiratórias (bronquiolite e pneumonia), nos primeiros dois anos de vida, com baixos níveis de vitamina D ao nascimento.

Em função do exposto, garantir adequados níveis de vitamina D na gestação, além de ser essencial para o metabolismo ósseo do feto e do recém-nascido, pode representar uma medida preventiva contra doenças em fases precoces ou tardias da vida, porém, mais estudos necessitam ser feitos para confirmarem ou não essas associações.

2.9 Considerações finais

A forma ativa da vitamina D parece exercer papéis que vão além do metabolismo ósseo. Sua deficiência, apesar de os pontos de corte serem ainda motivo de discussão, é uma realidade no século atual, e sérios problemas relacionados à saúde podem estar associados a essa carência nutricional.

Obesidade e pré-eclâmpsia compartilham muitas características entre si, como alto estresse oxidativo, excesso de marcadores inflamatórios e, segundo grande número de publicações, níveis mais baixos de vitamina D. Dessa forma, independentemente das questões de causalidade, o fenótipo grávida obesa com pré-eclâmpsia parece representar um importante fator de risco para a deficiência/ insuficiência de vitamina D, tanto para as gestantes quanto para seus fetos.

Mais pesquisas devem ser realizadas para verificar tais associações, inclusive em países com alta incidência de radiação UVB como o nosso, pois, do ponto de vista da saúde pública, seria de grande valor identificar grupos que estejam em maior risco de hipovitaminose D, a fim de que ações pontuais possam ser tomadas e, com isso, a suplementação dessa vitamina não ocorra de forma arbitrária e para todas as gestantes. Talvez, com isso, a deficiência de vitamina D deixe de ser rotulada como um “modismo” deste início de século, e seja enfrentada como uma verdadeira e importante carência nutricional, com potenciais riscos à saúde dos indivíduos, principalmente nos recém-nascidos.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Local do estudo

As gestantes foram recrutadas no período de novembro de 2012 a março de 2013, na Maternidade do Hospital Barão de Lucena (HBL), referência em gestações de alto risco do Sistema Único de Saúde (SUS), no Estado de Pernambuco, Brasil. Essa maternidade apresenta uma média de 250 partos mensais, porém, parte desses acabam sendo de baixo risco, por livre demanda, da população que reside no entorno do Hospital. Assim, não foi necessário escolher uma maternidade de baixo risco para alcançarmos nossa meta amostral.

3.2 Desenho e sujeitos do estudo

Foi realizado um estudo observacional, de corte transversal, com o objetivo de comparar os níveis de vitamina D em gestantes e em seus recém-nascidos. As gestantes ingressaram na pesquisa de acordo com a demanda da Maternidade, de modo a preencher quatro grupos:

1. PE⁺/ OB⁻ (gestantes com PE não obesas);
2. PE⁺/ OB⁺ (gestantes com PE e obesas);
3. PE⁻/ OB⁺ (gestantes sem PE e obesas);
4. PE⁻/ OB⁻ (gestantes sem PE não obesas).

A presença de **pré-eclâmpsia** foi definida de acordo com os critérios do Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia (ACOG, 2002): pressão sistólica \geq 140 mmHg e/ou pressão diastólica \geq 90 mmHg, diagnosticada somente após a vigésima semana de gestação em mulheres sabidamente normotensas, e associada à proteinúria (excreção de 300 mg ou mais de proteína em urina de 24 h, ou presença de $\geq 1+$ de proteína em amostra simples de urina).

Para definirmos **obesidade gestacional** utilizamos o IMC da primeira consulta do pré-natal, e, a partir deste, classificamos o estado nutricional da gestante conforme descrito no Manual Técnico do Pré-Natal e Puerpério do Ministério da Saúde do Brasil (2006).

Como critérios de inclusão, todas as gestantes deveriam ter idade superior a 16 e inferior a 40 anos, e deveria se tratar de gestação única, com no mínimo 34 semanas completas de idade gestacional, além de a primeira consulta no pré-natal dever ter ocorrido antes da 16ª semana.

Os critérios de exclusão compreenderam a existência de hipertensão antes da 20ª semana de gestação, e/ou história prévia de hipertensão arterial crônica; comorbidades cardíacas, hepáticas, renais; doenças autoimunes; diabetes melito ou gestacional; uso de medicações anticonvulsivas, como fenobarbital, fenitoína ou carbamazepina; e doença infecciosa febril atual, ou ter feito antibioticoterapia no último mês. Também eram inelegíveis recém-nascidos (RN) com graves malformações (cardíacas, renais ou hepáticas) ou síndromes genéticas diagnosticadas ainda no pré-natal, ou antes da alta hospitalar.

Ao término, 179 binômios mãe-RN estavam aptos a participarem da pesquisa. O fluxograma abaixo (Figura 2) apresenta o número de gestantes recrutadas inicialmente, o número daquelas posteriormente excluídas, e a distribuição final em cada grupo.

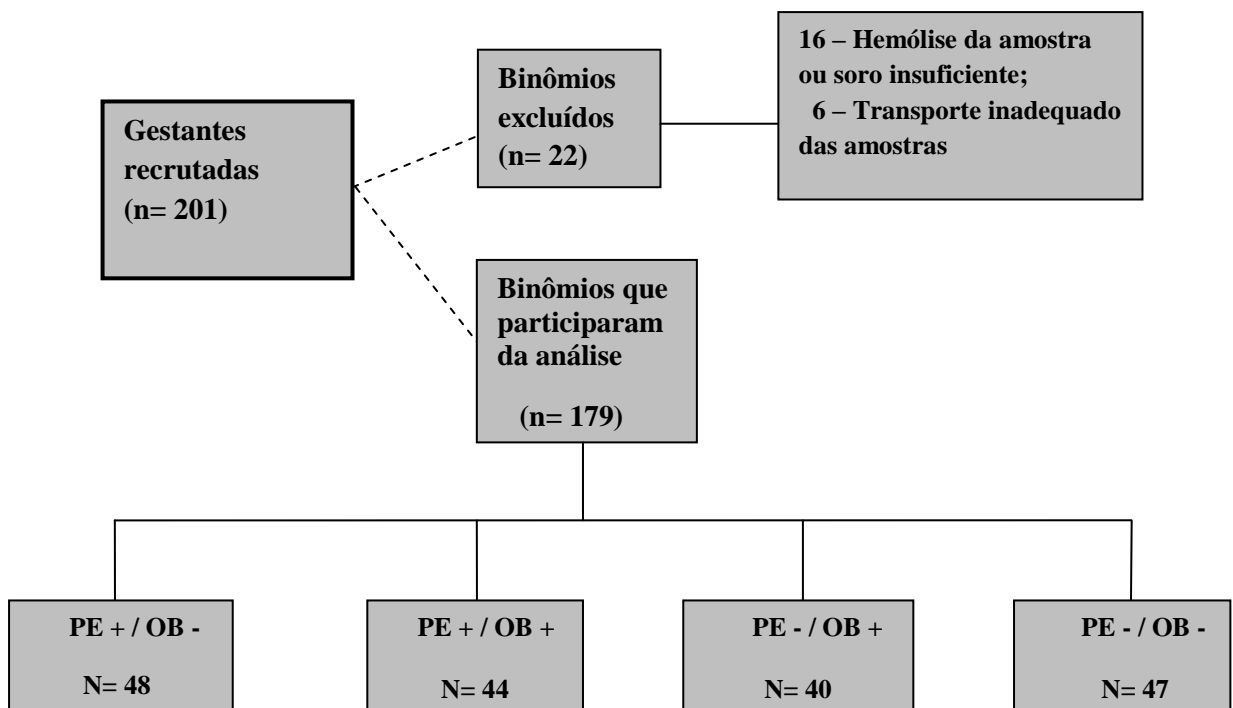


Figura 2 – Organograma do fluxo e da distribuição dos participantes da pesquisa em seus quatro grupos. PE= pré-eclâmpsia; OB= obesidade

3.3 Variáveis do estudo

A amostra foi caracterizada através das seguintes variáveis: a) variáveis maternas: idade materna, idade gestacional no momento do parto, paridade, cor da pele, rendimento *per capita*, escolaridade, uso de polivitamínicos que continham vitamina D na gestação, tempo médio de exposição ao sol e uso de protetor solar; e b) variáveis dos recém-nascidos: peso, comprimento, e classificação segundo a adequação do peso à idade gestacional (PIG, AIG, GIG).

Em seguida, a definição e a categorização das variáveis:

- Idade materna – em anos, devendo obrigatoriamente estar compreendida entre 16 e 40 anos;
- Idade gestacional – para a idade gestacional foi priorizada a data da última menstruação (DUM) ou, na ausência desta ou na existência de dúvidas, a ultrassonografia do primeiro trimestre;
- Paridade – se primigesta (no curso da primeira gestação) ou múltipara (2 ou mais gestações);
- Cor da pele – a definição da cor da pele foi aquela autodeclarada pelas gestantes; caso houvesse dúvidas por parte das gestantes, eram fornecidas as cinco opções categorizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), conforme o censo demográfico de 2010: branca, preta, amarela, parda ou indígena;
- Rendimento *per capita* – a soma do total ganho no último mês, incluindo o valor da bolsa-família, caso recebida, total esse dividido pelo número de pessoas que residissem com a gestante;
- Escolaridade materna – categorizada em: analfabeta; ensino fundamental incompleto (menos de oito anos); fundamental completo (até oito anos); ensino médio (entre nove e onze anos); e nível superior (\geq doze anos);
- Polivitamínicos com vitamina D – o uso regular de polivitamínicos contendo vitamina D (pelo menos 4x na semana) no último mês; registraram-se o nome comercial e a posologia;
- Tempo de exposição ao sol – questionaram-se todas as atividades, realizadas pela gestante no último mês da gravidez, que a fizessem se expor de forma pelo menos parcial aos raios solares, ou seja, com vestiário que deixasse no mínimo cabeça e

membros expostos (MEREWOOD et al., 2010); esse tempo poderia ser aquele que a gestante usava para chegar ao trabalho, levar o filho à escola ou à creche, lavar e estender roupa, ou desempenhar quaisquer outras atividades domésticas ou de lazer; só consideramos positivas as respostas em que o horário da exposição estivesse compreendido entre as 6 h e as 16 h. Calculou-se uma média semanal e, após, uma diária, que foi empregada na análise dos dados;

- Protetor solar – uso de protetor solar nas áreas expostas, com regularidade de aplicação (a cada 2 horas, se fosse pertinente àquele momento), na maioria das vezes em que se houvesse exposto ao sol, no último mês da gestação;
- Peso do RN – em gramas, logo após o nascimento, utilizando-se uma balança digital da marca Welmy[®];
- Comprimento – em centímetros, logo após o nascimento, realizado com o RN deitado, utilizando-se uma régua antropométrica horizontal, graduada em centímetros e milímetros, com uma haste fixa e um cursor que desliza sobre a escala milimetrada, de marca Caumaq[®];
- Adequação do RN – utilizando-se da curva de Lubchenco.

O *status* da vitamina D das gestantes e dos RN foram aqueles sugeridos por Holick e Hossein-Nezhad (2013):

- Suficiência: $\geq 30,0$ ng/mL
- Insuficiência: 20,0-29,9 ng/mL
- Deficiência: $< 20,0$ ng/mL

3.4 Operacionalização do estudo

Durante uma semana, todas as equipes de obstetras e neonatologistas do Hospital Barão de Lucena receberam orientações sobre a pesquisa, sendo esclarecidas as dúvidas sobre a seleção das gestantes, assim como sobre o procedimento de coleta da 25(OH)D. Diariamente, eram realizadas visitas à Emergência Obstétrica e ao Pré-parto do Centro Obstétrico do HBL, com o objetivo de identificar, a partir do Cartão do Pré-natal ou do prontuário, as gestantes que preenchiam os critérios de inclusão do estudo. No momento do recrutamento era

explicado o objetivo da pesquisa, e aquelas que decidissem participar assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Em seguida, 5 mL de sangue periférico eram coletados das gestantes, antes do parto, e 1 mL era coletado do sangue do cordão umbilical de seus neonatos, imediatamente após o clampeamento, para a realização da dosagem da vitamina D no soro. Essas amostras eram colhidas em tubo com ativador de coágulo e gel separador Vacuette[®], e enviadas de imediato ao laboratório do próprio Hospital, sendo centrifugadas durante 4 minutos a 3000 rpm e, em seguida, refrigeradas em temperatura mantida entre 2-8° C, até serem transportadas ao laboratório terceirizado que realizaria a dosagem da vitamina D. Um termômetro digital (Incoterm[®]) fixado ao congelador sempre registrava a temperatura atual e a variação entre a mínima e a máxima, e, desta forma, uma vez que valores abaixo de 2°C ou acima de 8°C fossem registrados, aquelas amostras eram desprezadas e os pacientes excluídos posteriormente da pesquisa. O transporte do soro ao laboratório terceirizado era feito em recipiente térmico, com um termômetro digital da mesma marca, e procedia-se da mesma forma como relatado acima, caso houvesse oscilações de temperatura fora da faixa permitida. Também foram descartadas amostras que sofreram hemólise.

