



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Joana de Novais Pereira

Investigação de biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em gestantes e de seus determinantes sociodemográficos, de estilo de vida e genéticos

Rio de Janeiro

2019

Joana de Novais Pereira

Investigação de biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em gestantes e de seus determinantes sociodemográficos, de estilo de vida e genéticos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Linha de Pesquisa: Adaptações fisiológicas e metabólicas: Programação, nutrição e atividade física.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flávia Fioruci Bezerra

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

P436 Pereira, Joana de Novais.
 Investigação de biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em
 gestantes e de seus determinantes sociodemográficos, de estilo de vida e
 genéticos / Joana de Novais Pereira. – 2019.
 113 f.

 Orientadora: Flávia Fioruci Bezerra.
 Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de
 Nutrição.

 1. Nutrição – Teses. 2. Gestação – Teses. 3. Vitamina D – Teses. I. Bezerra,
 Flávia Fioruci. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de
 Nutrição. III. Título.

es CDU 612.3(81)

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Joana de Novais Pereira

Investigação de biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em gestantes e de seus determinantes sociodemográficos, de estilo de vida e genéticos

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Linha de Pesquisa: Adaptações fisiológicas e metabólicas: Programação, nutrição e atividade física.

Aprovada em 26 de julho de 2019.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Flávia Fioruci Bezerra (Orientador)

Instituto de Nutrição – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Marta Citelli dos Reis

Instituto de Nutrição – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Lucia de Fátima Campos Pedrosa

Departamento de Nutrição - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^a. Dr^a. Verônica Marques Zembrzuski

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dr^a. Maria Eduarda Leão Diogenes Melo

Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus maiores incentivadores e companheiros de vida, que transmitiram a mim o valor de uma profissão e a importância da fé na construção do meu próprio caminho.

AGRADECIMENTOS

À universidade do Estado do Rio de Janeiro, por me acolher durante os quatro anos de doutorado. Por me proporcionar, mesmo em seus momentos mais difíceis e desafiadores momentos de imensa alegria, crescimento profissional, encontros com pessoas que caminharam comigo e hoje, são imensamente importantes em minha vida.

À professora Flávia Fioruci Bezerra, pela inspiração na perfeição no que conduz a sua profissão. Serei eternamente grata por cada ensinamento, pela orientação na execução deste projeto e para muito além dele. Obrigada por me guiar, me acompanhar desde os primeiros tortos passos.

Aos laboratórios de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição, minha segunda casa durante esses quatro anos de doutorado, ao laboratório para Estudos da Interação entre Nutrição e Genética (Instituto de Nutrição – UERJ) e ao laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde (Instituto de Nutrição – UERJ) pela contribuição e aprendizagem.

Às minhas queridas alunas de iniciação científica Julia e Fernanda, por todo o apoio e ajuda durante essa caminhada, estando ao meu lado desde o momento das coletas de amostras até a realização das análises laboratoriais. Sou muito sortuda em ter sido contemplada com as melhores alunas de iniciação científica que eu poderia ter. Vocês deram um colorido especial a este trabalho.

Aos queridos amigos do NENFE e do PPG Alimentação, Nutrição e Saúde, por estarem ao meu lado e me acompanharem ao longo dessa caminhada.

Às minhas queridas amigas, Thamiris, Elaine, Caroline, presentes da UERJ e dessa jornada linda e inesquecível. Obrigada por todas as risadas, todo o apoio e aconchego nos momentos mais difíceis.

À todas as minhas amigas do Laboratório de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição, minha segunda família durante esses quatro anos.

Às minhas amadas primas, Júlia e Luna, minhas grandes incentivadoras. Sempre acreditando, no meu potencial e nos meus sonhos. Sou grata a Deus por permitir o nosso encontro nessa vida.

A minha amada avó Adilea. Sinto tanto a sua falta, do seu carinho, da sua voz. Eu tenho certeza que você continua orando, zelando por mim. Sinto a sua presença ao meu lado

todos os dias. Obrigada por ter se tornando o meu anjo protetor e me ajudar a concluir esse ciclo. Saudades, sempre.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e ao CNPQ pela concessão do apoio financeiro para o Projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À todas as voluntárias que aceitaram fazer parte desta pesquisa. Vocês são a razão para a realização desse estudo.

A todos os funcionários do Hospital Maternidade Herculano Pinheiro, em especial à enfermeira Eliane que me recebeu de braços abertos e realizou todas as coletas de amostras biológicas das voluntárias do presente estudo.

Ao meu irmão, pelo amor, carinho e incentivo incondicionais.

E finalmente àqueles que são e sempre serão os mais importantes na minha vida, os meus pais. Muito obrigada por estarem sempre de mãos dadas comigo e me ensinarem todos os dias e, incansavelmente, o real valor da vida. Hoje sei que mais importante do que saber para onde vamos, é saber de onde viemos, e que eu sempre terei para onde voltar. Eu amo muito vocês.

Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.

Augusto Branco

RESUMO

PEREIRA, J. *Investigação de biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em gestantes e de seus determinantes sociodemográficos, de estilo de vida e genéticos*. 2019. 113 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

O conhecimento dos determinantes do estado de vitamina D em mulheres durante o período gestacional é particularmente importante devido as potenciais implicações da insuficiência dessa vitamina para a saúde materna e fetal. Além de fatores sociodemográficos e de estilo de vida, é possível que polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) determinem a predisposição de gestantes à inadequação de vitamina D. Por ser um período de importantes alterações no metabolismo da vitamina D, a determinação do estado dessa vitamina em gestantes baseada exclusivamente nas concentrações séricas do indicador convencional de adequação [25(OH)D] tem sido questionada. Na presente Tese são apresentados dois manuscritos originais que objetivaram investigar um amplo conjunto de biomarcadores de estado nutricional de vitamina D em gestantes brasileiras e seus determinantes demográficos e de estilo de vida (artigo 1), bem como a associação entre as concentrações desses biomarcadores e SNPs localizados no gene que codifica a proteína ligante de vitamina D (DBP - gene GC) (artigo 2). Trata-se de um estudo transversal com uma amostra de conveniência (n=123) composta por mulheres adultas no terceiro trimestre de gestação atendidas em uma maternidade pública da rede Municipal de saúde da cidade do Rio de Janeiro. Informações sobre idade materna, escolaridade, idade gestacional, IMC pré-gestacional, número de gestações anteriores, hábito de fumar, hábito de beber e de praticar atividade física durante a gestação foram autorrelatadas no momento da entrevista. A determinação da pigmentação da pele foi avaliada com auxílio de um colorímetro portátil. As concentrações séricas de 25(OH)D3 foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). As concentrações séricas de albumina, DBP e PTH foram determinadas utilizando métodos convencionais. As frações livre e biodisponível de 25(OH)D3 foram determinadas indiretamente por equação matemática baseada na constante de afinidade de ligação com albumina e DBP. As genotipagens dos SNPs rs2282679 (G>T), rs4588 (G>T) e rs7041 (A>C) foram realizadas por PCR em tempo real. No primeiro artigo, utilizando análises de regressão linear múltipla, a idade gestacional se associou inversamente às concentrações de 25(OH)D3, enquanto o IMC-pré gestacional foi diretamente associado às concentrações de DBP ($\beta = 5,84$, 95% IC: 0,62, 11,06). As mulheres que tiveram o sangue coletado durante o inverno e o outono apresentaram menores concentrações de 25(OH)D3, DBP, 25(OH)D3 livre e 25(OH)D3 biodisponível. No segundo artigo, após ajustes pela estação do ano, idade gestacional e IMC pré-gestacional, as mulheres com o genótipo GG (rs2282679) apresentaram menores concentrações de DBP comparadas àquelas com genótipo TT. Os genótipos GT e GG (rs2282679) foram associados as maiores concentrações de PTH ($\beta = 14,53$; 95% IC: 3,86, 25,20 e $\beta = 19,66$; 95% IC: 0,28, 39,04), enquanto menores concentrações de PTH foram observadas nas mulheres com os genótipos GT e TT no SNP rs4588 ($\beta = -14,12$; 95% IC: -25,47, -2,78 e $\beta = -19,39$; 95% IC: -38,88, 0,11, respectivamente). Em conjunto, nossos resultados sugerem que a estação do ano, a idade gestacional, e o IMC pré-gestacional são os principais fatores responsáveis por determinar a predisposição de gestantes à insuficiência de vitamina D e que, aparentemente, as concentrações de 25(OH)D3 total e de suas frações livre e biodisponível fornecem informações semelhantes a respeito do estado nutricional de vitamina D em gestantes brasileiras. Os resultados sugerem ainda que os SNPs avaliados, embora não tenham apresentado associação com as concentrações de 25(OH)D3 total e frações, parecem influenciar as concentrações de PTH, considerado um indicador de funcionalidade da vitamina D.

Palavras chave: Gestação. Vitamina D. Determinantes demográficos. SNP. Brasil.

ABSTRACT

PEREIRA, J. *Investigation of biomarkers of vitamin D status in pregnant women and their sociodemographic, lifestyle and genetic determinants*. 2019. 113 f. (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

The knowledge of the determinants of vitamin D status in pregnant women is particularly important due to the potential implications of its insufficiency for both maternal and fetal health. In addition to sociodemographic and lifestyle factors, it is possible that single nucleotide polymorphisms (SNPs) determine the genetic predisposition of pregnant women to inadequate vitamin D status. Pregnancy is associated with important changes in vitamin D metabolism. Vitamin D status assessment in pregnant women based exclusively on the serum concentrations of the conventional vitamin D indicator [25(OH)D] has been questioned. In the present thesis, two original manuscripts are presented investigating a broad set of biomarkers of nutritional vitamin D status in Brazilian pregnant women and their demographic and lifestyle determinants (manuscript 1), as well as the association between concentrations of these biomarkers and SNPs the gene encoding vitamin D binding protein (DBP - *GC* gene) (manuscript 2). This is a cross-sectional study with a convenience sample (n = 123) conducted in women in the third trimester of pregnancy attended at a public maternity of the Municipal health in Rio de Janeiro, Brazil. Information on maternal age, educational attainment, gestational age, pre-gestational BMI, number of previous pregnancies, smoking habit, drinking habits and practicing of physical exercise during pregnancy were self-reported at the time of the interview. The skin pigmentation was evaluated using a portable colorimeter. Serum concentration of total 25(OH)D₃ was measured by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD). Serum concentrations of albumin, DBP and PTH were determined. Free and bioavailable fractions of 25(OH)D₃ were indirectly estimated based on the protein-ligand binding kinetics. The genotyping of the SNPs rs2282679 (G>T), rs4588 (G>T) e rs7041 (A>C) were performed by Real-Time PCR. In the first manuscript, using multiple linear regression analysis, gestational age was inversely associated with 25(OH)D₃ concentrations, whereas pre-pregnancy BMI was directly associated with DBP concentrations ($\beta = 5.84$, 95% CI: 0.62, 11.06). Lower concentrations of 25(OH)D₃, DBP and free and bioavailable 25(OH)D₃ fractions were observed in women who had blood collected during the winter and autumn. In the second manuscript, after adjustments for season, gestational age and pre-pregnancy BMI, women with GG genotype (rs2282679) had lower DBP concentrations compared to those with TT genotype. The genotypes GT and GG (rs2282679) were associated with the highest PTH concentrations ($\beta = 14.53$, 95% CI: 3.86, 25.20 and $\beta = 19.66$, 95% CI: 0.28, 39, 04), while lower concentrations of PTH were observed in women with GT and TT genotypes at the SNP rs4588 ($\beta = -14.12$; 95% CI: -25.47, -2.78 and $\beta = -19.39$; 95% CI: -38.88, 0.11, respectively). Our results suggest that the season of the year, gestational age and pre-pregnancy BMI are the main factors determining the predisposition of pregnant women to vitamin D insufficiency and that, apparently, total 25(OH)D₃, as well as its free and bioavailable fractions, provide similar information about vitamin D status in Brazilian pregnant women. The results also suggest that although the evaluated SNPs were not associated with 25(OH)D₃ (both total and fractions), it appears that they may influence PTH concentrations, considered a marker of vitamin D function.

Keywords: Pregnancy. Vitamin D. Demographic determinants. SNP. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Categorias de indicadores de estado de vitamina D.....22

Figura 1 - Genes envolvidos (em azul) com a síntese e o metabolismo de vitamina D. ...28

Artigo 1

Figure 1 - Association between 25(OH)D3 and DBP and albumin. (A) positive correlation between 25(OH)D3 and albumin, (B) positive correlation between 25(OH)D3 and DBP..... 62

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1 -	General Characteristics of the study population.	60
Table 2 -	Concentrations of biochemical measures by category.....	61
Table 3 -	Linear regression data of variables predicting 25(OH)D3, DBP, PTH, free 25(OH)D3 and bioavailable 25(OH)D3 concentrations.	63
Table 4 -	Concentrations of fractions of 25(OH)D3 estimated by p-DBP and m-DBP assays.	63

Artigo 2

Tabela 1 -	Características gerais da população estudada (n=101).	77
Tabela 2 -	Frequências dos genótipos na população investigada.	78
Tabela 3 -	Comparação dos genótipos em função do estado de vitamina D.	78
Tabela 4 -	Concentração dos biomarcadores de vitamina D por categoria de genótipos dos SNPs.	79
Tabela 5 -	Associação entre os biomarcadores de estado de vitamina D e os genótipos dos SNPs investigados.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D	1,25-di-hidroxivitamina D
1 α -OHase	1 α -hidroxilase
7-DHC	7-dehidrocolesterol
24-OHase	24-hidroxilase
25-OHase	25-hidroxilase
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
25(OH)D ₃	25-hidroxivitamina D ₃
BMI	Body Mass Index
IMC	Índice de massa corporal
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos
DBP	Proteína ligante de vitamina D (do inglês <i>Vitamin D Binding Protein</i>)
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
HPLC-DAD	High performance liquid chromatography coupled with diode array detector
IL-6	Interleucina 6
ITA	Ângulo de tipologia individual
PTH	Paratormônio
PCR	Proteína C reativa
SEI	Índice exposição solar
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos)
UVB	Radiação ultravioleta B
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elementos de resposta à vitamina D (do inglês <i>vitamin D response element</i>)

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	14
	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1	Gestação como período de elevada demanda de nutrientes	17
1.2	Vitamina D – histórico, definição e metabolismo	17
1.3	Indicadores e métodos de avaliação do estado nutricional de vitamina D	20
1.4	Outros biomarcadores do estado de vitamina D	22
1.4.1	<u>Hormônio da paratireoide (PTH)</u>	23
1.4.2	<u>Proteína ligante de vitamina D, vitamina D livre e biodisponível</u>	24
1.5	Polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo de vitamina D	27
1.6	Determinantes do estado nutricional de vitamina D	29
1.7	Estado nutricional de vitamina D na gestação	31
2	HIPÓTESES	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Geral	36
3.2	Específicos	36
4	MÉTODOS	37
4.1	População e desenho de estudo	37
4.2	Aspectos Éticos	37
4.3	Determinação da pigmentação da pele constitutiva e por bronzamento	38
4.4	Análises Bioquímicas	38
4.4.1	<u>Coleta e preparo de amostras de sangue materno</u>	38
4.4.2	<u>Determinação da concentração sérica de 25-hidroxivitamina D</u>	39
4.4.3	<u>Determinação da concentração sérica de albumina</u>	39
4.4.4	<u>Determinação da concentração sérica de Proteína Ligante de Vitamina D (DBP)</u>	40
4.4.5	<u>Determinação da concentração de Hormônio da paratireoide</u>	40
4.5	Determinação das frações de 25(OH)D3 livre e biodisponível	41
4.6	Genotipagem dos polimorfismos genéticos	41
4.6.1	<u>Extração e purificação do DNA</u>	41
4.6.2	<u>Genotipagens de SNPs</u>	42
4.7	Análise de dados	42
5	RESULTADOS	44

5.1	Artigo 1: Investigation of biomarkers of vitamin D status in Brazilian pregnant women and their potential demographic and lifestyle determinants	44
5.1.1	<u>Introduction</u>	44
5.1.2	<u>Methods</u>	46
5.1.2.1	Study design and population	46
5.1.2.2	Blood collection and biochemical analyses.....	46
5.1.2.3	Skin color measurements.....	47
5.1.2.5	Statistical analysis	48
5.1.3	<u>Results</u>	48
5.1.4	<u>Discussion</u>	50
5.1.5	<u>Conclusions</u>	54
5.1.6	<u>References</u>	54
5.2	Artigo 2: Associação entre polimorfismos localizados no gene GC e as concentrações de biomarcadores de estado de vitamina D em gestantes	65
5.2.1	<u>Introdução</u>	65
5.2.2	<u>Métodos</u>	67
5.2.2.1	População de estudo	67
5.2.2.2	Coleta de sangue e análises bioquímicas.....	67
5.2.2.3	Determinação da pigmentação da pele	68
5.2.2.4	Genotipagem dos polimorfismos.....	69
5.2.2.5	Análise de dados.....	69
5.2.3	<u>Resultados</u>	70
5.2.4	<u>Discussão</u>	71
5.2.5	<u>Conclusão</u>	74
5.2.6	<u>Referências</u>	74
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	81
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A - Questionário estruturado	95
	APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido	99
	APÊNDICE C - Material educativo	100
	APÊNDICE D - Parecer consubstanciado do CEP	101
	APÊNDICE E - Sintaxe das análises do artigo 1	104
	APÊNDICE F - Sintaxe das análises do artigo 2	109

APRESENTAÇÃO

A presente Tese compreende um estudo transversal desenvolvido na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A investigação do estado nutricional de vitamina D em mulheres durante o período gestacional é particularmente importante devido às potenciais implicações da inadequação dessa vitamina para a saúde materna e fetal. Apesar da gestação estar associada a diversas alterações no metabolismo de vitamina D, os critérios utilizados para a definição do estado de vitamina D em mulheres durante o período gestacional são os mesmos empregados para a população adulta em geral. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar os biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em gestantes adultas bem como os seus determinantes sócio-demográficos, de estilo de vida e genéticos.

Durante o desenvolvimento da tese a aluna realizou o recrutamento, no Hospital Maternidade Herculano Pinheiro, das voluntárias estudadas assim como todas análises laboratoriais que compõe o presente trabalho, incluindo a determinação das concentrações séricas de 25(OH)D₃, da proteína ligante de vitamina D, de PTH e de albumina no Laboratório de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição (UERJ). A extração do DNA e as genotipagens dos SNPs investigados foram realizadas no Laboratório para Estudos de Interação entre Nutrição e Genética (UERJ).

Este documento se encontra estruturado nas seguintes secções: apresentação, introdução, revisão bibliográfica, hipóteses, objetivos, métodos, resultados e conclusões. Os questionários e os materiais complementares utilizados no momento da coleta de dados e de amostras biológicas das voluntárias que aceitaram participar do estudo estão apresentadas nas secções “apêndice”.

As secções de “resultados” e “discussão” foram desenvolvidas no formato de dois artigos científicos. O primeiro, intitulado “*Investigation of biomarkers of vitamin D status in Brazilian pregnant women and their potential demographic and lifestyle determinants*” e o segundo intitulado “*Associação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos localizados no gene GC e as concentrações de biomarcadores de estado de vitamina D em gestantes brasileiras*” serão em breve submetidos para periódicos de circulação internacional.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos revelam expressiva insuficiência de vitamina D em grupos populacionais de diferentes países, de vários continentes, em geral associada à fatores ambientais, sócio demográficos e de estilo de vida (MITHAL et al., 2009). Dentre os diferentes grupos populacionais, a investigação do estado de vitamina D em mulheres durante o período gestacional merece especial atenção devido às potenciais implicações da insuficiência dessa vitamina para a saúde materna e fetal.

A gestação é um estágio de importantes alterações biológicas, anatômicas e endócrinas incluindo a secreção aumentada de hormônios, a expansão do volume plasmático e da massa eritrocitária, a variação da composição corporal materna e à necessidade aumentada de nutrientes em resposta ao desenvolvimento dos tecidos materno e fetal (DONANGELO, BEZERRA, 2016). A demanda aumentada de cálcio, principalmente no terceiro trimestre de gestação, necessária para a síntese óssea fetal, induz adaptações metabólicas que incluem o aumento da eficiência de absorção intestinal de cálcio nesse período, que por sua vez depende de alterações fisiológicas no metabolismo de vitamina D (KOVACS, KRONENBERG, 1997), em especial, do incremento das concentrações séricas da forma ativa da vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)₂D], sendo até então, pouco esclarecido o impacto desse ajuste sobre as concentrações séricas de 25(OH)D, substrato para a síntese de 1,25(OH)₂D.

Mais recentemente o aumento da síntese hepática da proteína ligante de vitamina D (DBP), em especial no terceiro trimestre de gestação, tem sido relatado em estudos longitudinais (JASSIL et al., 2017; BEST et al., 2018; KARRAS et al., 2018). Considerando que, de acordo com a hipótese do “hormônio livre”, apenas os hormônios na sua forma livre, não complexados à proteínas transportadoras específicas, estariam sujeitos a exercerem as suas atividades biológicas (TSUPRYKOV et al., 2017), seria plausível considerar que as concentrações séricas de 25(OH)D total, considerado o melhor indicador de suficiência de vitamina D (NORMAN, 2008; HOLICK et al., 2011) em indivíduos saudáveis pode não refletir o real estado de vitamina D, em condições de alterações nas concentrações séricas da DBP, por não considerar a biodisponibilidade da vitamina D (KIM et al., 2017; TSUPRYKOV et al., 2019).

Diante do exposto tem sido postulado que a informação complementar a respeito das concentrações de outros biomarcadores associados ao estado de vitamina D, incluindo o hormônio da paratireoide (PTH), a DBP e as frações livre e biodisponível de vitamina D poderiam contribuir para a melhor determinação do estado de vitamina D em mulheres

durante o período gestacional (PRENTICE et al., 2008; BIKLE et al., 2017; TSUPRYKOV et al., 2017).

Sexo feminino, idade avançada, cor de pele escura, baixa exposição solar, baixa ingestão dietética e meses de inverno, tem sido considerados os principais determinantes das concentrações séricas de 25(OH)D em diferentes populações (HILGER et al., 2014; YAO et al., 2017). Além desses fatores, estudos sobre associações genéticas no campo da vitamina D, tem relatado que alguns polimorfismos genéticos de nucleotídeos únicos (SNPs) parecem estar associados às concentrações séricas e às funções de vitamina D no organismo humano. Nesse sentido, tem sido proposto que SNPs localizados em genes envolvidos com as vias de síntese e de metabolismo da vitamina D podem determinar a predisposição genética de indivíduos à inadequação do estado de vitamina D (JOLLIFFE et al., 2016).

Devido ao conhecimento ainda limitado a respeito da influência da gestação e de algumas características genéticas nas concentrações séricas do principal biomarcador do estado de vitamina D, consideramos oportuna a investigação, para a melhor determinação do estado nutricional de vitamina D materna, das concentrações séricas da 25(OH)D₃, de outros biomarcadores de estado de vitamina D e de polimorfismos localizados em genes envolvidos com o metabolismo e o transporte da vitamina D .

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Gestação como período de elevada demanda de nutrientes

A gestação representa um estágio do desenvolvimento humano responsável por importantes alterações fisiológicas e anatômicas no organismo materno (HOLLIS et al., 2017) que se iniciam no momento da nidação e se prolongam até o término da gestação (DAWES, CHOWIENCZYK, 2001). Os principais ajustes fisiológicos observados no metabolismo materno incluem mudanças na secreção de hormônios maternos, principalmente de progesterona e estrogênio, necessárias à manutenção da gestação, aumento do volume plasmático (45 a 50%) e da massa eritrocitária (15 a 20%), diminuição dos valores do hematócrito, mudanças na composição corporal materna e requerimento aumentado de nutrientes incluindo proteína, vitaminas e minerais, como consequência do desenvolvimento dos tecidos materno e fetal, transferência placentária de nutrientes e capacitação do organismo materno para a lactação (DONANGELO, BEZERRA, 2016).

Entre os nutrientes com demanda aumentada durante a gestação, figura o cálcio, em resposta à transferência placentária desse mineral (13 a 33g) para a formação do esqueleto fetal (KOVACS, KRONENBERG, 1997; ZHANG et al., 2014; KARRAS et al., 2017). Ajustes fisiológicos no organismo materno garantem o suprimento aumentado de cálcio sem que haja necessidade aumentada da sua ingestão por mulheres durante o período gestacional. Dentre as principais adaptações no metabolismo do cálcio já descritas, destaca-se o aumento da eficiência de absorção intestinal materna que ocorre na dependência da ação da vitamina D (HEANEY, SKILLMAN, 1971; BRANNON et al., 2011; BEST et al., 2018).

A definição das recomendações de ingestão de vitamina D é, no entanto, complexa devido às alterações fisiológicas e anatômicas no organismo materno e à compreensão, ainda limitada, a respeito das adaptações no metabolismo de vitamina D durante a gestação (BEST et al., 2018). Estudos têm sugerido que possíveis ajustes metabólicos responsáveis, em condições fisiológicas normais, pelo incremento das concentrações de vitamina D, assegurem a manutenção da saúde materna e fetal independente da maior ingestão e/ou suplementação dessa vitamina durante o período gestacional (IOM, 2011).

1.2 Vitamina D – histórico, definição e metabolismo

As primeiras descrições a respeito do raquitismo, ou doença de Glisson, surgiram no século XVII, em regiões da Holanda e da Inglaterra, onde a exposição solar era escassa ao longo do ano. Ainda que sem impacto na comunidade científica internacional, no século XIX

o professor polonês S'niadecki relatou a alta frequência de raquitismo em áreas urbanas e enfatizou o possível papel da radiação solar no tratamento da doença. Em 1919, o pesquisador Edward Mellamby, observou que os cães utilizados em suas pesquisas e desprovidos de exposição solar desenvolveram alterações esqueléticas semelhantes às observadas em crianças raquíticas, e que tais alterações foram evitadas nos animais administrados com doses diárias de óleo de peixe (PÉREZ-LOPEZ, 2007).

Na década de 1930, a vitamina D foi identificada por pesquisadores que estudavam as estruturas químicas de membros da família do colesterol (PÉREZ-LOPEZ, 2007). Atualmente, o termo “vitamina D” é utilizado para referenciar um grupo de moléculas secosteroides sintetizadas a partir do 7-deidrocolesterol (7-DHC) (CASTRO, 2011). Devido à similaridade da estrutura química e mecanismo de ação biológica, a forma ativa da vitamina D é considerada um hormônio esteroide. Atualmente, atribui-se a esse hormônio uma ação pleiotrópica que vem sendo crescentemente investigada em relação às diversas ações biológicas relacionadas à saúde humana, para além da homeostasia do cálcio e metabolismo ósseo (CHRISTAKOS et al., 2016).

Apesar de ser obtida através da ingestão de determinados alimentos de origem animal (colecalfiferol, vitamina D₃), incluindo peixes gordurosos de água de fria e profunda, e alimentos de origem vegetal e fungos comestíveis (ergosterol, vitamina D₂), a principal fonte de vitamina D é a síntese cutânea. Na pele, a síntese da vitamina D é iniciada no estrato basal e espinhoso do tecido epitelial onde está armazenado o composto precursor da vitamina D, o 7-DHC. A absorção cutânea da radiação solar, especialmente a ultravioleta (UVB), nos comprimentos de onda entre 290 e 315 nanômetros (nm), promove a conversão do 7-DHC, a partir da ruptura da ligação presente entre os carbonos 9 e 10 do anel B, em pré-vitamina D₃ (CASTRO, 2011), que por sua vez é termicamente isomerizada à vitamina D₃ (CHEN et al., 2007).

A síntese cutânea de vitamina D parece ser influenciada por diversas variáveis incluindo, o uso frequente de protetor solar, a pigmentação da pele, o ângulo de incidência da luz solar sobre a Terra (zênite solar) e a latitude. O ângulo zenital, maior durante os meses de inverno e proporcional à latitude, promove a redução da incidência de radiação solar sob a Terra e, consequentemente, a diminuição da síntese cutânea de vitamina D₃ (WEBB et al., 1988). Além disso, o processo inicial de ativação da vitamina D também parece depender da pigmentação da pele (CHEN et al., 2007; MCCARTY., 2008) uma vez que a melanina compete com o 7-DHC pela absorção da radiação UVB (MITHAL et al., 2009). Com o intuito de evitar a síntese excessiva de colecalfiferol, em situação de prolongada exposição cutânea à luz solar, o organismo humano faz o uso de um mecanismo de proteção, a partir da absorção de fótons UVB pela pré-vitamina D₃ e sua isomerização em metabólitos biologicamente inativos incluindo o lumesterol, taquisterol, 5,6-transvitamina D₃ e suprasterol (WEBB et al., 1988).