A dosagem da vitamina D foi realizada através do ensaio comercial LIAISON[®] 25OH Vitamin D Total (310600), da DiaSorin Inc. (EUA), que utiliza a técnica de quimioluminescência. Este ensaio determina tanto a 25(OH)D₂ quanto a 25(OH)D₃ no plasma ou soro, com intervalo de medição entre 4,0 e 150,0 ng/mL. Seguiram-se rigorosamente as orientações do fabricante (LIAISON[®]), desde a coleta até a mensuração da vitamina D.

No pós-parto, um mesmo pesquisador aplicava um formulário às gestantes (Apêndice B), para registro de informações socioeconômicas e demográficas, e aferir as medidas antropométricas dos RN (peso e comprimento).

3.5 Cálculo amostral e análise estatística

O tamanho total da amostra foi estimado a partir dos dois grupos que julgávamos ter a maior e a menor frequência de deficiência de vitamina D, ou seja, PE⁺/OB⁺ e PE⁻/OB⁻, respectivamente. Pela ausência de dados nacionais sobre os níveis de vitamina D entre gestantes, estimamos uma frequência máxima de deficiência de vitamina D no grupo PE⁻/OB⁻ de 20%, e, para o grupo PE⁺/OB⁺, utilizamos os dados do estudo de Robson et al. (2010),

segundo o qual 54% das gestantes com PE, com uma mediana do IMC de 34 kg/m², estavam deficientes em 25(OH)D. Consideramos um erro- α de 5% e um poder de 80%. Utilizando a calculadora Statcalc do programa estatístico EPI-INFO versão 6.04, encontramos um número mínimo de 36 pacientes por grupo. No entanto, ao término da coleta, o número de participantes em cada grupo variou entre 40 e 48, totalizando 179 pares mãe-RN para a análise.

O mesmo programa estatístico foi utilizado para a análise dos resultados. Procedeu-se a uma entrada dupla dos dados a partir do comando *validate*. As variáveis quantitativas foram expressas por média e desvio-padrão quando de distribuição simétrica, ou mediana e quartis quando de distribuição assimétrica, enquanto as variáveis qualitativas o foram em proporções. As diferenças de frequência e a associação entre as variáveis qualitativas foram testadas pelo qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado. Utilizou-se a correlação linear de Pearson para testar duas variáveis quantitativas. Para se examinar a associação entre uma variável quantitativa simétrica ou assimétrica e uma variável qualitativa, empregou-se a ANOVA e o Kruskal-Wallis, respectivamente. O nível de significância empregado em todos os testes foi de 5%. O programa SPSS (Statistical Package for Social Science) foi utilizado apenas para analisar a significância das correlações.

3.6 Aspectos éticos

Este estudo seguiu os princípios da Declaração de Helsinque e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, com número do parecer 137.886 e CAAE 07742012.0.0000.5208 (Anexo A). Todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

As coletas de sangue na genitora foram realizadas por profissionais capacitados (enfermeiro(a)/ técnico(a) de enfermagem), e executadas de acordo com as normas de biossegurança e com o máximo de cuidado para não causar sofrimento desnecessário as participantes do estudo. Geralmente, a coleta era feita simultaneamente com os exames de rotina do internamento.

O sangue do cordão umbilical foi coletado pelo neonatologista que assistia ao recém-nascido em sala de parto, com o igual rigor descrito acima.

Como benefícios diretos, os resultados dos níveis da 25(OH)D eram comunicados às gestantes ainda na maternidade e escritos em folha específica, para que fossem mostrados na primeira consulta com o obstetra e com o pediatra. No caso de resultados que ficaram prontos após a alta, o pesquisador entrou em contato por meio de telefone com a genitora ou com o responsável, pedindo que fossem anotados os valores da vitamina D de ambos (mãe e filho) em folha específica, entregue durante o internamento na maternidade, a fim de que fossem mostrados na próxima consulta médica.

3.7 Problemas metodológicos

A falta de dados nacionais sobre a frequência de deficiência de vitamina D entre as gestantes foi um dos primeiros problemas enfrentados por nós. Isso dificultou o cálculo do tamanho amostral. O curto espaço de tempo e os custos da dosagem da 25(OH)D inviabilizaram a realização de um projeto piloto.

Por se tratar de um estudo de corte transversal, viés de seleção pode ter ocorrido. No entanto, conforme será apresentado no capítulo de resultados, a análise dos dados mostrou que, entre os quatro grupos do estudo, não ocorreram diferenças significativas em relação a importantes variáveis, como: idade gestacional, cor da pele, rendimento *per capita*, escolaridade e uso de suplementos vitamínicos. Viés de informação foi minimizado pelo fato de um único pesquisador ter entrevistado todas as gestantes. A dupla digitação dos dados no programa estatístico também diminuiu a chance de erros de informação.

A coleta da vitamina D de todos os participantes ocorreu no período de maior incidência de radiação UVB na região (entre novembro e março), reduzindo com isso uma importante interferência do meio ambiente sobre os níveis da 25(OH)D. Contudo, é importante considerar que qualquer biomarcador apresenta limitações, quer seja por fatores fisiológicos, quer pelas dificuldades metodológicas na sua mensuração (PRENTICE et al., 2008). Assim, apesar de a dosagem da 25(OH)D ser utilizada como um dos principais marcadores do estado nutricional da vitamina D, é pertinente ressaltar que situações fisiológicas ou patológicas, por si sós, podem alterar esse biomarcador, e, com isso, suas baixas concentrações podem não necessariamente refletir uma condição de causalidade linear.

O pequeno número de participantes de cada grupo não permitiu fazer uma análise multivariada, reduzindo o poder estatístico do estudo.

Outro importante problema, porém não exclusivo de nossa pesquisa, é a falta de consenso por parte da comunidade científica sobre qual o melhor valor que define suficiência/deficiência de vitamina D. De um lado, o Instituto de Medicina (IOM) reconhece unicamente os benefícios da 25(OH)D sobre o metabolismo ósseo, e, dessa forma, assumiu em 2010 níveis iguais ou superiores a 20 ng/mL como seguros para a saúde (HEWISON, 2012). Em contrapartida, a diretriz da *Endocrine Society*, publicada em 2011, composta, entre outros, por um dos maiores *experts* em vitamina D, o Dr. Holick, rejeitou a posição adotada pelo IOM (HOLICK et al., 2011). Primeiro, por haver evidências científicas de que 20 ng/mL podem não assegurar saúde óssea, sendo necessários valores de pelo menos 30 ng/mL para esse objetivo (HEANEY; HOLICK, 2011). Segundo, pelo fato de o IOM recomendar a mesma RDA (600UI/dia) de vitamina D para todos os indivíduos adultos, desconsiderando necessidades maiores em determinadas situações, como na gestação/ lactação e entre os obesos (HOLICK et al., 2011). Por fim, apesar de poucas pesquisas tipo Ensaios Clínicos Randomizados, não devem ser ignorados os inúmeros estudos existentes até o momento (ecológicos, coorte e caso-controle), que demonstram a associação de baixos níveis de 25(OH)D com um maior risco de câncer, doenças inflamatórias e infecciosas e afecções cardiovasculares (CHRISTAKOS et al., 2013; LICHTENSTEIN et al., 2013). Baseado nesses aspectos, escolhemos os critérios da Sociedade de Endocrinologia Norte-Americana para definirmos o *status* da vitamina D em gestantes e em RN.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Artigo original: “Níveis maternos e neonatais de vitamina D: interferência da pré-eclâmpsia e da obesidade gestacional”*

Resumo

Pressupostos Nos últimos anos, uma alta prevalência de deficiência de vitamina D entre gestantes e recém-nascidos (RN) tem sido observada em várias regiões do mundo, em especial na presença de pré-eclâmpsia (PE) ou obesidade (OB). O objetivo deste estudo foi identificar se PE, com ou sem OB, determina um pior *status* da 25(OH)D, principal forma circulante da vitamina D, no binômio mãe-filho, bem como se há correlação entre os níveis maternos e neonatais dessa vitamina.

Método Realizou-se um estudo de corte transversal, envolvendo 179 gestantes com idade gestacional ≥ 34 semanas, em uma maternidade de Recife, Brasil (9°S), de modo a preencher quatro grupos: PE⁺/OB⁻; PE⁺/OB⁺; PE⁻/OB⁺; PE⁻/OB⁻. Sangue periférico das gestantes e do cordão umbilical dos RN foi colhido para a dosagem da 25(OH)D, realizada por quimioluminescência (LIAISON[®]).

Resultados Deficiência de 25(OH)D foi observada em aproximadamente 50% das grávidas com PE. Os RN de mães com PE apresentaram menores medianas de 25(OH)D, em relação àqueles nascidos de mães sem PE ($p < 0.01$). A obesidade na gestação determinou uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D entre gestantes e RN, porém, não foi estatisticamente significativa. Grávidas e neonatos do grupo PE⁺/OB⁺ não apresentaram um pior *status* de vitamina D em relação ao grupo PE⁺/OB⁻. A 25(OH)D dos neonatos apresentou-se fortemente correlacionada com as das mães ($p = 0.01$). Essa correlação foi menor na ocorrência da obesidade.

Conclusões As gestantes com PE apresentaram uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D, bem como seus neonatos, no entanto, a presença de obesidade não influenciou de forma significativa. Gestantes obesas transferiram menos 25(OH)D para seus RN.

Palavras-chave: Vitamina D. Deficiência de vitamina D. Pré-eclâmpsia. Obesidade. Gravidez. Recém-nascido.

* Artigo de acordo com as normas do periódico *European Journal of Nutrition*

Abstract

Background In recent years, a high prevalence of vitamin D deficiency amongst pregnant women and newborn babies (NB) has been observed throughout several regions of the world, especially in the presence of pre-eclampsia (PE) or obesity (OB). The aim of this study was to identify whether PE, with or without OB, determines a poor 25(OH)D status, the major circulating form of vitamin D, in the mother-infant dyad, as well as the correlation between maternal and neonatal levels of this vitamin.

Methodology We conducted a cross-sectional study involving 179 pregnant women with a gestational age ≥ 34 weeks, at a maternity hospital in Recife, Brazil (9°S), in order to form four separate groups: PE⁺/OB⁻; PE⁺/OB⁺; PE⁻/OB⁺; PE⁻/OB⁻. Peripheral blood from pregnant women and the umbilical cord of newborn infants was collected to measure the 25(OH)D, analysed by chemiluminescence (LIAISON[®]).

Results A deficiency of 25(OH)D was observed in approximately 50% of pregnant women with PE. The newborn infants of mothers with PE presented the lowest median levels of 25(OH)D compared to those born to mothers without PE ($p < 0.01$). Obesity during pregnancy presented a greater frequency of 25(OH)D deficiency among pregnant women and newborns. However, this was not statistically significant. Pregnant women and newborns in the PE⁺/OB⁺ group not presented a poorer vitamin D status in relation to the PE⁺/OB⁻ group. The 25(OH)D of newborns was strongly correlated with the mothers' ($P=0.01$). This correlation was lower in the occurrence of obesity.

Conclusions Pregnant women with PE, together with their neonates, presented a higher frequency of 25(OH)D deficiency. However, the presence of obesity was not a significant influence. Obese pregnant women transferred less 25(OH)D to their newborn infants.

Keywords: Vitamin D. Vitamin D deficiency. Pre-eclampsia. Obesity. Pregnancy. Newborn.