Independente da origem, dietética ou a partir da síntese cutânea, a vitamina D é transportada até o fígado, complexada a proteínas transportadoras específicas como a albumina e, principalmente, a proteína ligante de vitamina D (DBP) (CHUN et al., 2014). No fígado, a vitamina D é convertida pela enzima vitamina D-25-hidroxilase (25-OHase, gene *CYP2R1*) em 25-hidroxivitamina D (calcidiol, 25(OH)D₃ e 25(OH)D₂), o principal metabólito circulante de vitamina D (NORMAN, 2008; HOLICK et al., 2011). Por não apresentar funções biológicas específicas, a 25(OH)D ligada às proteínas transportadoras é sequencialmente metabolizada no túbulo renal proximal pela enzima 25(OH)D-1 α -hidroxilase (1 α -OHase, gene *CYP27B1*), resultando na síntese da 1,25-dihidroxivitamina D (calcitriol, 1,25(OH)₂D), metabólito responsável pelas ações biológicas da vitamina D (CHRISTAKOS et al., 2016). A síntese renal de 1,25(OH)₂D é regulada pelas concentrações séricas de cálcio, de fósforo, do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) e do paratormônio (PTH) (HOLICK, 2011) que parecem também determinar a expressão/atividade renal da CYP27B1 (WEBSKY et al., 2018). Um importante mecanismo de proteção contra a síntese excessiva da 1,25(OH)₂D, é a sua conversão renal, pela enzima 25-hidroxivitaminaD-24-OHase (24-OHase, gene *CYP24A1*), nos metabólitos intermediários 24,25(OH)₂D e 1,24,25(OH)₃D (ZIEROLD et al., 2003).

As ações biológicas da 1,25(OH)₂D são mediadas pela sua ligação com o receptor de vitamina D (VDR), um fator de transcrição pertencente à família de receptores de esteroides nucleares, incluindo os receptores de ácido retinóico, de hormônios tireoidianos e sexuais (MARGOLIS, CHRISTAKOS., 2010). A 1,25(OH)₂D, através da interação com o VDR regula de forma direta e indireta a expressão de aproximadamente 2000 genes humanos, muitos dos quais apresentam em sua região promotora elementos de resposta à vitamina D (VDRE, Vitamin D Response Element) (WEBSKY et al., 2018).

A principal função biológica da vitamina D é a sua atuação na homeostasia do cálcio através do controle da troca de íons de cálcio e de fosfato na membrana celular dos enterócitos, das células tubulares renais e dos miócitos, favorecendo a adequada mineralização e desenvolvimento do esqueleto em crianças e adolescentes e manutenção da saúde óssea no decorrer da vida (HOLICK, 2007).

Além disso, a expressão do VDR e da enzima 1 α -hidroxilase em células humanas não relacionadas ao metabolismo do cálcio incluindo as células do sistema imunológico (macrófagos, linfócitos B e linfócitos T e células dendríticas), neurônios, células placentárias e do sistema nervoso central (JONES et al., 1998) sugere que a atuação da vitamina D no organismo humano não se limita à manutenção da saúde óssea.

Nesse contexto, estudos recentes tem relatado que a vitamina D esteja envolvida na modulação do sistema imune adaptativo através da ativação de células T reguladoras (BIKLE, 2008; KAMEN et al., 2010), na proteção do sistema nervoso central contra radicais livres (BISCHOFF-FERRARI et al., 2006), no sistema cardiovascular, regulando a contractilidade e o relaxamento da musculatura cardíaca (PUSCEDDU et al., 2015). Durante a gestação, a expressão placentária do VDR, principalmente no terceiro trimestre de gestação (SHAHBAZI et al., 2011), indicam a atuação da vitamina D na implantação embrionária, na vascularização placentária (JI et al., 2017) e nos desfechos relacionados à gestação incluindo, o desenvolvimento de distúrbios hipertensivos gestacionais (BACA et al., 2016; BAKACAK et al., 2015; BÄREBRING et al., 2016) parto prematuro e baixo peso ao nascer (DROR, ALLEN, 2010; CHUN et al., 2016).

1.3 Indicadores e métodos de avaliação do estado nutricional de vitamina D

Nos últimos 10 anos a percepção do que se constitui um estado adequado em vitamina D vem sofrendo intensa revisão. Até então, a inadequação de vitamina D era definida por critérios básicos de presença ou ausência de doenças ósseas (raquitismo em crianças e osteomalácia em adultos), usualmente associados à concentrações muito baixas da principal forma circulante dessa vitamina, a 25(OH)D. Essas definições sofreram e vêm sofrendo intensas modificações de forma que valores (não consensuais) mais altos de 25(OH)D têm sido adotados como referência para a definição de um estado ótimo de vitamina D (HOLICK, 2007).

As diretrizes atuais consideram a determinação da concentração sérica de 25(OH)D o melhor indicador do estado nutricional de vitamina D (NORMAN, 2008; HOLICK et al., 2011). Devido a sua meia-vida de 2 a 3 semanas, as concentrações séricas de 25(OH)D oscilam pouco em um curto período, e por isso, refletem tanto a ingestão dietética quanto a síntese cutânea de vitamina D (NORMAN, 2008). Além disso, estudos determinaram que as concentrações de 25(OH)D estão fortemente associadas aos desfechos clássicos de adequação de vitamina D (BISCHOFF-FERRARI et al., 2006), incluindo a mineralização óssea, o risco de fraturas (PRIEMEL et al., 2010) e de eventos cardiovasculares, as causas de mortalidade (DOBNIG et al., 2008) e a supressão das concentrações séricas de PTH circulante (HARRIS et al., 2003).

Embora a 1,25(OH)₂D seja o metabólito de vitamina D com atividade biológica específica, a sua utilização como indicador do estado nutricional de vitamina D é pouco

indicada pelas diretrizes atuais, devido a sua regulação por fatores como o PTH e o cálcio/fosfato sérico. Além disso, a sua meia-vida, de aproximadamente 4 horas, determina uma significativa variabilidade intra-individual das suas concentrações séricas. Do ponto de vista analítico, a dosagem de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é desafiadora devido às suas concentrações 1000 vezes menores que as da $25(\text{OH})\text{D}$ e a escassez de métodos de referência aceitos internacionalmente (HERRMANN et al., 2017).

Diferentes pontos de corte, baseados nas concentrações séricas de $25(\text{OH})\text{D}$ foram sugeridos pelo Instituto de Medicina Americano e pela Sociedade Americana de Endocrinologia, como indicadores do estado de vitamina D em indivíduos saudáveis. A Sociedade Americana de Endocrinologia defende que concentrações séricas de 75 nmol/mL (30ng/mL), sejam adotadas como ponto de corte para definir suficiência de vitamina D (HOLICK et al., 2011). Por outro lado, segundo o Instituto de Medicina americano (IOM, 2011), as concentrações séricas de 50 nmol/L (20ng/mL) atenderiam os requerimentos de vitamina D em 97,5% da população geral, enquanto concentrações séricas de 75 nmol/mL (30ng/mL), não proporcionam maiores benefícios à saúde esquelética, incluindo a absorção intestinal de cálcio, a densidade mineral óssea e a maior proteção ao desenvolvimento de osteomalácia em adultos e raquitismo em crianças, quando comparadas às concentrações de 50 nmol/L.

Diferentes métodos analíticos para a determinação das concentrações séricas de vitamina D têm sido reportados na literatura (SEAMARK et al., 1981; SHIMADA, KOBAYASHI, 1991; CARTER, 2011; HERRMANN et al., 2017). Esses métodos são baseados na separação dos diferentes metabólitos de vitamina D por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e por Cromatografia Gasosa (CG) com diferentes sistemas de detecção, incluindo os detectores fotométricos ou seletivos de massas (KICH et al., 2012; HERMMANN et al., 2017) e os métodos de radioimunoensaio e imunoensaios enzimáticos (BRUNETTO et al., 2004). Os estudos mais recentes tem considerado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência o método preferencial para a determinação das concentrações plasmáticas de vitamina D. Uma das principais vantagens dessa metodologia é a possibilidade de separação e quantificação de forma independente e simultânea dos diferentes metabólitos de vitamina D (KICH et al., 2012) e maior especificidade e precisão dos resultados (LENSMEYER et al., 2006; CARTER et al., 2017).

1.4 Outros biomarcadores do estado de vitamina D

Ainda que a concentração sérica de 25(OH)D seja preferencialmente utilizada como indicador de suficiência de vitamina D (HOLLIS, WAGNER, 2005; BISCHOFF-FERRARI et al., 2006), tem sido sugerido que a informação complementar a respeito de outros biomarcadores poderia contribuir para uma melhor avaliação do estado nutricional dessa vitamina em indivíduos saudáveis (PRENTICE et al., 2008; BIKLE et al., 2017; TSUPRYKOV et al., 2017). Quatro diferentes categorias de indicadores já foram sugeridas (**Quadro 1**): os indicadores de suprimento aos tecidos; os indicadores de função, que fornecem informação sobre a resposta biológica; desfechos intermediários, que fornecem informações sobre o risco de doença; e as manifestações clínicas propriamente ditas (PRENTICE et al., 2008).

Quadro 1 - Categorias de indicadores de estado de vitamina D.

Categoria	Indicador de estado de vitamina D
Indicador de suprimento tecidual	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamina D circulante • 25(OH)D • 25(OH)D livre • 25(OH)D biodisponível • 25(OH)D livre /25(OH)D total
Indicador de função biológica	<ul style="list-style-type: none"> • 1,25(OH)₂D • PTH • 1,25(OH)₂livre/1,25(OH)₂D total • 1,25(OH)₂D/25(OH)D • 1,25(OH)₂D/24,25(OH)₂D
Desfechos intermediários	<ul style="list-style-type: none"> • Absorção intestinal de cálcio • Densidade mineral óssea • Função muscular/risco de quedas
Manifestações clínicas	<ul style="list-style-type: none"> • Raquitismo/osteomalácia • Osteoporose/fraturas

Fonte: Prentice et al., 2008.

1.4.1 Hormônio da paratireoide (PTH)

A utilização do PTH como biomarcador complementar do estado de vitamina D tem sido sugerida (MALABAN et al., 1998; PRENTICE et al., 2008) devido a sua participação na homeostase do cálcio (PRENTICE, 2007). Em condições fisiológicas normais, a secreção do PTH, pelas glândulas da paratireoide é estimulada em resposta à hipocalcemia decorrente da baixa ingestão de cálcio dietético, da absorção intestinal reduzida ou devido à maior demanda de cálcio pelo organismo (PRENTICE et al., 2008). A síntese aumentada de PTH por sua vez, estimula a expressão da 1- α -hidroxilase, favorecendo a conversão da 25(OH)D em 1,25(OH)₂D (CASTRO et al., 2011). Embora alguns estudos não tenham relatado associação entre as concentrações de PTH e de 25(OH)D em diferentes populações (POWE et al., 2011; REID et al., 2011; LAI et al., 2015; AL-DAGHRI et al., 2017), a relação inversa entre a 25(OH)D circulante e o PTH tem sido mais frequentemente observada, na população geral, em estudos transversais e longitudinais (DENBURG et al., 2013; ALOIA et al., 2015; AGGARWAL et al., 2016; OLERÖD et al., 2017).

Considerando as adaptações fisiológicas maternas no metabolismo de vitamina D devido à maior necessidade de absorção intestinal de cálcio para o desenvolvimento do esqueleto fetal, mesmo em condições de inadequação de vitamina D, é de se esperar que a correlação entre as concentrações de 25(OH)D circulante e de PTH em gestantes seja diferente da observada em outros estágios reprodutivos (KRAMER et al., 2016).

Estudos prévios transversais sugeriram fraca correlação entre as concentrações de 25(OH)D e PTH durante a gestação (HADDOW et al., 2011; WAGNER, HOLLIS., 2011). Kramer e colaboradores (2016) determinaram, em estudo longitudinal, resultados divergentes ao correlacionarem as concentrações de 25(OH)D e de PTH em mulheres durante o período gestacional e após o parto. Foi investigado pelos autores o limiar de 25(OH)D abaixo do qual é observado o aumento de PTH circulante. Os resultados revelaram que durante a gestação e doze meses após o parto a concentração de 25(OH)D abaixo da qual é observado o incremento de PTH é de 32,5 ng/mL e 32,4 ng/mL, respectivamente. Apesar disso, a magnitude do estímulo da síntese de PTH quando a concentração de 25(OH)D está na faixa entre 16 e 36 ng/mL parece ser maior em mulheres durante o período gestacional. Esses resultados foram reforçados por Gustafsson e colaboradores (2018) ao relatarem, em estudo longitudinal, a supressão das concentrações de PTH em gestantes quando a concentração de 25(OH)D circulante foi maior que 29,6 ng/mL. Em estudo longitudinal conduzido em

gestantes adolescentes, foi observada correlação inversa entre o PTH e a 25(OH)D apenas no momento do parto (BEST et al., 2018).

Considerando a similaridade dos limiares de 25(OH)D associados à supressão do PTH em mulheres gestantes e não gestantes é possível que as concentrações de PTH durante a gestação, também possam refletir, assim como na população em geral, informações adicionais a respeito do estado nutricional de vitamina D.

A escolha do método para a determinação das concentrações séricas de PTH é de grande importância, uma vez que alguns ensaios parecem superestimar as concentrações de PTH (1-84 aminoácidos) (LEPAGE et al., 1998; JOHN et al., 1999) por reagirem com fragmentos (7-84 aminoácidos) que não possuem os seis primeiros aminoácidos da molécula intacta (SOUBERBIELLE et al., 2001). Atualmente, as concentrações séricas de PTH são determinadas, preferencialmente, por ensaios que reconhecem apenas a molécula intacta, incluindo, o ensaio imunorradiométrico (SOUBERBIELLE et al., 2001), o ensaio imuno electroquimioluminescência (KRAMER et al., 2016; GUSTAFSSON et al., 2018) e o ensaio imonoenzimático (BEST et al., 2018; JONES et al., 2018).

1.4.2 Proteína ligante de vitamina D, vitamina D livre e biodisponível

Apesar de existir um consenso de que a determinação da concentração sérica de 25(OH)D é considerada o melhor indicador do estado nutricional de vitamina D (NORMAN, 2008; HOLICK et al., 2011), a biodisponibilidade de vitamina D nos tecidos extra-renais parece depender da fração de 25(OH)D circulante não ligada a proteínas séricas transportadoras (NIELSON et al., 2016). Nesse contexto, a “hipótese do hormônio livre”, bem estabelecida para hormônios esteroides sexuais e tireoidianos (MENDEL, 1992; VERMEULEN et al., 1999), postula que os hormônios complexados a proteínas transportadoras específicas são biologicamente inativos enquanto os hormônios na sua forma livre estariam sujeitos a exercerem a sua atividade biológica ao serem difundidos através da membrana celular de suas células-alvo (CHUN et al., 2014; DELANGHE et al., 2015; JASSIL et al., 2017; TSUPRYKOV et al., 2017).

Alguns estudos a respeito dos mecanismos pelos quais os hormônios esteroides interagem com as suas respectivas células-alvo têm sugerido a expressão de proteínas transmembranas na superfície das células epiteliais do túbulo proximal, incluindo a megalina e a cubalina que facilitariam a captação e a endocitose do complexo 25(OH)D-DBP (NYKJAER et al., 1999; CHUN et al., 2014). À exceção da existência do mecanismo de

captação renal do complexo 25(OH)D-DBP, é bem aceito que a maior parte das células humanas é exposta às frações não ligadas de vitamina D, sendo portanto, as frações livre e biodisponível de 25(OH)D altamente relevantes para a síntese e a ação local de 1,25(OH)₂D (BIKLE et al., 2017).

Devido a sua lipofilicidade, a maior parte da 25(OH)D₃ circulante encontra-se fortemente associada à DBP (85 a 90%) (TSUPRYKOV et al., 2017) de 10 a 15% fracamente complexada à albumina e aproximadamente 0,01% está disponível na sua forma livre, não ligada (BIKLE et al., 2017). Sendo assim, a “vitamina D biodisponível” é representada pela soma das frações de vitamina D livre e da fração de vitamina D ligada à albumina, enquanto a “vitamina D total” se refere a soma das frações de vitamina D livre e das frações ligadas à albumina e à DBP (TSUPRYKOV et al., 2017).

A DBP, também conhecida como componente específico do soro (GC-globulina) (FENDO et al., 2013) é uma glicoproteína plasmática, composta por 458 aminoácidos, sintetizada principalmente pelas células do parênquima hepático (CHUN et al., 2012; LIONG et al., 2013). As três principais formas polimórficas da DBP (GC1F, GC1S e GC2), são formadas por sequências de aminoácidos idênticas exceto nas posições 416 e 420 da cadeia carbônica. Quando comparadas à isoforma GC1F, a GC1S possui, na posição 416, o ácido glutâmico no lugar do ácido aspártico, enquanto na posição 420 da isoforma GC2 a tirosina é substituída pela lisina (CHUN et al., 2012).

Há condições fisiológicas específicas que parecem determinar o incremento das concentrações de DBP circulante. Estudos *in vitro* (BASTARD et al., 2000; GUHA et al., 1995) relataram que as maiores concentrações de citocinas inflamatórias, em particular, a interleucina 6 (IL-6) e de estrogênio livre em indivíduos em condições de obesidade, poderia atuar como agente potencializador da síntese hepática de DBP em indivíduos obesos (KARLSSON et al., 2012; SAARNIO et al., 2018).

Em mulheres durante o período gestacional, a síntese hepática de DBP é estimulada por hormônios esteroides sexuais, em particular o estrogênio, fisiologicamente aumentado durante esse período fisiológico (BOUILLON et al., 1977; BIKLE et al., 1984; VAN HOOFF et al., 2001; JONES et al., 2016). Ainda que com relatos de magnitude muito variada, estudos longitudinais, conduzidos em gestantes, têm reportado aumento das concentrações de DBP variando de 40 a 100%, com concentrações máximas atingidas no terceiro trimestre de gestação (ZHANG et al., 2014; TSUPRYKOV et al., 2018). Jones e colaboradores (2016) ao avaliarem, em

estudo longitudinal, as concentrações de alguns indicadores bioquímicos envolvidos no metabolismo da vitamina D relataram maiores concentrações de DBP (778 ± 128 mg/L) nas mulheres durante o terceiro trimestre de gestação quando comparadas às lactantes (461 ± 63 mg/L) e ao grupo controle (482 ± 60 mg/L). Como consequência, as mulheres durante o período gestacional também apresentaram as menores concentrações de 25(OH)D₃ livre e biodisponível. Tsuprykov e colaboradores (2018) em estudo longitudinal investigando as concentrações de 25(OH)D total e livre em gestantes determinaram concentrações máximas de DBP e redução de 25(OH)D livre no terceiro trimestre de gestação.

As frações de 25(OH)D livre e biodisponível podem ser calculadas diretamente, por ensaio imunoenzimático (Future Diagnostics Solutions B.V. Wijchen, Holanda) (KANE et al., 2013; ALOIA et al., 2015; SCHWARTZ et al., 2016) ou por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS-MS) (JASSIL et al., 2017), ou indiretamente a partir das concentrações de 25(OH)D total, albumina e DBP, por ensaio imunoenzimático com anticorpo monoclonal ou policlonal, e das constantes de afinidade da DBP e da albumina com a 25(OH)D (BOUILLON et al., 1981; BIKLE et al., 1986; POWE et al., 2011; CHUN et al., 2014; JOHNSON et al., 2014; JONES et al., 2016).

Estudos recentes têm relado, particularmente em populações multirraciais, menor precisão dos valores de vitamina D livre quando utilizados ensaios monoclonais para a determinação das concentrações de DBP circulante (JEMIELITA et al., 2016; SRIKANTH et al., 2016). Powe e colaboradores (2013) relataram menores concentrações de 25(OH)D total e de DBP, por ensaio imunoenzimático utilizando anticorpo monoclonal, em afro-americanos quando comparadas às observadas em indivíduos brancos. Aparentemente, os ensaios monoclonais, por reconhecerem apenas um epítipo do antígeno próximo à região polimórfica da proteína (JASSIL et al., 2017), apresentam menor afinidade a isoforma de DBP Gc1f, mais frequente em populações de descendência africana (NIELSON, 2016; TSUPRYKOV et al., 2017), resultando em valores subestimados de DBP nessa população, quando comparado ao anticorpo policlonal que apresenta a mesma afinidade às três isoformas de DBP (ALOIA et al., 2015; HENDERSON et al., 2016).

A evidência de que os resultados gerados pelo ensaio monoclonal são dependentes das isoformas de DBP foi reforçada por Hoofnagle e colaboradores (2015) em estudo metodológico comparando as concentrações de DBP calculada diretamente, por HPLC-MS-MS e indiretamente por ensaio imunoenzimático monoclonal e policlonal. A utilização do ensaio monoclonal resultou em subestimação dos níveis de DBP em indivíduos negros

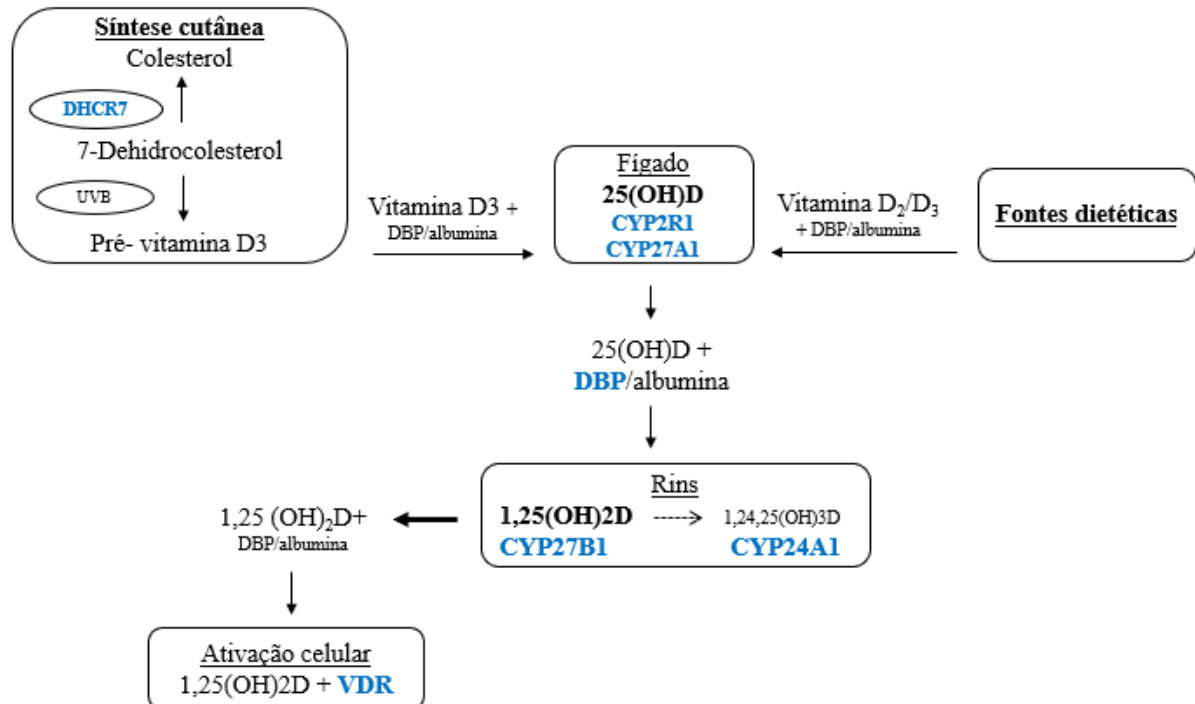
enquanto as concentrações reveladas por HPLC-MS/MS e por ensaio imunoenzimático policlonal não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Essa hipótese foi apoiada, por Nielson e colaboradores (2016), ao determinarem concentração média de DBP aproximadamente 50% menor em indivíduos de descendência africana, enquanto as concentrações determinadas por ensaio policlonal não diferiram entre os indivíduos brancos e negros.

1.5 Polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo de vitamina D

O primeiro polimorfismo genético envolvido com a via metabólica de vitamina D foi relatado há 25 anos, quando Morrison e colaboradores (1992) investigaram associações existentes entre algumas variantes alélicas no gene que codifica o receptor de vitamina D (VDR) e a densidade mineral óssea da população estudada.

Desde então, estudos sobre polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) localizados em genes envolvidos com a síntese e o metabolismo da vitamina D têm sido frequentemente realizados. Jolliffe e colaboradores (2016) realizaram uma revisão de literatura com o intuito de identificar associações entre os desfechos esqueléticos e bioquímicos de adequação de vitamina D e SNPs localizados em genes envolvidos nas vias metabólicas da vitamina D incluindo: *DHCR7*, *CYP2R1*, *CYP3A4*, *CYP27A1*, *DBP*, *LRP2*, *CUBN*, *CYP27B1*, *CYP24A1*, *VDR* e *RXRA* (**Figura 1**). Dos 120 estudos selecionados, 44 relataram ao menos uma associação entre um SNP e as concentrações séricas de 25(OH)D e/ou 1,25(OH)₂D. Os polimorfismos localizados nos genes que codificam a DBP (GC - LAURIDSEN et al., 2005; FU et al., 2009; AHN et al., 2010), a 25-hidroxilase (*CYP2R1* - WANG et al., 2010; HASSANEIN et al., 2014) e a 7-deidrocolesterol redutase (*DHCR7* - ZHANG et al., 2012; CHEUNG et al., 2013; VOIPIO et al., 2015) foram os mais frequentemente associados com as concentrações de 25(OH)D circulantes.

Figura 1 - Genes envolvidos (em azul) com a síntese e o metabolismo de vitamina D.



Fonte: Adaptado JOLLIFFE et al., 2016.

A proteína ligante de vitamina D, também conhecida como componente específico do soro (GC-globulina) (FENDO et al., 2018) é uma glicoproteína plasmática, membro da família dos genes da albumina, α -fetoproteína e da α -albumina/afamina, codificada pelo gene *GC*. Tem sido reportado, em estudos de associação pangenômica, que grande parte dos efeitos polimórficos sobre o estado de vitamina D estão associados a polimorfismos no gene *GC*, em particular o rs2282679, o rs4588 e o rs7041 (BOUILLON et al., 2017).

Powe e colaboradores (2013) relataram, em estudo multirracial, que a presença do alelo T (G>T) no SNP rs7041 e do alelo A (C>A) no SNP rs4588 determinaram a redução das concentrações séricas de 25(OH)D. Estudo transversal conduzido em adolescentes observou diferença significativa nas concentrações de 25(OH)D e PTH em função dos diferentes genótipos no SNP rs4588, de forma que os indivíduos com o alelo T foram associados às menores concentrações de ambos os biomarcadores (PEKKINEN et al., 2014).

Estudos conduzidos em gestantes investigando associações entre polimorfismos localizados no gene *GC* e as concentrações de biomarcadores de estado de vitamina D são escassos e tem revelado resultados conflitantes. Estudo de coorte associou a presença do alelo T no SNP rs4588 e do alelo C no SNP rs7041 à redução das concentrações de 25(OH)D em gestantes chinesas. Além disso, diferentes combinações alélicas no rs2282679 (T>G), também determinaram as concentrações maternas de 25(OH)D (SHAO et al., 2017). Esses dados

foram de acordo com estudo transversal, conduzido em gestantes norueguesas, que associou os diferentes genótipos no SNP 2282679 às concentrações séricas de 25(OH)D (STØRDAL et al., 2017). O alelo A no SNP rs2282679 foi associado, após ajuste pelas potenciais covariáveis, ao aumento das concentrações séricas de 25(OH)D₃ em resposta à suplementação com vitamina D₃ em gestantes britânicas, sem associação entre o SNP investigado e as concentrações basais de 25(OH)D₃ (MOON et al., 2017). Nenhuma associação significativa foi observada entre os diferentes genótipos nos SNPs rs4588 e rs7041 e as concentrações de 25(OH)D total e biodisponível em mulheres chinesas no terceiro trimestre de gestação (KIM et al., 2019).

1.6 Determinantes do estado nutricional de vitamina D

A insuficiência de vitamina D é considerada um problema de saúde pública, atingindo cerca de 1 bilhão de pessoas ao redor do mundo (HOLICK et al., 2007; PALACIOS C, GONZALEZ, 2014). Mulheres durante o período gestacional são reconhecidas como grupo de risco para a inadequação de vitamina D em resposta, principalmente, ao aumento da demanda dessa vitamina para o desenvolvimento do esqueleto fetal (HOLICK et al., 2007; KELISHADI et al., 2013; PRATUMVINIT et al., 2015). Adotando o ponto de corte <50nmol/L (IOM, 2011), em revisão sistemática, uma ampla variação de prevalência de insuficiência foi observada entre gestantes em diferentes países, com relatos de prevalência variando de 46% na Europa Oriental a 87 % na Ásia Oriental (SARAF et al., 2015). No Brasil, poucos estudos foram realizados até o presente momento. Em estudo conduzido em adolescentes brasileiras durante o terceiro trimestre de gestação, foi observada prevalência de inadequação atingindo 43% das mulheres (DIOGENES et al., 2013). Mais recentemente, estudo de coorte, com 299 gestantes no terceiro trimestre de gestação atendidas em um centro de saúde pública no estado do Rio de Janeiro revelou prevalência de insuficiência em 10,2% das gestantes avaliadas (FIGUEIREDO et al., 2017).