Introdução

A deficiência de vitamina D na gravidez é observada com frequência [1, 2], e traz preocupações devido à sua associação com diversas condições mórbidas, tais como pré-eclâmpsia (PE), obesidade e diabetes gestacional, além das repercussões de médio e longo prazo nos recém-nascidos (RN) [1, 3, 4].

Classicamente é ressaltada a importância da vitamina D em relação ao metabolismo ósseo [5], porém, nos últimos anos, a sua forma ativa ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) vem assumindo um papel biológico e clínico cada vez maior [6]. Observa-se uma mudança de paradigma, de tal forma que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é vista hoje como um hormônio, agindo em receptores específicos, descritos em pelo menos 36 tipos diferentes de células [6].

Tem sido demonstrada a participação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na regulação do sistema imunológico (ação imunomoduladora) [7, 8], de maneira que a sua deficiência passou a ser considerada um fator de risco para doenças inflamatórias, como, por exemplo, a PE [8-11]. A obesidade pré-gestacional também está associada a uma maior chance de PE [12]. Por outro lado, pesquisas têm demonstrado uma relação inversa entre o IMC e o *status* da vitamina D [13-15]. Assim, a presença de baixos níveis dessa vitamina em gestantes obesas [16] pode contribuir na gênese da PE, que é complexa e multifatorial [17].

Como o *status* da vitamina D do feto é dependente dos níveis maternos [1, 18], quaisquer situações que determinem deficiência dessa vitamina na gestação implicam baixas concentrações no recém-nascido. Repercussões ósseas (craniotabes, menor conteúdo mineral ósseo e raquitismo) [19] e não ósseas (maior risco de infecções respiratórias, asma e diabetes tipo 1) [20] podem estar associadas à deficiência de vitamina D ao nascimento.

Assim, esta pesquisa tem por objetivo investigar se grávidas com pré-eclâmpsia, associada ou não a obesidade, bem como seus recém-nascidos, apresentam menores concentrações de $25(\text{OH})\text{D}$ em relação às gestantes sem pré-eclâmpsia, com e sem obesidade, além de verificar se há correlação entre os níveis maternos e neonatais dessa vitamina.

Sujeitos e métodos

Desenho e sujeitos do estudo

Realizou-se um estudo observacional, de corte transversal, no período de novembro de 2012 a março de 2013, na Maternidade do Hospital Barão de Lucena, na cidade do Recife (9° S), Brasil. Este estudo seguiu os princípios da Declaração de Helsinque, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (n° do parecer: 137.886). As gestantes ingressaram na pesquisa após assinatura do consentimento livre e esclarecido, e foram distribuídas em quatro grupos: grávidas com PE e sem obesidade (PE⁺/OB⁻); grávidas com PE e obesidade (PE⁺/OB⁺); grávidas sem PE e obesas (PE⁻/OB⁺); grávidas sem PE e não obesas (PE⁻/OB⁻).

Foram incluídas gestantes com idade compreendida entre 16 e 40 anos, no curso de uma gestação única e com idade gestacional mínima de 34 semanas, além de a sua primeira consulta no pré-natal ter ocorrido até a 16ª semana. Não foram admitidas aquelas com registro de hipertensão antes da 20ª semana de gestação, ou com história de hipertensão crônica; com diabetes melito ou gestacional; com doenças hepáticas ou renais; na vigência de infecção; ou em uso de medicações anticonvulsivas.

De um total de 201 binômios recrutados inicialmente, 22 foram excluídos por: hemólise ou material insuficiente (16); armazenamento ou transporte inadequado (6), de maneira que ao término da coleta, 179 pares mãe-RN estavam aptos a participarem da pesquisa.

Variáveis do estudo

A idade gestacional foi determinada pela data da última menstruação. A PE foi definida a partir dos critérios do Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG) [21]. A classificação de obesidade durante a gestação foi estabelecida de acordo com o Manual Técnico do Pré-natal e Puerpério do Ministério da Saúde do Brasil [22].

Para definir o *status* da vitamina D, utilizamos os pontos de corte propostos por Holick et al. [23] para adultos (gestantes), sendo os mesmos valores empregados para os RN [24]: ≥ 30 ng/mL como suficiente para a promoção de saúde (ações ósseas e não clássicas); deficiente quando abaixo de 20 ng/mL; e insuficiente se situado entre 20 e 29.9 ng/mL.

Um único pesquisador aplicou um formulário às gestantes no pós-parto, registrando informações socioeconômicas e demográficas e dados clínicos da gestação, além do tempo de exposição à luz solar, e a frequência de uso de protetor solar e de suplementos vitamínicos contendo vitamina D. Também foram anotados dados antropométricos dos RN (peso e comprimento).

Análise laboratorial

Foram coletadas amostras de sangue periférico das gestantes, bem como do cordão umbilical dos RN, em tubo com ativador de coágulo e gel separador Vacuette[®], amostras essas imediatamente centrifugadas e, em seguida, refrigeradas à temperatura de 2-8° C até a dosagem da vitamina D, que ocorria nas primeiras 72 horas após a coleta. Utilizou-se a técnica de quimioluminescência, através do ensaio comercial LIAISON 25OH Vitamin D Total (310600)[®], da DiaSorin Inc. (EUA), o qual apresenta um intervalo de medição entre 4.0 e 150.0 ng/mL.

Cálculo amostral e análise estatística

O tamanho da amostra foi determinado a partir da frequência de deficiência da vitamina D nos grupos PE^+/OB^+ e PE^-/OB^- . Pela ausência de dados nacionais, estimamos uma frequência de deficiência de vitamina D, no grupo PE^-/OB^- , de 20%, e, para o grupo PE^+/OB^+ , utilizamos os dados do estudo de Robson et al. [11], que foi de 54%. Considerando um erro- α de 5% e um poder de 80%, e a partir do programa estatístico EPI-INFO versão 6.04, encontramos um número mínimo de 36 pacientes por grupo. O mesmo programa foi utilizado para a análise dos resultados. As variáveis quantitativas de distribuição simétrica foram

expressas por média e desvio-padrão, enquanto aquelas de distribuição assimétrica foram apresentadas por mediana e quartis. As variáveis qualitativas foram expressas em proporções. As diferenças entre frequências e a associação entre as variáveis qualitativas foram testadas pelo qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado. Utilizou-se a correlação linear de Pearson para testar duas variáveis quantitativas. Para se examinar a associação entre uma variável quantitativa simétrica ou assimétrica e uma variável qualitativa, empregou-se a ANOVA e o Kruskal-Wallis, respectivamente. O nível de significância empregado em todos os testes foi de 5%. O programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) foi utilizado para analisar a significância das correlações.

Resultados

A análise de 179 binômios mãe-RN mostrou que 63% (58/92) das gestantes com PE era primigesta, em comparação àquelas sem PE (31%; 27/87), enquanto as grávidas não obesas eram mais jovens em relação às obesas, sendo essas diferenças estatisticamente significantes. Observou-se um maior percentual de RN PIG no grupo PE^+/OB^- , assim como uma maior frequência de GIG nos grupos de gestantes obesas (PE^+/OB^+ e PE^-/OB^+). Essas e outras características socioeconômicas e clínicas das gestantes e dos neonatos encontram-se na Tabela 1.

Encontramos um baixo percentual de suficiência em 25(OH)D entre todas as gestantes (12.3%; 22/179) e neonatos (44.7%; 80/179) do estudo. No entanto, as gestantes com PE, assim como seus RN, apresentaram uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D em relação àquelas sem PE. Observamos também uma maior frequência de deficiência de 25(OH)D no grupo PE^-/OB^+ , em relação ao grupo PE^-/OB^- , tanto nas gestantes como nos RN, porém estatisticamente não significante. O grupo PE^+/OB^+ não apresentou um pior *status* da vitamina D no binômio mãe-RN quando comparado ao grupo PE^+/OB^- (Tabela 2).

Grávidas e neonatos dos grupos com PE apresentaram uma menor mediana de vitamina D em comparação aos grupos sem PE. A mediana da 25(OH)D dos RN, em todos os grupos, foi cerca de 1/3 superior àquela das mães (Figura 1).

Na Figura 2 observa-se que, nos grupos de gestantes não obesas, ocorreu uma forte correlação positiva entre os níveis de 25(OH)D neonatais com os níveis maternos, enquanto

naqueles em que a obesidade esteve presente esta correlação também foi positiva, porém menor. Em todos os grupos, as correlações foram estatisticamente significantes ($p= 0.01$).

Entre os grupos de grávidas obesas, não encontramos diferenças significativas em relação ao IMC ($p= 0.91$). Um pequeno número de gestantes recebeu suplementação vitamínica durante a gestação, 17/179 (9.5%), e apenas 8.9% (16/179) fez uso de protetor solar. Não houve diferenças significativas do ponto de vista estatístico em relação ao *status* da vitamina D quando comparados os grupos que usaram polivitamínicos ou protetor solar e os grupos que não o fizeram. A cor da pele também não influenciou o *status* da vitamina D entre as gestantes ($p= 0.50$). As grávidas com deficiência de 25(OH)D se expuseram menos ao sol (Md= 20.0; Q1= 10.0, Q3= 40.0) em relação àquelas com suficiência (Md= 22.5; Q1= 15.0, Q3= 45.0), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0.67$).

Discussão

A pré-eclâmpsia esteve associada tanto a uma menor mediana quanto a uma maior frequência de deficiência de vitamina D nas gestantes e em seus recém-nascidos. Nossos resultados mostraram uma maior deficiência de vitamina D em presença da obesidade, embora sem significância estatística.

Entretanto, chamou nossa atenção o fato de a associação PE e OB não ter conferido um pior *status* da 25(OH)D em relação ao grupo PE^+/OB^- . Não encontramos na literatura revisada estudos que tenham testado os níveis séricos da 25(OH)D na presença desses dois distúrbios, dificultando-se, com isso, a comparação dos nossos achados. Deve-se considerar que, por tratar-se de um estudo observacional, viés de seleção possa ter ocorrido. A maioria das nossas pacientes obesas apresentava um IMC entre 30 e 35 (obesidade grau I), e, dessa forma, resultados diferentes poderiam ter sido encontrados se um percentual maior de obesas grau II e III compusesse o grupo PE^+/OB^+ . Além disso, o emprego do IMC como meio único para a definição da obesidade, sem que esteja associado a uma análise da composição corporal, pode ter levado à seleção de gestantes com um menor percentual de tecido adiposo, e, assim, um menor sequestro da 25(OH)D da circulação ter ocorrido [15]. Também não podemos afastar a possibilidade de que um tamanho amostral maior pudesse conferir resultados diferentes.

A cor da pele não influenciou de forma significativa os níveis da 25(OH)D entre as gestantes do nosso estudo. Pesquisadores mostram que uma maior quantidade de melanina na

pele dificulta a produção endógena da 25(OH)D [25, 26]. A intensa miscigenação da população brasileira e a subjetividade associada à autodefinição da cor da pele, provavelmente, contribuíram para o baixo poder explicativo dessa variável [27].

Além do pequeno percentual de gestantes que fizeram uso de suplementos orais contendo vitamina D, nenhum desses atingia a RDA (*Recommended Dietary Allowance*) de 600 UI proposta pelo Instituto de Medicina Americano (IOM) [28], nem, tampouco, àquela da *Endocrine Society* (1500-2000 UI/dia) [23]. Isso justifica, em parte, o achado da não interferência da suplementação vitamínica nas gestantes no presente estudo, sob os níveis séricos da 25(OH)D. Estudos mostram que suplementar vitamina D na gravidez, principalmente com doses mais altas (2000 UI/dia), é capaz de manter níveis adequados de 25(OH)D na circulação das gestantes [4, 23].

Talvez o maior tempo de exposição ao sol não tenha influenciado significativamente os níveis de 25(OH)D das gestantes do estudo, pois a maioria delas afirmou ser entre 6:00 e 7:00 da manhã o principal horário em que tinham contato diretamente com os raios solares. Acredita-se que, nesse período, os raios UVB que atingem a superfície da Terra sejam mais oblíquos, e, portanto, menos efetivos na fotoconversão do precursor da vitamina D na pele [23, 29].