O estado de vitamina D parece ser determinado por inúmeros fatores ambientais, sócio demográficos e de estilo de vida, incluindo, a exposição à radiação UVB, a estação do ano, a ingestão dietética de alimentos fonte e/ou fortificados com vitamina D, o índice de massa corporal, a idade e a raça/etnia (HOLICK et al., 2002; GANZ et al., 2018). Além disso, evidências recentes sugerem que fatores genéticos, incluindo alguns polimorfismos genéticos (abordados no tópico “Polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo de vitamina D”) também desempenham um importante papel na determinação das concentrações séricas de

25(OH)D (JOLLIFFE et al., 2016; CHUN et al., 2017; SHAO et al., 2017; MEZZAVILLA et al., 2018).

Em meta-análise Mithal e colaboradores (2009) investigaram os principais determinantes do estado de vitamina D em diferentes grupos populacionais de seis diferentes regiões incluindo a Ásia, a Europa, a América Latina, o Oriente Médio/África, a América do Norte e a Oceania. Como resultado foi relatado que o país de origem, as características genéticas e comportamentais, a latitude e a estação do ano foram determinantes do estado de vitamina D. Em estudo mais recente, Brouwer-Brolsma e colaboradores (2016) concluíram que a exposição solar, a ingestão dietética de vitamina D e os fatores genéticos explicaram 35% da variabilidade inter-individual das concentrações de 25(OH)D circulante.

Yao e colaboradores (2017) investigaram os determinantes do estado de vitamina D em mulheres saudáveis afro-americanas (n=909) e americanas com descendência europeia (n=847). Embora tenha sido relatado que os fatores demográficos e de estilo de vida incluindo a obesidade, a estação do ano, o uso de suplemento vitamínico e a prática de exercício físico tenham efeitos semelhantes sobre as concentrações de 25(OH)D nos diferentes grupos raciais, a associação com a ingestão dietética de vitamina D foi significativa apenas nas mulheres negras, enquanto o tabagismo e o consumo de álcool foram significativos nas mulheres brancas.

Estudos têm relatado que os determinantes do estado nutricional de vitamina D em mulheres durante o período gestacional são similares aos observados na população em geral, e incluem a pigmentação da pele (BREMBECK et al., 2013; RICHARD et al., 2017) a adiposidade, a latitude de residência (BODNAR et al., 2007), a ingestão de alimentos ricos e/ou fortificados com vitamina D, o uso de suplementos vitamínicos (JENSEN et al., 2012) e de protetores solares (RICHARD et al., 2017).

Krieger e colaboradores (2018), ao avaliarem o estado nutricional de vitamina D de mulheres no terceiro trimestre de gestação, identificaram a escolaridade, a latitude, a estação do ano de ocorrência do parto e principalmente, a administração oral de suplemento de vitamina D como os principais determinantes de adequação do estado de vitamina D. Não foi determinada, no entanto, relação entre a pigmentação da pele e as concentrações séricas de 25(OH)D. Esses resultados foram apoiados, em parte, por Best e colaboradores (2018) ao relatarem influência da estação do ano de ocorrência do parto e da raça nas concentrações de 25(OH)D maternas, menores durante o inverno e entre as gestantes negras.

1.7 Estado nutricional de vitamina D na gestação

Aparentemente, a inadequação de vitamina D é maior em mulheres durante a gestação e lactação e preocupa pelo potencial impacto não apenas na saúde da mãe, incluindo o desenvolvimento de distúrbios hipertensivos, tais como, hipertensão gestacional, pré eclampsia e eclampsia, diabetes gestacional, quadros infecciosos e aumento da mortalidade materna (DAWODU, Wagner, 2007; ZHANG et al., 2008), mas também do feto (baixo comprimento e peso ao nascer, parto prematuro, reduzido perímetro cefálico) (CHEN et al., 2017).

Durante a gestação, a principal adaptação fisiológica no metabolismo de vitamina D ocorre em resposta à maior demanda de cálcio para o desenvolvimento do esqueleto fetal (BRUNS, BRUNS, 1983; DROR, ALLEN, 2010), independente da ingestão materna de cálcio dietético (RITCHIE et al., 1998). Em condições normais de saúde materna, a manutenção da saúde óssea fetal é acompanhada pelo incremento da síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, responsável em parte, pelo aumento da eficiência da absorção intestinal de cálcio, em até 200% no terceiro trimestre de gestação e normalização ao final da gravidez (KENT et al., 1991).

Embora o mecanismo pelo qual ocorre o aumento das concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ não seja completamente esclarecido, já foi sugerido que pode ser resultado da maior expressão da $1-\alpha$ -hidroxilase (VERHAEGHE et al., 1992) em sítios extra-renais, no organismo materno, incluindo células placentárias e da camada funcional do endométrio (decídua). No entanto, Zehnder e colaboradores (2002) determinaram a expressão de $1-\alpha$ -hidroxilase 1000 vezes maior na decídua e 80 vezes maior na placenta humana durante o primeiro e o segundo trimestre de gestação. Esses resultados sugerem que se fosse a expressão da $1-\alpha$ -hidroxilase em tecidos extra-renais maternos o principal mecanismo responsável pelo aumento da concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, poderia se esperar um o incremento simultâneo da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ circulante nos estágios iniciais da gestação. Assim, parece ser mais plausível, que as concentrações séricas aumentadas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, a partir do terceiro trimestre de gestação, seja devido à maior expressão de $1-\alpha$ -hidroxilase nos rins maternos e independente da síntese extra renal (KOVACS, 2008; GRAY, LESTER, 1981).

De forma simultânea à elevação da síntese materna de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, o aumento das concentrações séricas de DBP a partir do segundo trimestre de gestação também é frequentemente observado em estudos transversais (BIKLE et al., 1986; JONES et al., 2014) e

longitudinais (ZHANG et al., 2014), ainda que os relatos a respeito da magnitude desse aumento sejam bastante variáveis.

O mecanismo pelo qual ocorre o aumento da expressão hepática de DBP durante a gestação é ainda desconhecido. Estudos apoiam a hipótese de que o aumento da síntese hepática de DBP possa ser estimulada em função da concentração, naturalmente mais elevada, de estrogênio durante a gestação (WESTPHAL, 1971; HADDAD et al., 1976; ZHANG et al., 2014; TSUPRYKOV et al., 2017). Estudo prévio determinou maiores concentrações séricas de DBP em mulheres na pós-menopausa administradas com doses orais de estrogênio (DICK et al., 1995). Estudos mais recentes, utilizando ensaio imunoenzimático (anticorpo monoclonal e policlonal), também têm observado concentrações aumentadas de DBP em mulheres durante o período gestacional, sendo relatados na literatura valores variando de 225 mg/L a 775 mg/L (KIM et al., 2016; JONES et al., 2016).

Embora a gestação esteja associada à alterações no metabolismo de vitamina D, o impacto dessas adaptações nas concentrações séricas dos biomarcadores do estado nutricional de vitamina D ainda é contraditório. Já foram reportadas na literatura, evidências de que a maior concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ possa afetar o metabolismo de $25(\text{OH})\text{D}$. Estudos em animais e em humanos apontam que a administração oral de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ parece favorecer o catabolismo de $25(\text{OH})\text{D}$ circulante e, conseqüentemente, determinar a redução da sua meia vida e da concentração de $25(\text{OH})\text{D}$ circulante (LORÉ et al., 1982; BERLIN, BJÖRKHEM, 1987.; HALLORAN, CASTRO, 1989; CLEMENTS et al., 1992). Os estudos mais recentes conduzidos durante a gestação investigando a associação entre $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e $25(\text{OH})\text{D}$ tem produzido resultados conflitantes (JONES et al., 2016; PARK et al., 2016; BEST et al., 2018).

Ao investigarem as adaptações no metabolismo de vitamina D durante a gestação, Bouillon e colaboradores (1981) relataram o aumento progressivo das concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, principalmente na 40^a semana gestacional e de DBP até a 35^a semana gestacional. Como consequência, o incremento de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ livre no último mês de gestação poderia favorecer a maior transferência de cálcio materno para a ossificação do esqueleto fetal ao final da gestação, uma vez que acredita-se que os hormônios ligados a proteínas transportadoras não são capazes de atravessar a placenta (HIRSCHFELD, LUNELL, 1962). Apesar dos ajustes no metabolismo de vitamina D, não foi observada influência nas concentrações maternas de $25(\text{OH})\text{D}$ circulante. Resultados semelhantes foram observados por Ritchie e colaboradores (1998) ao não relatarem alterações nas concentrações de $25(\text{OH})\text{D}$ em gestantes saudáveis apesar do aumento significativo das concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e DBP no segundo e no terceiro trimestre de gestação.

Papapetrou (2010), em uma meta-análise, objetivou investigar se a síntese de 25(OH)D e 24,25(OH)₂D durante a gestação é também alterada pelo aumento das concentrações séricas de 1,25(OH)₂D. Apesar do aumento esperado de 1,25(OH)₂D não foram observadas alterações nas concentrações de 25(OH)D e de 24,25(OH)₂D nas gestantes avaliadas. Além disso, devido a não correlação entre as concentrações de 1,25(OH)₂D e de 25(OH)D, foi proposto pelos autores que o incremento de 1,25(OH)₂D não tem efeito repressor sobre a síntese de 25(OH)D em mulheres durante o período gestacional.

Resultados divergentes foram apresentados por Zhang e colaboradores (2014) em uma análise longitudinal das concentrações séricas de 25(OH)D total e livre e DBP em mulheres (n=30) a partir do segundo trimestre de gestação. Além do aumento esperado de DBP circulante, principalmente na 28ª semana gestacional, foi relatada diminuição progressiva de 25(OH)D total e livre ao decorrer da gestação, com as menores concentrações observadas na trigésima sexta semana gestacional, quando foi também relatado as menores concentrações de albumina sérica, consequência da maior expansão do volume plasmático materno.

Por outro lado, alguns estudos recentes têm ainda demonstrado, além das concentrações séricas aumentadas de 1,25(OH)₂D e DBP em mulheres durante o período gestacional, a elevação da 25(OH)D circulante. Park e colaboradores (2016) determinaram que a gestação, além de promover o aumento de 1,25(OH)₂D e de DBP também, determinou a elevação das concentrações de 25(OH)D. Além disso, foi proposto pelos autores que a informação a respeito da concentração de 25(OH)D livre pode ser utilizada como um possível biomarcador do estado nutricional de vitamina D em gestantes, devido a sua forte associação com a 25(OH)D total, 1,25(OH)₂D e 24,25(OH)₂D, não observada em mulheres durante a lactação. Apesar das concentrações mais elevadas de 1,25(OH)₂D nas gestantes, não foi observado o aumento de 24,25(OH)₂D circulante, principal produto do catabolismo da 25(OH)D e da 1,25(OH)₂D. Assim, a razão 25(OH)D/24,25(OH)₂D maior entre as gestantes, sugere uma possível atenuação do catabolismo de vitamina D neste estado reprodutivo uma vez que em condições fisiológicas normais, a elevação da 1,25(OH)₂D está associada a maiores concentrações de 24,25(OH)₂D (WAGNER et al., 2011).

Jones e colaboradores (2016), em estudo longitudinal com gestantes no terceiro trimestre de gestação, também sugeriram, ao mencionar uma possível supressão da atividade renal da CYP24A1, que adaptações no metabolismo de vitamina D parecem proteger o organismo materno contra possíveis inadequações no estado nutricional de vitamina D. Em apoio à hipótese da atividade reduzida da CYP24A1, não foi observada elevação simultânea da 24,25(OH)₂D circulante apesar das maiores concentrações de 1,25(OH)₂D e 25(OH)D nas

gestantes. Além disso, embora tenha sido relatado maiores concentrações de 25(OH)D nas gestantes, esse aumento não foi equivalente ao incremento de 100% da 1,25(OH)₂D, possivelmente devido a não regulação homeostática e a dependência de suprimento dietético e cutâneo de vitamina D para a síntese de 25(OH)D. Foi ainda sugerido que o aumento, de aproximadamente 40%, das concentrações de DBP poderia atuar como mecanismo de conservação da vitamina D até o final da gestação, por diminuir a biodisponibilidade e, conseqüentemente, prolongar a meia vida da 25(OH)D ao longo do período gestacional.

Em estudo longitudinal conduzido em gestantes adolescentes, Best e colaboradores (2018) observaram, exceto quando as concentrações de 25(OH)D foi menor que 13ng/mL, o aumento de 24,25(OH)₂D circulante em resposta as concentrações aumentadas de 25(OH)D₃. Em dependência dos resultados, os autores sugeriram a existência de um possível mecanismo de proteção do estado nutricional materno, responsável pela redução do catabolismo da 25(OH)D, em condições de inadequação de vitamina D e manutenção das concentrações aumentadas de 1,25(OH)₂D ao decorrer da gestação.

2 HIPÓTESES

As nossas hipóteses são:

- a) Há fatores sócio-demográficos e de estilo de vida capazes de influenciar de forma distinta os diferentes biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em gestantes.
- b) Polimorfismos genéticos localizados no gene *GC* podem contribuir para a predisposição de gestantes à inadequação do estado de vitamina D.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os biomarcadores do estado nutricional de vitamina D em gestantes adultas bem como seus determinantes sócio-demográficos, de estilo de vida e biológicos.

3.2 Específicos

- a) Analisar a distribuição das concentrações séricas do indicador convencional de estado de vitamina D [25(OH)D₃] e determinar a frequência de sua insuficiência em uma população de gestantes;
- b) Investigar associações entre as concentrações séricas de biomarcadores de estado de vitamina D e seus potenciais fatores determinantes considerando: escolaridade, exposição solar, estação do ano, IMC pré-gestacional, ganho de peso gestacional e idade gestacional;
- c) Investigar associações entre as concentrações séricas de biomarcadores de estado de vitamina D e polimorfismos de nucleotídeo único localizados no gene da proteína ligante de vitamina D.

4 MÉTODOS

4.1 População e desenho de estudo

Trata-se de estudo transversal com uma amostra de conveniência composta por mulheres adultas saudáveis no terceiro trimestre de gestação (27^a à 41^a semana) atendidas no Hospital Maternidade Herculano Pinheiro, uma maternidade pública de média complexidade da rede municipal de saúde da cidade do Rio de Janeiro, situada na zona norte (22°57'S). Foram excluídas as mulheres que preencheram um ou mais dos seguintes critérios: idade inferior a 18 anos, gestação múltipla, diagnóstico de doença crônica, função hepática e/ou função renal alteradas e gestação de risco (diabetes gestacional, distúrbios hipertensivos gestacionais).

As gestantes no terceiro trimestre de gestação foram informadas e esclarecidas a respeito do estudo e convidadas a responder a um questionário para coleta de dados gerais, a realizar a determinação da pigmentação da pele e a realizar coleta de sangue. Todas as gestantes (n=123) que aceitaram participar do estudo e que se encontravam em jejum noturno de 8 horas responderam a um questionário estruturado (**Apêndice A – Questionário Estruturado**) para coleta de informações sócio-demográficas maternas (raça, escolaridade, renda, local de residência, idade), de estilo de vida (prática regular de exercício físico, hábito de fumar, de ingerir bebidas alcoólicas e de se expor ao sol) e dados obstétricos (paridade, idade gestacional, uso de medicamentos e suplementos contendo vitamina D). Em seguida, foi realizada a determinação da pigmentação da pele constitutiva e por bronzamento e a coleta de amostra biológica.

4.2 Aspectos Éticos

A execução do projeto, incluindo a coleta de amostras, foi realizada após o consentimento expresso das voluntárias, previamente esclarecidas da finalidade e dos procedimentos a serem adotados no estudo (**Apêndice B -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**). As voluntárias receberam material educativo com foco na importância da vitamina D para a saúde materna e fetal (**Apêndice C – Material Educativo**). Anterior ao seu início, o projeto obteve Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Pedro Ernesto UERJ, parecer 1.598.920, emitido em 20/06/2016,

CAAE 56617516.5.0000.5259, no sistema CONEP/ Plataforma Brasil (**Apêndice D – Parecer Consubstanciado do CEP**)

4.3 Determinação da pigmentação da pele constitutiva e por bronzamento

A pigmentação da pele (constitutiva e facultativa) foi avaliada com auxílio do colorímetro portátil (Chroma Meter CR-400, New Jersey, EUA). A avaliação da luminosidade constitutiva da pele foi realizada a partir de medições colorimétricas na região superior interna do braço direito, próximo à axila, normalmente não exposta à luz solar e utilizada para classificar a cor de pele em seis diferentes categorias (muito clara, clara, intermediária, bronzeada, marrom, escura) de acordo com o ângulo de tipologia individual (ITA) (DEL BINO et al., 2006; JOHN et al., 2007). Para a avaliação da luminosidade facultativa foram realizadas medições na região frontal da cabeça e no dorso da mão direita entre o polegar e o dedo indicador, ambas regiões normalmente expostas à luz solar. Para cada sítio avaliado o equipamento fornece a média de três leituras independentes. Utilizamos os valores de L^* como uma medida da luminosidade da pele em um eixo preto/branco contínuo, sendo 100 o valor para o branco absoluto e 0 o valor para o preto absoluto. A pigmentação derivada do bronzamento (Índice Exposição Solar - SEI) em cada sítio foi estimada pela diferença entre os valores de luminosidade facultativa e constitutiva, dividida pelos valores de luminosidade constitutiva e multiplicada por 100 (JOHN et al., 2007).

4.4 Análises Bioquímicas

4.4.1 Coleta e preparo de amostras de sangue materno

As amostras de sangue (15mL) foram coletadas após jejum noturno de 8h por profissional capacitado da equipe do Hospital Maternidade Herculano Pinheiro, em tubos Vacutainer® (Becton, Dickinson & Company do Brasil) contendo EDTA-Na e tubos sem anticoagulante. Alíquotas de sangue total, bem como de plasma e soro, após centrifugação, foram armazenadas à -80°C até o momento das análises. O processamento das amostras para posterior armazenamento foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição/ Instituto de Nutrição, UERJ.

4.4.2 Determinação da concentração sérica de 25-hidroxivitamina D

As concentrações séricas de 25(OH)D foram determinadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Technologies, 1260 Infinity), acoplado a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) conforme método modificado descrito por Kich e colaboradores (2012). Inicialmente, as amostras de soro materno (950µL) foram precipitadas, com 500µL da mistura metanol: isopropanol (80:20, v/v). Em seguida, a mistura foi transferida para um tubo de tampa rosca, e extraída com 4mL de hexano, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 2.500g por 10 minutos. A alíquota referente à fração orgânica foi transferida para um tubo de evaporação e o procedimento de extração repetido com outro volume de 4 mL de hexano, sendo a fração orgânica proveniente da segunda centrifugação adicionada ao tubo de evaporação. A amostra extraída foi mantida sob leve corrente de ar até a completa evaporação dos solventes. O resíduo seco foi ressuspendido com 130 µL da fase móvel metanol: água Milli-Q (90:10, v/v) e injetado no sistema cromatográfico. A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa (Kromosil, C18, 300 x 4,6mm) de acordo com as seguintes condições cromatográficas: temperatura da coluna cromatográfica: 25°C; fase móvel: metanol: água Milli-Q (90:10, v/v); vazão da fase móvel: 1 mL/minuto; volume de injeção: 50µL; tempo de corrida cromatográfica: 15 minutos. A detecção de 25(OH)D foi realizada por detector de arranjo de diodo em 265nm com a aquisição de espectros de varredura entre 210 e 380 nm. Os resultados são apresentados em ng/mL. Para conversão em nmol/L, é necessário multiplicar os valores por 2,5.

4.4.3 Determinação da concentração sérica de albumina

As concentrações de albumina foram determinadas por teste colorimétrico (catálogo K040, Bioclin) de acordo com as instruções cedidas pelo fabricante. Esse método é baseado na dosagem da albumina pelo princípio do “erro proteico dos indicadores”. Em presença da albumina, o verde de bromocresol forma um complexo corado com espectro de absorção diferente do corante no seu estado livre. A absorbância do complexo formado foi medida em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) ajustado em 630nm.

4.4.4 Determinação da concentração sérica de Proteína Ligante de Vitamina D (DBP)

As concentrações séricas de DBP por ensaio imunoenzimático com anticorpo monoclonal foram determinadas de acordo com os procedimentos cedidos pelo fabricante (catálogo DDBP0, R & D Systems). Esse ensaio baseia-se na utilização de anticorpos derivados de uma única linhagem de linfócitos B que ao ser clonada produz anticorpos com a mesma estrutura, especificidade e afinidade, reconhecendo, portanto, um único epítopo do antígeno. Resumidamente, as amostras previamente diluídas, foram incubadas para a interação entre o antígeno e os anticorpos monoclonais de captura, acoplados nos poços da microplaca. Em seguida, a microplaca foi lavada com solução salina de lavagem e os complexos anticorpo-antígeno formados foram reconhecidos por anticorpos específicos conjugados à um marcador enzimático. A reação entre o complexo “anticorpo-antígeno-anticorpo” e o substrato tetrametilbenzidina (TMB) promoveu a mudança de cor das soluções. Após a segunda incubação sob temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição da solução “stop” em cada poço. A densidade ótica das amostras foi determinada em espectrofotômetro ajustado em 450nm. Com o intuito de corrigir as imperfeições ópticas na placa, as leituras realizadas a 450nm foram subtraídas das leituras realizadas a 570nm.

A utilização de imunoensaio com anticorpo policlonal para a quantificação de DBP se torna importante, devido às disparidades nos resultados em função do método utilizando, principalmente a subestimação das concentrações de DBP resultante da menor especificidade/afinidade de ensaios com anticorpo monoclonal pela variante genética Gc1f. As concentrações séricas de DBP por ensaio imunoenzimático com anticorpo policlonal foram determinadas de acordo com os procedimentos cedidos pelo fabricante (catálogo 30-2314, ALPCO). Esse ensaio é baseado na detecção de antígenos por anticorpos policlonais, derivados de diferentes linhagens de linfócitos B que resultam em uma mistura de imunoglobulinas secretadas contra um antígeno específico, cada um reconhecendo um epítopo diferente no antígeno. O complexo anticorpo-antígeno ao reagirem com um substrato específico promoveram a mudança da coloração da solução. A densidade ótica das amostras foi determinada em espectrofotômetro ajustado em 450nm.

4.4.5 Determinação da concentração de Hormônio da paratireoide

As concentrações séricas de PTH intacto foram determinadas por ensaio imunoenzimático (Catálogo 21-IPTHU-E01, ALPCO), de acordo com as instruções cedidas

pelo fabricante. Esse método baseia-se na interação entre as cadeias de PTH biologicamente intactas (84 aminoácidos) e os anticorpos de captura acoplados nos poços da microplaca e na associação entre os fragmentos de PTH, anticorpos biotinilado (39-84 aminoácidos) e anticorpos marcados com peroxidase de rabanete (HRP) (1 a 34 aminoácidos), a serem removidos após a lavagem dos poços com solução salina de lavagem. A reação entre o complexo anticorpo de interesse-antígeno e o substrato tetrametilbenzidina (TMB) promoveu a mudança de cor das soluções. A densidade ótica das amostras foi determinada em espectrofotômetro ajustado em 450nm.

4.5 Determinação das frações de 25(OH)D3 livre e biodisponível

A concentração sérica de 25(OH)D livre foi determinada, indiretamente, de acordo com a equação baseada nas constantes de afinidade de ligação da albumina e da DBP com a 25 (OH) D₃, seguindo as seguintes equações (Bikle et al., 1986; Powe et al., 2013):

Equação 1:

$$[25(\text{OH})\text{D livre}] = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (1)$$

Onde:

$$a = K_{\text{DBP}} \times K_{\text{albumina}} \times [\text{albumina}] + K_{\text{DBP}}$$

$$b = K_{\text{DBP}} \times [\text{DBP total}] - K_{\text{DBP}} \times [25(\text{OH})\text{D total}] + K_{\text{albumina}} \times [\text{albumina}] + 1$$

$$c = - [25(\text{OH})\text{D total}]$$

Equação 2:

$$[25(\text{OH})\text{D biodisponível}] = [25(\text{OH})\text{D livre}] + [25(\text{OH})\text{D albumina}] = (K_{\text{albumina}} \times [\text{albumina}] + 1) \times [25(\text{OH})\text{D livre}] \quad (2)$$

4.6 Genotipagem dos polimorfismos genéticos

4.6.1 Extração e purificação do DNA

As amostras de DNA foram extraídas, a partir de 1 mL de sangue total, com a utilização do Kit comercial Puregene (QIAGEN), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O procedimento de extração de DNA foi realizado em duas principais etapas: a primeira, consistiu na lise das membranas celulares para a exteriorização do DNA e a segunda fase foi responsável pela purificação do DNA a partir da emulsificação de moléculas de

gordura e de proteínas, por soluções detergentes e centrifugação. Em seguida, foi realizada a avaliação da concentração e da qualidade do DNA extraído por espectrofotometria (BioDrop DUO, BioDrop, Cambridge, England). As amostras foram armazenadas à -80°C até o momento das análises.

4.6.2 Genotipagens de SNPs

Os SNPs rs2282679, rs4588 e rs7041 (gene *GC*) foram genotipados no Laboratório para Estudos de Interação entre Nutrição e Genética da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. As genotipagens dos polimorfismos foram realizadas por PCR em tempo real, utilizando ensaio TaqMan® (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster, CA, USA). A técnica de genotipagem consiste no uso de sondas construídas especialmente para a ligação exclusiva nos sítios polimórficos a serem estudados. Cada alelo determina uma amplificação de DNA sinalizada pela intensificação de uma fluorescência alelo-específica. A utilização das sondas ligadas a diferentes fluoróforos torna possível a observação, em tempo real, do conjunto alélico de cada indivíduo para um determinado SNP no genoma em apenas uma reação.

As sondas foram especificamente desenhadas e validadas pelo fabricante (Thermo Scientific Inc.). O volume total da reação foi 4µL distribuídos entre o DNA, sonda, TaqMan Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc) e água Milli-Q. As reações ocorreram em um sistema StepOne Plus Real-Time PCR (Thermo Scientific Inc.) de acordo com parâmetros de ciclagem padrão para ensaios TaqMan.

4.7 **Análise de dados**

Inicialmente, foram realizadas as medidas sumárias dos desfechos e das covariáveis de interesse (frequências, médias, medianas, intervalo de confiança e erro padrão). Foram consideradas variáveis de exposição: idade cronológica materna, IMC pré gestacional, ganho de peso gestacional, pigmentação da pele constitutiva e por bronzamento, índice de exposição solar, nível de escolaridade, estação do ano e genótipos derivados de cada SNP investigado. As diferenças nas concentrações médias dos biomarcadores de estado de vitamina D em função das variáveis sociodemográficas e dos genótipos dos SNPs estudados foram investigadas por ANOVA, seguida do teste post-hoc (LSD). Essas diferenças também foram exploradas após ajuste pelas covariáveis de interesse. Com base nas informações relatadas na literatura (YAO et al., 2017; KRIEGER et al., 2018), as seguintes variáveis foram

investigadas como potenciais determinantes das concentrações de 25(OH)D₃, DBP, livre e biodisponível 25(OH)D₃: idade materna, nível de instrução, tipo de pele, semana gestacional, IMC pré-gestacional, número de gestações anteriores, tabagismo, consumo de álcool e prática de exercícios durante a gravidez, bem como mês de coleta de sangue (para o hemisfério sul: inverno, junho-setembro; primavera, setembro-dezembro; verão, dezembro-março; outono, março-junho). Diferenças nas frequências dos genótipos em função do estado suficiente (≥ 50 nmol/L) ou insuficiente (<50 nmol/L) de vitamina D foram investigadas por teste de χ^2 . Os determinantes das concentrações de 25(OH)D₃, DBP, 25(OH)D₃ livre, 25(OH)D₃ biodisponível e PTH foram identificadas usando análises de regressão linear múltipla. As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS 22.0 (versão 22, Inc., Chicago, IL, EUA) e a significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Investigation of biomarkers of vitamin D status in Brazilian pregnant women and their potential demographic and lifestyle determinants

ABSTRACT

Pregnancy is a life stage at which significant changes in vitamin D metabolism occur to provide calcium requirement for the fetus. The impact of gestation on the concentrations, and bioavailability of 25(OH)D is not completely understood. The aim of this study was to investigate the biomarkers of the nutritional status of vitamin D in pregnant women as well as their socio-demographic and lifestyle determinants. This cross-sectional study was conducted in Brazilian women during the third trimester of pregnancy (n=123) attended in a public maternity in Rio de Janeiro (2016-2018). Multiple linear regression analyses showed that gestational week, BMI before pregnancy, sample collection season and education level were the determinants of 25(OH)D₃, DBP, free and bioavailable 25(OH)D₃ concentrations in pregnant women. After adjustment for all potential determinants, serum 25(OH)D₃ was inversely associated with gestational week ($\beta = -0.71$, 95% confidence interval (CI) = -1.29, -0.13) and with autumn ($\beta = -9.19$, 95% CI = -15.55, -2.82) and winter ($\beta = -15.82$, 95% CI = -22.40, -9.24). DBP, free and bioavailable 25(OH)D₃ concentrations were also inversely associated with winter. DBP were directly associated with pre pregnancy BMI ($\beta = 5.84$, 95% CI = 0.62, 11.06). Pregnant women with incomplete fundamental education level had higher free and bioavailable 25(OH)D₃ concentrations ($\beta = 0.09$, 95% CI = 0.01, 0.16). Our finding suggest that the biomarkers studied provide similar information about the nutritional status of vitamin D in Brazilian pregnant women, given that the total 25(OH)D₃ and fractions of 25(OH)D₃ concentrations appeared to be similarly affected by the potential determinants investigated.

Key-words: Vitamin D, pregnancy, determinants of vitamin D status, Brazil

5.1.1 Introduction

It is estimated that inadequate vitamin D status affects about 1 billion people worldwide (Luxwolda et al., 2013; Hypponen, Power et al., 2007; Palacios, Ganzales., 2014). Pregnant women have been considered one of the main risk groups for vitamin D insufficiency due to increased demand to ensure fetal bone mineralization. Moreover, observational studies suggest an increased risk of gestational diabetes, pre-eclampsia, infections, caesarean section and other adverse pregnancy outcomes in vitamin D insufficient mothers (Brannon, Picciano., 2011; Al-Shaikh et al., 2016; Adela et al., 2017).

The assessment of nutritional status of vitamin D is usually based on measurements of its main circulating metabolite, 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] (Norman., 2008). Although subjected to an intense debate in the last years, the cutoff value of 50 nmol/L for defining

insufficiency in general population has been relatively well accepted by scientific community (IOM., 2011).

Longitudinal changes in concentrations of 25(OH)D appears to not occur during pregnancy (Papapetrou., 2010; Best et al., 2018). However, an important increase in serum concentrations of the biologically active metabolite 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] is well documented (Tedesco et al., 2013; Hollis, Wagner., 2017; Best et al., 2018) as being a physiological change in vitamin D metabolism in response to pregnancy. This rise is supposed to promote an up to 60% increase in calcium absorption, especially

during the third trimester (Karras et al., 2014), and to ensure fetal bone mineralization (Kovacs., 2016; Gustafsson et al., 2018). More recently, a progressive increase in concentrations of vitamin D binding protein (DBP) during pregnancy has been also observed and attributed to a rise in liver synthetic function in response to the high estrogen concentrations in this period (Tsuprykov et al., 2018; Jones et al., 2018; Doneray et al., 2018).

The free hormone hypothesis postulates that protein-bound hormones are not biologically available and only unbound hormones could traverse the cell membrane of their target cells and exert biological activity (Jassil et al., 2016). Due to its lipophilic nature, about 85–90% of the total serum 25(OH)D circulates in the DBP-bound condition, 10–15% are loosely bound to serum albumin and the minority fraction of 25(OH)D is unbound in free condition (Schwartz et al., 2014; Tsuprykov et al., 2018). The terminology “total 25(OH)D” refers to the sum of these three fractions, while “bioavailable 25(OH)D” has been used to represent both the albumin-bound and free fractions.

The assertive determination of vitamin D status in the setting of pregnancy is of particular importance for both maternal and fetal health (Aghajafari et al., 2013; Akoh et al., 2017; Bärebring et al., 2016). Given that normal pregnancy is characterized by many changes in vitamin D metabolism, the determination of vitamin D status based exclusively on the 25(OH)D concentrations has been questioned (Tsuprykov et al., 2019). Few studies investigated free and bioavailable fractions of 25(OH)D in pregnant women with none of them being conducted in Brazilian women. The aim of this study was to evaluate a broad set of biomarkers of the nutritional vitamin D status in adult Brazilian pregnant women as well as their demographic and lifestyle determinants.

5.1.2 Methods

5.1.2.1 Study design and population

This cross-sectional study was conducted at a public maternity in Rio de Janeiro (22°57'S) between October 2016 and March 2018. Participated in this study 123 Brazilian women during the third trimester of pregnancy (27-41 weeks). The study started after the consent of the participants previously clarified about the purpose and procedures adopted in the study. The study protocol was registered at the Brazilian National Research Ethics System and approved by the Ethical Committee of the State Health Secretary of Rio de Janeiro. Exclusion criteria were: pregnant women under 18 years old, multiple gestation, high risk-pregnancy (hypertensive disorders, gestational diabetes and multiparity), diagnosis of chronic disease, disturbance in renal and liver functions.

After providing written informed consent, participants were invited to perform an interview that included a structured questionnaire to record socio-demographic and gestational information, skin color assessment and blood sample (10 mL) collection. Information on maternal chronological age, education level, gestational week, self-reported body mass index (BMI) before pregnancy, number of previous pregnancies, smoking habits, alcohol consumption and exercise practice during pregnancy were collected during the interview. Information on season (spring, summer, autumn, winter) was also registered at this time. Two participants had insufficient material for biochemical analyses and two participants had unexplained very high DBP or PTH concentrations, thus 119 participants with overall complete information were included in the current analyses.

5.1.2.2 Blood collection and biochemical analyses

Fasting blood samples were collected, serum was separated by centrifugation and stored at -80°C until laboratory analysis. Serum concentration of total 25(OH)D was measured by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD) as previously described (Kich et al., 2012) with slight modification. Vitamin D status was defined based on 25(OH)D₃ concentrations according to the Institute of Medicine's (IOM) cutoffs for adults: 25(OH)D₃ < 50nmol/L (insufficiency) and 25(OH)D₃ ≥ 50nmol/L (sufficiency). Intact parathyroid hormone (iPTH) was measured by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA; ALPCO Diagnostics, Salem, NH). Serum albumin was

measured using an enzymatic colorimetric method (Bioclin, Brazil). DBP concentration was measured using a polyclonal antibody commercial ELISA kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). Additionally, in order to be comparable with some studies, DBP was also measured in a subsample (n=52) by an alternative monoclonal antibody ELISA kit (R&D Systems; Bio-Techne, Minneapolis, Minneapolis, USA).

Free and bioavailable fractions of 25(OH)D₃ were indirectly estimated based on the protein-ligand binding kinetics (Bikle et al., 1986; Powe et al., 2013). Free 25(OH)D₃ was calculated using 25(OH)D₃, DBP and albumin concentrations and the binding affinity constants of 25(OH)D₃-DBP and 25(OH)D₃-albumin (equation 1). Bioavailable 25(OH)D₃ [referred as bioavailable 25(OH)D₃] corresponds to the non-DBP bound vitamin D fraction and was calculated using the information of free 25(OH)D₃ as well as concentration and binding affinity constant of albumin (equation 2):

Equation 1:

$$\text{Free 25(OH)D}_3: \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (3)$$

$$a = K_{\text{DBP}} \times K_{\text{alb}} \times \text{albumin} + K_{\text{DBP}}$$

$$b = K_{\text{DBP}} \times \text{DBP} - K_{\text{DBP}} \times 25(\text{OH})\text{D total} + K_{\text{alb}} \times \text{albumin} + 1$$

$$c = -25(\text{OH})\text{D}$$

Equation 2:

$$\text{Bioavailable 25(OH)D}_3: (K_{\text{alb}} \times [\text{albumin}] + 1) \times (\text{free 25(OH)D}_3) \quad (4)$$

5.1.2.3 Skin color measurements

Constitutive skin pigmentation was measured using a portable reflectometer (Chroma Meter CR-400, New Jersey, EUA) at the upper right armpit, a site usually not exposed to sunlight, and used to classify skin type into six groups according to individual typology angle (ITA): very light, light, intermediate, tanned, brown and dark (Del Bino et al., 2006; John et al., 2007). Few pregnant women were classified as “very light” skin type (n=2) and therefore, were grouped in the category of “light” skin type. The pregnant woman (n=1) classified with “very dark” skin was grouped in the category of “brown” skin, resulting in four constitutive skin type categories (very light or light, intermediate, tanned and brown or dark). Facultative pigmentation was determined from measurement on the dorsum of the right hand, a site generally exposed to sunlight. The values of Luminance (*), which ranges from 0 (absolute black) to 100 (absolute white), were recorded and used to estimate the sun exposure index

(SEI). SEI is used as an indicator of cumulative UV exposure and was calculated from the difference between facultative and constitutive pigmentation (Lock-Andersen et al., 1998).

5.1.2.5 Statistical analysis

Data was presented as mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables and frequencies and percentages (%) for categorical variables. ANOVA followed by least square means (LSD) post-hoc test was used to compare 25(OH)D₃, DBP, PTH, free and bioavailable 25(OH)D₃ means by categories of independent variables. Pearson's correlation analysis was conducted to investigate associations between all biochemical parameters. Based on information reported in the literature (Yao et al., 2017, Krieger et al., 2018) the following variables were investigated as potential determinants of 25(OH)D₃, DBP, free and bioavailable 25(OH)D₃: maternal age, education level, skin type, gestational week, pre-pregnancy BMI, number of previous pregnancies, smoking habits, alcohol consumption and exercise practice during pregnancy, as well as month of blood sample collection (for south hemisphere: winter, June-September; spring, September-December; summer, December-March ; autumn, March-June). Determinants of 25(OH)D₃, DBP, PTH, free and bioavailable 25(OH)D₃ were identified using multiple linear regression analysis. Statistical analysis were performed using the SPSS 22.0 software (version 22, Inc., Chicago, IL, USA) and statistical significance was set at $P < 0.05$.

5.1.3 Results

Descriptive characteristics of the study population are shown in Table 1. Pregnant women were between 18 and 44 years old (mean 26 ± 5.7 y) and between 27 and 41 weeks of pregnancy (mean 33.9 ± 4.07 wk). Based on self-reported pre-pregnancy BMI, the majority of the women studied was considered eutrophic before pregnancy (BMI lower than 25 Kg/m², (WHO, 1995). Pregnant women were relatively well distributed in the four skin type categories. The majority of women had one (40.3%) or more (28.6%) previous gestations, had complete fundamental (44.5%) or high school (43.7%) education level, and reported no cigarette smoking (93.3%), no alcohol consumption (88.2%) nor physical exercise (91.6%) during current pregnancy. Blood sampling were carried out throughout the year, in order to balance sample distribution between the four seasons.

Serum 25(OH)D₃ concentration ranged from 24.9 to 85.7 nmol/L and vitamin D insufficiency (<50nmol/L, ref IOM) was found in 47.9 % of the pregnant women. DBP concentrations ranged from 491.15 to 1302.77 mg/L. Free and bioavailable fractions, represented about 0.007 % and 1.9 % of the total 25(OH)D₃ concentrations. Mean PTH and albumin concentrations were 29.5 ± 14.9 pg/mL and 3.12 ± 0.42 g/dL, respectively.

Unadjusted means of 25(OH)D₃, DBP, PTH, free 25(OH)D₃ and bioavailable 25(OH)D₃ were also described by categories of gestational weeks, pre pregnancy BMI, skin type, number of previous pregnancies, smoking habits, alcohol consumption, physical exercise, education level, gestational weight gain and season of the year (**Table 2**). DBP concentrations were higher at the beginning of third trimester (27-31 weeks, $P < 0.048$). Based on pre-pregnancy BMI, obese women had lower mean free 25(OH)D₃ compared to those who were overweight before pregnancy (1.20 ± 0.31 pg/mL vs. 1.48 ± 0.42 pg/mL, respectively; $P = 0.038$). Bioavailable 25(OH)D₃ concentration also tended to be lower in those women who were obese previous to pregnancy ($P = 0.065$), while DBP concentrations tended to be higher in those women ($P = 0.072$). Free and bioavailable 25(OH)D₃ concentrations were higher in women with incomplete fundamental education level compared to women with complete high school or more ($P = 0.024$ and $P = 0.009$, respectively). The same tendency was observed for 25(OH)D₃ concentrations, with higher values among those with lowest education level, although it did not reach statistical significance ($P = 0.076$). Serum 25(OH)D₃, DBP, free and bioavailable fractions of 25(OH)D₃ concentrations were influenced by season of the year (Table 2). Compared to women who had blood collected during spring months, those who were studied during autumn and winter had 17% and 30% lower 25(OH)D₃ concentrations ($P = 0.008$ and $P < 0.001$, respectively). There were no statistically significant differences in all biochemical markers among categories of skin type, number of previous pregnancies, cigarette smoking, alcohol consumption, physical exercise and gestational weight gain.

Correlations between biochemical measurements were explored by Pearson correlation analysis. Serum 25(OH)D₃ concentration was directly associated with albumin ($r = 0.320$, $P < 0.001$) and DBP concentrations ($r = 0.231$, $P = 0.01$) (**Figure 1**). Albumin was also directly associated with DBP ($r = 0.267$, $P = 0.004$) and with bioavailable 25(OH)D₃ concentrations ($r = 0.446$, $P < 0.001$). As expected, free and bioavailable 25(OH)D₃ fractions were directly associated with 25(OH)D₃ ($r = 0.719$ and $r = 0.764$, respectively, both $P < 0.001$) and inversely with DBP ($r = -0.439$, $P < 0.001$ and $r = -0.287$, $P = 0.002$, respectively). No statistically significant association was observed between 25(OH)D₃ and PTH.

Multiple linear regression analyses were performed to investigate the potential exposure variables (each one adjusted by all the others) associated with 25(OH)D₃, DBP, PTH, free and bioavailable 25(OH)D₃ concentrations (**Table 3**). Gestational week was inversely associated with serum 25(OH)D₃, with an estimated decrease of 0.71 nmol/L with each additional week of gestation. Pre-pregnancy BMI was directly associated with DBP concentrations ($\beta = 5.84$, 95% CI: 0.62, 11.06). Taking spring as the reference season, collecting blood in autumn months was associated with lower serum concentrations of both serum 25(OH)D₃ ($\beta = -9.19$, 95% CI: -15.55, -2.82) and serum DBP ($\beta = -91.27$, 95% CI: -164.82, -17.71). Similarly, collecting blood in winter months was associated with lower serum concentrations of both serum 25(OH)D₃ ($\beta = -15.82$, 95% CI: -22.40, -9.24) and serum DBP ($\beta = -89.93$, 95% CI: -168.97, -13.90), but also with free and bioavailable fractions of 25(OH)D₃ ($\beta = -0.28$, 95% CI: -0.49, -0.08 and $\beta = -0.09$, 95% CI: -0.16, -0.03, respectively). A higher education level was inversely associated with free and bioavailable fractions of 25(OH)D₃ ($\beta = -0.31$, 95% CI: -0.55, -0.06 and $\beta = -0.10$, 95% CI: -0.18, -0.03, respectively). The same tendency was observed for serum total 25(OH)D₃, although it did not reach statistical significance ($\beta = -4.40$, 95% CI: -12.39, 3.58). After adjustment for all the other exposure variable, gestational weight gain, age, ITA, sun exposure index, as well as the number of previous pregnancies were not associated with any biochemical measurements. None of the exposure variables evaluated was associated with serum PTH.

In a subsample, it was observed that DBP measured by the monoclonal antibody (*m*-DBP) was significantly lower than DBP measured by the polyclonal (*p*-DBP) antibody assay (347.3 ± 63.3 mg/mL vs. 773.5 ± 129.5 mg/mL, $P = 0.039$). Mean free and bioavailable 25(OH)D₃ estimated by *m*-DBP were both 55% higher than the estimated concentrations obtained from *p*-DBP (**Table 4**).

5.1.4 Discussion

The impact of pregnancy on the concentrations and bioavailability of 25(OH)D is not completely understood, nevertheless the criteria for defining vitamin D status in pregnant women is the same used for the general adult population. The present study investigated a broad set of biomarkers of vitamin D status in Brazilian pregnant women as well as their demographic and lifestyle determinants. In general, the concentrations of DBP, total 25(OH)D₃, as well as its fractions, shared the same associated factors, suggesting that these

biomarkers transmit equivalent information about the nutritional status of vitamin D in Brazilian pregnant women.

In the present study, vitamin D insufficiency reached 47.9% of women. A number of environmental and individual intrinsic factors may contribute to the great variability in the prevalence of vitamin D insufficiency including season and latitude of residence, as well as differences in the genetic background of the populations, skin pigmentation and adiposity status (Ponsonby et al., 2010; Hilger et al., 2014, Yao et al., 2017). Adopting the cut-off value of 50 nmol/L for total 25(OH)D (IOM, 2011), a wide global variation of vitamin D insufficiency has been observed in pregnant women, varying from 46% in Eastern Europe to 87% in East Asia (Saraf et al., 2015). In Brazil, few studies have been conducted to date. While a study in adolescent women during the 3rd trimester of gestation showed 43% of the mothers with vitamin D insufficiency (Diogenes et al., 2013), a more recent prospective cohort conducted in the same municipality and same gestational period revealed that vitamin D insufficiency was prevalent in only 10.2% of the pregnant adult women studied (FIGUEIREDO et al., 2017).

The determinants of vitamin D deficiency in the third trimester of pregnancy (36–42 wk) were recently investigated in a multicentre study in Switzerland (Krieger et al., 2018). The authors observed that the centre of study, country of origin, season of delivery and vitamin D supplement intake were the main determinants of vitamin D status, while BMI, skin colour, use of sunscreen and education level were not individually correlated with vitamin D concentrations. Furthermore, some data suggest that the 25(OH)D concentrations may be modulated by pregnancy-related factors, including the gestational age. In a longitudinal study conducted in 1768 pregnant women (15 to 40 wk gestation), the progression of gestation was inversely associated with 25(OH)D concentration, with a nadir at 36 weeks (Zhang et al., 2014). In the present study conducted in the 3rd trimester of gestation (27–41 wk), the main determinants of total 25(OH)D₃ concentrations were season of blood sample collection and gestational week, with lower concentrations being observed among women participating in the study during autumn/winter months and in those in more advanced gestation.

A similar inverse correlation between gestational week and free and bioavailable fractions of 25(OH)D₃ was observed, although it did not reach statistical significance. It is possible that these fractions respond similarly to gestational age, with the lowest concentrations being observed in the last few weeks of gestation. Interestingly, the relative proportions of free and bioavailable 25(OH)D₃ fractions (defined as a percentage from total

25(OH)D₃), were not different among the three categories of gestational week studied. Our findings suggest that maternal organism is able to maintain the percentage of free 25(OH)D₃ fraction/ total 25(OH)D₃ independent on gestational age.

It is well established that season of the year is one of the main determinants of vitamin D status in the general population (Islam et al., 2006; Snellman et al., 2009), but its influence on concentrations of DBP as well as 25(OH)D fractions is still not clear. In a case-control study with African and European American women, DBP displayed an opposite seasonal trend to 25(OH)D with the concentrations being higher during spring and winter and lower in during summer and autumn (Yao et al., 2017). In longitudinal study with healthy blood donors, while there was no seasonal variation in serum DBP concentration, free and bioavailable 25(OH)D concentrations followed the same seasonal variation of total 25(OH)D, with a peak during the summer and a low point during the winter (Olerod et al., 2017). Similar results were reported in a longitudinal study conducted in pregnant women that observed seasonal variations in total and fractions of 25(OH)D in 2nd and 3rd trimesters, but not in DBP concentrations (Gustafsson et al., 2018). In the present study, not only 25(OH)D₃ but also DBP and fractions of 25(OH)D₃ concentrations showed the same seasonal-dependent pattern, with higher concentrations being observed in women whose blood sample was obtained during spring and lower in those during winter. DBP concentrations were directly associated with 25(OH)D₃ suggesting a control mechanism for maintenance of the relative free and bioavailable 25(OH)D₃ concentration under in conditions of lower 25(OH)D₃ circulating.

DBP concentrations in the present study were also directly associated with pre pregnancy BMI. Although studies have reported that obesity disfavors an adequate 25(OH)D concentration (Liel et al., 1988; Vigna et al., 2019; Wortsman et al., 2000), the association between obesity and other biomarkers of the vitamin D status was poorly investigated. Higher DBP concentrations in obese individuals have been previously reported (Bastard et al., 2000; Guha et al, 1995; Saarnio et al., 2018). It was postulated that the higher interleukin-6 frequently observed in obesity could be behind the higher DBP concentrations among obese individuals (Bastard et al., 2000; Guha et al, 1995). Alternatively, it is also speculated that higher levels of free estrogen in obese people could stimulate hepatic synthesis of DBP (Saarnio et al., 2018). High DBP concentrations during pregnancy are frequently observed and are consistent with the hyperestrogenic state typical of pregnancy (Tsuprykov et al., 2018). We hypothesized that DBP levels could be even higher in pregnant women that started pregnancy with overweight, which in turn may influence the bioavailability of vitamin D.

Nevertheless, the only longitudinal study conducted in pregnant women addressing this question found no significant association between BMI during pregnancy and serum concentrations of DBP, total and free 25(OH)D₃ (Zhang et al., 2014).

Education level was an additional factor inversely associated with concentrations of both free and bioavailable fractions of 25(OH)D₃. Although not statistically significant, serum 25(OH)D₃ followed the same trend, with the highest concentrations among women with the lower education attainment. We postulate that some lifestyle habits such as the longer skin exposure time to ultraviolet B radiation (UVB) could explain the higher concentrations of fractions of 25(OH)D₃ in this specific population.

Considering the mixed racial characteristics of the Brazilian population and in order to expand comparability with the literature, we also analyzed *m*-DBP in a subsample (n=52) of the pregnant women studied. As expected, *m*-DBP concentrations were significantly lower compared to *p*-DBP. As a consequence, the 25(OH)D fractions estimated by *m*-DBP were overestimated and did not appear to reflect the real concentrations in pregnancy women. It is important to consider that the data on the bioavailability of vitamin D is subjected to a great variability, especially when it is indirectly estimated based on the protein-ligand binding kinetics. In part, this variability can be explained by the use of different analytical methods for measure the DBP concentrations, in particular ELISA techniques employing monoclonal (*m*-DBP) or polyclonal antibodies (*p*-DBP) (Hoofnagle et al., 2015). In contrast to *p*-DBP, the *m*-DBP may not be reliable to measure the GC1F, the genetic DBP variant most frequently observed in black individuals (Bouillon et al., 2014; Hollis, Bikle et al., 2014; Tsuprykov et al., 2017).

The present study was limited by the sample size (n=119) that was not designed to be representative of the pregnant Brazilian population and may have underpowered the detection of small effects. Also, serum 25(OH)D₃ was analyzed by HPLC-DAD, although liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is considered the golden standard for measurement of 25(OH)D concentrations (Spiro, Buttriss., 2014). Additionally, serum concentrations of 25(OH)D₃ fractions were estimated indirectly from *p*-DBP ELISA and therefore were subjected to accurate measurements of DBP and albumin (Bouillon, 2016; Bikle et al., 2017). Other potential determinants of vitamin D status, such as nutritional intake or genetic background were not investigated.

5.1.5 Conclusions

This study evaluated a broad set of biomarkers of vitamin D status in Brazilian pregnant women contributing with information on free and bioavailable fractions of vitamin D in this special physiologic state. Although Brazil is a sunny country throughout the year, we found that seasonality is the main determinant not only of serum 25(OH)D₃, but also of serum concentrations of DBP, free and bioavailable 25(OH)D₃ fractions. Gestational age, BMI before pregnancy and educational attainment were additional determinants. Our results suggest that the set of biomarkers studied provide similar information about the nutritional status of vitamin D in Brazilian pregnant women, given that the concentrations of total 25(OH)D₃, free and bioavailable 25(OH)D₃ fractions appeared to be similarly affected by the potential determinants investigated. Finally, we agree that the impact of pregnancy on the bioavailability of vitamin D, such as its consequences for the mother and fetal healthy deserves further investigation, particularly in obese and pregnant women with advanced gestation, who may be at greater risk of developing inadequate status of vitamin D.

5.1.6 References

- Adela, R., Borkar, R. M., Mishra, N., et al. 2017. Lower Serum Vitamin D Metabolite Levels in Relation to Circulating Cytokines/Chemokines and Metabolic Hormones in Pregnant Women with Hypertensive Disorders. *Frontiers in Immunology*.
- Aghajafari, F., Nagulesapillai, T., Ronksley, P. E., et al. 2013. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 346: 1169–f1169.
- Akoh, C. C., Pressman, E. K., Cooper, E., et al. 2017. Low Vitamin D is Associated with Infections and Proinflammatory Cytokines During Pregnancy. *Reproductive Sciences*. 25 (3): 414–423.
- Al-Shaikh, G. K., Ibrahim, G. H., Fayed, A. A., et al. 2016. Impact of vitamin D deficiency on maternal and birth outcomes in the Saudi population: a cross-sectional study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 16: 1.
- Anwar, S., Iqbal, I., Azam, A., et al. 2016. Urban and rural comparison of vitamin D status in Pakistani pregnant women and neonates. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 36:3, 318-323.
- Ardawi, M. S., Nasrat, H. A., BA'Aqueel, H. S. 1997. Calcium regulating hormones and parathyroid hormone-related peptide in normal human pregnancy and postpartum: a longitudinal study. *Eur J Endocrinol*. 137: 402–409.

- Bärebring, L., Bullarbo, M., Glantz, A., et al. 2016. Preeclampsia and Blood Pressure Trajectory during Pregnancy in Relation to Vitamin D Status. *PLOS ONE*. 11(3): 0152198.
- Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., et al. 2000. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 85: 3338–3342.
- Best, C. M., Pressman, E. K., Queenan, R. A., et al. 2018. Longitudinal Changes in Serum Vitamin D Binding Protein and Free 25-hydroxyvitamin D in a Multiracial Cohort of Pregnant Adolescents. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
- Bikle, D. D., Gee, E., Halloran, B., et al. 1986. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 63:954-9.
- Bischof, M. G., Heinze, G., Vierhapper, H. 2006. Vitamin D Status and Its Relation to Age and Body Mass Index. *Hormone Research in Paediatrics*. 66 (5): 211–215.
- Bouillon, R., Jones, K., Schoenmakers, I. 2014. Vitamin D-binding protein and vitamin D in blacks and whites. *N Engl J Med*. 370:879.
- Bouillon, R., Van Assche, F. A., Van Baelen, H., et al. 1981. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: significance of the free 1,25- dihydroxyvitamin D₃ concentration. *Journal of Clinical Investigation*. 67:589 – 596.
- Brannon, P. M., Picciano, M. F. 2011. Vitamin D in Pregnancy and Lactation in Humans. *Annual Review of Nutrition*, 31(1), 89–115.
- Del Bino, S., Sok, J., Bessac, E., et al. 2006. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Research*. 19 (6): 606–614.
- Doneray, H., Yesilcibik, R. S., Laloglu, E., et al. 2018. Serum vitamin D and vitamin D-binding protein levels in mother-neonate pairs during the lactation period. *Italian Journal of Pediatrics*. 44 (1).
- Drincic, A. T., Armas, L. A., Van Diest, E. E., et al. 2012. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity*. 20 (7):1444–1448.
- Fernández-Alonso, A. M., Dionis-Sánchez, E. C., Chedraui P., et al. 2012. First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D₃ status and pregnancy outcome. *Int J Gynaecol Obstet*. 116: 6–9.
- Figueiredo, A. C. C., Cocate, P. G., Adegboye, A. A., et al., 2017. Changes in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D during pregnancy: a Brazilian cohort. *Eur J Nutr*.
- Gallagher, J. C., Yalamanchili, V., Smith, L. M. 2013. The effect of vitamin D supplementation on serum 25(OH)D in thin and obese women. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 136: 195–200.