Nossos achados de um pior *status* da vitamina D no binômio mãe-filho, nos grupos com PE com ou sem obesidade, estão de acordo com dados da literatura [9-11, 30]. Robinson et al. [11] e Baker et al. [10] encontraram, em gestantes americanas com PE grave, percentuais de deficiência de 25(OH)D de 54% e 26%, respectivamente, sendo esses valores significativamente maiores quando comparados aos daquelas mulheres sem PE ($p < 0.05$). Esses pesquisadores utilizaram os mesmos pontos de corte que definem o *status* da vitamina D empregados por nós. Em outro estudo caso-controle, Bodnar et al. [9] observaram um maior percentual de deficiência de vitamina D entre gestantes americanas que desenvolveram PE em relação ao grupo controle ($p = 0.08$). Igualmente, os neonatos nascidos daquelas mães com PE apresentaram um pior *status* de 25(OH)D em relação aos nascidos das mulheres do grupo controle ($p < 0.05$).

Postula-se que o *status* materno da vitamina D seja capaz de alterar o risco da pré-eclâmpsia [31]. Essa doença pode ser explicada, em parte, pela implantação superficial do trofoblasto no endométrio, decorrente de uma exacerbada resposta do sistema imunológico da gestante (aumento de citocinas pró-inflamatórias), levando, assim, a uma menor tolerância materna ao feto [17, 32]. As propriedades imunomoduladoras da forma ativa da vitamina D podem ser fundamentais nesse momento da implantação do trofoblasto, de maneira que a

deficiência dessa vitamina, no começo da gestação, poderá levar ao desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, constituindo-se em um fator de risco para a ocorrência da PE [33].

Nos estudos de Baker et al. [10] e Bodnar et al. [9], os baixos níveis de 25(OH)D precederam a apresentação clínica da PE, tendo-se em vista que as amostras de sangue foram coletadas na primeira metade da gestação. Dessa forma, uma maior inferência causal pode ser especulada, e talvez o encontro de baixos níveis de vitamina D no começo da gestação tenha alguma participação na complexa fisiopatologia da PE.

Bodnar et al. [16] encontraram também um maior percentual de 25(OH)D abaixo de 20 ng/mL no binômio mãe-filho quando o IMC pré-gestacional era $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, em comparação com o grupo sem obesidade ($p < 0.05$). Especula-se que o encontro de baixos níveis de vitamina D em indivíduos obesos decorra da solubilidade dessa vitamina em gordura, e, portanto, quanto maior o percentual de tecido adiposo, menor é a concentração sérica da 25(OH)D [13].

Quando analisamos as medianas de vitamina D dos RN de todos os grupos, observamos que foram superiores às das mães. A vitamina D no sangue de cordão é relatada como sendo 25-30% mais baixa em relação à do sangue materno [34]. Mas há autores que mostram resultados discordantes. Dror e Alen (2010), revisando a literatura, encontraram relatos de que as concentrações da 25(OH)D no sangue do cordão foram até 108% maiores que os níveis das gestantes [1]. A não uniformidade dos estudos em relação aos diversos métodos de se mensurar a vitamina D pode em parte justificar as diferenças encontradas. Não podemos afastar, também, a possibilidade de que os resultados encontrados possam refletir diferenças entre as populações estudadas, com possibilidade de polimorfismos genéticos, conforme já vem sendo descoberto em relação à proteína ligadora de vitamina D (DBP) [35].

Semelhantemente ao encontrado em outros estudos [36, 37], os níveis neonatais de vitamina D, na nossa pesquisa, apresentaram uma correlação positiva com os valores das gestantes, mostrando como os fetos são dependentes das concentrações séricas da 25(OH)D materna. Entretanto, pelos coeficientes de determinação encontrados, observamos que ocorreu uma menor transferência da 25(OH)D materno-fetal nos grupos de gestantes com maior IMC. Em recente estudo, Josefson et al. [38] também observaram que mães obesas transferiam menos 25(OH)D para seus filhos, em comparação àquelas não obesas. Até o presente momento, desconhece-se o porquê disso, e, assim, algumas hipóteses são aventadas, de explicação não linear, baseadas nos aspectos fisiológicos do transporte da vitamina D na placenta, bem como na fisiopatologia da obesidade.

Ainda não está claro como a vitamina D atravessa a placenta. Estudos da década de 1980 [39], bem como revisões recentes da literatura [40], consideram que o mecanismo principal seja por difusão passiva, assim como acontece com os hormônios esteroides sexuais. A fração livre de 25(OH)D no plasma talvez reflita a quantidade disponível para a absorção celular, pela teoria do hormônio livre [41]. Dessa forma, apenas a 25(OH)D livre, lipossolúvel, cruzaria a bicamada lipídica das células. Karlsson et al. [42] identificaram que mulheres obesas em idade reprodutiva apresentam maiores níveis circulantes da DBP em relação às mulheres magras, resultando num menor percentual de 25(OH)D livre. Caso isso também ocorra em gestantes obesas, e assumindo-se o transporte passivo da 25(OH)D através da placenta, talvez se justifique, pelo menos em parte, a menor transferência da vitamina D para os seus fetos.

Por outro lado, a placenta é um órgão complexo, e sua estrutura pode sofrer mudanças diante de diferentes contextos clínicos. É esperado que, nos primeiros meses de gestação, aconteça uma maior expressão do gene CYP27B1 na placenta, que codifica a enzima 1 α -hidroxilase, necessária para a conversão do calcidiol em calcitriol, e que, ao mesmo tempo, ocorra um “silenciamento” do gene CYP24A1, responsável pelo catabolismo tanto da 25(OH)D como da 1,25(OH)₂D [33]. Estudo *in vitro* mostrou que o TNF- α foi capaz de estimular a expressão do CYP24A1 em culturas de trofoblastos [31]. Sabe-se também que, em gestantes obesas, a placenta encontra-se inflamada, com uma maior concentração de citocinas pró-inflamatórias [43]. Pelo exposto, é possível que uma maior expressão gênica do CYP24A1, modulada por mecanismos epigenéticos, ocorra diante de uma placenta inflamada de gestantes obesas, resultando em uma menor concentração da 25(OH)D na interface materno-fetal, e, portanto, em uma menor passagem dessa vitamina para o feto.

Acreditamos que estudos futuros, principalmente *in vivo*, possam elucidar o transporte da vitamina D através da placenta de mulheres magras e obesas, com e sem complicações, como a pré-eclâmpsia, contribuindo, dessa forma, para um melhor entendimento do *status* da vitamina D nos recém-nascidos.

Os resultados desta pesquisa devem ser analisados à luz de suas limitações. Além das questões referentes ao viés de seleção, o pequeno número de participantes pode não ter sido representativo das populações obesas ou com PE. Termos dosado a 25(OH)D imediatamente antes do parto reflete tão somente o seu *status* nas últimas 2-3 semanas [25]. Chamamos atenção também para o fato de que qualquer biomarcador apresenta limitações, quer por fatores fisiológicos, quer pelas dificuldades metodológicas de sua mensuração [41]. Entre os vários fatores capazes de interferir na concentração da 25(OH)D, destacam-se: o aumento das

necessidades fisiológicas, a adiposidade corporal, a hemodiluição e os efeitos do envelhecimento, bem como a afinidade da vitamina D com os tecidos alvos e a eficiência da absorção celular, entre outros [41]. Apesar de ser o mais utilizado por clínicos e pesquisadores, a 25(OH)D é um marcador de fornecimento do nutriente vitamina D, podendo, assim, não representar o melhor biomarcador de função biológica [41]. Por fim, o não uso do padrão ouro para mensurar a vitamina D, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), pode refletir menor fidedignidade quanto aos verdadeiros níveis de 25(OH)D encontrados na amostra.

Vale a pena ressaltar que o nosso estudo foi realizado em uma latitude próxima ao equador (9° S), com raios UVB abundantes praticamente nas quatro estações do ano, elemento que, por si só, controlou esse fator de confusão geográfico, encontrado nos estudos feitos em elevadas latitudes.

Em conclusão, nossos resultados mostraram uma menor mediana, e, conseqüentemente, um pior *status* da vitamina D no binômio mãe-RN, quando em presença de PE ou obesidade gestacional. Como a obesidade tornou-se uma das maiores epidemias mundiais do início deste século, acreditamos que pesquisas devam ser realizadas com o objetivo de se saber se a suplementação com doses mais altas de vitamina D em grávidas obesas é capaz de promover um melhor *status* da 25(OH)D nos seus RN.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por fomentar nossa pesquisa; à gerente do Laboratório de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do Hospital Barão de Lucena, a Sr.^a Ana Maria de Lima Barros; e à Prof.^a Dr.^a Vera Magalhães da Silveira, pela dosagens da vitamina D.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Tabela 1 – Características maternas e neonatais expressas em percentual (%), mediana (Md) e quartis (Q1, Q3), ou em média (\bar{X}) e desvio-padrão

VARIÁVEIS	PE ⁺ /OB ⁻ (48)	PE ⁺ /OB ⁺ (44)	PE ⁻ /OB ⁺ (40)	PE ⁻ /OB ⁻ (47)	P VALOR
IDADE DAS GESTANTES (Anos)	Md= 21.0 (19.0-27.0)	Md= 26.5 (21.5-31.5)	Md= 27.0 (22.0-33.0)	Md= 24.0 (19.0-29.0)	0.003*
IMC DAS GESTANTES	Md= 23.7 (21.2-25.7)	Md= 32.9 (31.5-36.8)	Md= 32.8 (31.6-35.9)	Md= 24.2 (21.3-26.3)	< 0.001*
NÚMERO DE GESTAÇÕES: 1 ≥ 2	70.8% (34) 29.2% (14)	54.5% (24) 45.5% (20)	27.5% (11) 72.5% (29)	34.0% (16) 66.0% (31)	< 0.001**
IDADE GESTACIONAL: < 37SEMANAS ≥ 37 SEMANAS	25.0% (12) 75.0% (36)	18.2% (08) 81.8% (36)	12.5% (05) 87.5% (35)	14.9% (07) 85.1% (40)	0.43**
COR DA PELE: BRANCA NÃO BRANCA	16.7% (08) 83.3% (40)	25.0% (11) 75.0% (33)	17.5% (07) 82.5% (33)	14.9% (07) 85.1% (40)	0.62**
RENDA <i>per capita</i> (Em Reais)	Md= 312.00 (208.00-500.00)	Md= 339.00 (211.20-450.00)	Md= 252.00 (169.50-336.20)	Md= 282.70 (200.00-400.00)	0.09*
ESCOLARIDADE: ANALFABETA ALFABETIZADA	2.1% (01) 97.9% (47)	4.5% (02) 95.5% (42)	10.0% (04) 90.0% (36)	10.6% (05) 89.4% (42)	0.28**
DURAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO SOL (Minutos/Dia)	Md= 20.0 (10.0-32.5)	Md= 20.0 (15.0-35.0)	Md= 32.5 (15.0-50.0)	Md= 20.0 (10.0-30.0)	0.16*
USO DE VITAMINA D: SIM NÃO	10.4% (05) 89.6% (43)	13.6% (06) 86.4% (38)	0.0% (0) 100% (40)	12.8% (06) 87.2% (41)	0.13**
USO DE PROTETOR SOLAR: SIM NÃO	10.4% (05) 89.6% (43)	09.1% (04) 90.9%(40)	07.5% (03) 92.5% (37)	08.5% (04) 91.5% (43)	0.97**
SEXO DO RN FEMININO MASCULINO	45.8% (22) 54.2% (26)	59.1% (26) 40.9% (18)	55.0% (22) 45.0% (18)	53.2% (25) 46.8% (22)	0.63**
PESO DO RN (g)	\bar{X} = 2782.3 ± 750.9	\bar{X} = 3272.6 ± 648.6	\bar{X} = 3326.7 ± 589.3	\bar{X} = 3221.2 ± 544.3	< 0.001***
COMPRIMENTO DO RN (cm)	Md=46.5 (44.5-48.0)	Md= 48.0 (47.0-49.0)	Md= 49.0 (47.0-50.0)	Md=48.0 (46.0-49.0)	0.006*
ADEQUAÇÃO ^β DO RN AIG PIG GIG	58.3% (28) 33.3% (16) 08.4% (04)	70.5% (31) 0% (0) 29.5% (13)	75.0% (30) 05.0% (02) 20.0% (08)	83.0% (39) 04.3% (02) 12.7% (06)	<0.001**

RN (recém-nascido); g (gramas); cm (centímetros). ^β (Classificação de acordo com a curva de Lubchenco).