- Galobardes, B. 2006. Indicators of socioeconomic position (part 1). *Journal of Epidemiology & Community Health*. 60 (1): 7–12.
- Guha, C., Osawa, M., Werner, P. A., et al. 1995. Regulation of human Gc (vitamin D-binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression in vitro. *Hepatology*. 21(6):1675–1681.
- Gustafsson, M. K., Romundstad, P. R., Stafne, S. N., et al. 2018. Alterations in the vitamin D endocrine system during pregnancy: A longitudinal study of 855 healthy Norwegian women. *Plos One*. 13 (4).
- Hilger, J., Friedel, A., Herr, R., et al. 2014. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr*. 111: 23 –45.
- Holick, M.F., Binkley, N.C., Bischoff-Ferrari, H.A., et al. 2011. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An Endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1191–1130.
- Hollis, B. W., Bikle, D. D. 2014. Vitamin D-binding protein and vitamin D in blacks and whites. *N Engl J Med*. 370: 879–80.
- Hollis, B. W., Wagner, C. L. 2017. New insights into the vitamin D requirements during pregnancy. *Bone Research*. 5, 17030.
- Hoofnagle AN, Eckfeldt JH, Lutsey PL. Vitamin D-binding protein concentrations quantified by mass spectrometry. *N Engl J Med* 2015; 373:1480–2.
- Hoofnagle, A. N., Eckfeldt, J. H., Lutsey, P. L. 2015. Vitamin D-binding protein concentrations quantified by mass spectrometry. *N Engl J Med*. 373: 1480–1482.
- Hypponen, E., Power, C. 2007. Hypovitaminosis D in British adults at age 45y: nation-wide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am. J. Nutr*. 85 (3): 860-868.
- Institute of Medicine. Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
- Islam, M. Z., Akhtaruzzaman, M., Lamberg-Allardt, C. 2006. Hypovitaminosis D is common in both veiled and nonveiled Bangladeshi women. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 15(1): 81.
- Jassil, N. K., Sharma, A., Bikle, D., et al. 2017. Vitamin d binding protein and 25-hydroxyvitamin d levels: Emerging clinical applications. *Endocrine Practice*. 23(5): 605–613.
- John, E. M., Schwartz, G. G., Koo, J., et al. 2007. Sun Exposure, Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, and Breast Cancer Risk in a Multiethnic Population. *Am J Epidemiol*. 166: 1409-1419.

- Jones, K. S., Assar, A., Prentice, I., et al. 2016. Vitamin D expenditure is not altered in pregnancy and lactation despite changes in vitamin D metabolite concentrations. *Sci. Rep.* 6: 26795.
- Lee, D. H., Ryu, H. M., Han, Y. J., et al. 2015. Effects of Serum 25-hydroxy-vitamin D and Fetal Bone Growth during Pregnancy. *Journal of Bone Metabolism.* 22(3): 127.
- Liel, Y., Ulmer, E., Shary, J. 1988. Low circulating vitamin D in obesity. *Calcif Tissue Int.* 43 (4): 199–201.
- Lock-Andersen., Knudstorp., Wulf. (1998). Facultative skin pigmentation in Caucasians: an objective biological indicator of lifetime exposure to ultraviolet radiation? *British Journal of Dermatology.* 138 (5): 826–832.
- Karras, S. N., Anagnostis, P., Annweiler, C., et al. 2014. Maternal vitamin D status during pregnancy: the Mediterranean reality. *European Journal of Clinical Nutrition.* 68(8): 864–869. doi:10.1038/ejcn.2014.80.
- Kich, D. M., Vieira, F. A. S., Bassuino, M., et al. 2012. Determinação de 25-hidroxivitamina D2 e D3 em plasma por CLAE-DAD. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 48(5): 329–336.
- Kim, H.-J., Ji, M., Song, J., et al. 2017. Clinical Utility of Measurement of Vitamin D-Binding Protein and Calculation of Bioavailable Vitamin D in Assessment of Vitamin D Status. *Annals of Laboratory Medicine.* 37 (1): 34.
- Kovacs, C. S. 2016. Maternal Mineral and Bone Metabolism During Pregnancy, Lactation, and Post-Weaning Recovery. *Physiological reviews.* 96 (2): 449–547.
- Krieger, J.-P., Cabaset, S., Canonica, C., et al. 2018. Prevalence and determinants of vitamin D deficiency in the third trimester of pregnancy: a multicentre study in Switzerland. *British Journal of Nutrition.* 119 (03): 299–309.
- Lee, D. H., Ryu, H. M., Han, Y.J., et al. 2015. Effects of Serum 25-hydroxy-vitamin D and Fetal Bone Growth during Pregnancy. *J Bone Metab* 22:127– 133.
- Lips, P. 2001. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocrine Rev.* 22: 477–501.
- Luxowolda, M. F., Kuipers, R. S., Kema, I. P., et al. 2013. Vitamin D status indicators in indigenous populations in East Africa. *Eur. J. Nutr.* 52 (3): 1115-1125.
- Marwaha, R. K., Tandon, N., Chopra, S., et al. 2011. Vitamin D status in pregnant Indian women across trimesters and different seasons and its correlation with neonatal serum 25-hydroxyvitamin D levels. *Br. J. Nutr.* 106 (9): 1383-1389.
- Molla, A. M., Al Badawi, M., Hammound, M. S., et al. 2005. Vitamin D status of mothers and their neonates in Kuwait. *Pediatr. Int.* 47 (6): 649-652.

- Nielson, C. M., Jones, K. S., Chun, R. F., et al. 2016. Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial-genotypic associations. *J Clin Endocrinol Metab.* 101(5): 2226–34.
- Norman, A. W. 2008. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 88 (2): 491S–499S.
- Oleröd, G., Hultén, L. M., Hammarsten, O., et al. 2017. The variation in free 25-hydroxy vitamin D and vitamin D-binding protein with season and vitamin D status. *Endocrine Connections*, 6 (2): 111–120.
- Palacios, C., Gonzalez, L. 2014. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 144: 138–145.
- Papapetrou, P. D. 2010. The interrelationship of serum 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D in pregnancy at term: a meta-analysis. *Hormones.* 9 (2):136-144.
- Park, H., Brannon, P. M., West, A. A., et al. 2016. Vitamin D Metabolism Varies among Women in Different Reproductive States Consuming the Same Intakes of Vitamin D and Related Nutrients. *The Journal of Nutrition* 146(8): 1537–1545, 2016.
- Ponsonby, A-L., Lucas, R. M., Lewis, S., et al. 2010. Vitamin D status during pregnancy and aspects of offspring health. *Nutrients.* 2: 389–407.
- Powe, C. E., Evans, M. K., Wenger, M. D. J. 2013. Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans. *The New England Journal of Medicine.* 369: 21.
- Saarnio, E., Pekkinen, M., Itkonen, S. T., Kemi, V., Karp, H., Ivaska, K. K., et al. 2018. Low free 25-hydroxyvitamin D and high vitamin D binding protein and parathyroid hormone in obese Caucasians. A complex association with bone? *PLOS ONE.* 13(2): e0192596.
- Saraf, R., Morton, S. M. B., Camargo, C. A., et al. 2015. Global summary of maternal and newborn vitamin D status - a systematic review. *Maternal & Child Nutrition.* 12(4): 647–668.
- Schwartz, J. B., Lai, J., Lizaola, B., et al. 2014. A comparison of measured and calculated free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations. *J Clin Endocrinol Metab.* 99: 1631–7.
- Shao, B., Jiang, S., Muyiduli, X., et al. 2017. Vitamin D pathway gene polymorphisms influenced vitamin D level among pregnant women. *Clinical Nutrition.*
- Snellman, G., Melhus, H., Gedeberg, R., et al. 2009. Seasonal genetic influence on serum 25-hydroxyvitamin D levels: a twin study. *Plos one* 4(11): 7747.
- Spiro, A., Buttriss, J. L. 2014. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutrition Bulletin.* 39 (4) :322–50.

Tsuprykov, O., Buse, C., Skoblo, R., et al. 2019. Comparison of Free and Total 25-hydroxyvitamin D in Normal Human Pregnancy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.

Tsuprykov, O., Buse, C., Skoblo, R., et al. 2018. Reference intervals for measured and calculated free 25-hydroxyvitamin D in normal pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 181: 80–87.

Tsuprykov, O., Chen, X., Hoche, C.-F., et al. 2017. Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 180: 87–104.

Vigna, L., Silvia Tirelli, A., Grossi, E., et al. 2019. Directional Relationship Between Vitamin D Status and Prediabetes: A New Approach from Artificial Neural Network in a Cohort of Workers with Overweight-Obesity. *Journal of the American College of Nutrition*. 1–12.

World Health Organization. 1995. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series.

Wortsman, J., Matsuoka, L. Y., Chen, T. C., et al. 2000. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 72 (3): 690–693.

Yao, P., Sun, L., Lu, L., et al. 2016. Effects of Genetic and Non-genetic Factors on Total and Bioavailable 25(OH)D Responses to Vitamin D Supplementation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2930.

Yao, S., Hong, C.-C., Bandera, E. V., et al. 2017. Demographic, lifestyle, and genetic determinants of circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein in African American and European American women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 105: 1362–1371.

Zhang, J. Y., Lucey, A. J., Horgan, R., et al. 2014. Impact of pregnancy on vitamin D status: a longitudinal study. *British Journal of Nutrition*. 112 (07): 1081–1087.

Table 1 - General Characteristics of the study population.

Variables	Value ^a
Age, years	26.3±5.7
Gestational Week, weeks	33.9±4.1
Prepregnancy BMI, Kg/m²	
Underweight or normal	67 (56.3)
Overweight	25 (21)
Obesity	27 (22.7)
Previous pregnancy	
0	37 (31.1)
1	48 (40.3)
>1	34 (28.6)
Skin type	
Very light or light	22 (18.5)
Intermediate	34 (28.6)
Tanned	32 (26.9)
Brown or dark	31 (26.1)
Cigarette smoking	
Yes	8 (6.7)
No	111 (93.3)
Alcohol consumption	
Never	14 (11.8)
Ever	105 (88.2)
Physical exercise	
Yes	10 (8.4)
No	109 (91.6)
Education level	
Incomplete fundamental	14 (11.8)
Complete fundamental	53 (44.5)
Complete high school or more	52 (43.7)
Season)	
Winter	28 (23.5)
Spring	36 (30.3)
Summer	27 (22.7)
Autumn	28 (23.5)
25(OH)D ₃ , nmol/L	50.7 ±13.9
PTH, pg/mL	29.5 ± 14.9
DBP, mg/L	778.0 ± 148.1
Free 25(OH)D ₃ , pg/mL	1.34 ± 0.40
Bioavailable25(OH)D ₃ , ng/mL	0.38 ± 0.13
Albumin, g/dL	3.12 ± 0.42
Vitamin D status	
Insufficiency (< 50nmol/L)	57 (47.9)
Sufficiency (≥ 50nmol/L)	62 (52.1)

^aValues are mean ± standard deviation or number of observations (% frequency)

Table 2 - Concentrations of biochemical measures by category.

	25(OH)D₃		DBP		PTH		Free 25(OH)D₃		Bioavailable 25(OH)D₃	
	(nmol/L) ^a	P ^b	(mg/L)	P	(pg/mL)	P	(pg/mL)	P	(ng/mL)	P
Gestational Week										
27-31	54.4±14.3		825.3±163.5		28.7±13.6		1.38±0.40		0.40±0.14	
32-36	49.1±12.0	0.150	741.4±151.3	0.048	29.0±15.3	0.848	1.37±0.39	0.575	0.38±0.11	0.316
37-41	49.0±14.5		766.0±127.1		30.4±15.8		1.30±0.41		0.36±0.13	
BMI before pregnancy										
< 25	49.5±13.2		767.6±152.6		28.4±13.7		1.35±0.42 ^a		0.38±0.13	
25-29	53.3±13.5	0.513	746.2±143.7	0.072	30.3±19.5	0.632	1.48±0.42 ^a	0.048	0.42±0.14	0.065
≥ 30	51.2±16.1		833.3±130.4		31.6±13.1		1.20±0.31 ^b		0.34±0.96	
Skin type										
Very light or light	50.3±13.0		755.6±130.7		34.1±18.8		1.38±0.43		0.38±0.13	
Intermediate	52.6±13.5	0.698	784.8±152.2	0.311	28.9±16.3	0.470	1.37±0.37	0.877	0.39±0.12	0.946
Tanned	51.2±14.5		813.9±178.7		28.2±11.2		1.31±0.41		0.38±0.13	
Brown or dark	48.5±14.8		749.5±155.2		28.3±13.6		1.32±0.43		0.37±0.13	
Previous pregnancy										
0	50.1±14.4		788.0±112.1		27.4±15.9		1.29±0.36		0.37±0.12	
1	53.5±14.2	0.137	774.4±149.7	0.136	30.0±14.3	0.537	1.43±0.41	0.136	0.41±0.13	0.086
≥ 2	47.4±12.5		772.3±180.7		31.2±14.8		1.27±0.41		0.35±0.13	
Cigarette smoking										
Ever	50.0±11.2	0.887	845.1±248.7	0.186	37.3±14.8	0.125	1.22±0.28	0.376	0.34±0.06	0.382
Never	50.8±14.2		773.2±138.7		29.0±14.8		1.35±0.41		0.38±0.13	
Alcohol consumption										
Ever	50.5±9.8	0.961	767.6±133.4	0.780	33.8±12.5	0.254	1.38±0.39	0.692	0.38±0.12	0.948
Never	50.7±14.4		779.4±150.5		29.0±15.2		1.34±0.41		0.38±0.13	
Physical exercise										
Ever	49.9±10.1	0.848	764.2±90.2	0.760	27.8±11.4	0.707	1.33±0.31	0.925	0.38±0.08	0.922
Never	50.8±14.3		779.3±152.6		29.7±15.2		1.34±0.41		0.38±0.13	
Education										
Incomplete fundamental	58.3±11.9	0.076	782.9±236.8	0.766	33.7±13.3	0.266	1.61±0.53 ^b	0.024	0.48±0.15 ^b	0.009
Complete fundamental	48.8±13.0		767.0±133.0		27.2±14.4		1.32±0.40 ^a		0.37±0.13 ^a	

Table 2 - Concentrations of biochemical measures by category.

	25(OH)D ₃		DBP		PTH		Free 25(OH)D ₃		Bioavailable 25(OH)D ₃	
	(nmol/L) ^a	P ^b	(mg/L)	P	(pg/mL)	P	(pg/mL)	P	(ng/mL)	P
Complete high school or more	50.6±14.9		788.0±134.9		30.7±15.7		1.29±0.35 ^a		0.36±0.11 ^a	
Gestational weight gain (Kg)										
≤ 10	50.2±14.2	0.698	773.4±131.5	0.727	28.5±16.5	0.659	1.31±0.39	0.404	0.37±0.13	0.791
> 10	51.2±13.7		782.9±164.8		29.9±12.1		1.37±0.42		0.38±0.12	
Season										
Spring	58.7±13.1 ^a	<0.001	840.7±160.2 ^a	0.019	31.14±12.7	0.660	1.45±0.38 ^a	0.014	0.42±0.12 ^a	0.002
Summer	52.5±13.4 ^{ab}		760.9±159.2 ^{ab}		26.67±15.0		1.42±0.43 ^{ab}		0.41±0.13 ^{ab}	
Autumn	48.4±13.8 ^{bc}		756.8±120.3 ^{ab}		29.08±16.5		1.31±0.41 ^{ab}		0.36±0.12 ^{abc}	
Winter	41.1±8.6 ^c		735.3±125.9 ^b		30.61±16.2		1.15±0.33 ^b		0.31±0.09 ^c	

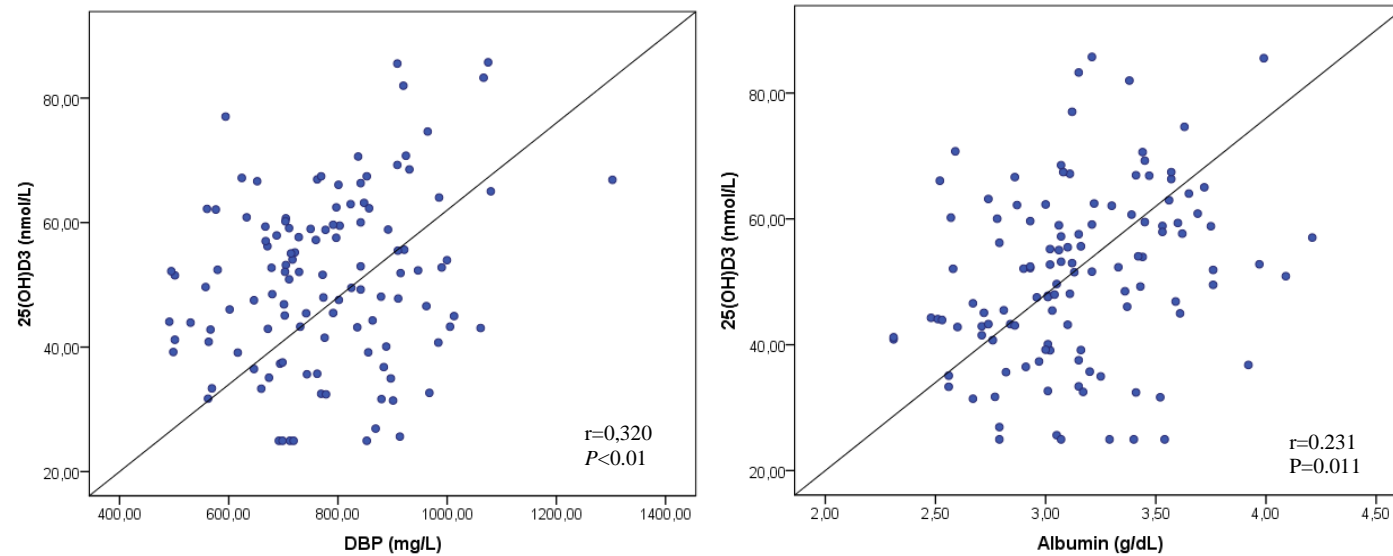
^aValues are mean ± standard deviation.^bP Values for unadjusted least square means (LSD) post-hoc test.Figure 1 - Association between 25(OH)D₃ and DBP and albumin. (A) positive correlation between 25(OH)D₃ and albumin, (B) positive correlation between 25(OH)D₃ and DBP.

Table 3 - Linear regression data of variables predicting 25(OH)D₃, DBP, PTH, free 25(OH)D₃ and bioavailable 25(OH)D₃ concentrations.

	25(OH)D ₃ (nmol/L)	DBP (mg/L)	PTH (pg/mL)	Free 25(OH)D ₃ (pg/mL)	Bioavailable 25(OH)D ₃ (ng/mL)
			β (95% CI)		
Gestational Week	-0.71 (-1.29;-0.13)	-6.13 (-12.81;0.55)	0.05 (-0.66;0.75)	-0.01 (-0.03;0.01)	-0.01 (-0.01;0.00)
BMI before pregnancy	0.10 (-0.35;0.56)	5.84 (0.62;11.06)	0.07 (-0.48;0.62)	-0.01 (-0.03;0.00)	-0.00 (-0.01;0.00)
Gestational weight gain	0.19 (-0.28;0.66)	0.63 (-4.82;6.07)	0.31 (-0.26;0.89)	0.01 (-0.01; 0.02)	0.00 (-0.00; 0.01)
Age	-0.14 (-0.61;0.34)	-0.88(-6.36;4.59)	-0.02 (-0.60;0.56)	-0.00 (-0.02;0.01)	0.00 (-0.00;0.01)
ITA	0.04 (-0.08;0.17)	-0.21 (-1.69;1.27)	0.06 (-0.10;0.21)	0.00 (-0.00;0.01)	0.00 (-0.00;0.00)
SEI hand	0.30 (-0.15;0.75)	5.23 (0.05; 10.41)	-0.53 (-1.08;0.01)	-0.00 (-0.02;0.01)	0.00 (-0.00;0.00)
Previous pregnancy	-0.70 (-2.60;1.20)	-3.86 (-25.76;18.04)	1.22 (-1.08;3.52)	-0.01 (-0.07;0.05)	-0.01 (-0.03;0.01)
Season					
Spring	ref	ref	ref	Ref	ref
Summer	-4.02 (-10.62;2.58)	-79.14 (-155.41;-2.88)	-4.56 (-12.58;3.46)	0.06 (-0.15;0.26)	0.02 (-0.04;0.08)
Autumn	-9.19 (-15.55;-2.82)	-91.27 (-164.82;-17.71)	0.00 (-7.73;7.73)	-0.08 (-0.28;0.12)	-0.04 (-0.10;0.02)
Winter	-15.82 (-22.40;-9.24)	-89.93 (-165.97;-13.90)	-0.12 (-8.12;7.87)	-0.28 (-0.49;-0.08)	-0.09 (-0.16;-0.03)
Education level					
Incomplete fundamental	ref	ref	ref	ref	ref
Complete fundamental	-4.82 (-12.66;3.03)	22.04 (-68.57;112.60)	-6.48 (-16.01;3.04)	-0.24 (-0.48;0.01)	-0.09 (-0.16;-0.01)
Complete high school or more	-4.40 (-12.39;3.58)	41.37 (-50.87;133.61)	-3.42 (-13.11;6.28)	-0.31 (-0.55; -0.06)	-0.10 (-0.18;-0.03)

Abbreviation: CI, confidence interval.

Table 4 - Concentrations of fractions of 25(OH)D₃ estimated by p-DBP and m-DBP assays.

Biochemical index	Mean ± SD		P-Value
	Polyclonal	Monoclonal	
DBP, mg/L	773.5±129.5	347.3±63.3	0.039
Free 25(OH)D ₃ , pg/mL	1.31±0.40	2.89±0.88	0.008
Bio 25(OH)D ₃ , ng/mL	0.37±0.13	0.82±0.30	> 0.001

^aValues are mean \pm standard deviation.

5.2 Artigo 2: Associação entre polimorfismos localizados no gene GC e as concentrações de biomarcadores de estado de vitamina D em gestantes

RESUMO

Associações entre polimorfismos genéticos e as concentrações séricas de biomarcadores de estado de vitamina D em mulheres durante o período gestacional têm sido investigadas e gerado resultados conflitantes. O objetivo do presente estudo foi investigar associações entre polimorfismos localizados no gene que codifica a Proteína Ligante de Vitamina D (DBP) (gene *GC* rs2282679, G>T; rs4588, G>T e rs7041, A>C) e as concentrações séricas de biomarcadores de estado de vitamina D em gestantes brasileiras. O estudo transversal envolveu um total de 101 mulheres durante o terceiro trimestre de gestação atendidas em uma maternidade pública da rede municipal de saúde da cidade do Rio de Janeiro (2016-2018). As diferenças nas concentrações médias dos biomarcadores de estado de vitamina D por genótipos foram avaliadas por ANOVA. Associações entre os SNPs rs2282679, rs4588 e rs7041 e as concentrações de 25(OH)D₃, DBP, 25(OH)D₃ livre, 25(OH)D₃ biodisponível e PTH foram investigadas por análise de regressão linear múltipla ajustada pela estação do ano de coleta de amostra, idade gestacional e IMC pré-gestacional. As mulheres com genótipo GG (rs2282679) apresentaram concentrações de DBP significativamente menores comparadas as gestantes com os genótipos TT e GT ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) nas concentrações médias dos demais biomarcadores bioquímicos em função dos SNPs investigados. Na análise de regressão linear múltipla, os genótipos GT e GG (rs2282679) foram diretamente associados às concentrações de PTH ($\beta = 14,53$; 95% CI 3,86, 25,20 e $\beta = 19,66$; 95% CI 0,28, 39,04, respectivamente). Associação inversa foi observada entre os genótipos GT e TT (rs4588) e as concentrações séricas de PTH ($\beta = -14,12$; 95% CI -25,47, -2,78 e $\beta = -19,39$; 95% CI -38,88, 0,11, respectivamente). Os resultados sugerem que os SNPs avaliados, embora não tenham apresentado associação com as concentrações de 25(OH)D₃ total e frações, parecem influenciar as concentrações de PTH, considerado um indicador de funcionalidade da vitamina D.

Palavras chave: Vitamina D, gestação, SNPs.

5.2.1 Introdução

O estado inadequado de vitamina D tem sido frequentemente relatado entre gestantes, com estimativas de prevalência de insuficiência atingido cerca de 30 a 96% das mulheres em diferentes regiões do mundo (Palacios, Gonzalez., 2014; Saraf et al., 2016). A sazonalidade, a pigmentação da pele, o estado de adiposidade, a idade gestacional e a ingestão dietética de vitamina D têm sido considerados os principais determinantes de estado nutricional de vitamina D em mulheres durante o período gestacional (Kriger et al., 2018). Embora menos explorados, estudos genômicos no campo da vitamina D têm relatado que fatores genéticos podem também determinar a predisposição da população geral e de gestantes à inadequação do estado de vitamina D (Ahn et al., 2010; Wang et al., 2010; Jolliffe et al., 2016; Shao et al., 2017).

Devido a sua natureza lipofílica, a maior parte da vitamina D circulante encontra-se associada à proteína ligante de vitamina D (DBP). No entanto, consistente com a hipótese do hormônio livre, a atividade biológica específica só é exercida após difusão da forma ativa livre da DBP pela membrana celular, seguida de ligação ao receptor nuclear de vitamina D (Tsuprykov et al., 2018). Além de ser a principal proteína transportadora dos metabólitos de vitamina D, tem sido sugerido que a DBP exerça um importante papel na homeostase da vitamina D (Brannon, Picciano., 2011) por prolongar a meia-vida da principal forma circulante de vitamina D [calcidiol, 25(OH)D₃] e promover o controle do seu acesso as suas respectivas células-alvo (Oleröd et al., 2017). No entanto, é preciso considerar a existência de diferentes isoformas da DBP que resultam em diferenças em sua afinidade pela vitamina D. Portanto, o papel regulador da DBP pode ser dependente da isoforma predominante no indivíduo, que por sua vez é geneticamente determinada.

A DBP é codificada pelo gene *GC* localizado no cromossomo 4q12-q1344 (Bikle et al., 2017). Estudos prévios de associação pangenômica tem relatado o impacto de alguns SNPs localizados no gene *GC*, nas concentrações séricas de 25(OH)D₃ e de outros biomarcadores de estado de vitamina D (Ahn et al., 2010; Wang et al., 2010). Estudos conduzidos em mulheres durante o período gestacional são escassos e tem gerado resultados conflitantes. Associação entre as concentrações séricas de 25(OH)D₃ e os SNPs rs2282679, rs4588 e rs7041, localizados no gene *GC* foi relatada em estudo de coorte conduzido em mulheres chinesas durante o terceiro trimestre de gestação (Shao et al., 2017), enquanto Moon e colaboradores (2017) não observaram associação significativa entre o SNP rs2282679 e as concentrações basais de 25(OH)D em gestantes de etnia branca. Além das concentrações de 25(OH)D total independentes dos SNPs rs4588 e rs7041, estudo em mulheres coreanas durante o terceiro trimestre de gestação não observou associação entre os SNPs investigados e as concentrações de 25(OH)D biodisponível (Kim et al., 2019).

Considerando o possível impacto de fatores genéticos no estado nutricional de vitamina D e a escassez de informações a respeito da distribuição das frequências genótípicas dos SNPs rs2282679, rs4588 e rs7041, frequentemente associadas as concentrações de 25(OH)D na população brasileira, o objetivo do presente estudo foi investigar a associação entre SNPs localizados no gene *GC* e as concentrações séricas de diferentes biomarcadores de estado de vitamina D em mulheres brasileiras no terceiro trimestre de gestação.

5.2.2 MÉTODOS

5.2.2.1 População de estudo

Trata-se de um estudo transversal conduzido em mulheres adultas brasileiras no terceiro trimestre de gestação atendidas no Hospital Maternidade Herculano Pinheiro, Rio de Janeiro, Brasil (22°57'S). Todas as participantes do estudo forneceram consentimento para o uso de informações pessoais e do material biológico para fins de pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (56617516.5.0000.5259).

Entre outubro de 2016 e março de 2018 foram recrutadas gestantes que atenderam aos seguintes critérios de inclusão: estar no terceiro trimestre de gestação (≥ 27 semanas) e idade superior a 18 anos. Os seguintes critérios de exclusão foram aplicados: gestação múltipla, diagnóstico de doença crônica, função hepática e/ou função renal alteradas e gestação de risco (diabetes gestacional, distúrbios hipertensivos gestacionais). Um total de 123 gestantes que se enquadram nos critérios de seleção aceitaram participar do estudo. Informações sobre a idade cronológica materna, escolaridade, semana gestacional, índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional, número de gestações anteriores, hábito de fumar, de ingerir bebidas alcoólicas e prática de exercícios físicos durante a gestação foram coletadas por meio de questionários administrados pelo entrevistador. Para as análises do presente estudo foram excluídas as participantes que não obtiveram material biológico suficiente para a quantificação das concentrações de 25(OH)D₃ (n=2) e para a extração de DNA (n=18) ou com concentrações séricas de DBP ou PTH inexplicavelmente elevadas (n=2). No total, foram incluídas nas análises do presente estudo, 101 mulheres no terceiro trimestre de gestação.

5.2.2.2 Coleta de sangue e análises bioquímicas

As amostras de sangue materno foram coletadas após jejum noturno de 8 horas. As alíquotas de sangue total e de soro após centrifugação, foram armazenadas à -80°C até o momento das análises. As concentrações séricas de 25(OH)D₃ foram determinadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Technologies, 120 Infinity), acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) conforme descrito previamente (Kich et al., 2012), com ligeiras modificações. A definição do estado nutricional de vitamina D foi baseada nas concentrações séricas de 25(OH)D₃ de acordo com os pontos de corte sugeridos pelo Instituto

de Medicina americano (IOM, 2011) para adultos: $25(\text{OH})\text{D}_3 < 50\text{nmol/L}$ (insuficiência) e $25(\text{OH})\text{D}_3 \geq 50\text{nmol/L}$ (suficiência). As concentrações de albumina foram determinadas por teste colorimétrico (Bioclin, Brazil). Ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para determinação das concentrações séricas de DBP (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) e de PTH (ELISA; ALPCO Diagnostics, Salem, NH).

As concentrações das frações livre e biodisponível de $25(\text{OH})\text{D}_3$ foram determinadas, indiretamente, de acordo com as equações baseadas nas constantes de afinidade de ligação da albumina e da DBP com a $25(\text{OH})\text{D}_3$ seguindo as seguintes equações (Bikle et al., 1986; Powe et al., 2013):

Equação 1:

$$25(\text{OH})\text{D}_3 \text{ livre: } \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (6)$$

$a = K_{\text{DBP}} \times K_{\text{alb}} \times \text{albumina} + K_{\text{DBP}}$
 $b = K_{\text{DBP}} \times \text{DBP} - K_{\text{DBP}} \times 25(\text{OH})\text{D total} + K_{\text{alb}} \times \text{albumina} + 1$
 $c = -25(\text{OH})\text{D}$

Equação 2:

$$25(\text{OH})\text{D}_3 \text{ biodisponível: } (K_{\text{alb}} \times [\text{albumina}] + 1) \times (25(\text{OH})\text{D}_3 \text{ livre}) \quad (7)$$

5.2.2.3 Determinação da pigmentação da pele

A pigmentação da pele constitutiva foi avaliada, com auxílio de um colorímetro portátil (Chroma Meter CR-400, New Jersey, EUA), a partir de medições na região superior da axila direita, uma região normalmente não exposta à luz solar, e utilizada para classificar o tipo de pele em seis diferentes grupo de acordo com o ângulo de tipologia individual (ITA): muito clara, clara, intermediária, bronzeada, marrom e escura (Del Bino et al., 2006; John et al., 2007). Devido ao número reduzido de gestantes classificadas com o tipo de pele “muito clara” (n=2), foi realizado o agrupamento destas participantes na categoria de “pele clara”. A gestante (n=1) classificada com pele de coloração “muito escura” foi agrupada na categoria de pele “marrom”. Desta forma, as mulheres avaliadas foram distribuídas entre 4 categorias de tipo de pele: muito clara ou clara, intermediária, bronzeada e marrom ou escura. A pigmentação da pele facultativa foi determinada através da medição colorimétrica no dorso da mão direita, um local geralmente exposto à luz solar. Os valores de luminância (*), variando de 0 (preto absoluto) a 100 (branco absoluto) foram utilizados para estimar a pigmentação derivada do bronzeamento (Índice de Exposição Solar - SEI), utilizada como indicadora de

exposição cumulativa aos raios ultravioleta (UV). O SEI foi calculado a partir da diferença entre os valores de luminosidade facultativa e constitutiva (Lock-Andersen et al., 1998).

5.2.2.4 Genotipagem dos polimorfismos

Os SNPs rs2282679 (G>T), rs4588 (G>T) e rs7041 (A>C) localizados no gene *GC* foram selecionados com base na literatura referente aos polimorfismos genéticos frequentemente associados às concentrações séricas de 25(OH)D₃ e que determinam as isoformas de DBP (Chun., 2012; Powe et al., 2013). As amostras de DNA foram extraídas do sangue total com auxílio de um Kit comercial (Puregene Blood Kit – Qiagen, Hilden, Germany) conforme as instruções cedidas pelo fabricante. Após a avaliação da concentração e da qualidade do DNA extraído por espectrofotometria (BioDrop DUO, BioDrop, Cambridge, England), as amostras foram armazenadas à -80°C.

A discriminação alélica por PCR em tempo real através do ensaio TaqMan (Thermo Scientific Inc., Foster City, CA, USA) foi utilizada para as análises de genotipagem dos SNPs. As sondas empregadas para a ligação exclusiva nos sítios polimórficos foram desenhadas e validadas pelo fabricante (Thermo Scientific Inc.). As genotipagens foram conduzidas em um sistema Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Scientific Inc.) e os resultados analisados utilizando o software 7500 Fast Real Time PCR Systems (Thermo Scientific Inc.).

5.2.2.5 Análise de dados

Estatística descritiva foi utilizada para caracterizar a população de estudo. As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão (DP) e as variáveis categóricas expressas como frequências (n) e porcentagens (%). As frequências genotípicas para cada SNP foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o teste χ^2 entre as frequências observadas e as esperadas de cada alelo. As diferenças nas concentrações médias de 25(OH)D₃, DBP, 25(OH)D₃ livre, 25(OH)D₃ biodisponível e PTH em função dos genótipos dos SNPs estudados foram investigadas por ANOVA, seguida do teste post-hoc (LSD). Essas diferenças em função dos genótipos foram também exploradas após ajustes pela estação do ano, idade gestacional e IMC pré-gestacional, identificadas como determinantes das concentrações de 25(OH)D₃ e de DBP no artigo 1. Diferenças nas frequências dos genótipos em função do estado suficiente (≥ 50 nmol/L) ou insuficiente (<50 nmol/L) de

vitamina D foram investigadas por teste de χ^2 . Análise de regressão múltipla foi utilizada para investigar associações entre os diferentes genótipos dos SNPs investigados e as concentrações de 25(OH)D₃, DBP, PTH, e das frações livre e biodisponível 25(OH)D₃. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 22.0 (versão 22, Inc., Chicago, IL, EUA) e os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.2.3 Resultados

As características gerais da população estudada estão apresentadas na **Tabela 1**. A idade materna variou de 18 a 44 anos ($26,4 \pm 5,8$) e a idade gestacional de 27 a 41 semanas ($33,9 \pm 4,1$). Com base no IMC pré-gestacional e de acordo com a classificação proposta pela OMS para indivíduos adultos (WHO, 1995), a maioria das mulheres investigadas foi considerada eutrófica antes do início da gestação ($\text{IMC} < 25 \text{ Kg/m}^2$). As mulheres foram relativamente bem distribuídas entre as quatro categorias de pigmentação da pele. A maioria das mulheres relatou ter uma (41,6%) ou mais gestações anteriores (29,7%), ensino fundamental (46,5%) ou médio completo (40,6%) e negou o hábito de fumar (94,1%), de ingerir bebida alcoólica (89,1%) e de praticar exercício físico (91,1%) durante a gestação atual. As coletas das amostras biológicas foram realizadas ao longo do ano de modo que a distribuição do número de gestantes recrutadas se mantivesse equilibrada entre as quatro estações do ano.

A concentração sérica de 25(OH)D₃ variou de 25,0 nmol/L a 85,5 nmol/L, sendo a insuficiência de vitamina D ($< 50 \text{ nmol/L}$, ref IOM) reportada em 43,6% das gestantes. As concentrações de DBP variaram de 491,2 mg/L a 1307,8 mg/L. As concentrações de 25(OH)D₃ livre e de 25(OH)D₃ biodisponível variaram de 0,60 pg/mL a 2,66 pg/mL e de 0,14 ng/mL a 0,74 ng/mL, respectivamente.

As frequências genotípicas dos SNPs rs2282679 (T>G), rs4588 (G>T) e rs7041 (A>C) obedeceram o equilíbrio de Hardy-Weinberg e estão apresentadas na **Tabela 2**. Foi observada maior frequência do genótipo TT no SNP rs2282679 (65,3%) e do genótipo GG no SNP rs4588 (70,3%) e do heterozigoto CA (51,5%) no SNP rs7041. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição das frequências dos genótipos para os SNPs investigados em função do estado de vitamina D (**Tabela 3**).

As médias brutas de DBP, 25(OH)D₃, 25(OH)D₃ livre, 25(OH)D₃ biodisponível e PTH foram descritas por categoria de genótipos e de alelos para cada SNP investigado (rs2282679, rs4588 e rs7041) (**Tabela 4**). As concentrações de DBP foram menores nos

indivíduos portadores do genótipo GG no SNP rs2282679 ($P = 0,044$). Essa diferença foi mantida após ajuste pela estação do ano de coleta de amostra, idade gestacional e IMC pré-gestacional ($P = 0,027$, Tabela 4). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as médias de DBP, 25(OH)D₃, 25(OH)D₃ livre, 25(OH)D₃ biodisponível e PTH para os três possíveis genótipos para o SNP rs4588 e rs7041.

A análise de regressão linear múltipla foi utilizada para investigar associações entre os biomarcadores de estado de vitamina D e os genótipos dos SNPs localizados no gene *GC*. Comparado com a referência (genótipo TT) e após ajuste pelas covariáveis, foram observadas menores concentrações de DBP nas mulheres com o genótipo GG (rs2282679) (**Tabela 5**). Os genótipos GT e GG (rs2282679) foram associados com maiores concentrações de PTH ($\beta = 14,53$; 95% CI: 3,86, 25,20 e $\beta = 19,66$, 95% CI: 0,28, 39,04, respectivamente). Menores concentrações de PTH foram observadas nas mulheres com os genótipos GT e TT para o SNP rs4588 ($\beta = -14,12$; 95% CI: -25,47, -2,78 e $\beta = -19,39$; 95% CI: -38,88, 0,11, respectivamente).

5.2.4 Discussão

O presente estudo investigou a associação entre polimorfismos localizados no gene *GC* e as concentrações de biomarcadores de estado de vitamina D em mulheres brasileiras durante o terceiro trimestre de gestação. Embora as concentrações de 25(OH)D total e frações não tenham sido influenciadas pelos SNPs estudados, nossos resultados sugerem que as concentrações de DBP e de PTH estão sujeitas à variação em função de SNPs localizados no gene da DBP (*GC* - rs2282679 e *GC* - rs4588).

A estação do ano, a pigmentação da pele, a latitude de residência, a idade gestacional e a escolaridade materna tem sido mencionadas como potenciais determinantes do estado de vitamina D em mulheres durante o período gestacional (Zhang et al., 2014; Kriger et al., 2018). Mais recentemente, a contribuição de alguns fatores genéticos nas concentrações de vitamina D tem sido reportada (Shao et al., 2017; Størdal et al., 2017).

Há uma certa plausibilidade biológica de que a DBP, codificada pelo gene *GC*, desempenhe importantes papéis no metabolismo da vitamina D (Al-Daghri et al., 2019). Em princípio, é bem aceito, que a DBP além de ser a principal proteína transportadora de vitamina D no organismo humano, determine a meia vida dos metabólitos de vitamina D, em especial da 25(OH)D₃, por controlar o seu acesso às suas respectivas células alvo (Kalousova et al., 2015; Karras et al., 2018). Baseados nessas evidências, estudos recentes têm relatado a

associação entre polimorfismos localizados no gene *GC*, em especial o rs2282679, rs4588 e o rs7041 e as concentrações séricas de biomarcadores de estado de vitamina D. Estudos conduzidos em mulheres durante o período gestacional são escassos e têm revelado resultados controversos.

Estudo de coorte realizado por Shao e colaboradores (2017) explorando a relação entre polimorfismos localizados em genes envolvidos com o metabolismo de vitamina D em gestantes chinesas associou o alelo T no SNP rs4588 e o alelo G no SNP rs2282679 as menores concentrações de 25(OH)D₃, enquanto o alelo C no rs7041 foi associado a maiores concentrações de 25(OH)D₃. Resultados conflitantes foram reportados por Kim e colaboradores (2019) ao não reportarem associação entre os diferentes genótipos nos SNPs rs4588 e rs7041 e as concentrações de 25(OH)D₃ total e biodisponível em mulheres coreanas durante o terceiro trimestre de gestação. Associação significativa foi observada, em estudo transversal conduzido em gestantes norueguesas, entre os diferentes genótipos no gene *GC* no SNP 2282679 e as concentrações séricas de 25(OH)D (Størdal et al., 2017). Estudo conduzido em gestantes britânicas não reportou associação entre o SNP rs2282679 e as concentrações basais de 25(OH)D₃. Após ajuste pelas potenciais covariáveis, foi observado em resposta à suplementação com vitamina D₃, o aumento das concentrações séricas de 25(OH)D₃ nas mulheres carregando o alelo A no SNP rs2282679 (Moon et al., 2017).

Foi observado no presente estudo, que as concentrações séricas de DBP nas mulheres com o genótipo GG no rs2282679 foram menores do que as observadas nas gestantes com ao menos um alelo T. As gestantes com o genótipo homozigoto menos frequente (GG) apresentaram concentrações de DBP, em média, 24,5% menores comparadas as mulheres com o alelo T ($P = 0,044$). As diferenças nas concentrações de DBP em função do genótipo (rs2282679) permaneceram estatisticamente significativas após ajuste pela estação do ano, idade gestacional e IMC pré-gestacional ($P = 0,027$).

O aumento fisiológico da síntese hepática de DBP, principalmente no terceiro trimestre de gestação, tem sido frequentemente observado em estudos longitudinais (Jones et al., 2014; Zhang et al., 2014) e atribuído às altas concentrações de estrogênio durante esse período (Tsuprykov et al., 2017). Nossos resultados sugerem que genótipo GG (rs2282679) desempenhe um efeito repressor sobre a síntese de DBP em mulheres durante o período gestacional.

Embora as contrações de DBP terem sido influenciadas pelos diferentes genótipos no SNP rs2282679, não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações das frações de 25(OH)D₃ entre as mulheres avaliadas. Nossos resultados sugerem a existência de

um mecanismo adaptativo no metabolismo de vitamina D nas mulheres avaliadas que determine a permanência das concentrações relativas de 25(OH)D₃ livre e biodisponível (definida como porcentagem das frações de 25(OH)D₃ em relação à concentração da 25(OH)D₃ total) em condições de variações das concentrações séricas de DBP. Concentrações de 25(OH)D₃ livre dependentes do SNP rs7041 foram previamente relatadas em estudo avaliando o efeito do SNP investigado em mulheres em diferentes estados reprodutivos (gestantes, lactantes, não gestantes e não lactantes). Foi relatado pelos autores que o genótipo TT determinou maiores concentrações de 25(OH)D₃ livre e 25(OH)D₃ total nas mulheres avaliadas (Ganz et al., 2017).

O paratormônio (PTH) e o metabólito ativo da vitamina D, a 1,25-dihidroxicálciferol [1,25(OH)₂D₃], são os principais hormônios reguladores da homeostase do cálcio e do fósforo sérico (Silver et al., 1985; Aloia et al., 2010; Li et al., 2016). Em resposta à hipocalcemia, a secreção aumentada do PTH estimula a conversão renal da 25(OH)D₃ em 1,25(OH)₂D₃ que por sua vez promove o aumento da eficiência da absorção intestinal de cálcio (Prentice et al., 2008), necessária para a mineralização óssea fetal (Kovacs., 2016; Gustafsson et al., 2018). Por ser o principal substrato para a síntese de 1,25(OH)₂D₃, em condição normal de saúde, a relação inversa entre a 25(OH)D₃ e o PTH tem sido frequentemente relatada (Aggarwal et al., 2016; Oleröd et al., 2017).

No presente estudo, as variações genótípicas no rs2282679 e rs4588 influenciaram as concentrações séricas de PTH nas mulheres investigadas. De acordo com os dados de regressão linear múltipla, os genótipos menos frequentes no SNP rs2282679 foram associados às maiores concentrações de PTH. Resultado inverso foi observado para o SNP rs4588 uma vez que as gestantes com os genótipos menos frequentes foram associadas às menores concentrações de PTH. Embora sem associação estatística, foi observado na análise por categoria e após ajuste pelas covariáveis, que as mulheres com os maiores valores de 25(OH)D₃ (genótipo TT para rs2282679 e para rs4588) apresentaram as menores concentrações de PTH. Nossos resultados foram de acordo com o único estudo transversal investigando a associação entre os diferentes genótipos para o SNP rs4588 e a saúde óssea em crianças e adolescentes que revelou menores concentrações séricas de PTH nos indivíduos carregando o alelo T (Pekkinen et al., 2014).

As limitações do presente estudo incluem o seu desenho transversal e o reduzido tamanho amostral, provavelmente insuficiente para detectar pequenos efeitos. Considerando as análises bioquímicas, as concentrações de 25(OH)D₃ foram determinadas por CLAE-DAD, embora a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS / MS) seja

considerada o método padrão ouro para a determinação das concentrações dos metabólitos de vitamina D (Spiro, Buttriss., 2014). Associações entre outros polimorfismos genéticos determinantes das concentrações de biomarcadores de estado de vitamina D não foram avaliados e serão investigados em estudo futuro.

5.2.5 Conclusão

Nossos resultados sugerem que os SNPs investigados não determinaram as concentrações de 25(OH)D₃ e das frações livre e biodisponível de 25(OH)D₃ e que condições da gestação assim como, fatores demográficos e de estilo de vida parecem ser os principais determinantes do estado nutricional de vitamina D nas gestantes investigadas. Nosso estudo foi o primeiro a relatar associações significativas entre polimorfismos localizados no gene *GC* e as concentrações séricas de PTH e da proteína ligante de vitamina D, em mulheres brasileiras, durante o terceiro trimestre de gestação, podendo assim contribuir com dados já existentes na literatura investigando os potenciais determinantes de estado de estado de vitamina D nessa população.

5.2.6 REFERÊNCIAS

Abbas, S., Linseisen, J., Slinger, T., et al. 2008. The Gc2 Allele of the Vitamin D Binding Protein Is Associated with a Decreased Postmenopausal Breast Cancer Risk, Independent of the Vitamin D Status. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 17(6): 1339–1343.

Aggarwal, A. K., Yadav, R., Ramachandran, V., et al. 2016. Bioavailable vitamin D levels are reduced and correlate with bone mineral density and markers of mineral metabolism in adults with nephrotic syndrome. *Nephrology*. 21: 483–489.

Ahn, J., Yu, K., Stolzenberg-Solomon, R., et al. 2010. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum. Mol. Genet*. 19: 2739–2745.

Al-Daghri, N. M., Mohammed, A. K., Bukhari, I., Rikli, M., Abdi, S., Ansari, M. G. A., Alokail, M. S. (2019). Efficacy of Vitamin D Supplementation According to Vitamin D Binding Protein Polymorphisms. *Nutrition*. 63-64: 148-154.

Aloia, J. F., Chen, D.-G., Yeh, J. K., & Chen, H. 2010. Serum vitamin D metabolites and intestinal calcium absorption efficiency in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(4), 835–840.

Bikle, D. D., Gee, E., Halloran, B., et al. 1986. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 63:954-9.

- Bikle, D. D., Malmstroem, S., Schwartz, J. 2017. Current Controversies. Are Free Vitamin Metabolite Levels a More Accurate Assessment of Vitamin D Status than Total Levels? *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 46(4): 901–918.
- Brannon, P. M., Picciano, M. F. 2011. Vitamin D in Pregnancy and Lactation in Humans. *Annual Review of Nutrition*. 31: 89–115.
- Chun, R. F. 2012. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochemistry and Function*. 30(6): 445–456.
- Del Bino, S., Sok, J., Bessac, E., et al. 2006. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Research*. 19 (6): 606–614.
- De-Regil, L. M., Palacios, C., Lombardo, L. K., et al. 2016. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Women and Birth*. 31(4): e216.
- Ganz, A. B., Park, H., Malysheva, O. 2018. Vitamin D binding protein rs7041 genotype alters vitamin D metabolism in pregnant women. *The FASEB Journal*. 32(4): 2012–2020.
- Institute of Medicine. 2011. Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press.
- John, E. M., Schwartz, G. G., Koo, J., et al. 2007. Sun Exposure, Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, and Breast Cancer Risk in a Multiethnic Population. *Am J Epidemiol*. 166: 1409–1419.
- Jones, K. S. et al. 25(OH)D₂ half-life is shorter than 25(OH)D₃ half-life and is influenced by DBP concentration and genotype. 2014. *J Clin Endocrinol Metab*. 99: 3373–3381.
- Kalousova, M., Dusilova-Sulkova, S., Zakiyanov, O., et al. 2015. Vitamin D Binding Protein Is Not Involved in Vitamin D Deficiency in Patients with Chronic Kidney Disease. *BioMed Research International*. 1–8.
- Karras, S. N., Koufakis, T., Fakhoury, H., & Kotsa, K. 2018. Deconvoluting the Biological Roles of Vitamin D-Binding Protein During Pregnancy: A Both Clinical and Theoretical Challenge. *Frontiers in Endocrinology*, 9: 259.
- Kich, D. M., Vieira, F. A. S., Bassuino, M., et al. 2012. Determinação de 25-hidroxivitamina D₂ e D₃ em plasma por CLAE-DAD. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 48 (5).
- Kim, Hyun-Young., Kim, Jin Hyun., Jung, Myeong Hee., et al. 2019. Clinical Usefulness of Bioavailable Vitamin D and Impact of GC Genotyping on the Determination of Bioavailable Vitamin D in a Korean Population. *International Journal of Endocrinology*.
- Li, S. S., Gao, L. H., Zhang, X.Y., et al. 2016. Genetically Low Vitamin D Levels, Bone Mineral Density, and Bone Metabolism Markers: a Mendelian Randomisation Study. *Scientific Reports*. 6(1).

- Lock-Andersen., Knudstorp., Wulf. 1998. Facultative skin pigmentation in Caucasians: an objective biological indicator of lifetime exposure to ultraviolet radiation? *British Journal of Dermatology*. 138 (5): 826–832.
- Lu, L., Bennett, D. A., Millwood, I. Y., et al. 2018. Association of vitamin D with risk of type 2 diabetes: A Mendelian randomisation study in European and Chinese adults. *PLOS Medicine*, 15(5): e1002566.
- Møller, U. K., Streym, S., Heickendorff, L. 2012. Effects of 25(OH)D concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *European Journal of Clinical Nutrition*. 66:862–8.
- Oleröd, G., Hultén, L. M., Hammarsten, O. 2017. The variation in free 25 hydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein with season and vitamin D status, *Endocrine Connections* . 6: 111–120.
- Powe, C. E., Evans, M. K., Wenger, M. D. J. 2013. Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans. *The New England Journal of Medicine*. 369: 21.
- Saraf, R., Morton, S. M. B., Camargo, C. A., 2016. Global summary of maternal and newborn vitamin D status - a systematic review. *Maternal and Child Nutrition*. 12: 647–668.
- Silver, J., Russel, J., Sherwood, L. M. 1985. Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Medical Sciences*. 82: 4270-4273.
- Størdal, K., Mårild, K., Tapia, G., et al. 2017. Fetal and Maternal Genetic Variants Influencing Neonatal Vitamin D Status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 102: 11.
- Tsuprykov, O., Buse, C., Skoblo, R., et al. 2018. Reference intervals for measured and calculated free 25-hydroxyvitamin D in normal pregnancy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 181: 80–87.
- Tsuprykov, O., Chen, X., Hoche., Carl-Friedrich., et al. 2017. Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 180: 87-104.
- Wang, T. J., Zhang, F., Richards, J. B., et al. 2010. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 376: 180–188.
- White, P., Cooke, N. 2000. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 11: 320–7.
- World Health Organization. 1995. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series.
- Zhang, J. Y., Lucey, A. J., Horgan, R., et al. 2014. Impact of pregnancy on vitamin D status: a longitudinal study. *British Journal of Nutrition*. 112 (07): 1081–1087

Tabela 1 - Características gerais da população estudada (n=101).

Variáveis	Média ± DP ou n° (% frequência)
Idade, anos	26,4 ± 5,8
Semana gestacional, semanas	33,9 ± 4,1
IMC Pré gestacional, Kg/m²	
< 25	57 (56,4)
25-29	22 (21,8)
≥ 30	22 (21,8)
Gestações anteriores	
0	30 (29,7)
1	42 (41,6)
>1	29 (28,7)
Pigmentação da pele	
Muito clara ou clara	19 (18,8)
Intermediária	28 (27,7)
Bronzeada	27 (26,7)
Marrom ou escura	27 (26,7)
Hábito de fumar	
Sim	6 (5,9)
Não	95 (94,1)
Hábito de beber	
Sim	11 (10,9)
Não	90 (89,1)
Prática de exercício físico	
Sim	9 (8,9)
Não	92 (91,1)
Escolaridade	
Fundamental incompleto	13 (12,9)
Fundamental completo	47 (46,5)
Ensino médio completo ou mais	41 (40,6)
Estação do ano	
Inverno	20 (19,8)
Primavera	31 (30,7)
Verão	26 (25,7)
Outono	24 (23,8)
25(OH)D₃, nmol/L	51,2 ± 13,6
PTH, pg/mL	29,4 ± 14,8
DBP, mg/L	764,3 ± 148,3
25(OH)D₃ livre, pg/mL	1,38 ± 0,41
25(OH)D₃ biodisponível, ng/mL	0,39 ± 0,13
Albumina (g/dL)	3,14 ± 0,42
Estado de 25(OH)D₃	
Insuficiência (< 50nmol/L)	44 (43,6)
Suficiência (≥ 50nmol/L)	57 (56,4)

Tabela 2 - Frequências dos genótipos na população investigada.

SNP	Genótipo	n (%)
rs2282679	TT	66 (65,3)
	GT	31 (30,7)
	GG	4 (4)
rs4588	GG	71 (70,3)
	GT	27 (26,7)
	TT	3 (3,0)
rs7041	AA	37 (36,6)
	CA	52 (51,5)
	CC	12 (11,9)

Tabela 3 - Comparação dos genótipos em função do estado de vitamina D.

Genótipos	25(OH)D ₃ (nmol/L)	
	<50	≥50
rs2282679		
TT	29 (65,9)	37 (64,9)
GT	13 (29,5)	18 (31,6)
GG	2 (4,5)	2 (3,5)
<i>P</i> -valor*	0,949	
rs4588		
GG	32 (72,7)	39 (68,4)
GT	12 (27,3)	15 (26,3)
TT	0 (0)	3 (5,3)
<i>P</i> -valor*	0,303	
rs7041		
AA	17 (38,6)	20 (35,1)
CA	23 (52,3)	29 (50,9)
CC	4 (9,1)	8 (14,0)
<i>P</i> -valor*	0,739	

*Qui-quadrado.

Tabela 4 - Concentração dos biomarcadores de vitamina D por categoria de genótipos dos SNPs.

SNP	DBP		25(OH)D ₃		25(OH)D ₃ livre		25(OH)D ₃ Biodisponível		PTH	
	(mg/L)		(nmol/L)		(pg/mL)		(ng/mL)		(pg/mL)	
	Bruto	Ajustado*	Bruto	Ajustado*	Bruto	Ajustado*	Bruto	Ajustado*	Bruto	Ajustado*
rs2282679										
TT	769,1±153,8 ^a	770,7±16,9	50,9±14,8	51,5±1,5	1,36±0,42	1,37±0,05	0,39±0,13	0,39±0,02	28,4±14,7	28,4±1,9
GT	777,2±130,8 ^a	774,1±24,7	52,1±11,1	51,0±2,2	1,40±0,38	1,38±0,07	0,40±0,13	0,39±0,02	31,3±15,9	31,4±2,7
GG	584,4±64,8 ^b	581,8±68,1	48,1±12,3	48,3±6,0	1,54±0,53	1,57±0,20	0,41±0,14	0,41±0,06	31,1±8,1	30,8±7,5
P-valor	0,044	0,027	0,833	0,873	0,628	0,624	0,796	0,917	0,662	0,648
T	770,7±148,8	771,4±10,8	51,2±14,1	51,4±0,9	1,38±0,41	1,37±0,03	0,39±0,13	0,39±0,01	29,0±14,9	28,9±1,2
G	737,6±142,8	734,4±22,2	51,3±11,1	50,5±1,9	1,43±0,40	1,42±0,06	0,40±0,13	0,40±0,02	31,2±14,5	31,2±2,4
rs4588										
GG	770,3±150,0	771,2±16,8	51,0±14,4	51,5±1,4	1,36±0,40	1,37±0,05	0,38±0,12	0,39±0,01	30,3±15,9	30,3±1,8
GT	752,1±152,8	751,4±81,6	51,3±12,3	50,1±2,3	1,42±0,44	1,39±0,08	0,41±0,14	0,40±0,02	27,9±11,7	28,0±2,9
TT	732,0±60,0	717±81,6	55,2±2,4	54,4±6,9	1,53±0,53	1,54±0,23	0,42±0,02	0,42±0,07	20,9±12,2	20,5±8,7
P-valor	0,805	0,702	0,875	0,799	0,651	0,766	0,616	0,812	0,463	0,469
G	767,4±149,7	768,0±10,7	51,0±14,0	51,2±0,9	1,37±0,41	1,37±0,03	0,39±0,13	0,39±0,10	29,9±15,3	29,9±1,1
T	748,4±147,9	745,4±24,2	52,0±11,2	51,0±2,0	1,44±0,40	1,42±0,07	0,41±0,13	0,40±0,02	26,6±11,8	26,7±2,6
rs7041										
AA	766,0±149,5	767,7±23,1	49,5±12,1	49,5±1,9	1,32±0,37	1,32±0,06	0,37±0,11	0,37±0,02	28,6±14,8	28,7±2,5
CA	752,0±153,5	752,5±19,6	51,6±13,4	51,4±1,6	1,44±0,43	1,43±0,05	0,40±0,13	0,40±0,02	30,0±12,9	30,0±2,1
CC	811,9±119,6	804,6±41,1	54,6±18,7	55,1±3,4	1,31±0,40	1,35±0,11	0,40±0,16	0,41±0,04	29,1±22,3	28,6±4,4
P-valor	0,455	0,516	0,515	0,354	0,361	0,367	0,477	0,378	0,905	0,905
A	760,3±150,1	761,5±12,4	50,4±12,6	50,3±1,0	1,37±0,40	1,36±0,03	0,38±0,12	0,38±0,01	29,2±14,0	29,3±1,3
C	770,9±144,9	768,8±16,0	52,5±15,0	52,6±1,3	1,40±0,42	1,41±0,04	0,40±0,14	0,41±0,01	29,7±16,1	29,6±1,7

P-valor obtido por análise de variância.