* Kruskal-Wallis ; ** Qui-quadrado ; *** ANOVA

Tabela 2 – Distribuição do *status* da 25(OH)D entre as gestantes e recém-nascidos

STATUS DA 25(OH)D	PE ⁺ /OB ⁻ (48)	PE ⁺ / OB ⁺ (44)	PE ⁻ / OB ⁺ (40)	PE ⁻ /OB ⁻ (47)	p VALOR [*]
GESTANTES					
≥30.0	08.3%(04)	04.6%(02)	20.0%(08)	17.0%(08)	0.002
20.0-29.9	39.6%(19)	47.7%(21)	47.5%(19)	68.1%(32)	
<20.0	52.1%(25)	47.7%(21) ^c	32.5%(13) ^a	14.9%(07)	
RECÉM-NASCIDOS					
≥30.0	33.3%(16)	36.4%(16)	52.5%(21)	57.4%(27)	0.06
20.0-29.9	52.1%(25)	54.5%(24)	40.0%(16)	42.6%(20)	
<20.0	14.6%(07)	09.1%(04) ^d	07.5%(03) ^b	0% (0)	

* χ^2 ^a $p = 0.10$ (PE⁻/OB⁺ vs PE⁻/OB⁻)^b $p = 0.16$ (PE⁻/OB⁺ vs PE⁺/OB⁻)^c $p = 0.62$ (PE⁺/OB⁺ vs PE⁺/OB⁻)^d $p = 0.72$ (PE⁺/OB⁺ vs PE⁻/OB⁻)

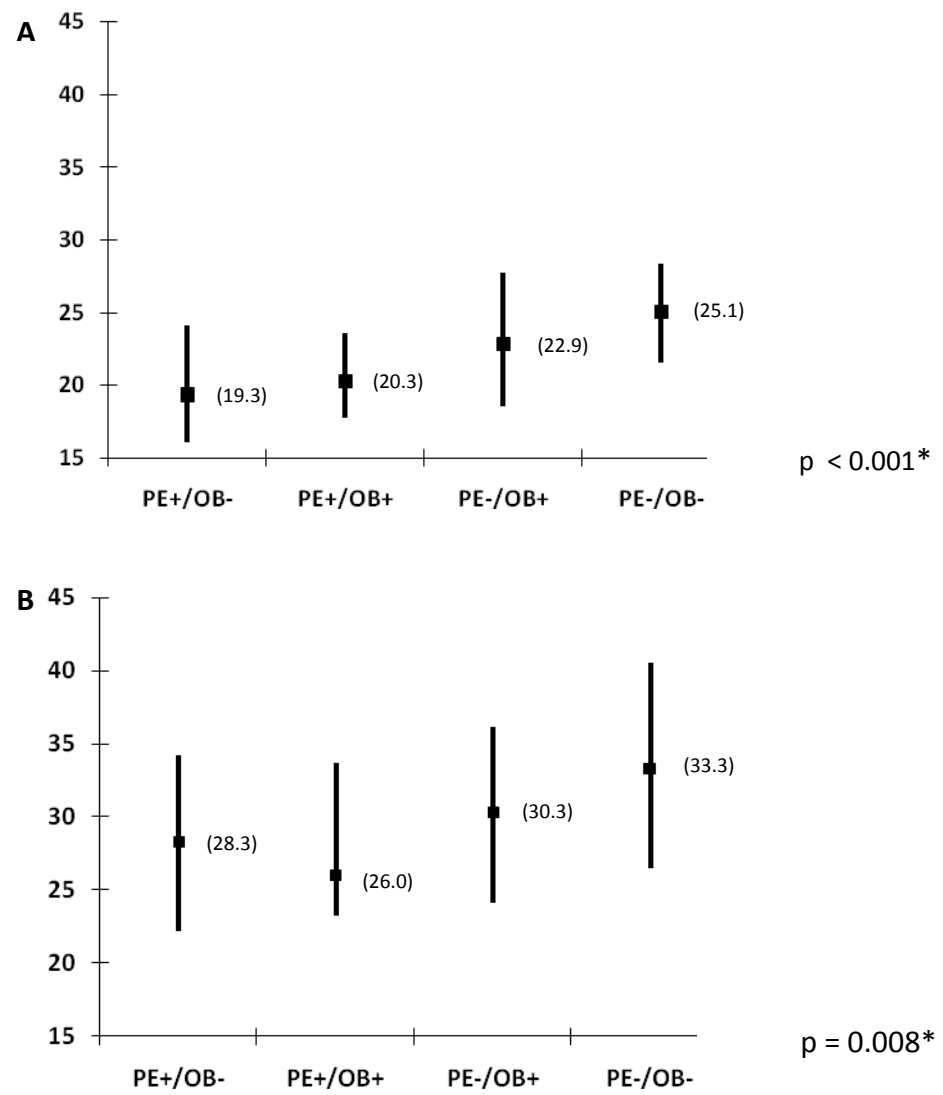
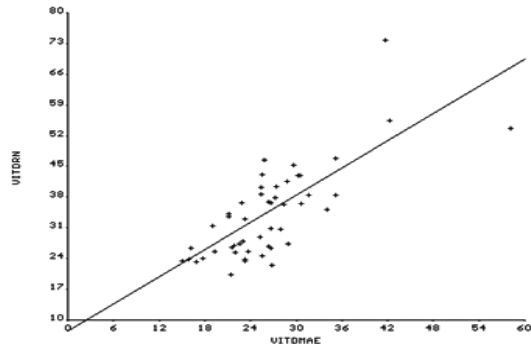


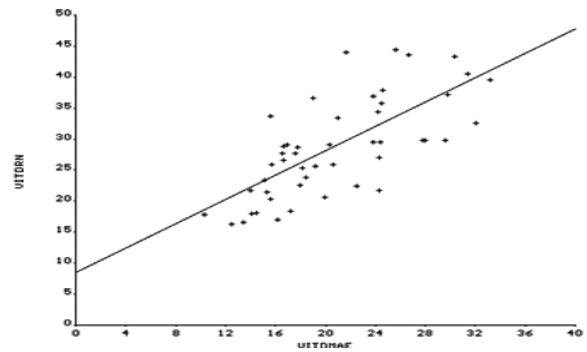
Figura 1 – Medianas e intervalos interquartílicos da 25(OH)D entre as gestantes (A) e recém-nascidos (B).

* Kruskal-Wallis.

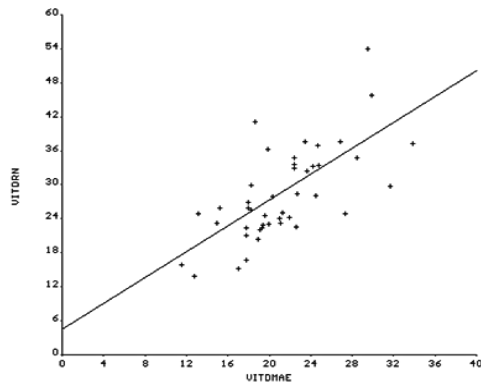
A) PE^-/OB^-
 $r = +0,75^*$ $r^2 = +0,56$



B) PE^+/OB^-
 $r = +0,71^*$ $r^2 = +0,51$



C) PE^+/OB^+
 $r = +0,68^*$ $r^2 = +0,46$



D) PE^-/OB^+
 $r = +0,58^*$ $r^2 = 0,34$

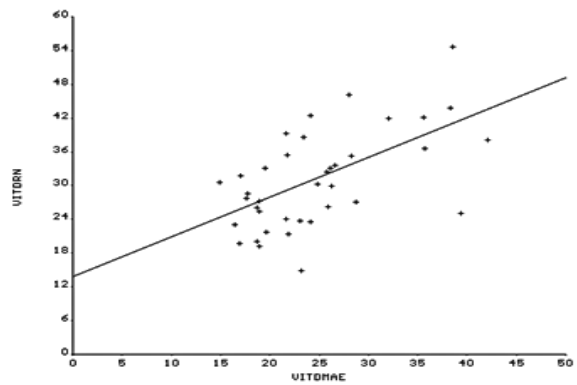


Figura 2 – Correlações entre os níveis maternos e neonatais de 25(OH)D
 $* p = 0.01$

Referências

1. Dror DK, Allen L (2010) Vitamin D inadequacy in pregnancy: biology, outcomes, and interventions. *Nutr Rev* 68(8):465-477. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00306.x
2. Bener A, Al-Hamaq AO, Saleh NM (2013) Association between vitamin D insufficiency and adverse pregnancy outcome: global comparisons. *Int J Womens Health* 5: 523–531. doi: 10.2147/IJWH.S51403
3. Kaludjerovic J, Vieth R (2010) Relationship between vitamin D during perinatal development and health. *J Midwifery Womens Health* 55(6):550-560. doi: 10.1016/j.jmwh.2010.02.016
4. Principi N, Bianchini S, Baggi E, Esposito S (2013) Implications of maternal vitamin D deficiency for the fetus, the neonate and the young infant. *Eur J Nutr* 52:859–867. doi: 10.1007/s00394-012-0476-4
5. Christakos S, Ajibade DV, Puneet Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ (2010) Vitamin D: Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39(2):243-253. doi:10.1016/j.ecl.2010.02.002
6. Norman AW (2008) From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 88(suppl):491S-499S
7. Jeffery L.E, Burke F, Mura M, Zhenget Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LSK, A. Lammas DA, Raza K, Sansom DM (2009) 1,25 dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FOXP3. *J Immunol* 183: 5458-5467. doi: 10.4049/jimmunol.0803217
8. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM (2010) Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta* 31:1027-1034. doi: 10.1016/j.placenta.2010.08.015
9. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM (2007) Maternal Vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 92(9):3517-3522. doi: 10.1210/jc.2007-0718
10. Baker AM, Haeri S, Camargo CA Jr, Espinola JA, Stuebe AM (2010) A nested case-control study os midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 95(11):5105-5109. doi: 10.1210/jc.2010-0996
11. Robinson CJ, Alanis MC, Wagner CL, Hollis BW, Johnson DD (2010) Plasma 25-OH-Vitamin D levels in early onset severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 203(4):366.e1-366.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2010.06.0368
12. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005) Pre-eclampsia. *Lancet* 365(9461):785-799
13. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF (2000) Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 72(3):690-693

14. Young KA, Engelman CD, Langefeld CD, Hairston KG, Haffner SM, Bryer-Ash M, Norris JM (2009) Association of plasma vitamin D levels with adiposity in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 94(9):3306-3313. doi: 10.1210/jc.2009-0079
15. Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD (2012) The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes (Lond)* 36(3):387-396. doi: 10.1038/ijo.2011.119
16. Bodnar LM, Catov JM, Roberts JM, Simhan HN (2007) Prepregnancy Obesity Predicts Poor Vitamin D Status in Mothers and Their Neonates. *J Nutr* 137(11):2437-2442
17. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DL (2012) Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 5(1):9-18. doi: 10.1242/dmm.008516
18. Pearce SH, Cheetham TD (2010) Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ* 340:142-147. doi: 10.1136/bmj.b5664
19. Viljakainen HT, Saarnio E, Hytinen T, Miettinen M, Surcel H, Mäkitie O, Andersson S, Laitinen K, Lamberg-Allardt C (2010) Maternal Vitamin D Status Determines Bone Variables in the Newborn. *J Clin Endocrinol Metab* 95(4):1749–1757. doi: 10.1210/jc.2009-1391
20. Camargo CA, Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, Epton MJ, Town GI, Pattemore PK, Espinola JA, Crane J (2011) Cord-Blood 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Respiratory Infection, Wheezing, and Asthma. *Pediatrics* 127(1):e180-e187. doi: 10.1542/peds.2010-0442
21. ACOG Committee on Practice Bulletins (2002) Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 99(1):159–167
22. Brasil (2006) Pré-natal e puerpério: atenção qualificada e humanizada: manual técnico. Ministério da Saúde, Brasília
23. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM (2011) Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7):1911–1930. doi: 10.1210/jc.2011-0385.
24. Holick MF (2006) Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 116(8):2062-2072
25. Tsiaras WG, Weinstock MA (2011) Factors Influencing Vitamin D Status. *Acta Derm Venereol* 91(2):115-124. doi: 10.2340/00015555-0980
26. Bodnar LM, Simhan, HN (2010) Vitamin D may be a link to black-white disparities in adverse birth outcomes. *Obstet Gynecol Surv* 65(4):273-284. doi:10.1097/OGX.0b013e3181dbc55b
27. Wood CH, Carvalho JAM (1994) Categorias do Censo e classificação subjetiva de cor no Brasil. *Rev Bras Estudos Pop* 11(1):3-17

28. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. (2011) The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 96(1):53–58. doi: 10.1210/jc.2010-2704
29. Grant WB, Holick MF (2005) Benefits and Requirements of Vitamin D for Optimal Health: A Review. *Altern Med Rev* 10(2):94-111
30. Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM (2013) Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. doi:10.1136/bmj.f1169
31. Díaz L, Noyola-Martínez N, Barrera D, Hernández G, Avila E, Halhali A, Larrea F (2009) Calcitriol inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *J Reprod Immunol* 81(1):17-24. doi: 10.1016/j.jri.2009.02.005
32. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CWG (2006) Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 11(5):309-316
33. Liu NQ, Hewison M (2012) Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Arch Biochem Biophys* 523(1):37-47. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.018.
34. Pawley N, Bishop NJ (2004) Prenatal and infant predictors of bone health: the influence of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80(suppl):1748S–1751S
35. Chun RF (2012) New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem Funct* 30(6):445-456. doi: 10.1002/cbf.2835
36. Halicioglu O, Aksit S, Koc F, Akmana SA, Albudaka E, Yapraka I, Coker I, Colak A, Ozturk C, Gulec ES (2011) Vitamin D deficiency in pregnant women and their neonates in spring time in western Turkey. *Paediatr Perinat Epidemiol* 26(1):53–60. doi: 10.1111/j.1365-3016.2011.01238.x
37. Molla AM, Badawi MA, Hammoud MS, Shukkur M, Thalib L, Eliwa MS (2005) Vitamin D status of mothers and their neonates in Kuwait. *Pediatr Int* 47(6):649-652
38. Josefson JL, Feinglass J, Rademaker AW, Metzger BE, Zeiss DM, Price HE, Langman CB (2013) Maternal Obesity and Vitamin D Sufficiency Are Associated with Cord Blood Vitamin D Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 98(1):114–119. doi: 10.1210/jc.2012-2882
39. Gertner JM, Glassman MS, Coustan DR, Goodman DBP (1980) Fetomaternal vitamin D relationships at term. *J Pediatr* 97(4):637-640
40. Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A, Bishop NJ, Glorieux FH (2000) Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 71(suppl):1317S–1324S
41. Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I (2008) Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr* 88(suppl):500S–506S

42. Karlsson T, Osmanovic A, Jansson N, Hulthén L, Holmång A, Larsson I (2013) Increased vitamin D-binding protein and decreased free 25(OH)D in obese women of reproductive age. *Eur J Nutr* doi: 10.1007/s00394-013-0524-8
43. Roberts KA, Riley SC, Reynolds RM, Barr S, Evans M, Statham A, Hor K, Jabbour HN, Norman JE, Denison FC (2011) Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta* 32(3):247-254. doi: 10.1016/j.placenta.2010.12.023

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatamos que a deficiência de vitamina D entre as gestantes com PE ou obesas foi mais frequente em relação àquelas sem PE e àquelas não obesas. Contudo, não podemos afirmar relação de causalidade, devido ao tipo de estudo realizado.

Um pequeno percentual de suficiência em 25(OH)D foi observado nos quatro grupos de grávidas, sendo essa situação mais favorável entre os neonatos. Esse achado chamou nossa atenção, pois, apesar de o estudo ter sido realizado em uma região ensolarada, com abundância de radiação ultravioleta praticamente durante todo o ano, apenas 12% (22/179) das gestantes apresentaram níveis iguais ou superiores a 30 ng/mL de 25(OH)D. Todavia, qual o ponto de corte ideal da vitamina D durante a gestação e no período neonatal? E, ainda, um questionamento mais difícil: qual o valor de normalidade dessa vitamina entre as gestantes e recém-nascidos da região Nordeste do Brasil? Igualmente, ainda sem resposta: os RN classificados como insuficientes, percentual expressivo em nosso estudo, se tornarão deficientes ou suficientes em médio-longo prazo? Independentemente das dúvidas expostas acima, acreditamos que a ingestão de alimentos ricos/suplementados em vitamina D, associada à exposição solar segura, deva ser estimulada nas consultas de pré-natal e de puericultura, a fim de minimizar o elevado percentual de inadequação dessa vitamina encontrado no binômio mãe-filho.

Entendemos que são necessários novos estudos, com um número maior de participantes, além do seguimento longitudinal desses indivíduos, para se chegar a um consenso acerca da suplementação medicamentosa com vitamina D em gestantes obesas, ou que tenham desenvolvido pré-eclâmpsia, bem como em seus neonatos.

Outros pontos ainda precisam ser elucidados, relacionados eles: à complexa fisiopatologia da PE e da obesidade; à incerteza sobre a fisiologia do transporte da vitamina D na placenta; e à questão sobre a associação de baixos níveis de 25(OH)D com doenças não ósseas, como a PE e a obesidade, ser causal ou devido a fatores de confusão ainda não bem controlados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACOG. American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee on Practice Bulletins. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 99, n. 33, p. 159-67, 2002.

AGHAJAFARI, F. et al. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMJ**, 2013. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/346/bmj.f1169>>. Acesso em: 5 maio de 2013.

ALVES, C. et al. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. **Rev Bras Saúde Matern Infant**, v. 7, n. 4, p. 357-63, 2007.

ANDERSON, P.H., MAY, B.K., MORRIS, H.A. Vitamin D Metabolism: New Concepts and Clinical Implications. **Clin Biochem Rev**, v.24, p. 13-26, 2003.

ANDERSON, N.H. et al. The impact of maternal body mass index on the phenotype of pre-eclampsia: a prospective cohort study. **BJOG**, v. 119, n. 5, p. 589-95, 2012.

BAKER, A.M., et al. A nested case-control study os midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 11, p. 5105-09, 2010.

BASILE, L.A. et al. Neonatal vitamin D status at birth al latitude 32°72': Evidence of deficiency. **J Perinatol**, v. 27, n. 9, p. 568-71, 2007.

BASU, S. et al. Pre-gravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. **Obesity**, v. 19, n. 3, p. 476-82, 2011.

BELLIA, A. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. **Intern Emerg Med**, v. 8, n. 1, p. 33-40, 2013.

BENER, A., AL-HAMAQ, A.O., SALEH, N.M. Association between vitamin D insufficiency and adverse pregnancy outcome: global comparisons. **Int J Womens Health**, v. 5, p. 523-31, 2013.

BODNAR, L.M., et al. The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. **Ann Epidemiol**, v. 15, n. 7, p. 475-82, 2005.

BODNAR, L.M., et al. Maternal Vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 9, p. 3517-22, 2007a.

BODNAR, L.M., et al. Prepregnancy Obesity Predicts Poor Vitamin D Status in Mothers and Their Neonates. **J Nutr**, v. 137, n. 11, p. 2437-42, 2007b.

BODNAR, L.M., SIMHAN, H.N. Vitamin D may be a link to black-white disparities in adverse birth outcomes. **Obstet Gynecol Surv**, v. 65, n. 4, p. 273-84, 2010.

BORZYCHOWSKI, A.M., SARGENT, I.L., REDMAN, C.W.G. Inflammation and pre-eclampsia. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 11, p. 309-16, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. **Pré-natal e puerpério: atenção qualificada e humanizada: manual técnico**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 163 p.

BRAEGGER, C., et al. Vitamin D in the healthy European paediatric population. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 56, n. 6, p. 692-01, 2013.

CAMARGO, C.A. et al. Vitamin D status of newborns in New Zealand. **Br J Nutr**, v. 104, n. 7, p. 1051-57, 2010.

CAMARGO, C.A. et al. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. **Pediatrics**, v. 127, n. 1, p. e180-e87, 2011.

CHALLIER, J.C. et al. Obesity in Pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. **Placenta**, v. 29, n. 3, p. 274-81, 2008.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 39, n. 2, p.243-53, 2010.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: beyond bone. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1287, p. 45-58, 2013.

CHUN, R.F. New perspectives on the vitamin D binding protein. **Cell Biochem Funct**, v. 30, p. 445-56, 2012.

DÍAZ, L. *et al.* Calcitriol inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. **J Reprod Immunol**, v. 81, n. 1, p. 17-24, 2009.

DROR, D.K.; ALLEN, L. Vitamin D inadequacy in pregnancy: biology, outcomes, and interventions. **Nutr Rev**, v. 68, n.8, p. 465-77, 2010.

EARTHMAN, C.P. et al. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. **Int J Obes**, v. 36, n.3, p.387-96, 2012.

GERTNER, J.M. et al. Fetomaternal vitamin D relationships at term. **J Pediatr**, v. 97, n. 4, p. 637-40, 1980.

GUHA, C. et al. Regulation of human Gc (vitamin D-binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression in vitro. **Hepatology**, v. 21, n. 6, p. 1675-81, 1995.

HEANEY, R.P.; HOLICK, M.F. Why the IOM Recommendations for Vitamin D Are Deficient. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 3, p. 455-57, 2011.

HEERWAGEN, M.J.R. et al. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. **Am J Physiol**, v. 299, p. R711-R722. 2010.

HENNESSY, A. et al. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. **J Immunol**, v. 163, n. 6, p. 3491-5, 1999.

HEWISON, M. An update on vitamin D and human immunity. **Clin Endocrinol**, v. 76, n. 3, p. 315-25, 2012.

HOLICK, M. F.; HOSSEIN-NEZHAD. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Clin Proc**, v. 88, n. 7, p. 720-55, 2013.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v.96, n.7, p. 1911-30, 2011.

HOLICK, M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **J Clin Invest**, v. 116, n. 8, p. 2062-72, 2006.

HOUSER, B.L. Decidual Macrophages and Their Roles at the Maternal-Fetal Interface. **Yale J Biol Med**, v. 85, n. 1, p. 105-18, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. Características da população e do domicílio. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 19 de jun. 2012.

JAMI, L. et al. Maternal Obesity and Vitamin D Sufficiency Are Associated with Cord Blood Vitamin D Insufficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 1, p. 114-19, 2013.

JEFFERY, L.E., et al. 1,25 dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FOXP3. **J Immunol**, v. 183, n. 9, p. 5458-67, 2009.

KALUDJEROVIC, J.; VIETH, R. Relationship between vitamin D during perinatal development and health. **J Midwifery Womens Health**, v.55, n. 6, p. 550-60, 2010.

KALKUNTE, S., et al. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 88, n. 2, p. 165-9, 2011.

KARLSSON, T. et al. Increased vitamin D-binding protein and decreased free 25(OH)D in obese women of reproductive age. **Eur J Nutr**. Disponível em: <http://download.springer.com/static/pdf/509/art%253A10.1007%252Fs00394-013-0524-8.pdf?auth66=1390390098_92f871ee8126495087fdce95ecc15284&ext=.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2013.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-43, 2000.

LAPILLONNE, A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. **Med Hypotheses**, v. 74, n. 1, p. 71-5, 2010.

LAURIDSEN, A.L. et al. Plasma concentrations of 25-Hydroxy-Vitamin D and 1,25-Dihydroxy-Vitamin D are Related to the Phenotype of Gc (Vitamin D-Binding Protein): A Cross-sectional Study on 595 Early Postmenopausal Women. **Calcif Tissue Int**, v. 77, n. 1, p. 15-22, 2005.

LEWIS, S. et al. Vitamin D deficiency and pregnancy: from preconception to birth. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, p. 1092-102, 2010.

LICHTENSTEIN, A. et al. Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. **Rev Assoc Med Bras**, v. 59, n. 5, p. 495-06, 2013.

LIU, N.Q. et al. Vitamin D and regulation of placental inflammation. **J Immunol**, v. 186, n. 10, p. 5968-74, 2011.

MARQUES, C.D.L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 1, p. 67-80, 2010.

MEREWOOD, A. et al. Widespread vitamin D deficiency in urban Massachusetts newborns and their Mothers. **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. 640-47, 2010.

MISRA, M. *et al.* Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. **Pediatrics**, v. 122, n. 2, p. 398-17, 2008.