*Ajustado pela estação do ano, idade gestacional e IMC pré-gestacional.

Tabela 5 - Associação entre os biomarcadores de estado de vitamina D e os genótipos dos SNPs investigados.

	DBP	25(OH)D ₃	25(OH)D ₃ livre	25(OH)D ₃ biodisponível	PTH
β (CI 95%)					
SNP					
rs2282679					
TT	ref	ref	ref	ref	ref
GT	5,30 (-95,24;105,80)	1,68 (-7,23;10,40)	0,03 (-0,25;0,32)	0,00 (-0,09;0,09)	14,53 (3,86;25,20)
GG	-204,20 (-386,74;-21,67)	0,21 (-15,79;16,21)	0,29 (-0,22;0,82)	0,04 (-0,12;0,20)	19,66 (0,28;39,04)
rs4588					
GG	ref	ref	ref	ref	ref
GT	1,83 (-105,03;108,69)	-1,12 (-10,50;8,25)	-0,01 (-0,32;0,29)	0,02 (-0,08;0,11)	-14,12 (-25,47;-2,78)
TT	-9,12 (-192,70;174,46)	1,91 (-14,19;17,99)	0,11 (-0,41;0,64)	0,03 (-0,13;0,19)	-19,39 (-38,88;0,11)
rs7041					
AA	ref	ref	ref	ref	ref
CA	-39,96 (-103,51;23,59)	2,26 (-3,32;7,83)	0,17 (-0,01;0,35)	0,05 (-0,01;0,10)	1,73 (-5,02;8,48)
CC	15,23 (-84,08;114,54)	5,99 (-2,71;14,70)	0,08 (-0,21;0,36)	0,05 (-0,03;0,14)	2,99 (-7,55;13,54)

Dados ajustados pelos demais SNPs e pela estação do ano, idade gestacional e IMC pré-gestacional.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A proposta do presente estudo emergiu de evidências de que as diversas adaptações no metabolismo de vitamina em mulheres durante o período gestacional poderiam favorecer alterações não somente nas concentrações séricas do biomarcador convencional de suficiência de vitamina D [25(OH)D₃] mas também na sua biodisponibilidade. Além disso, a investigação do estado de vitamina D a partir de um amplo conjunto de biomarcadores em gestantes, bem como os seus potenciais determinantes não havia sido realizada no Brasil. Com o intuito de contribuir para o melhor entendimento da associação entre os biomarcadores do estado nutricional de vitamina D e fatores sócio-demográficos, de estilo de vida e biológicos em gestantes adultas, investigamos i) a associação entre as concentrações séricas de biomarcadores de estado de vitamina D e seus potenciais determinantes sociodemográficos e de estilo de vida, considerando o impacto do estado inadequado de vitamina D na saúde materna e fetal; ii) a associação entre concentrações séricas de biomarcadores de estado de vitamina D e polimorfismos de nucleotídeos únicos localizados no gene *GC*, fator genético frequentemente associado como as concentrações de 25(OH)D₃.

Dentre o conjunto de fatores investigados, observamos que a estação do ano, a idade gestacional, o IMC-pré gestacional e o nível de escolaridade, independente dos demais fatores investigados, parecem ser os principais determinantes das concentrações séricas dos biomarcadores de estado de vitamina D. Também observamos que as concentrações séricas de 25(OH)D₃, DBP e das frações livre e biodisponível de 25(OH)D₃ foram, na sua maioria, afetadas pelos mesmos determinantes investigados.

Complementarmente, investigamos possíveis impactos de polimorfismos genéticos associados ao metabolismo da vitamina D nas concentrações de 25(OH)D₃ e de outros biomarcadores de estado dessa vitamina. Observamos que os polimorfismos avaliados, localizados no gene que codifica a DBP (gene *GC*) não determinaram as concentrações de 25(OH)D₃ e das frações livre e biodisponível de 25(OH)D₃. Por outro lado, as concentrações de PTH, considerado um indicador de funcionalidade da vitamina D, foram influenciadas pelos diferentes genótipos dos SNPs investigados.

Em conjunto nossos resultados sugerem que condições próprias da gestação e fatores demográficos e de estilo de vida parecem ser os principais determinantes do estado nutricional de vitamina D na população estudada. Os resultados sugerem ainda que os biomarcadores estudados fornecem informações semelhantes sobre o estado nutricional de vitamina D em gestantes brasileiras, considerando que as concentrações de 25(OH)D₃ total e das frações livre

e biodisponível de 25(OH)D₃ parecem ser afetadas de forma semelhante pelos potenciais determinantes estudados.

Assumimos que além dos fatores investigados na presente Tese, outros aspectos comportamentais e genéticos, incluindo o consumo alimentar e outros polimorfismos genéticos precisam ser explorados no contexto dos potenciais determinantes do estado nutricional de vitamina D em gestantes brasileiras. O consumo frequente de alimentos fonte de vitamina D, embora pouco comum no Brasil, pode exercer influência sobre as concentrações séricas de vitamina D, favorecendo o estado adequado dessa vitamina. Consideramos também a importância da investigação de outros polimorfismos genéticos localizados em genes envolvidos na síntese, no metabolismo e nas funções da vitamina D e com potencial capacidade moduladora sobre as concentrações e funções dessa vitamina no organismo humano. Além disso, concordamos que o impacto da gestação na biodisponibilidade da vitamina D, assim como as consequências na saúde materna e fetal, merece uma maior investigação, em especial em mulheres obesas e em fase mais avançada da gestação, que aparentemente, estão em condição de maior risco de desenvolver um estado inadequado de vitamina D.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- AGGARWAL, A. K. et al. Bioavailable vitamin D levels are reduced and correlate with bone mineral density and markers of mineral metabolism in adults with nephrotic syndrome. *Nephrology*. 2016; 21, 483–489.
- AHN, J. et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Human Molecular Genetics*. 2010; 19: 2739-2745.
- AL-DAGHRI, N. M. et al. Parathyroid hormone in relation to various vitamin D metabolites in adult females. *Medicine*. 2017; 96, 8071.
- ALOIA, J. et al. Free 25(OH)D and calcium absorption, PTH, and markers of bone turnover. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015; 100, 4140–4145.
- ALOIA, J. et al. Free 25(OH)D and the vitamin D paradox in African Americans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015; 100: 3356– 3363.
- ARNAUD, J., CONSTANS, J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Human Genetics*. 1993. 92(2): 183–8.
- BACA, K. M. et al. Low maternal 25-hydroxyvitamin D concentration increases the risk of severe and mild preeclampsia. *Annals of Epidemiology*. 2016; 26(12).
- BAKACAK, M. et al. Comparison of Vitamin D levels in cases with preeclampsia, eclampsia and healthy pregnant women. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015; 8(9): 16280-16286.
- BÄREBRING, L. et al. Preeclampsia and Blood Pressure Trajectory during Pregnancy in Relation to Vitamin D Status. *Plos One*. 2016; 11(3).
- BHAN, I. et al. Bioavailable vitamin D is more tightly linked to mineral metabolism than total vitamin D in incident hemodialysis patients. *Kidney International*. 2012; 82(1): 84-89.
- BASTARD, J. P. et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85:3338–3342.
- BERLIN, T.; Bjorkhem, I. On the regulatory importance of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and dietary calcium on serum levels of 25-hydroxyvitamin D₃ in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1987; 144, 1055-1058.
- BEST, C. M. et al. Gestational Age and Maternal Serum 25-hydroxyvitamin D Concentration Interact to Affect the 24,25-dihydroxyvitamin D Concentration in Pregnant Adolescents. *The Journal of Nutrition*. 2018; 148(6): 868–875.

BEZERRA, F. F.; MENDONÇA, L.; DONANGELO, C. M. Bone mass is associated with vitamin D status in lactating adolescent mothers. *FASEB J.* 2008; 22: 458-458.

BIKLE, D. D. et al. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1986; 63: 954–959.

BIKLE, D. et al. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1986; 63.

BIKLE, D.; MALMSTROEM, S.; SCHWARTZ, J. Current controversies are free vitamin metabolite levels a more accurate assessment of vitamin D status than total levels? *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2017; 46: 901-918.

BIKLE, D. Nonclassic Actions of Vitamin D. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2008; 94(1):26–34.

BISCHOFF-FERRARI, H. A. et al. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2006; 84:18–28.

BODNAR, L. M. et al. Maternal Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Are Associated with Small-for-Gestational Age Births in White Women. *The Journal of Nutrition.* 2010; 140(5), 999–1006.

BOUILLON, R. et al. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3: significance of the free 1,25- dihydroxyvitamin D3 concentration. *Journal of Clinical Investigation.* 1981; 67:589 – 596.

BRANNON, P. M.; PICCIANO, M. F. Vitamin D in pregnancy and lactation in humans. *Annual review of nutrition.* 2011; 31:89–115.

BRAUN, A.; KOFER, A.; MORAWIETZ, S. Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1993; 1216:385e94.

BREMBECK P.; WINKVIST A.; OLAUSSON, H. Determinants of vitamin D status in pregnant fair-skinned women in Sweden. *British Journal of Nutrition.* 2013; 110, 856–864.

BROUWER-BROLSMA, E. M. et al. Relative importance of summer sun exposure, vitamin D intake, and genes to vitamin D status in Dutch older adults: The B-PROOF study. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2016; 164: 168–176.

BRUNETTO, M. HPLC determination of Vitamin D3 and its metabolite in human plasma with on-line sample cleanup. *Talanta.* 2004; 64(5): 1364–1370.

BRUNS, E. M.; BRUNS, D. Vitamin D Metabolism and Function During Pregnancy and the Neonatal Period. *Annals of Clinical and Laboratory Science.* 1983; 13(6).

- CARTER, G. D. Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Assays: Confronting the Issues. *Current Drug Targets*. 2011; 12(1): 19–28.
- CARTER, G. D. et al. Hydroxyvitamin D assays: An historical perspective from DEQAS. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017; 177, 30–35.
- CASTRO, L. C. G. O sistema endócrino vitamina D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2011; 55.
- CHEN, T. C. et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007; 460: 213–7.
- CHENGUANG, L. et al. Bioavailable 25(OH)D but Not Total 25(OH)D Is an Independent Determinant for Bone Mineral Density in Chinese Postmenopausal Women. *E BioMedicine*. 2017; 15, 184–192.
- CHEUNG, C. et al. Genetic variant in vitamin D binding protein is associated with serum 25-hydroxyvitamin D and vitamin D insufficiency in Southern chinese. *Journal of Human Genetics*. 2013; 56(11): 749-751.
- CHRISTAKOS, S. et al. Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews*. 2016; 96(1): 365–408.
- CHUN, R. F. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochemistry and Function*. 2012; 30(6): 445–456.
- CHUN, R. F. et al. Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014; 144, 132–137.
- CHUN, S.K. et al. Effects of maternal genetic polymorphisms in vitamin D-binding protein and serum 25-hydroxyvitamin D concentration on infant birth weight. *Nutrition*. 2016; 35: 36–42.
- CLEMENTS, M. R. et al. The role of 1,25-dihydroxyvitamin D in the mechanism of acquired vitamin D deficiency. *Clinical Endocrinology*. 1992; 37(1): 17–27.
- COOKE, N. E.; DAVID, E. V. Serum vitamin D-binding protein is a third member of the albumin and alpha fetoprotein gene family. *Journal of Clinical Investigation*. 1985; 76(6): 2420–4.
- DAWES, M.; CHOWIENCZYK, P. J. Pharmacokinetics in pregnancy. Best Practice & Research: *Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2001; 15: 819–826.
- DAWODU A.; WAGNER, C. L. Mother-child vitamin D deficiency: an international perspective. *Archives of Disease in Childhood*. 2007; 92:737–40.
- DELANGHE, J. R.; SPEECKAERT, R.; SPEECKAERT, M. M. Behind the scenes of vitamin D binding protein: More than vitamin D binding. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015; 29(5): 773–786.

- DEL BINO, S. et al. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Research*. 2006; 19(6): 606–614.
- DENBURG, M. R. et al. Vitamin D bioavailability and catabolism in pediatric chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*. 2013; 28: 1843–1853.
- DICK, I. M. et al. Estrogen effects on calcitriol levels in post-menopausal women: a comparison of oral versus transdermal administration. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995; 219–24.
- DOBNIG, H. et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of Internal Medicine*. 2008; 168:1340–1349.
- DROR D. K.; ALLEN L. H. Vitamin D inadequacy in pregnancy: biology, outcomes, and interventions. *Nutrition Reviews*. 2010; 68: 465–477.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Changes in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D during pregnancy: a Brazilian cohort. *European Journal of Nutrition*. 2017; 57(3): 1059–1072.
- FU, L. et al. Common genetic variants of vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42: 1174-11777.
- GANZ, A. B. et al. Vitamin D binding protein rs7041 genotype alters vitamin D metabolism in pregnant women. *The FASEB Journal*. 2018; 32(4): 2012–2020.
- GIACOMELLO, A. et al. Validação relativa de Questionário de Frequência Alimentar em gestantes usuárias de serviços do Sistema Único de Saúde em dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2008; 8(4): 445-454.
- GRAY, T. K.; LOWE, W.; LESTER, G. E. Vitamin D and pregnancy: The the decidual immune cell profile. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1981; 47:242-50.
- GUHA, C. et al. Regulation of human Gc (vitamin D binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression in vitro. *Hepatology*. 1995; 21:1675–1681.
- GUSTAFSSON, M. K. et al. Alterations in the vitamin D endocrine system during pregnancy: A longitudinal study of 855 healthy Norwegian women. *PLOS ONE*. 2018; 13 (4).
- HADDAD, J. G.; WALGATE, J. Radioimmunoassay of the binding protein for vitamin D and its metabolites in human serum. Concentrations in normal subjects and patients with disorders of mineral homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*. 1976; 58: 1217-1222.
- HADDOW, J. E, NEVEUX, L. M, PALOMAKI, G. E. The relationship between PTH and 25-hydroxy vitamin D early in pregnancy. *Clinical Endocrinology*. 2011; 75(3): 309 –314.
- HALLORAN, B. P.; CASTRO, M. E. Vitamin D kinetics in vivo: effect of 1,25-dihydroxyvitamin D administration. *American Journal of Physiology*. 1989: 256.

HARRIS, S. S.; DAWSON-HUGHES, B. Seasonal changes in plasma 25hydroxyvitamin D concentrations of young American black and white women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998; 67:1232–1236.

HASSANEIN, S. I. et al. Triangular relationship between single nucleotide polymorphisms in the CYP2R1 gene (rs10741657 and rs12794714), 25-hydroxyvitamin D levels, and coronary artery disease incidence, *Biomarkers*. 2014; 19: 488-492.

HEANEY, R. P; SKILLMAN, T. G. Calcium metabolism in normal human pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1971; 33:661–7.

HENDERSON, C. M. et al. Measurement by a Novel LC-MS/MS Methodology Reveals Similar Serum Concentrations of Vitamin D-Binding Protein in Blacks and Whites. *Clinical Chemistry*. 2016; 62:179–87.

HERRMANN, M. et al. Assessment of vitamin D status – a changing landscape. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017; 55 (1): 3–26.

HIRSCHFELD, J.; LUNELL, O. Serum protein synthesis in fetus: haptoglobins and group-specific components. *Nature*. 1962; 1220.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011; 96(7):1911–1930.

HOLICK, M. F, MATSUOKA, L. Y, WORTSMAN J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet (letter). *Lancet*. 1989; 2:1104–1105.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine*. 2007; .357: 266–281.

HOLICK, M. F. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2002; 9:87–98.

HOLLIS, B. W.; WAGNER, C. L. New insights into the vitamin D requirements during pregnancy. *Bone Research*. 2017; v. 5.

HOLLIS, B. W.; WAGNER, C. L. Normal serum vitamin D levels. *New England Journal of Medicine*. 2005; 352:515–6.

HOOFNAGLE, A. N.; ECKFELDT, J. H.; LUTSEY, P. L. Vitamin D-binding protein concentrations quantified by mass spectrometry. *New England Journal of Medicine*. 2015; 373: 1480–1482.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

JASSIL, N. K. et al. Vitamin D binding protein and 25-hydroxyvitamin D levels: emerging clinical applications. *Endocrine Practice*. 2017; 23:605–13.

JAVORSKI, N. et al. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms are associated to spontaneous preterm birth and maternal aspects. *Gene*. 2018; 642: 58–63.

JEMIELITA, T. O et al. Association of 25-hydroxyvitamin D with areal and volumetric measures of bone mineral density and parathyroid hormone: impact of vitamin D-binding protein and its assays. *Osteoporosis International*. 2016; 27, 617–626.

JENSEN, C. B. et al. Sources and determinants of vitamin D intake in Danish pregnant women. *Nutrients*. 2012: 259–272.

Jl, J.-L. et al. Immunological function of vitamin D during human pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017; 78(2).

JOHN, E. M. et al. Sun Exposure, Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, and Breast Cancer Risk in a Multiethnic Population. *American Journal of Epidemiology*. 2007; 166:1409-1419.

JOHN, M. et al. A novel immunoradiometric assay detects full-length human PTH but not amino terminally truncated fragments: implication for PTH measurements in renal failure. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999; 84:4287–4290.

JOHNSEN, M. S. et al. Serum free and bio-available 25-hydroxyvitamin D correlate better with bone density than serum total 25-hydroxyvitamin D. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2014; 74: 177–183.

JOLLIFE, D. A. et al. Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentration of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: Review of genetic association studies. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2016; 164, 18-29.

JONES, G.; STRUGNELL, S. A.; DELUCA, H. F. Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D. *Physiological Reviews*. 1998; 78(4): 1193–1231.

JONES, K. S. et al. Vitamin D expenditure is not altered in pregnancy and lactation despite changes in vitamin D metabolite concentrations. *Scientific Reports*. 2016; 6 (1).

JONES, K. S. et al. 25(OH)D2 half-life is shorter than 25(OH)D3 half-life and is influenced by DBP concentration and genotype. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014; 99: 3373–3381.

KALOUSOVA M., et al. Vitamin D Binding Protein Is Not Involved in Vitamin D Deficiency in Patients with Chronic Kidney Disease. *BioMed Research International*. 2015; 2015: 492365.

KAMEN, D. L.; TANGPRICHA, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine*. 2010; 88(5): 441–450, 2010.

KANE, L. et al. Vitamin D3 effects on lipids differ in statin and non-statin-treated humans: superiority of free 25-OH D levels in detecting relationships. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013; 98: 4400–4409.

KARLSSON, T. et al. Increased vitamin D-binding protein and decreased free 25(OH)D in obese women of reproductive age. *European Journal of Nutrition*. 2014; 53:(1):259–267.

KELISHADI, R. et al. Determinants of hypovitaminosis D in pregnant women and their newborns in a sunny region. *International Journal of Endocrinology*. 2013; 1-6.

KENT, G. N. et al. The efficiency of intestinal calcium absorption is increased in late pregnancy but not in established lactation. *Calcified Tissue International*. 1991; 48: 293–295.

KICH, D. M. et al. Determinação de 25-hidroxivitamina D2 e D3 em plasma por CLAE-DAD. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2012; 48(5): 329–336.

KIM, H. J. et al. Clinical Utility of Measurement of Vitamin D-Binding Protein and Calculation of Bioavailable Vitamin D in Assessment of Vitamin D Status. *Annals of Laboratory Medicine*. 2017; 37(1): 34.

KISSMEYER, A. et al. Pharmacokinetic studies of vitamin D analogues: relationship to vitamin D binding protein (DBP). *Endocrine*. 1995; 3:263–6.

KOVACS, C. S.; KRONENBERG, H. M. Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation. *Endocrine Reviews*. 1997; 18(6): 832–872.

KRAMER, C. K. et al. The Relationship Between Parathyroid Hormone and 25-Hydroxyvitamin D During and After Pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016; 101(4): 1729–1736.

KRIEGER, J.P. et al. Prevalence and determinants of vitamin D deficiency in the third trimester of pregnancy: a multicentre study in Switzerland. *British Journal of Nutrition*. 2018; 119(03); 299–309.

LAI, J. C. et al. Total 25(OH) vitamin D, free 25(OH) vitamin D and markers of bone turnover in cirrhotics with and without synthetic dysfunction. *Liver International*. 2015; 35: 2294–2300.

LAURIDSEN, A. L. et al. Plasma concentration of 25-hydroxy vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D are related to phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcified Tissue International*. 2005; 77 (1): 15-22.

LENSMEYER, G. L. HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurement: Comparison with Contemporary Assays. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(6): 1120–1126.

LEPAGE, R. et al. Circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clinical Chemistry*. 1998; 44:805–809.

- LI, J. H. et al. Association of TaqI T/C and FokI C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection. 2006; 86 (28): 1952-1956.
- LIONG, S.; DI QUINZIO, M. K. W.; Fleming, G., Permezel, M., & Georgiou, H. M. Is Vitamin D Binding Protein a Novel Predictor of Labour? *PLOS ONE*. 2013; 8(10): e76490.
- LORÉ, F. et al. A Effect of the administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on serum levels of 25-hydroxyvitamin D in postmenopausal women. *Calcified Tissue International*. 1982; 34: 539-541, 1982.
- MALABANAN, A.; VERONIKIS, I. E, HOLICK, M. F. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet*. 1998; 351:805–6.
- MARGOLIS, R. N.; CHRISTAKOS, S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1192(1): 208–214.
- MCCARTY, C. A. Sunlight exposure assessment: can we accurately assess vitamin D exposure from sunlight questionnaires? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 87 (suppl): 1097S.
- MENDEL, C. M. The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *Journal of Andrology*. 1992; 13(2): 107-116.
- MEZZAVILLA, M. et al. Investigation of genetic variation and lifestyle determinants in vitamin D levels in Arab individuals. *Journal of Translational Medicine*. 2018; 16(1).
- MITHAL A. et al. Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*. 2009; 20(11): 1807-1820.
- MITHAL, A. et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*. 2009; 20(11): 1807–1820.
- MORRISON, N. A. et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994; 367: 284–287.
- NIELSON, C. M. et al. Free 25-Hydroxyvitamin D: Impact of Vitamin D Binding Protein Assays on Racial-Genotypic Associations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016; 101(5).
- NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 88:491S-9S.
- NYKJAER, A. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25(OH)D vitamin D3. *Cell*. 1999; 96 (4).
- OLERÖD, G. et al. The variation in free 25 hydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein with season and vitamin D status. *Endocrine Connections*. 2017; 111–120.

PAPAPETROU, P. D. The interrelationship of serum 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D in pregnancy at term: a meta-analysis. *Hormones*. 2010; 9 (2):136-144.

PARK, H. et al.. Vitamin D Metabolism Varies among Women in Different Reproductive States Consuming the Same Intakes of Vitamin D and Related Nutrients. *The Journal of Nutrition*. 2016; 146(8): 1537–1545.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R. Vitamin D: The secosteroid hormone and human reproduction. *Gynecological Endocrinology*. 2007; 23(1): 13–24.

PETERSEN, R. A. et al. Common genetic variants are associated with lower serum 25-hydroxyvitamin D concentrations across the year among children at northern latitudes. *British Journal of Nutrition*. 2017; 117(06): 829–838.

POWE, C. E.; EVANS, M. K.; WENGER, M. D. J. Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans. *The New England Journal of Medicine*. 2013; 369: 21.

POWE, C. E. et al. Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011; 26 (7): 1609-1616.

POWE, C. E. et al. First Trimester Vitamin D, Vitamin D Binding Protein, and Subsequent Preeclampsia. *Hypertension*. 2010; 56(4): 758–763.

PRATUMVINIT, B. et al. Maternal vitamin D status and its related factors in pregnant women in Bangkok, Thailand. *PLOS One*. 2015; 10(7): e0131126.

PRENTICE, A. Elsie Widdowson Lecture. Mining the depths: metabolic insights into mineral nutrition. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2007.; 66:512–21.

PRENTICE, A.; GOLDBERG, G. R.; SCHOENMAKERS, I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 88 (suppl): 500S–6S.

PRIEMEL, M. et al. Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010; 25:305–12.

REID, D. et al. The relation between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations after elective knee arthroplasty. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; 93: 1006–1011.

RICHARD A. e al. Prevalence of vitamin D deficiency and its associations with skin color in pregnant women in the first trimester in a sample from Switzerland. *Nutrients*. 2017; 9: 260.

RITCHIE, L. D. et al. A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1998; 67:693–701.

- SAITO, A. et al. Complete Cloning and Sequencing of rat gp330/"megalin," a Distinctive Member of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994; 91: 9725-9729,
- SARAF, R. et al. Global summary of maternal and newborn vitamin D status - a systematic review. *Maternal & Child Nutrition*. 2015; 12(4): 647–668.
- SCHWARTZ, J. B.; KANE, L.; BIKLE, D. Response of vitamin D concentration to vitamin D3 administration in older adults without sun exposure: a randomized double-blind trial. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2016; 64: 65–72.
- SCHWARTZ, J. B. et al. Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014; 144: 156–158.
- SHAHBAZI, M. et al. Expression profiling of vitamin D receptor in placenta, decidua and ovary of pregnant mice. *Placenta*. 2011; 32:657-664.
- SHAO, B. et al. Vitamin D pathway gene polymorphisms influenced vitamin D level among pregnant women. *Clinical Nutrition*. 2017.
- SICHERI R.; EVERHART, J. E.; Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutrition Research*. 1998; 18:1649-1659.
- SOUBERBIELLE, J. C.; CORMIER, C.; KINDERMANS, C. Vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001; 86: 3086–90.
- SRIKANTH, P. et al. Associations of total and free 25OHD and 1, 25(OH)₂ D with serum markers of inflammation in older men. *Osteoporosis International* . 2016; 27, 2291–2300.
- STORDAL, K. et al. Fetal and Maternal Genetic Variants Influencing Neonatal Vitamin D Status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017; 102: 11.
- SWAPNA, N. et al. Risk coferred by FolK polymorphism of vitamin D receptor (VDR) gene for essential hypertension. *Indian Journal of Human Genetics*. 2011; 17 (3), 201-206.
- TAVARES, M. P. et al. Estado nutricional e qualidade da dieta de nutrizes em amamentação exclusiva. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2013; 26(3): 294-8.
- TSUPRYKOV, O. et al. Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2017; 180, 87-104.
- VAN, H. J. et al. Relationship between free and total 1,25-dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding. *European Journal of Endocrinology*. 2001; 144: 391–396.
- VERHAEGHE, J.; BOUILLON, R. Calciotropic hormones during reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1992; 41(3-8): 469–477.

VERMEULEN L.; VERDONCK, J. M.; KAUFMAN, A. Critical evaluation of simple methods for the stimulation of free testosterone in serum. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999; 84 (10): 3666-3672.

VOIPIO, A. J. et al. Determinants of serum 25(OH)D concentration in Young and middle-age adults. The cardiovascular risk in Young Finns study. *Annals of Medicine*. 2015; 47 (3): 253-262.

WAGNER, C. L.; HOLLIS, B. W. Beyond PTH: assessing vitamin D status during early pregnancy. *Clinical Endocrinology*. 2011; 75(3): 285–286.

WALSH, J. S. et al. Free 25-hydroxyvitamin D is low in obesity, but there are no adverse associations with bone health. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2016; 103(6): 1465–1471.

WANG, T. J. et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 2010; 376: 180-188.

WEBB, A. R.; KLINE, L.; HOLICK, M. F. Influence of Season and Latitude on the Cutaneous Synthesis of Vitamin D₃: Exposure to Winter Sunlight in Boston and Edmonton Will Not Promote Vitamin D₃ Synthesis in Human Skin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1988; 67(2).

WEBSKY, V. et al. Impact of vitamin D on pregnancy-related disorders and on offspring outcome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018; 180: 51–64.

WESTPHAL, U. Steroid-Protein Interactions. *Springer Verlag*. 1971; 216, 372.

WILKINSON, R. J. et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphism on tuberculosis among Gujarati Asians in West London: a case-control study, *Lancet*. 2000; 355 (9204): 618-621.

WINTERS, S. J. et al. Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women. *Metabolism*. 2009; 58(4): 438–442.

YANG, F. et al. Human group-specific component (Gc) is a member of the albumin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985; 82(23): 7994–8.

YAO, P. et al. Effects of Genetic and Non-genetic Factors on Total and Bioavailable 25(OH)D Responses to Vitamin D Supplementation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2016; 2930.

ZEHNDER, D. et al. The Ontogeny of 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -Hydroxylase Expression in Human Placenta and Decidua. *The American Journal of Pathology*. 2002; 161(1), 105–114.

ZHANG, C. et al. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and the risk for gestational diabetes mellitus. *PLOS ONE*. 2008; 3753.

ZHANG, J. Y. et al. Impact of pregnancy on vitamin D status: a longitudinal study. *British Journal of Nutrition*. 2014; 112(07): 1081–1087.

ZHANG, Y. et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage pro-inflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *Journal of Immunology*. 2012; 188:2127–2135.

APÊNDICE A - Questionário estruturado



Contato 1 – Questionário inicial

Prevalência de insuficiência de vitamina D materna e associação com concentrações de vitamina D no leite humano



Seção 1: Essa seção deve ser preenchida pelo entrevistador (a), de acordo com as questões respondidas pela voluntária em entrevista.

Identificação da coleta de dados

Entrevistadora: _____

Número do questionário: _____ Data da coleta de dados: _____

Horário da entrevista: ____:____ (horário 24 horas)

1. Identificação materna

Nome da participante: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Nº do prontuário: _____ Cartão SUS: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento: _____

Bairro: _____ CEP: _____

Telefone para contato: _____ Nome do contato: _____

Menarca: _____ (ano/meses) Primípara: ☐ sim ☐ não

2. Dados demográficos

Cor ou raça: ☐ branca ☐ preta ☐ amarela ☐ parda ☐ indígena

Estado civil: ☐ solteira ☐ casada ☐ viúva ☐ separada judicialmente/divorciada

Profissão/ ocupação habitual: _____

Está estudando: ☐ sim ☐ não período (M/T/N): _____

Escolaridade: ☐ sem instrução ☐ fundamental incompleto ☐ médio incompleto

☐ médio completo ☐ superior incompleto ☐ superior completo

Mora com quem: ☐ própria família ☐ família do companheiro ☐ com companheiro

Renda familiar: ☐ < 1 salário mínimo ☐ 1 a 3 salários mínimos

☐ 3 a 5 salários mínimos ☐ 5 a 7 salários mínimos ☐ >7 salários mínimos

Casa: ☐ própria ☐ alugada

Saneamento básico: ☐ sim ☐ não

3. Histórico gestacional

Gestações anteriores

Nº de gestações anteriores: _____ Nº de partos vaginais: _____ Nº de cesárias: _____
 Nº de nascidos vivos: _____ Nº de perdas fetais/ abortos: _____

Gestação atual

A gestação foi planejada? ☐ sim ☐ não

Duração da gestação (em semanas): _____

Intercorrências durante a gestação? ☐ sim ☐ não

Caso sim, especificar: ☐ anemia ☐ hipertensão ☐ náuseas
☐ sangramentos ☐ edema ☐ diabetes gestacional

Outros: _____

Número de consultas de pré natal: ☐ nenhuma ☐ de 1 a 3
☐ de 4 a 6 ☐ 7 e mais ☐ ignorado

Mês de gestação que iniciou o pré natal: _____º mês

Em que serviço (s) de consultou?

☐ SUS (posto/centro de saúde/hospital público ou conveniado com o SUS)
☐ Convênio ☐ Serviço de saúde particular (consultório/clínica ou hospital)

Outro (especifique): _____

Fez uso de suplementos durante a gestação? ☐ sim ☐ não

Quais? ☐ ferro ☐ ácido fólico ☐ vitamina A ☐ vitamina D
☐ zinco ☐ cálcio ☐ magnésio ☐ iodo
☐ óleo de peixe Outros (especifique): _____

Mês de gestação que iniciou a suplementação: _____º mês

Por quanto tempo fez uso do suplemento? _____ meses

Tinha o hábito de fumar durante a gestação? ☐ sim ☐ não

Se sim, quantos cigarros por dia? _____ cigarros

Tinha o hábito de consumir bebida alcoólica durante a gestação? ☐ sim ☐ não

Se sim, quantas doses por dia? _____ doses

4. Aleitamento materno

Amamentou anteriormente? ☐ Sim ☐ não

Se sim, como foi a amamentação? _____

☐ Exclusiva (apenas leite materno) ☐ Predominante (leite materno, água ou chá)

☐ Mista (leite materno e leite artificial ou água e chás)

Qual foi a duração da última amamentação (meses)?

☐ 1 a 5 ☐ 13 a 24 ☐ 6 a 12 ☐ 25 ou mais

Você encontrou dificuldade nas amamentações anteriores? ☐ sim ☐ não

Se sim, especifique: _____

Você produziu bastante leite? ☐ sim ☐ não

Recebeu orientações sobre a amamentação neste hospital? ☐ sim ☐ não

Você pretende amamentar o seu bebê? ☐ sim ☐ não

Se sim, por quanto tempo você pretende amamentar o seu bebê (meses)?

☐ 1 a 5 ☐ 13 a 24 ☐ 6 a 12 ☐ 25 ou mais

Você tem alguma dúvida sobre amamentação? ☐ sim ☐ não

Qual (is)? _____

5. Questões relevantes sobre a vitamina D

Você faz uso frequente de bloqueadores solares? ☐ sim ☐ não

Qual (marca)? _____ Qual é o fator de proteção (FPS)? _____

Frequência por semana: _____ dias Frequência por dia: _____ vezes

Tem hábito de se expor ao sol? ☐ sim ☐ não

Frequência por semana: _____ dias Horas por dia: _____ Horário: _____

Você se expôs ao sol nos últimos dias? ☐ sim ☐ não

Se sim, quando? _____ Por quanto tempo: _____ (horas)

Praticou alguma atividade física regular durante a gestação? ☐ sim ☐ não

Qual (is)? _____

Frequência por semana: _____ dias Horas por dia: _____

Faz algum serviço doméstico? ☐ sim ☐ não

Qual (is)? _____

Frequência por semana: _____ dias Horas por dia: _____

Apresenta alguma das doenças crônicas:

- ☐ fibrose cística ☐ doenças do trato gastrointestinal ☐ doenças hematológicas
☐ doenças renais ☐ insuficiência cardíaca ☐ doenças respiratórias

Outra (s), especificar: _____

Seção 2: Essa seção deve ser preenchida pelo entrevistador (a), por consulta aos prontuários e/ou cartão do pré natal.

Identificação da coleta de dados

Entrevistadora: _____

Número do questionário: _____ Data da coleta de dados: _____

Horário da coleta de dados: ____:____ (horário 24 horas)

1. Parto atual

Data do parto: ____/____/____ Horário do parto: _____ (horário 24 horas)

Tipo de parto: ☐ vaginal ☐ cesário

Intercorrência no parto? ☐ sim ☐ não

Sexo do bebê ☐ feminino ☐ masculino

Nome do bebê: _____

Peso ao nascer: _____ kg comprimento ao nascer: _____ cm

Perímetro cefálico: _____ cm perímetro torácico: _____ cm

Índice de Apgar: ____/____ (1º minuto/5º minuto)

Complicações durante o parto? ☐ sim ☐ não

Se sim, especifique: _____

Data prevista para alta hospitalar: ____/____/____

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO, NUTRIÇÃO E SAÚDE
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução nº 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Este termo de consentimento refere-se a minha participação como voluntária no projeto de pesquisa "Prevalência de insuficiência de vitamina D materna e sua relação com as concentrações de vitamina D no leite humano". O projeto está sendo coordenado pela Dr^a. Flávia Fioruci Bezerra, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e tem como objetivo determinar a prevalência de insuficiência de vitamina D em gestantes bem como seus potenciais fatores determinantes, e investigar a relação entre as concentrações de vitamina D no soro da mãe e as concentrações no colostro e no leite maduro.

Fui esclarecida de que minha colaboração se fará por meio de preenchimento de questionário estruturado, avaliação da pigmentação da pele e coleta de amostras de sangue e de leite materno. As coletas de sangue (15 mL) serão realizadas após jejum de 8h, no terceiro trimestre de gestação, por profissional treinado e capacitado. As amostras de colostro (10 mL) e de leite maduro (10 mL) serão coletadas pela manhã, por ordenha manual da mama não sugada após a última mamada. Todo o material utilizado para as coletas, processamento e armazenamento das amostras de sangue e leite materno será descartável e estéril.

Fui informada sobre a possibilidade de desconforto ou constrangimento no momento do preenchimento dos questionários, bem como no momento da coleta de sangue e de leite materno, porém sem colocar em risco a minha saúde e à saúde do bebê. Ao participar do projeto, eu estarei contribuindo com informações sobre o estado de vitamina D materna de forma a auxiliar a adoção de manejo nutricional adequado durante a gestação.

As informações obtidas por questionário e análises bioquímicas serão mantidas em sigilo e analisadas e divulgadas apenas como estatística, ou seja, respostas individuais não constarão de nenhum relatório. Entretanto, como voluntária, receberei dos pesquisadores os resultados dos exames em data pré-agendada.

A minha participação nesse estudo não é obrigatória e não contempla qualquer remuneração. Poderei desistir da minha participação no projeto a qualquer momento, sem qualquer constrangimento.

Fui informada que para maiores esclarecimentos, poderei contatar, antes e durante o desenvolvimento da pesquisa, os pesquisadores Flávia Fioruci Bezerra ou Joana de Novais Pereira através dos tel. (21)2334-0679 r. 227 ou (21)97565-8038, ou ainda o Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE - (21) 2868-8253.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 20____.

Assinatura da participante: _____

Nome legível da participante: _____

Assinatura do pesquisador: _____

APÊNDICE C - Material educativo

A saúde do seu bebê depende da sua saúde. Por isso, você também precisa de cuidado.



Faça parte da pesquisa:

“Prevalência da insuficiência de vitamina D materna e associação com concentrações de vitamina D no leite humano”

Para ter um acompanhamento mais de perto e conhecer como estão as concentrações de vitamina D no seu organismo e no seu leite, você poderá participar voluntariamente deste projeto.

EQUIPE RESPONSÁVEL PELO PROJETO:

Flávia Fioruci Bezerra – Coordenador
Joana de Novais Pereira
Alexandra Anastácio Monteiro da Silva
Cintia Chaves Curioni
Flávia dos Santos Barbosa Brito
Maria Eduarda Leão Diógenes de Melo

Realização:



Apoio:



Para maiores esclarecimentos:

(21) 975658038

VITAMINA D: IMPORTÂNCIA NA SAÚDE DA MÃE E DO BEBÊ



Vitamina D

Qual é a importância da vitamina D para a minha saúde e a do meu bebê?

A vitamina D apresenta um papel fundamental para a saúde materna e fetal. No organismo materno, a vitamina D é responsável pela diminuição do risco de desenvolvimento de doenças ósseas. Quando insuficiente esta vitamina vem sendo associada a diversas condições de doença, incluindo: diabetes, doenças infecciosas, respiratórias e alérgicas. No organismo fetal, a vitamina D participa do processo de formação e manutenção dos ossos e dentes.

Por que é importante a avaliação da vitamina D durante a minha gestação?

É durante os últimos meses de gestação que ocorre a maior transferência de vitamina D da mãe para o feto através da placenta, sendo essa a principal fonte de vitamina D do recém nascido durante os primeiros meses de vida. Por isso, a concentração de vitamina D no bebê vai depender, inicialmente, dos níveis de vitamina D no sangue da mãe.

Como eu posso garantir o estoque adequado de vitamina D no meu bebê após o nascimento?

A manutenção dos teores adequados de vitamina D no organismo da mãe durante a gestação é essencial para a prevenção da deficiência de vitamina D nos recém nascidos. Mas para manter os níveis adequados de vitamina D nos primeiros meses de vida, a criança em amamentação exclusiva vai depender, além do estoque proveniente da transferência placentária durante a gravidez, da exposição à luz solar e da ingestão de vitamina D via leite materno.

Porque eu mereço especial atenção no contexto das implicações da insuficiência de vitamina D para a minha saúde?

O risco de insuficiência aumenta em situações de maior demanda de vitamina D pelo organismo, como é o caso da gestação e lactação. Estudos sugerem que durante a gestação cerca de 75 a 95% das gestantes apresentam níveis insuficientes de vitamina D, ocasionando o nascimento de crianças com baixas reservas dessa vitamina.

Quais são as principais fontes de vitamina D?

A vitamina D pode ser produzida pelo nosso organismo, na pele, a partir da exposição à luz solar. Por isso, os banhos de sol em horários seguros são muito importantes para as mães e seus bebês.

A nutrição também tem um papel fundamental na manutenção dos níveis adequados de vitamina D, embora sua presença natural nos alimentos esteja restrita aos peixes, ovos, leites e derivados.



APÊNDICE D - Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência de insuficiência de vitamina D materna e associação com concentrações de vitamina D no leite humano

Pesquisador: Flávia Fioruci Bezerra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56617516.5.0000.5259

Instituição Proponente: Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.702.634

Apresentação do Projeto:

Continuação do Parecer: 1.598.920

Objetivo da Pesquisa:

Continuação do Parecer: 1.598.920

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Continuação do Parecer: 1.598.920

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Continuação do Parecer: 1.598.920

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2888-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.702.634

das boas práticas e apresentando todos os dados necessários para apreciação ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram atendidas as considerações do Parecer anterior. O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO. Para ter acesso ao PARECER CONSUBSTANCIADO: Clicar na "LUPA" (DETALHAR) - Ir em "DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA", clicar na opção da ramificação (pequeno triângulo no entrocamento do organograma) de pastas chamada – "Apreciação", e depois na Pasta chamada "Pareceres", o Parecer estará nesse local.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_620737.pdf	25/08/2016 13:01:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado.pdf	25/08/2016 13:01:07	Flávia Fioruci Bezerra	Aceito
Outros	declaracao_de_ciencia.pdf	12/05/2016 22:13:48	Joana de Novais Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	16/02/2016 11:14:38	Joana de Novais Pereira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	16/02/2016 11:13:35	Joana de Novais Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: oep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.702.634

Não

RIO DE JANEIRO, 30 de Agosto de 2016

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)

APENDICE E - Sintaxe das análises do artigo 1

Table 1. General Characteristics of the study population

- 1) Ativação do filtro de exclusão
 USE ALL.
 COMPUTE filter_\$(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).
 VARIABLE LABELS filter_\$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
 VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
 FORMATS filter_\$ (f1.0).
 FILTER BY filter_\$.
 EXECUTE.
- 2) Análise descritiva das variáveis faixa etária, idade gestacional, IMC pré gestacional, número de gestações anteriores, tipo de pele, hábito de fumar, hábito de beber, atividade física regular, nível educacional, estação do ano, concentração dos biomarcadores e frequência de insuficiência de vitamina D.

```
FREQUENCIES  VARIABLES=NumGest_3cat  ITA_4cat  Hábito_de_fumar
Hábito_de_beber  Atividades_físicas_na_gestação  Escolaridade  Estçao_coleta
VitaminaD_2cat IMC_3cat
/ORDER=ANALYSIS.
```

```
DESCRIPTIVES VARIABLES= Idade_anos Duração_da_gestação VitaminaD_total PTH
DBP_poli VD_livre_poli VD_bio_poli Albumina
/STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

Table 2. Concentrations of biochemical measures by category

- 1) Ativação do filtro de exclusão
 USE ALL.
 COMPUTE filter_\$(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).
 VARIABLE LABELS filter_\$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
 VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
 FORMATS filter_\$ (f1.0).
 FILTER BY filter_\$.
 EXECUTE.
- 2) Médias dos biomarcadores de vitamina D em função das categorias das variáveis idade gestacional, IMC pré-gestacional, tipo de pele, número de gestações anteriores, hábito de fumar, hábito de beber, atividade física regular, nível educacional, ganho de peso, estação do ano.

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
Semana_gest_3cat
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
IMC_3cat
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
ITA_4cat
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
NumGest_3cat
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
Ganho_peso_2cat
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
Hábito_de_fumar
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
Hábito_de_beber
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
Atividades_físicas_na_gestação
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

```

ONEWAY VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 VD_livre_poli VD_livre_mono3
VD_bio_poli VD_bio_mono3 BY
Escolaridade
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

Figure 1. Association between 25(OH)D₃ and DBP and albumin. (A) positive correlation between 25(OH)D₃ and albumin, (B) positive correlation between 25(OH)D₃ and DBP.

```

1) Ativação do filtro de exclusão
USE ALL.
COMPUTE filter_$(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).
VARIABLE LABELS filter_$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_$ (f1.0).
FILTER BY filter_$.
EXECUTE.

```

```

CORRELATIONS
/VARIABLES=VitaminaD_total DBP_poli DBP_mono3 PTH VD_livre_poli VD_bio_poli
VD_livre_mono3
VD_bio_mono3 Albumina Ganho_peso_gestacional ganho_peso_semanal IMC_gestacional
Idade_anos
ITA_constitutivo SEImao SEItesta Duração_da_gestação Gestações_anteriores
/PRINT=TWOTAIL NOSIG
/MISSING=PAIRWISE.

```

Table 3. Linear regression data of variables predicting 25(OH)D₃, DBP, PTH, free 25(OH)D₃ and bioavailable 25(OH)D₃ concentrations

```

1) Ativação do filtro de exclusão
USE ALL.
COMPUTE filter_$(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).
VARIABLE LABELS filter_$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_$ (f1.0).
FILTER BY filter_$.
EXECUTE.

```

- 2) Modelo de regressão multivariada considerando a 25(OH)D₃ como variável dependente, ganho de peso gestacional, IMC pré gestacional, idade materna, ITA, SEI, semana gestacional, número de gestações anteriores, estação do ano e nível de escolaridade como variáveis independentes.

```
REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT VitaminaD_nmol
/METHOD=ENTER    Ganho_peso_gestacional    IMC_gestacional    Idade_anos
ITA_constitutivo SEImao
Duração_da_gestação    Gestações_anteriores    verao_dummy    primavera_dummy
outono_dummy inverno_dummy complfund_dummy complhigh_dummy.
```

- 3) Modelo de regressão multivariada considerando a DBP como variável dependente, ganho de peso gestacional, IMC pré gestacional, idade materna, ITA, SEI, semana gestacional, número de gestações anteriores, estação do ano e nível de escolaridade como variáveis independentes.

```
REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT DBP_poli
/METHOD=ENTER    Ganho_peso_gestacional    IMC_gestacional    Idade_anos
ITA_constitutivo SEImao
Duração_da_gestação    Gestações_anteriores    verao_dummy    primavera_dummy
outono_dummy inverno_dummy complfund_dummy complhigh_dummy.
```

- 4) Modelo de regressão multivariada considerando o PTH como variável dependente, ganho de peso gestacional, IMC pré gestacional, idade materna, ITA, SEI, semana gestacional, número de gestações anteriores, estação do ano e nível de escolaridade como variáveis independentes.

```
REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT PTH
/METHOD=ENTER    Ganho_peso_gestacional    IMC_gestacional    Idade_anos
ITA_constitutivo SEImao
Duração_da_gestação    Gestações_anteriores    verao_dummy    primavera_dummy
outono_dummy inverno_dummy complfund_dummy complhigh_dummy.
```

- 5) Modelo de regressão multivariada considerando a 25(OH)D₃ livre como variável dependente, ganho de peso gestacional, IMC pré gestacional, idade materna, ITA, SEI, semana gestacional, número de gestações anteriores, estação do ano e nível de escolaridade como variáveis independentes.

REGRESSION

/MISSING LISTWISE

/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA

/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)

/NOORIGIN

/DEPENDENT VD_livre_poli

/METHOD=ENTER Ganho_peso_gestacional IMC_gestacional Idade_anos
ITA_constitutivo SEImao

Duração_da_gestação Gestações_anteriores verao_dummy primavera_dummy
outono_dummy inverno_dummy complfund_dummy complhigh_dummy.

- 6) Modelo de regressão multivariada considerando a 25(OH)D₃ biodisponível como variável dependente, ganho de peso gestacional, IMC pré gestacional, idade materna, ITA, SEI, semana gestacional, número de gestações anteriores, estação do ano e nível de escolaridade como variáveis independentes.

REGRESSION

/MISSING LISTWISE

/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA

/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)

/NOORIGIN

/DEPENDENT VD_bio_poli

/METHOD=ENTER Ganho_peso_gestacional IMC_gestacional Idade_anos
ITA_constitutivo SEImao

Duração_da_gestação Gestações_anteriores verao_dummy primavera_dummy
outono_dummy inverno_dummy complfund_dummy complhigh_dummy.

APENDICE F - Sintaxe das análises do artigo 2

Tabela 1. Características gerais da população estudada.

- 1) Ativação do filtro de exclusão

USE ALL.

COMPUTE filter_\$(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).

VARIABLE LABELS filter_\$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
 VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
 FORMATS filter_\$ (f1.0).
 FILTER BY filter_\$.
 EXECUTE.

- 2) Análise descritiva das variáveis faixa etária, idade gestacional, IMC pré gestacional, número de gestações anteriores, tipo de pele, hábito de fumar, hábito de beber, atividade física regular, nível educacional, estação do ano, concentração dos biomarcadores e frequência de insuficiência de vitamina D

FREQUENCIES VARIABLES=NumGest_3cat ITA_4cat Hábito_de_fumar
 Hábito_de_beber Atividades_físicas_na_gestação Escolaridade
 Estçao_coleta VitaminaD_2cat IMC_3cat
 /ORDER=ANALYSIS.

DESCRIPTIVES VARIABLES= Idade_anos Duração_da_gestação VitaminaD_total
 PTH DBP_poli VD_livre_poli VD_bio_poli Albumina
 /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.

Tabela 2. Frequências dos genótipos na população investigada.

- 1) Ativação do filtro de exclusão

USE ALL.

COMPUTE filter_\$(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).

VARIABLE LABELS filter_\$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
 VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
 FORMATS filter_\$ (f1.0).
 FILTER BY filter_\$.
 EXECUTE.

- 2) Análise de frequência dos diferentes genótipos para dos SNPs rs2282679, rs4588 e rs7041.

FREQUENCIES VARIABLES=rs2282679_3cat RS7041_3cat RS4588_3cat
 /ORDER=ANALYSIS.

Tabela 3. Frequências dos genótipos em função do estado de vitamina D.

- 1) Ativação do filtro de exclusão

USE ALL.

```

COMPUTE filter_$=(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).
VARIABLE LABELS filter_$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_$ (f1.0).
FILTER BY filter_$.
EXECUTE.

```

```

CROSSTABS
/TABLES=VitaminaD_2cat BY rs2282679_3cat
/FORMAT=AVALUE TABLES
/STATISTICS=CHISQ
/CELLS=COUNT
/COUNT ROUND CELL.

```

```

CROSSTABS
/TABLES=VitaminaD_2cat BY rs2282679_3cat
/FORMAT=AVALUE TABLES
/STATISTICS=CHISQ
/CELLS=COUNT ROW
/COUNT ROUND CELL.

```

```

CROSSTABS
/TABLES=VitaminaD_2cat BY RS7041_3cat
/FORMAT=AVALUE TABLES
/STATISTICS=CHISQ
/CELLS=COUNT ROW
/COUNT ROUND CELL.

```

```

CROSSTABS
/TABLES=VitaminaD_2cat BY RS4588_3cat
/FORMAT=AVALUE TABLES
/STATISTICS=CHISQ
/CELLS=COUNT ROW
/COUNT ROUND CELL.

```

Tabela 4. Concentração dos biomarcadores de vitamina D por categoria de genótipos dos SNPs.

- 1) Ativação do filtro de exclusão
USE ALL.
COMPUTE filter_\$=(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).
VARIABLE LABELS filter_\$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_\$ (f1.0).
FILTER BY filter_\$.
EXECUTE.

- 2) Médias dos biomarcadores de vitamina D em função das categorias dos diferentes genótipos dos SNPs ajustadas pela estação do ano, idade gestacional e IMC pré-gestacional.

```
GLM DBP_poli VitaminaD_nmol VD_livre_poli VD_bio_poli PTH BY
rs2282679_3cat WITH Estçao_coleta Duração_da_gestação IMC_gestacional
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/EMMEANS=TABLES(rs2282679_3cat) WITH(Estçao_coleta=MEAN
Duração_da_gestação=MEAN IMC_gestacional=MEAN) COMPARE ADJ(LSD)
/CRITERIA=ALPHA(.05)
/DESIGN=Estçao_coleta rs2282679_3cat.
```

```
GLM DBP_poli VitaminaD_nmol VD_livre_poli VD_bio_poli PTH BY RS7041_3cat
WITH Estçao_coleta Duração_da_gestação IMC_gestacional
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/EMMEANS=TABLES(RS7041_3cat) WITH(Estçao_coleta=MEAN
Duração_da_gestação=MEAN IMC_gestacional=MEAN) COMPARE ADJ(LSD)
/CRITERIA=ALPHA(.05)
/DESIGN=Estçao_coleta RS7041_3cat.
```

```
GLM DBP_poli VitaminaD_nmol VD_livre_poli VD_bio_poli PTHBY RS4588_3cat
WITH Estçao_coleta Duração_da_gestação IMC_gestacional
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/EMMEANS=TABLES(RS4588_3cat) WITH(Estçao_coleta=MEAN
Duração_da_gestação=MEAN IMC_gestacional=MEAN) COMPARE ADJ(LSD)
/CRITERIA=ALPHA(.05)
/DESIGN=Estçao_coleta RS4588_3cat.
```

Tabela 5. Associação entre os biomarcadores de estado de vitamina D e os genótipos dos SNPs investigados.

- 1) Ativação do filtro de exclusão
USE ALL.
COMPUTE filter_\$=(DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120).
VARIABLE LABELS filter_\$ 'DBP_poli <= 2000 & PTH <= 120 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_\$ (f1.0).
FILTER BY filter_\$.
EXECUTE.
- 2) Modelo de regressão multivariada considerando a 25(OH)D₃ como variável dependente, genótipos dos SNPs, estação do ano, idade gestacional e IMC pré gestacional como variáveis independentes.

REGRESSION

```

/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT VitaminaD_nmol
/METHOD=ENTER IMC_gestacional Duração_da_gestação verao_dummy
primavera_dummy outono_dummy inverno_dummy rs2282_GGdummy
rs2282_TTdummy rs2282_GTdummy
rs7041_AAdummy rs7041_CCdummy rs7041_ACdummy rs4588_GGdummy
rs4588_TTdummy rs4588_GTdummy.

```

- 3) Modelo de regressão multivariada considerando a DBP como variável dependente, genótipos dos SNPs, estação do ano, idade gestacional e IMC pré gestacional como variáveis independentes.

```

REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT DBP_poli
/METHOD=ENTER IMC_gestacional Duração_da_gestação verao_dummy
primavera_dummy outono_dummy inverno_dummy rs2282_GGdummy
rs2282_TTdummy rs2282_GTdummy
rs7041_AAdummy rs7041_CCdummy rs7041_ACdummy rs4588_GGdummy
rs4588_TTdummy rs4588_GTdummy.

```

- 4) Modelo de regressão multivariada considerando a 25(OH)_{D3} livre como variável dependente, genótipos dos SNPs, estação do ano, idade gestacional e IMC pré gestacional como variáveis independentes.

```

REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT VD_livre_poli
/METHOD=ENTER IMC_gestacional Duração_da_gestação verao_dummy
primavera_dummy outono_dummy inverno_dummy rs2282_GGdummy
rs2282_TTdummy rs2282_GTdummy
rs7041_AAdummy rs7041_CCdummy rs7041_ACdummy rs4588_GGdummy
rs4588_TTdummy rs4588_GTdummy.

```

- 5) Modelo de regressão multivariada considerando a 25(OH)_{D3} biodisponível como variável dependente, genótipos dos SNPs, estação do ano, idade gestacional e IMC pré gestacional como variáveis independentes.

```

REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT VD_bio_poli
/METHOD=ENTER IMC_gestacional Duração_da_gestação verao_dummy
primavera_dummy outono_dummy inverno_dummy rs2282_GGdummy
rs2282_TTdummy rs2282_GTdummy
rs7041_AAdummy rs7041_CCdummy rs7041_ACdummy rs4588_GGdummy
rs4588_TTdummy rs4588_GTdummy.

```

- 6) Modelo de regressão multivariada considerando o PTH como variável dependente, genótipos dos SNPs, estação do ano, idade gestacional e IMC pré-gestacional como variáveis independentes.

```

REGRESSION
/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT PTH
/METHOD=ENTER IMC_gestacional Duração_da_gestação verao_dummy
primavera_dummy outono_dummy inverno_dummy rs2282_GGdummy
rs2282_TTdummy rs2282_GTdummy
rs7041_AAdummy rs7041_CCdummy rs7041_ACdummy rs4588_GGdummy
rs4588_TTdummy rs4588_GTdummy.

```