MARSHALL, L.; MEHTA, R.; PETROVA, A. Vitamin D in the maternal-fetal-neonatal interface: clinical implications and requirements for supplementation. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 26, n. 7, p. 633-638, 2013.

MOHAMED, W.A.; AL-SHEHRI, M.A. Cord blood 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of acute lower respiratory tract infection in early childhood. **J Trop Pediatr**, v. 59, n. 1, p. 29-35, 2013.

MURGUÍA-PENICHE, T. Vitamin D, Vitamin A, maternal-perinatal considerations: old concepts, new insights, new questions. **J Pediatr**, v.162, n.3, suppl 1, p. S26-30S, 2013.

NASSAR, N. et al. Systematic review of first-trimester vitamin D normative levels and outcomes of pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 205, p. 208.e1-7, 2011.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr**, v. 88 (suppl), p. 491S-9S, 2008.

NORVAL, M.; BJÖRN, L.O.; GRUIJL, F.R. Is the action spectrum for the UV-induced production of previtamin D3 in human skin correct? **Photochem Photobiol Sci**, v. 9, n. 1, p. 11-7, 2010.

PENNINGTON, K.A. et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. **Dis Model Mech**, v. 5, n. 1, p. 9-18, 2012.

PREMAOR, M.O.; FURLANETTO, T.W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n.1, p. 25-37, 2006.

PRENTICE, A.; GOLDBERG, G.R.; SCHOENMAKERS, I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. **Am J Clin Nutr**, v. 88 (suppl), p. 500S–506S, 2008.

PRINCIPI, N. et al. Implications of maternal vitamin D deficiency for the fetus, the neonate and the young infant. **Eur J Nutr**, v. 52, p. 859-867, 2013

REDMAN, C.W.G. Preeclampsia: a multi-stress disorder. **Rev Med Interne**, v. 32 (suppl), p. S41-S44, 2011.

ROBERTS, K.A., et al. Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. **Placenta**, v. 32, p. 247-254, 2011.

ROBINSON, C.J. et al. Plasma 25-OH-Vitamin D levels in early onset severe preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 203, n.4, p. 366.e1-366.e6, 2010.

ROSS, A.C., et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 1, p. 53-8, 2011.

SANEEI, P.; SALEHI-ABARGOUEI, A.; ESMAILZADEH, A. Serum 25-hidroxy vitamin D levels in relation to body mass index: a sistematic review and meta-analysis. **Obes Rev**, v. 14, n. 5 p. 393-404, 2013.

SCHUCH, N.J.; GARCIA, V.C.; MARTINI, L.A. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 625-33, 2009.

SHAW, N.J.; MUGHAL, M.Z. Vitamin D and child health Part 1: skeletal aspects. **Arch Dis Child**, v. 98, n. 5, p. 363-7, 2013.

SHIN, J.S. et al. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. **Placenta**, v. 31, p. 1027-34, 2010.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 365, n. 9461, p. 785-799, 2005.

SPECKER, B.L. Does vitamin D during pregnancy impact offspring growth and bone? **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 1, p. 38-45, 2012.

THAXTON, J.E.; SHARMA, S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, p. 482-91, 2010.

TROGSTAD, L. et al. Pre-eclampsia: risk and causal models. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 25, n. 3, p. 329-42, 2011.

TSIARAS, W.G.; WEINSTOCK, M.A. Factors Influencing Vitamin D Status. **Acta Derm Venereol**, v. 91, n. 2, p. 115-24, 2011.

VICTORA, C.G. et al. Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. **Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1863-76, 2011.

VIETH, R.; LADAK, Y.; WALFISH, P. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 1, p. 185-91, 2003.

YOUNG, K.A. et al. Association of plasma vitamin D levels with adiposity in Hispanic and African Americans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 9, p. 3306-13, 2009.

WAGNER, C.L.; HOLLIS, B.W.; Defining Vitamin D Sufficiency. In: WAGNER, C.L.; TAYLOR, W.S.; HOLLIS, B.W. **New Insights into Vitamin D during pregnancy, lactation & early infancy**. Canadá: HP, 2010. p. 57-68.

WALSH, S.W. Obesity: a risk factor for preeclampsia. **Trends Endocrinol Metab**, v. 18, n.10, p. 365-70, 2007.

WORTSMAN, J. et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. **Am J Clin Nutr**, v. 72, p. 690-93, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
TÍTULO DA PESQUISA: NÍVEIS NEONATAIS DE VITAMINA D: INTERFERÊNCIA
DA OBESIDADE PRÉ-GESTACIONAL E DA PRÉ-ECLÂMPSIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Introdução. A Sr.^a está sendo convidada a participar dessa pesquisa, que tem como pesquisadores os pediatras Homero Rabelo Pena e a Prof.^a Dr.^a Giselia Alves Pontes da Silva, pesquisa que tem como finalidade determinar os níveis de vitamina D tanto nas gestantes como nos seus recém-nascidos.

A obesidade e o aumento da pressão arterial na gravidez podem levar a baixos níveis de vitamina D nos fetos. Medir essa vitamina nos recém-nascidos logo após seu nascimento pode ser muito importante, pois valores baixos poderão trazer riscos para a sua saúde, principalmente para os ossos. No mundo, esse tipo de pesquisa já foi realizado em vários países, mostrando resultados preocupantes, porém, no Brasil, esse estudo é um dos primeiros.

Se decidir por participar da mesma, é importante que leia as informações a seguir, ou poderemos ler juntos. Este termo de consentimento pode conter palavras que a Sr.^a não entenda. Por favor, pergunte-me a respeito de quaisquer palavras que não entenda claramente.

Procedimentos, riscos, desconfortos. Concordando em participar desse estudo, primeiro a Sr.^a responderá a um formulário, cujas perguntas serão feitas por mim, sobre sua gestação. Para responder algumas perguntas, precisaremos do seu Cartão Pré-Natal. As informações do formulário que a Sr.^a responderá permanecerão em sigilo absoluto. Este será preenchido em ambiente reservado, de maneira que haja privacidade para a Sr.^a dar suas respostas.

Logo após, será necessária a coleta de seu sangue para medir a vitamina D. A Sr.^a terá a garantia dos pesquisadores deste estudo de que profissionais competentes, habilitados e treinados oferecerão alta qualidade técnica e procederão com segurança, usando materiais descartáveis, sem pôr em risco a sua saúde. O incômodo para a Sr.^a será o mesmo que o de uma coleta de sangue como qualquer outra que já tenha realizado. Serão necessários 5 ml de

seu sangue. Em relação ao seu recém-nascido, precisaremos do sangue do cordão umbilical, logo após o nascimento, do mesmo local em que se colhe para se saber o tipo de sangue do bebê, sem a necessidade de furar o seu filho(a), e sem prejudicá-lo(a). Também serão necessários 5 ml de sangue.

Benefícios da pesquisa. A Sr.^a estará contribuindo para sabermos se a obesidade e/ou o aumento da pressão arterial na gravidez podem ocasionar baixas quantidades de vitamina D nos recém-nascidos, pois, até o momento, desconhecemos se isso acontece em bebês nascidos em nossa cidade. Se valores muito baixos dessa vitamina forem encontrados em seu filho(a), a Sr.^a ficará sabendo pelo pediatra que fará a primeira consulta, o que nós chamamos de **egresso**, ou através de contato telefônico feito pelo próprio pesquisador.

Decisão de participar, não participar ou desistir. A Sr.^a, como convidada e voluntária dessa pesquisa, possui total liberdade para aceitar ou recusar-se a participar, tendo também o direito de desistir da participação sua e de seu recém-nascido em qualquer momento. A sua recusa ou desistência não lhe trará nenhum prejuízo para com esta maternidade, sendo assegurada a total assistência à Sr.^a e ao seu filho(a).

Não existirá nenhuma cobrança de taxa nem recompensa financeira para os participantes desta pesquisa.

Em aceitando, a Sr.^a receberá uma cópia deste Termo de Consentimento, da qual consta o meu telefone (86913727) e o meu e-mail (homero.rabelo@terra.com.br), para que possa esclarecer quaisquer dúvidas/perguntas que venham surgir posteriormente sobre a pesquisa.

Termo de consentimento livre e esclarecido. Pelo presente instrumento, declaro que li, ou o médico (nome do médico) leu por mim, as informações contidas neste documento antes de assiná-lo. Afirmo que fui suficientemente esclarecida sobre os procedimentos a que eu e meu recém-nascido iremos ser submetidos, ou seja, sobre as respostas a um formulário e sobre as coletas de meu sangue e do cordão umbilical, com a finalidade de medir a vitamina D e nada mais além disso, resposta e coletas que farão parte de uma pesquisa séria, realizada na Universidade Federal de Pernambuco, sem a necessidade de expor meu nome nem o do meu bebê publicamente. Autorizo a divulgação dos resultados em qualquer evento de caráter científico, inclusive em revistas científicas. Compreendo também que sou livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem sofrer nenhum prejuízo por conta disso. Confirmo

também que recebi uma cópia deste Termo de Consentimento. Declaro que não tenho dúvida alguma, pois todas foram devidamente esclarecidas.

Pelo presente, manifesto assim minha concordância e meu livre consentimento para a realização dos procedimentos acima descritos.

Local e data: _____

Nome e assinatura da paciente: _____

Documento de identidade: _____

Testemunha 1 _____

Testemunha 2 _____

Assinatura do médico que obteve o consentimento:

APÊNDICE B – Instrumento de Coleta de Dados: Formulário

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
TÍTULO DA PESQUISA: NÍVEIS NEONATAIS DE VITAMINA D: INTERFERÊNCIA
DA OBESIDADE PRÉ-GESTACIONAL E DA PRÉ-ECLÂMPsia

FormulárioNº do formulário : **1. IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE**Nome: _____ Idade: Contato telefônico: - Data da entrevista : //Prontuário: Data do parto: //Paridade: 1. ☐ primigesta 2. ☐ múltipara PARID ☐Tipo de parto: 1. ☐ vaginal 2. ☐ cesáreo TIPPAR ☐**2.IDADE GESTACIONAL NO MOMENTO DO PARTO**Qual foi a data de sua última menstruação? //Idade Gestacional: SD

3. CÁLCULO DO IMC GESTACIONAL

Altura em metros: , Peso em kg: , IMC: ,

Para categorizar:

1. Obesa ☐ 2. Não obesa ☐ IMCMAE ☐

4. NÍVEIS PRESSÓRICOS CONTIDOS NO CARTÃO PRÉ-NATAL A PARTIR DA 20ª SEMANA DE GESTAÇÃO E NA ADMISSÃO DA MATERNIDADE

Pré-natal: No cartão pré-natal, em alguma consulta após a 20ª semana de gestação, foi identificada PA sistólica ≥ 140 mmHg e/ou PA diastólica ≥ 90 mmHg ?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não PREECL ☐

Se sim, a primeira vez em que foram identificados estes valores de pressão foi:

1. ☐ < 34 semanas 2. ☐ ≥ 34 semanas IDADPA ☐

Maternidade: P sist P diast 1ª aferição

P sist P diast 2ª aferição

5. PROTEINÚRIA REGISTRADA NO PRÉ-NATAL, APÓS A 20ª SEMANA DE GESTAÇÃO, E NA MATERNIDADE

Pré-natal: Proteinúria: 1. ☐ sim 2. ☐ não PROTE ☐

Maternidade: Proteinúria: 1. ☐ sim 2. ☐ não

6. COR DA PELE

Qual é a sua cor da pele? _____

Após, para categorizar: 1. ☐ branca 2. ☐ não branca CORPEL ☐

7. RENDIMENTO MENSAL DOMICILIAR:

• • Quanto foi a renda total durante o último mês na sua casa? (Incluir o bolsa família, caso exista) R\$: _____

• • Após, para categorizar: RENDA ☐☐☐, ☐☐

8. ESCOLARIDADE MATERNA:

A Sr.^a sabe ler e escrever? ☐ sim ☐ não

Se sim, por quantos anos a Sr.^a frequentou a escola? ☐☐

Classificação final:

1. ☐ analfabeta 2. ☐ ensino fundamental incompleto 3. ☐ fundamental completo

4. ☐ ensino médio 5. ☐ nível superior 6. ☐ não sabe informar

ESTUD ☐

9. RECORDATÓRIO DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO SOL

A Sr.^a costuma tomar banho de sol nem que seja de roupa, mas sem chapéu?

☐ sim ☐ não

Descrever as atividades desempenhadas, sua duração e o número de vezes por semana, durante as quais receba sol:

Tempo médio de sol por semana: ☐☐☐ minutos

Tempo médio de sol por dia: ☐☐ minutos

10. SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D

A Sr.^a fez uso de vitaminas durante a gravidez? ☐ sim ☐ não

Qual é o nome desse polivitamínico? Está com ele aí ou com a receita do seu médico?

_____/_____(UI de Vit. D)

Durante quantos meses a Sr.^a tomou essas vitaminas? _____

Fazia de forma regular, ou seja, pelo menos 4x na semana? ☐ sim ☐ não

Para categorizar:

1. ☐ Se as respostas foram: fez uso de forma regular de polivitamínico contendo vitamina D, pelo menos 4 x por semana, no último mês;

2. ☐ Quaisquer outras combinações USOVIT ☐

11.DADOS DO RECÉM-NASCIDO

Sexo: 1. ☐ masculino 2. ☐ feminino SEXRN ☐

Peso ao nascer, em gramas: ☐☐☐☐

Comprimento, em cm: ☐☐

Para categorizar:

1. ☐ AIG 2. ☐ PIG 3. ☐ GIG CLASRN ☐

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Níveis Neonatais de Vitamina D : Interferência da Obesidade Pré-gestacional e da Pré-Eclâmpsia.

Pesquisador: HOMERO RABELO PENA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07742012.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 137.886

Data da Relatoria: 15/10/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado apresentando por Homero Rabelo Pena ao Programa de pósgraduação em saúde da criança e do adolescente da Universidade Federal de Pernambuco sob a orientação da professora orientadora doutora Giselia Alves Pontes da Silva com vistas a pesquisar os Níveis Neonatais de Vitamina D : Interferência da Obesidade Pré-gestacional e da Pré-Eclâmpsia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as concentrações da vitamina D no binômio gestante - recém-nascido em quatro grupos: obesas com e sem pré-eclâmpsia e não obesas com e sem pré-eclâmpsia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue periférico para a gestante poderá trazer dor, leve sangramento no local ou pequena mancha roxa.

Benefícios:

Espera-se, ao término dessa pesquisa, podermos identificar se obesidade e pré-eclâmpsia estão associados à deficiência/insuficiência de vitamina D nas gestantes e neonatos, mesmo em regiões com abundância em raios UVB, e assim, darmos um primeiro passo para discutirmos a real

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



necessidade de suplementação desta vitamina nesses grupos, conforme orientação Internacional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A deficiência de vitamina D é considerada, atualmente, um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Com o ressurgimento do raquitismo em países desenvolvidos como os Estados Unidos, os níveis séricos dessa vitamina vêm ganhando cada vez mais destaque na comunidade científica, principalmente entre as crianças. Este projeto de pesquisa apresenta-se desenhado como um estudo descritivo com componente analítico,

de corte transversal, para comparação dos níveis da vitamina D no binômio mãe-filho, entre gestantes obesas e eutróficas com pré-eclâmpsia, bem como gestantes sem pré-eclâmpsia com e sem obesidade pré-gestacional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Itens de apresentação obrigatória apresentados corretamente.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Favorável a aprovação da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:


Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

Recife, 04.11.2012
Vânia Pinheiro Ramos

 **Prof. Vânia Pinheiro Ramos**
Vice-coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa CCS/UFPE

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



RECIFE, 04 de Novembro de 2012

Vânia Pinheiro Ramos



Profª Vânia Pinheiro Ramos
Vice-coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa CCS/UFPE

Assinador por:

pt GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Anexo B - Avaliação do estado nutricional da gestante de acordo com o Manual do Ministério da Saúde

QUADRO 1 – AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL (EN) DA GESTANTE ACIMA DE 19 ANOS, SEGUNDO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC) POR SEMANA GESTACIONAL					
Semana gestacional	Baixo peso IMC ≤	Adequado IMC entre	Sobrepeso IMC entre	Obesidade IMC ≥	
6	19,9	20,0 24,9	25,0 30,0	30,1	
8	20,1	20,2 25,0	25,1 30,1	30,2	
10	20,2	20,3 25,2	25,3 30,2	30,3	
11	20,3	20,4 25,3	25,4 30,3	30,4	
12	20,4	20,5 25,4	25,5 30,3	30,4	
13	20,6	20,7 25,6	25,7 30,4	30,5	
14	20,7	20,8 25,7	25,8 30,5	30,6	
15	20,8	20,9 25,8	25,9 30,6	30,7	
16	21,0	21,1 25,9	26,0 30,7	30,8	
17	21,1	21,2 26,0	26,1 30,8	30,9	
18	21,2	21,3 26,1	26,2 30,9	31,0	
19	21,4	21,5 26,2	26,3 30,9	31,0	
20	21,5	21,6 26,3	26,4 31,0	31,1	
21	21,7	21,8 26,4	26,5 31,1	31,2	
22	21,8	21,9 26,6	26,7 31,2	31,3	
23	22,0	22,1 26,8	26,9 31,3	31,4	
24	22,2	22,3 26,9	27,0 31,5	31,6	
25	22,4	22,5 27,0	27,1 31,6	31,7	
26	22,6	22,7 27,2	27,3 31,7	31,8	
27	22,7	22,8 27,3	27,4 31,8	31,9	
28	22,9	23,0 27,5	27,6 31,9	32,0	
29	23,1	23,2 27,6	27,7 32,0	32,1	
30	23,3	23,4 27,8	27,9 32,1	32,2	
31	23,4	23,5 27,9	28,0 32,2	32,3	
32	23,6	23,7 28,0	28,1 32,3	32,4	
33	23,8	23,9 28,1	28,2 32,4	32,5	
34	23,9	24,0 28,3	28,4 32,5	32,6	
35	24,1	24,2 28,4	28,5 32,6	32,7	
36	24,2	24,3 28,5	28,6 32,7	32,8	
37	24,4	24,5 28,7	28,8 32,8	32,9	
38	24,5	24,6 28,8	28,9 32,9	33,0	
39	24,7	24,8 28,9	29,0 33,0	33,1	
40	24,9	25,0 29,1	29,2 33,1	33,2	
41	25,0	25,1 29,2	29,3 33,2	33,3	
42	25,0	25,1 29,2	29,3 33,2	33,3	

Fonte: Atalah et al., 1997.

Anexo C – Normas de publicação do *European Journal of Nutrition*

European Journal of Nutrition

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

- Accepted article types: Original Articles, Reviews, Short Communications, Letters to the Editors.
- Declaration of Conflict of Interest is mandatory for all submissions. Please refer to the section "Integrity of research and reporting" in the Instructions for Authors.
- Original Articles must not exceed 25 manuscript pages of max. 32 lines each. Exceptions can be made only with the agreement of the responsible Editor.
- Short Communications should not have more than 4 authors, and not contain more than 1000 words and 10 references. Summary and key words are not required. Preliminary results of highly innovative studies may be submitted as Short Communications.
- Letters to the Editors should not have more than 4 authors, and not contain more than 1000 words and 10 references. Summary and key words are not required. Letters are expected to provide substantive comments on papers published in the EJN. Both the letter and a reply, if appropriate, are published together whenever possible.
- Please submit Original Articles, Reviews, Short Communications electronically via Editorial Manager using the hyperlink "Submit online"
- Please send Letters to the Editor directly to the following e-mail address: ejn@mri.bund.de

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)

- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- **Journal article**
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- **Article by DOI**
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086
- **Book**
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- **Dissertation**
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- **EndNote style (zip, 2 kB)**

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

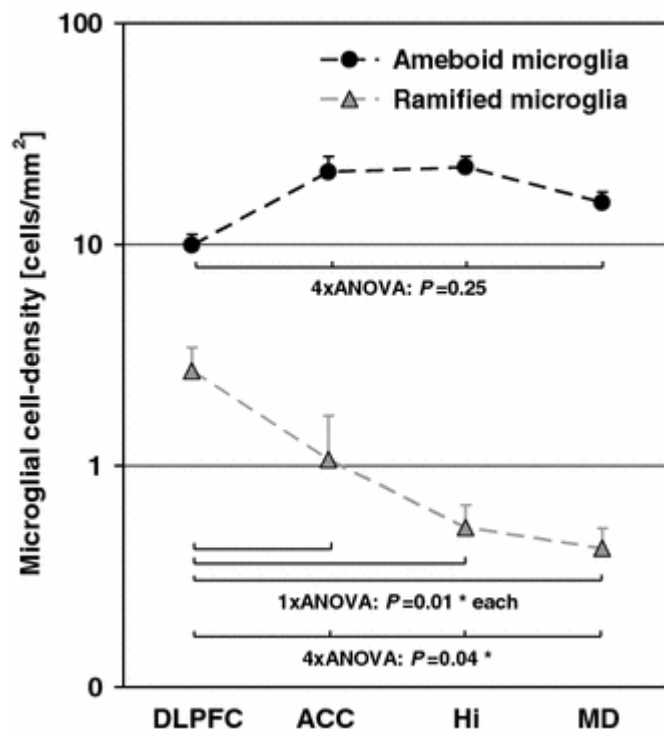
ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

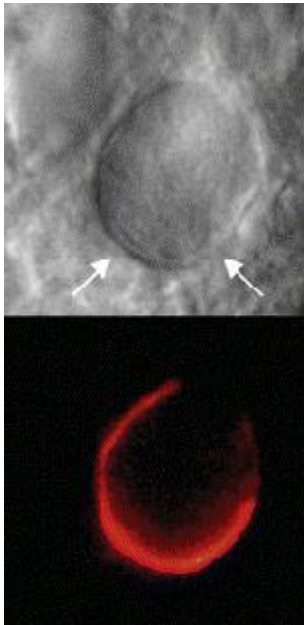
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



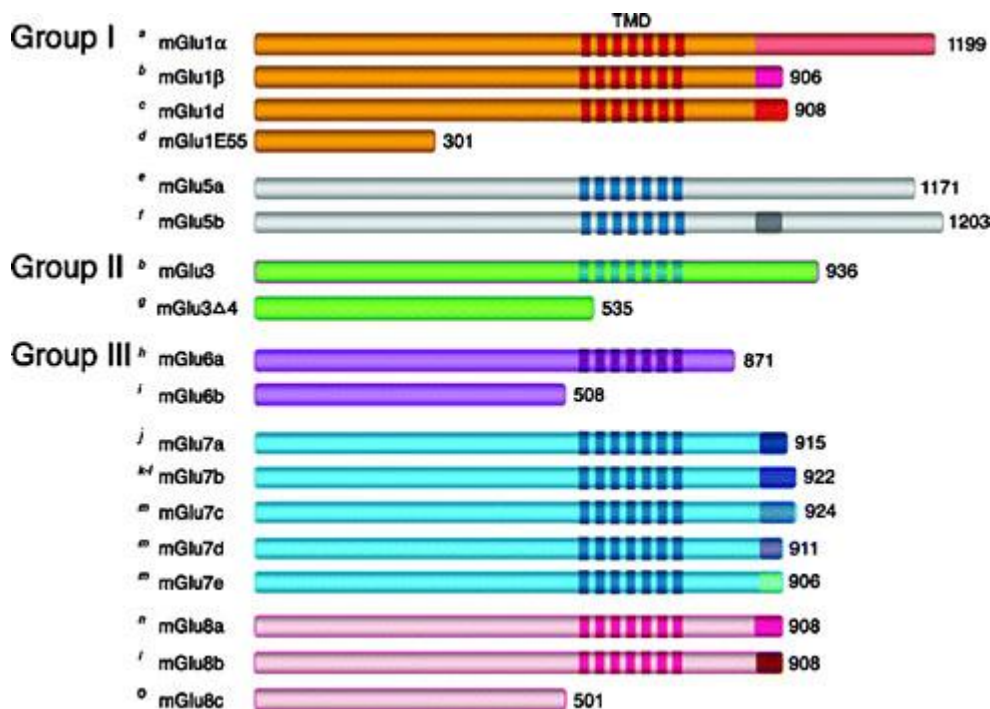
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and

white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements.

The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- 理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- エダンズ グループ ジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- Edanz Editing Global

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers