



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Paula Normando dos Reis Costa

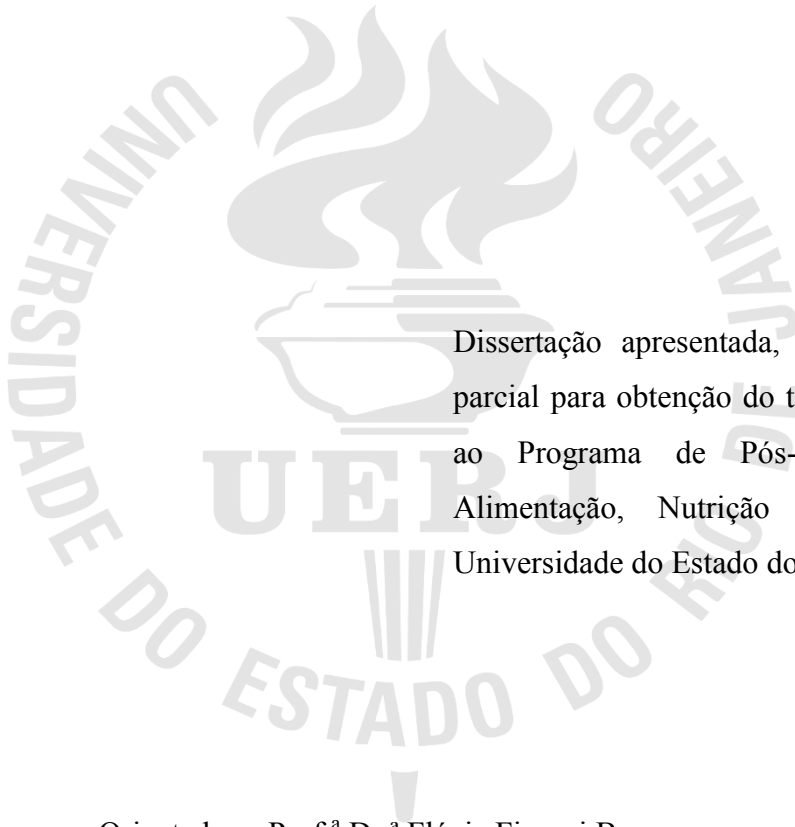
**Influência dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR)  
sobre a massa óssea em nutrizes adolescentes**

Rio de Janeiro

2014

Paula Normando dos Reis Costa

**Influência dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) sobre a massa óssea em nutrizes adolescentes**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Fioruci Bezerra

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Maria Eduarda Leão Diogenes Melo

Rio de Janeiro

2014

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

C837 Costa, Paula Normando dos Reis  
Influência dos polimorfismos nos gene do receptor de vitamina D (VDR)  
sobre a massa óssea em nutrizes adolescentes / Paula Normando dos Reis Costa. -  
2014.  
106 f.

Orientadora: Flávia Fioruci Bezerra.  
Coorientador: Maria Eduarda Leão Diognes Melo.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto  
de Nutrição.

1. Polimorfismo genético - Teses. 2. Osso e ossos - Teses. 3. Lactação -  
Teses. 4. Adolescente - Teses. I. Bezerra, Flávia Fioruci. II. Melo, Maria  
Eduarda Leão Diogenes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto  
de Nutrição. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-  
raduação em Alimentação, Nutrição e Saúde.

CDU 612.39-053.6

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

---

Assinatura

---

Data

Paula Normando dos Reis Costa

**Influência dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) sobre a massa óssea em nutrizes adolescentes**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em: 23/07/2014

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Flávia Fioruci Bezerra

Instituto de Nutrição - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Instituto de Nutrição - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu pai Paulo e à minha mãe Terezinha por todo amor e dedicação. Meus maiores exemplos de vida, e de que a educação e o conhecimento são fundamentais para qualquer conquista.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Flávia, por tudo que conquistei nesses cinco anos de orientação. Muito obrigada por todo o conhecimento, incentivo, dedicação e confiança no meu trabalho. Convivendo com você aprendo o real caminho para me tornar uma grande profissional: gostar daquilo que se faz, dedicar-se arduamente ao trabalho, respeitar sempre o próximo, e não desistir mesmo diante das situações mais difíceis. Ser sua aluna é um privilégio, e é uma alegria imensa saber que continuarei aprendendo com você nos próximos quatro anos.

À Duda, fundamental na minha formação. Sou grata por tudo que aprendi com você ao longo desses quatro anos, e também agradeço muito a confiança e a oportunidade de dar continuidade ao bellissimo trabalho que você iniciou. Desejo que nossa parceria e amizade permaneçam mesmo após o fim dessa etapa.

À Professora Carmen Donangelo, pela oportunidade de ingressar nesse projeto, e poder aprender muito com todos que fizeram parte desse trabalho.

À Elaine e Fernanda, por todo aprendizado e dedicação, e pela agradável companhia ao longo do projeto. Vocês também foram fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Giselda Kalil e ao Dr. Pedro Cabello, pela oportunidade de realizar meu trabalho no Laboratório de Genética Humana (LGH), por todo o aprendizado e pela ótima convivência.

À Professora Josely, pelo incentivo, confiança, e por todas as contribuições dadas ao meu trabalho e a minha formação. Impossível não se contagiar com o seu bom humor e carisma, e exemplo de competência e profissionalismo.

Aos professores do PPG Alimentação, Nutrição e Saúde, por todo o conhecimento transmitido.

À Gabi, minha maior parceira nesses últimos seis anos e meio. Quem esteve ao meu lado desde o primeiro dia da Graduação, que construiu o “sonho Mestrado” comigo, quem participou de todos os momentos, bons e ruins. Saber que tenho você ao meu lado torna tudo mais fácil. Que venham os próximos quatro anos, e o desejo de que nossa parceria seja eterna.

Aos amigos do NENFE e do PPG Alimentação, Nutrição e Saúde, por estarem ao meu lado nessa jornada. Em especial, agradeço a Amina, pelo apoio, torcida e ajuda ao longo desses anos. Aprendi e ainda aprendo muito com você, além de ter ganhado uma grande amiga.

Aos amigos do LGH, que foram fundamentais para a execução do meu trabalho, em especial à Carol, meu “anjo da guarda”, sempre disposta a me ensinar e ajudar. Além de uma grande companheira de trabalho, se tornou uma amiga muito querida, que quero levar para a vida toda. Você merece todo o sucesso do mundo, e não tenho dúvidas de que você irá brilhar ainda mais.

A todos os meus amigos, em especial aos maiores presentes que a UERJ me deu: Mari, Cella, Ana, Carol, Ingrid e Tamiris. Todas foram fundamentais nessa caminhada. Sou muito grata por ter pessoas tão especiais na minha vida.

À Ju, mais que amiga, confidente e companheira. Minha irmã de alma. Aquela que está presente nas minhas melhores lembranças. Obrigada por ser essa amiga incrível, que torce pelas minhas conquistas e que está sempre ao meu lado para o que for.

Ao André, por todo o apoio e companheirismo, principalmente nos momentos mais difíceis. Apesar de ele acreditar que fez pouco pelo meu trabalho, foi fundamental para que eu superasse todas as angústias e medos, sempre me incentivando, e tornando meus dias mais alegres com todo o seu carinho. Amo você!

À minha irmã Roberta, o maior presente que eu ganhei na vida. Minha grande amiga e companheira, que está sempre torcendo e rezando por mim. Sem o seu apoio nada seria possível. Tenho muito orgulho de ser irmã de uma pessoa tão iluminada, e que tem um caminho brilhante pela frente. Amo muito você!

Aos meus pais, os grandes responsáveis por tudo que eu conquistei até hoje. Sempre acreditando nos meus sonhos e no meu potencial. Sem vocês eu nada seria. Muito obrigada por todo amor e dedicação. Amo muito vocês e sou eternamente grata por ter vocês como pais.

A todas as voluntárias que participaram deste projeto, pelo carinho, confiança e disponibilidade.



“The beautiful thing about learning is that nobody can take it away from you.”

A coisa mais bonita sobre a aprendizagem é que ninguém pode tirar isso de você.

*B.B. King*

## RESUMO

NORMANDO, Paula. *Influência dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) sobre a massa óssea em nutrizes adolescentes*. 106 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Rio de Janeiro, 2014.

Em mães adolescentes com baixa ingestão de cálcio, a suplementação com cálcio e vitamina D durante a gestação parece proteger contra a excessiva perda óssea materna na lactação. Polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) têm sido associados à massa óssea em adolescentes e é possível que os mesmos influenciem a perda óssea induzida pela lactação. Além disso, é possível que esses polimorfismos sejam capazes de modular respostas ósseas frente a uma suplementação com cálcio e vitamina D. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de polimorfismos no gene do VDR e sua interação com a suplementação de cálcio e vitamina D durante a gestação sobre a massa óssea de nutrizes adolescentes (14-19 anos) com baixa ingestão habitual de cálcio (~600mg/dia). As adolescentes foram suplementadas com cálcio e vitamina D<sub>3</sub> (600mg+200UI/dia; n=30) ou receberam placebo (n=26) desde a 26ª semana gestacional (SG) até o parto. As concentrações séricas de IGF-1, PTH, Estradiol, Prolactina e 25(OH)D foram avaliadas na 26ª SG, na 5ª e 20ª semana pós-parto (SPP). As avaliações da massa óssea incluíram o conteúdo mineral (CMO), a densidade mineral (DMO) e a área óssea (AO) total e de sítios específicos [coluna lombar (CL, L1-L4), fêmur total (FT) e colo do fêmur (CF)] avaliados por DXA na 5ª e 20ª SPP. Os polimorfismos rs1544410 (G>A), rs10735810 (C>T), rs7975232 (T>G), rs731236 (T>C) foram determinados por RFLP. Os polimorfismos rs7139166 (G>C, 1521pb) e rs4516035 (A>G, 1012pb) localizados na região promotora do gene foram determinados por PCR em tempo real. A influência dos polimorfismos, e sua interação com a suplementação sobre a massa óssea das nutrizes foram avaliadas por ANCOVA após ajustes por co-variáveis significativas. A distribuição dos genótipos para todos os polimorfismos avaliados não diferiu entre os grupos placebo e suplementado. Adolescentes com o genótipo CC (rs10735810) apresentaram menores perdas no CMO no corpo total da 5ª a 20ª SPP comparadas àquelas com genótipo CT e TT ( $P<0,01$ ). Para a região do CF, as adolescentes com o genótipo TC (rs731236) apresentaram menores perdas de DMO e de Zscore de DMO da 5ª a 20ª SPP em relação àquelas com genótipo TT e CC ( $P<0,01$ ). Nas mães suplementadas com a combinação genotípica 1521GG/1012AA foram observadas maiores concentrações séricas de PTH na 20ª SPP ( $P=0,02$ ) e maior redução na AO total da 5ª a 20ª SPP comparadas às nutrizes de mesma combinação genotípica que receberam placebo ( $P=0,03$ ). Nas nutrizes suplementadas 1521GG/1012AA também foi observada menor redução no Z score da DMO total ( $P=0,03$ ) e DMO do CF ( $P=0,008$ ), e maior incremento na AO do FT ( $P=0,05$ ) da 5ª a 20ª SPP, quando comparadas às nutrizes suplementadas com outras combinações genotípicas, bem como quando comparadas a nutrizes 1521GG/1012AA que receberam placebo. Nossos resultados sugerem que polimorfismos no gene do VDR, especialmente aqueles localizados na região promotora do gene, podem influenciar tanto a massa óssea durante a lactação quanto às respostas ósseas maternas frente a uma suplementação com cálcio e vitamina D durante a gestação em adolescentes.

Palavras-chave: Polimorfismos. Massa óssea. Lactação. Adolescência.

## ABSTRACT

NORMANDO, Paula. Influence of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms on bone mass in lactating adolescents. 106 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Rio de Janeiro, 2014.

In adolescent mothers with low dietary calcium intake, calcium plus vitamin D supplementation during mid-pregnancy appears to protect against excessive maternal bone loss during lactation. Polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene have been associated with bone mass in adolescents and it is possible that bone loss of lactation is also influenced by these polymorphisms. Moreover, it is also possible that these polymorphisms are able to modulate bone responses to calcium and vitamin D supplementation. The objective of the study was to evaluate the influence of VDR gene polymorphisms and its interaction with calcium and vitamin D supplementation during pregnancy on bone mass of lactating adolescents (14-19 y) with habitually low calcium intake (~600mg/d). Adolescents received calcium plus vitamin D supplements (600mg+200UI/d; n=30) or placebo (n=26) from 26 wk of gestation until parturition. Serum concentrations of IGF-1, PTH, estradiol, prolactin and 25(OH)D were assessed at 26wk gestation, 5 and 20 wk postpartum. Bone mass assessments included bone mineral content (BMC), density (BMD) and bone area (BA) at total body and specific sites [lumbar spine (LS, L1-L4), total hip (TH) and femoral neck (FN)] assessed by DXA at 5 and 20 wk postpartum. The polymorphisms rs1544410 (G>A), rs10735810 (C>T), rs7975232 (T>G), rs731236 (T>C) were determined by RFLP. Polymorphisms rs7139166 (G>C, 1521pb) and rs4516035 (A>G, 1012pb), located in the gene promoter region, were determined by real-time PCR. The effects of polymorphisms and its interaction with supplementation on bone mass were assessed by ANCOVA after adjustment for significant covariates. The genotype distribution for all polymorphisms evaluated were not different between placebo and supplemented groups. Adolescents with CC (rs10735810) genotype had lower losses in total body BMC from 5 to 20 wk postpartum compared to those with CT and TT genotypes ( $P < 0.01$ ). At femoral neck, lactating adolescents with TC genotype (rs731236) had lower losses in BMD and Z score BMD from 5 to 20 wk postpartum compared to those with CC and TT genotypes ( $P < 0.01$ ). Supplemented mothers with 1521GG/1012AA genotype combination had higher serum PTH at 20 wk postpartum ( $P=0.02$ ) and greater reduction in total BA from 5 to 20 wk compared to those with the same genotype combination who received placebo ( $P=0.03$ ). Supplemented mothers with 1521GG/1012AA had lower reduction at total Z score BMD ( $P=0.03$ ) and femoral neck BMD ( $P=0.008$ ) and higher increment at total hip BA ( $P = 0.05$ ) from 5 to 20 wk postpartum compared to those supplemented mothers with other genotype combinations, and to mothers with 1521GG/1012AA who received placebo. Overall, our results suggest that VDR gene polymorphisms, especially those located at promoter region, may influence bone mass during lactation as well as maternal bone responses to calcium and vitamin D supplementation during pregnancy in adolescents.

Keywords: Polymorphisms. Bone mass. Lactation. Adolescence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Localização dos polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (VDR).....	34
<b>Figura 2</b> - Localização dos polimorfismos na região promotora do gene do receptor de vitamina D (VDR).....	37
<b>Figura 3</b> - Diagrama de fluxo do recrutamento, randomização dos grupos, perdas e acompanhamento dos participantes do estudo .....	42
<b>Figura 4</b> - Resultado da digestão com a enzima de restrição BsmI (rs1544410, G>A). .....	47
<b>Figura 5</b> - Resultado da digestão com a enzima de restrição FokI (rs1544410, C>T).....	48
<b>Figura 6</b> - Resultado da digestão com a enzima de restrição ApaI (rs7975232, T>G). .....	48
<b>Figura 7</b> - Resultado da digestão com a enzima de restrição TaqI (rs731236, T>C).....	49
<b>Figura 8</b> - Genotipagem dos polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) através da reação de PCR em tempo real .....	51
<b>Figura 9</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre a variação nas concentrações séricas de 25(OH)D entre a 26 <sup>a</sup> semana gestacional e a 5 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	63
<b>Figura 10</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre a variação nas concentrações séricas de PTH na 5 <sup>a</sup> semana pós-parto ( <b>A</b> ) e na 20 <sup>a</sup> semana pós-parto ( <b>B</b> ). .....	64
<b>Figura 11</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs10735810 (FokI) sobre variações ósseas da 5 <sup>a</sup> para a 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	71
<b>Figura 12</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs7975232 (ApaI) sobre variações ósseas da 5 <sup>a</sup> para a 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	71
<b>Figura 13</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs731236 (TaqI) sobre variações ósseas da 5 <sup>a</sup> para a 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	72
<b>Figura 14</b> - Efeito dos genótipos determinados pelos polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre variações ósseas da 5 <sup>a</sup> para a 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características gerais das adolescentes no início do estudo (26 <sup>a</sup> semana gestacional) .....	54
<b>Tabela 2</b> - Frequência dos genótipos avaliados nas nutrizes adolescentes.....	55
<b>Tabela 3</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs1544410 (BsmI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5 <sup>a</sup> e 20 <sup>a</sup> semanas pós-parto .....	57
<b>Tabela 4</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs10735810 (FokI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5 <sup>a</sup> e 20 <sup>a</sup> semanas pós-parto .....	58
<b>Tabela 5</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs7975232 (ApaI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5 <sup>a</sup> e 20 <sup>a</sup> semanas pós-parto .....	59
<b>Tabela 6</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs731236 (TaqI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5 <sup>a</sup> e 20 <sup>a</sup> semanas pós-parto .....	60
<b>Tabela 7</b> - Efeito dos genótipos determinados pelos polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5 <sup>a</sup> e 20 <sup>a</sup> semanas pós-parto. ....	61
<b>Tabela 8</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs1544410 (BsmI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> e a na 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	66
<b>Tabela 9</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs10735810 (FokI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> e a na 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	67
<b>Tabela 10</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs7975232 (ApaI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> e a na 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	68
<b>Tabela 11</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs731236 (TaqI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> e a na 20 <sup>a</sup> semana pós-parto.....	69
<b>Tabela 12</b> - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> e a na 20 <sup>a</sup> semana pós-parto. ....	70
<b>Tabela 13</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) total das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> semana, na 20 <sup>a</sup> semana e na variação da 5 <sup>a</sup> para a 20 <sup>a</sup> semana pós-parto ( $\Delta$ ).....	74
<b>Tabela 14</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) total das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> semana, na 20 <sup>a</sup> semana e na variação da 5 <sup>a</sup> para a 20 <sup>a</sup> semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	75
<b>Tabela 15</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) total das adolescentes estudadas na 5 <sup>a</sup> semana, na 20 <sup>a</sup> semana e na variação da 5 <sup>a</sup> para a 20 <sup>a</sup> semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	76

<b>Tabela 16</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	77
<b>Tabela 17</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	79
<b>Tabela 18</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ).....	80
<b>Tabela 19</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	81
<b>Tabela 20</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	82
<b>Tabela 21</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ).....	84
<b>Tabela 22</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	85
<b>Tabela 23</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ).....	86
<b>Tabela 24</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	87
<b>Tabela 25</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) do colo do fêmur das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ).....	89
<b>Tabela 26</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) do colo do fêmur das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ) .....	90
<b>Tabela 27</b> - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) do colo do fêmur das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ ).....	91

**Tabela 28** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )..... 92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) <sub>2</sub> D	1,25 dihidroxi-vitamina D
25(OH)D	25 hidroxí-vitamina D
ANCOVA	Análise de covariância
aDMO	Área de densidade mineral ósea
AO	Área ósea
CMO	Conteúdo mineral ósseo
DMO	Densidade mineral ósea
dNTP's	Deoxinucleotídeos
DOC	Densidade de osso cortical
DXA	Absorciometria de dupla emissão de raios X
ELISA	Imunoensaio enzimático competitivo
GH	Hormônio de crescimento
IGF-I	Fator de crescimento tipo I semelhante à insulina
INU	Instituto de Nutrição
LIAN	Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional
MCS-F	Fator estimulador de colônia de macrófagos
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTH	Hormônio da paratireóide
PTHrP	Peptídeo relacionado ao paratormônio
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa beta
RANK L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa beta
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>



RT-qPCR	PCR em tempo real
RXR	Receptor de ácido retinóico
SG	Semana gestacional
SPP	Semana pós-parto
SNP	Polimorfismos de um único nucleotídeo
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VDR	Receptor de Vitamina D ( <i>Vitamin D receptor</i> )
VDRE	Elementos de resposta da vitamina

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	21
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
1.1 Aspectos gerais do metabolismo ósseo e de cálcio .....	23
1.2 Aquisição de massa óssea durante a adolescência .....	25
1.3 Influência da gestação e lactação sobre a massa óssea de adolescentes .....	28
1.4 Influência de polimorfismos genéticos sobre a massa óssea na adolescência .....	31
2. HIPÓTESES .....	38
3. OBJETIVOS .....	39
3.1 Objetivos geral .....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
4. MÉTODOS .....	40
4.1 Recrutamento das voluntárias e desenho experimental .....	40
4.2 Avaliação da Massa Óssea e medidas antropométricas .....	43
4.3 Avaliação Bioquímica .....	43
4.4 Análise da ingestão dietética .....	43
4.5 Determinação dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) .....	44
4.5.1 Extração do DNA genômico .....	45
4.5.2 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP</i> .....	45
4.5.2.1 Amplificação das regiões de interesse .....	45
4.5.2.2 Digestão com enzimas de restrição .....	46
4.5.2.3 Identificação dos polimorfismos .....	47
4.5.3 PCR em tempo Real .....	50
4.5.3.1 Quantificação do DNA genômico .....	50
4.5.3.2 Identificação dos polimorfismos .....	50
4.6 Análises Estatísticas .....	52
5. RESULTADOS .....	54
6. DISCUSSÃO .....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
APÊNDICE A - Consentimento Livre e Esclarecido .....	107
APÊNDICE B - Questionário Inicial .....	108
APÊNDICE C - Evolução Pós-Parto .....	110
APÊNDICE D - Recordatório de 24 Horas .....	112

## INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a adolescência como o período entre 10 e 19 anos de idade, marcado pelo rápido crescimento e desenvolvimento, e durante o qual ocorrem alterações físicas, sexuais e emocionais (WHO, 2009). A adequação da mineralização óssea durante adolescência é considerada um determinante na prevenção do desenvolvimento de osteoporose. Durante esta fase, as taxas de formação óssea são superiores às de reabsorção, e o pico de velocidade de acúmulo de massa óssea é alcançado (MATKOVIC, 1996; SAGGESE, BARONCELLI, BERTELLONI, 2002; YILMAZ et al., 2005), influenciado por fatores genéticos e ambientais, como por exemplo a ingestão de cálcio (MATKOVIC, 1996), e condições fisiológicas, como a gestação e a lactação (BEZERRA et al., 2004; JARJOU et al., 2010).

Estudos de herdabilidade têm demonstrado uma substancial contribuição da genética para a densidade mineral óssea (DMO). O gene do receptor de vitamina D (VDR) tem sido amplamente estudado pelo seu potencial papel no metabolismo ósseo e polimorfismos nesse gene têm sido associados a medidas de DMO em diferentes sítios ósseos (MITCHELL, YERGES-ARMSTRONG, 2011). Dentre os polimorfismos, os reconhecidos pelas enzimas de restrição ApaI, BsmI, TaqI e FokI têm sido estudados em adolescentes, embora os resultados ainda sejam controversos. Parte da controvérsia pode ser devido a características fisiológicas próprias dos adolescentes estudados (ex. estágio de maturação) e/ou a interação com fatores ambientais (SASSAGE, BARONCELLI, BERTELLONI, 2002; DAVIES, EVANS, GREGORY, 2005; PRENTICE et al., 2007).

A gestação e a lactação também são fatores fisiológicos capazes de interferir na densidade mineral óssea materna. Nesses períodos, os mecanismos de manutenção da homeostase de cálcio se adaptam para assegurar a formação óssea fetal e a produção de leite materno, o que inclui aumento da absorção intestinal de cálcio, redução da excreção renal de cálcio e aumento da remodelação óssea (RITCHIE et al., 1998; BEZERRA, DONANGELO, 2007), com conseqüente perda óssea particularmente na lactação. Porém, estudos com mães adolescentes mostraram que as adaptações fisiológicas durante a gestação e a lactação podem não ser suficientes para garantir o adequado acúmulo ósseo característico da adolescência, além do crescimento fetal e da produção de leite materno, principalmente se a ingestão de cálcio for baixa e/ou o estado nutricional de vitamina D for insuficiente (BEZERRA, DONANGELO, 2005; BEZERRA, DONANGELO, 2007; WARD et al., 2009). De fato

estudos em adolescentes já verificaram diferentes graus de perda óssea, em diferentes sítios ósseos durante a lactação (BEZERRA, DONANGELO, 2005; BEZERRA, DONANGELO, 2007).

A suplementação com cálcio durante a gestação e/ou lactação parece não prevenir a perda óssea característica da lactação, ao menos em mulheres adultas (KALKWARF et al., 1997; JARJOU et al., 2010). No entanto, recentemente, Diogenes e colaboradores (2013) demonstraram que a suplementação com cálcio (600 mg) e vitamina D (200 UI) durante a gestação parece prevenir a perda excessiva de massa óssea durante a lactação em adolescentes.

Considerando a forte influência da genética, assim como da gestação e lactação sobre a massa óssea na adolescência, torna-se relevante investigar a influência de polimorfismos no gene do VDR sobre a massa óssea de adolescentes na lactação. Além disso, é possível que esses polimorfismos sejam também capazes de influenciar a capacidade de resposta do organismo da nutriz adolescente frente a uma suplementação de cálcio e vitamina D, o que também precisa ser investigado.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Aspectos gerais do metabolismo ósseo e de cálcio

A adequada aquisição de massa óssea durante a adolescência é considerada um importante determinante para a saúde óssea na vida adulta, e para o futuro risco de desenvolvimento da osteoporose (MOURATIDOU et al., 2013; RIZZOLI et al., 2010; VATANPARAST et al., 2009).

O tecido ósseo é formado por células como os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento, minerais (principalmente cálcio e fósforo) e matriz protéica (proteínas colágenas e não-colágenas), sofrendo remodelação contínua ao longo da vida. A remodelação óssea envolve a remoção de “osso velho”, e a subsequente mineralização da matriz proteica para formar o “osso novo”, e é necessária para manter a integridade estrutural dos ossos, como também a homeostase de cálcio (RAISZ, 1999).

Do ponto de vista macroscópico, existem dois tipos de osso: cortical e trabecular. O osso cortical possui uma maior compactação, com 30 a 90% da sua estrutura calcificada, predominando na diáfise de ossos longos. O osso trabecular possui uma estrutura altamente porosa, formado por inúmeras trabéculas interconectadas, tendo apenas 15 a 20% da sua estrutura calcificada, e sendo encontrado em sítios ósseos como vertebras, pelve e esterno. Diante de sua maior relação superfície/volume, o osso trabecular em geral é mais responsivo aos estímulos metabólicos, com uma rápida remodelação óssea (HEANEY, 2003).

A unidade de remodelação do osso é composta por um grupo fortemente acoplado de osteoclastos e os osteoblastos, que realizam respectivamente, a reabsorção de osso antigo e a formação de osso novo (CLARKE, 2008). Os osteoblastos são células responsáveis pela formação óssea, sintetizando, depositando e orientando as proteínas da matriz proteica óssea, e em seguida iniciando mudanças que tornam esta matriz suscetível a mineralização. Essas mudanças envolvem a secreção de proteínas dentro da matriz previamente depositada, o que contribui para criar uma configuração tridimensional que atrai íons de cálcio e fosfato, e os organiza na configuração de cristal de apatita. Os osteoclastos por sua vez são células envolvidas na reabsorção óssea, e para realizar tal função aderem a uma região microscópica da superfície do osso, e secretam ácido e enzimas proteolíticas, que dissolvem o conteúdo

mineral e digerem a matriz proteica para serem liberados no líquido extracelular (HEANEY, 2003).

A remodelação óssea envolve uma sequência de etapas altamente reguladas. A primeira etapa é a de ativação da remodelação óssea, que por sua vez depende dos efeitos de fatores locais e sistêmicos sobre as células mesenquimais da linhagem dos osteoblastos. Estas células interagem com precursores hematopoiéticos para formar os osteoclastos, que dão início a etapa de reabsorção. Em seguida, ocorre uma fase de "inversão" nas quais células mononucleares presentes na superfície do osso completam o processo de reabsorção, e sinalizam o início a formação óssea. Por fim, a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos funcionais estabelece a fase de formação da matriz óssea (RAIZ, 1999; CLARKE, 2008).

A regulação desse processo envolve tanto fatores sistêmicos, como o hormônio da paratireoide (PTH), vitamina D (1,25-di-hidroxitamina D ou  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ), hormônio de crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), quanto fatores locais como citocinas, prostaglandinas e fatores de crescimento (CLARKE, 2008; RAISZ, 1999). O PTH e a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  atuam sobre os osteoblastos estimulando a osteoclastogênese. O ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa beta (RANK L), produzido pelos osteoblastos, ativa seu receptor específico ativador do fator nuclear Kappa beta (RANK) nos percussores dos osteoclastos, e promove assim a maturação dos osteoclastos na presença do fator estimulador de colônia de macrófagos (MCS-F), principal mediador da diferenciação e ativação dos osteoclastos (LEEMING et al., 2006). A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  também inibe a expressão da osteoprotegerina (OPG), uma proteína sintetizada nos osteoblastos, que se liga ao RANKL, e conseqüentemente inibe a diferenciação dos osteoclastos (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2005).

Uma vez que 99% do cálcio do organismo humano está armazenado nos ossos, a regulação do metabolismo ósseo guarda estreita relação com o metabolismo de cálcio. A regulação da homeostase de cálcio é mediada principalmente pelo PTH e pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Quando a concentração plasmática de cálcio diminui, a glândula da paratireoide é estimulada a liberar PTH. O PTH promove o aumento da remoção renal de fosfato, reabsorção tubular renal de cálcio, e aumenta a atividade dos osteoclastos nos locais onde ocorrerá a reabsorção óssea. (HEANEY, 2003). O PTH também estimula a conversão renal da 25-hidroxitamina D [ $25(\text{OH})\text{D}$ ] em sua forma ativa  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , que por sua vez, aumenta a absorção intestinal transcelular de cálcio. Por sua vez, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  se liga ao seu receptor nuclear (VDR) nos

enterócitos e estimula a síntese de uma proteína transportadora de cálcio, a calbidina, que por transporte ativo, carrega o cálcio através do epitélio das células intestinais para a circulação (HEANEY, 2003).

## **1.2 Aquisição de massa óssea durante a adolescência**

Na infância e adolescência, a formação e reabsorção óssea ocorrem de forma simultânea em diferentes sítios, levando ao aumento no tamanho dos ossos e pequenas mudanças na forma dos mesmos (PARFITT, 2000; HEANEY, 2003). Além disto, a velocidade de formação óssea supera a degradação, resultando no rápido acúmulo de massa óssea característico da adolescência (WELCH, WEAVER, 2008).

Van Coeverden e colaboradores (2002) avaliaram o aumento do conteúdo mineral ósseo (CMO), expresso em gramas, e da densidade mineral óssea (DMO), expressa em  $\text{g/cm}^2$ , do esqueleto total, coluna lombar e fêmur, ao longo da puberdade em meninos e meninas saudáveis. Em ambos os sexos, o crescimento longitudinal, bem como a massa óssea aumentaram rapidamente durante a puberdade. O crescimento longitudinal foi mais rápido durante as fases iniciais da puberdade tanto em meninos quanto em meninas. Já o acúmulo mineral ósseo foi maior a partir da menarca em meninas (estágio III de Tanner), e em meninos, a partir do estágio IV de Tanner.

Kontulainen e colaboradores (2006) investigaram longitudinalmente se o desenvolvimento da densidade mineral óssea cortical diferia entre os sexos durante a puberdade. Após 20 meses de acompanhamento, meninas demonstraram um maior aumento na densidade de osso cortical (DOC) da tíbia em comparação com os meninos em estágios de maturação semelhantes. Meninas pré-púberes que chegaram à menarca durante o acompanhamento do estudo apresentaram maior aumento na DOC média e da consolidação da região subcortical. Este dimorfismo sexual no desenvolvimento da densidade óssea cortical é consistente com a hipótese de que as mulheres durante a puberdade depositam mais cálcio nos ossos para as futuras necessidades reprodutivas.

Em meninas, o início da secreção de estrogênio e outros esteroides sexuais durante a puberdade (entre 11 e 13 anos) promove a aquisição óssea, assim como o crescimento longitudinal do esqueleto. Os níveis do hormônio de crescimento (GH) e do fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) aumentam durante a puberdade, com o aumento dos níveis de esteroides sexuais. A ação do GH nos ossos é mediada principalmente pelo IGF-1, que estimula a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, promovendo a remodelação e a aquisição óssea (DAVIES, EVANS, GREGORY, 2005).

O conteúdo mineral ósseo é maior após a puberdade, com diferenças observadas entre sexos e sítios esqueléticos (BONJOUR et al., 2001; RIZZOLI et al., 2010). Em meninos, um maior conteúdo mineral ósseo (CMO) e área óssea na coluna lombar e no colo do fêmur são alcançados em uma idade mais avançada, quando comparado a meninas (BONJOUR, 2001). Estudos sugerem que o pico de velocidade no acúmulo do CMO em meninas ocorra aos 12,5 anos de idade (WHITIN et al., 2004; VANTAPARAST et al., 2009; RIZZOLI et al., 2010). Durante os dois anos de maior crescimento do esqueleto, adolescentes adquirem cerca de 25% do seu futuro pico de massa óssea (WHITIN et al., 2004), que pode ser definido como a quantidade de osso presente no esqueleto ao final do seu processo de maturação, sendo atingido no final da segunda década de vida (RIZZOLI et al., 2010).

Jackowski e colaboradores (2011) observaram os efeitos do tempo de maturação biológica durante a adolescência no desenvolvimento do CMO em adultos jovens. Em mulheres, foi observada uma maior aquisição da massa óssea total naquelas que tiveram um desenvolvimento mais precoce da puberdade, e essa diferença em relação às mulheres que tiveram um desenvolvimento puberal tardio persistiu até início da idade adulta, quando o pico de massa óssea foi alcançado.

Estima-se que 60 a 80% da variabilidade do pico de massa óssea seja explicada por fatores genéticos (DAVIES, EVANS, GREGORY, 2005; RIZZOLI et al., 2010; GIROUX et al., 2010). No entanto, a aquisição de massa óssea durante a adolescência também é afetada por outros fatores incluindo os determinantes ambientais como a ingestão de nutrientes, atividade física, e condições fisiológicas específicas como a gestação e lactação (MATKOVIC, 1996; PRENTICE et al., 2007; VATANPARAST et al., 2009; RIZZOLI et al., 2010; MOURATIDOU et al., 2013).

Estudos sugerem uma associação positiva entre a ingestão de cálcio e o conteúdo e/ou densidade mineral óssea em crianças e adolescentes. A ingestão dietética diária de cálcio necessária para que ocorra a retenção máxima de cálcio no esqueleto é a base para as atuais recomendações de ingestão de 1300 mg/d (IOM, 2011). De fato, estudos de balanço



metabólico sugerem que a retenção de cálcio máxima em meninas de 9 a 18 anos é alcançada com uma ingestão de cálcio entre 1200 e 1500 mg/dia (WEAVER et al., 1996; BRAUN et al., 2006).

Huncharek e colaboradores (2008) em uma meta-análise com 21 ensaios clínicos randomizados, concluíram que o aumento da ingestão de laticínios/produtos ricos em cálcio, com ou sem vitamina D, aumentam significativamente o CMO do corpo todo e da coluna lombar em crianças com uma baixa ingestão basal de cálcio. Winzenberg e colaboradores (2006) em outra meta-análise com 19 ensaios clínicos randomizados, incluindo 2859 crianças e adolescentes com idade entre 3 a 18 anos, também mostraram um efeito positivo da suplementação de cálcio, com doses variando entre 300 e 1200 mg/dia, no CMO do corpo todo.

A ingestão de vitamina D também parece contribuir com a saúde óssea na adolescência (PRENTICE et al., 2007; RIZZOLI, et al. 2010). Em meninas libanesas pré-menarca, a ingestão diária de 5 µg de vitamina D<sub>3</sub> (200 UI) por um ano aumentou o CMO e a DMO da coluna lombar (GARABÉDIAN et al., 2005). Da mesma forma, a acúmulo de CMO da coluna lombar e do quadril foi maior (12 e 17%, respectivamente) em meninas finlandesas entre 10 a 17 anos, após 1 ano de suplementação com 5 ou 10 µg/dia de vitamina D<sub>3</sub>, em comparação com o grupo placebo (EL HAJJ et al., 2006). Recentemente as recomendações de ingestão diária de vitamina D também foram revisadas, e para adolescentes a recomendação de ingestão passou de 200 UI/dia (5 µg/dia) para 600 UI/dia (15 µg/dia) (IOM, 2011).

Martini e colaboradores (2013) observaram em adolescentes brasileiras do sexo feminino uma baixa ingestão média de cálcio (597 mg/dia, 66% da recomendação de ingestão diária de cálcio para adolescentes; DRI, 2013), assim como prevalência de 100% de inadequação da ingestão dietética de vitamina D, considerando as novas recomendações de ingestão dietética diária.

A gestação e a lactação, em decorrência da alta demanda de cálcio para a formação do feto e produção de leite materno, também podem influenciar a aquisição óssea na adolescência, e serão abordadas com mais detalhe a seguir.

### 1.3 Influência da gestação e lactação sobre a massa óssea de adolescentes

A gestação e a lactação também são fatores capazes de interferir na massa óssea como consequência de ajustes fisiológicos na homeostase de cálcio. Durante o período gestacional há um aumento da demanda de cálcio pelo organismo materno, especialmente no último trimestre, para garantir a transferência de aproximadamente 30g de cálcio para o feto até o final da gestação. Ao longo da lactação a alta demanda materna é mantida, com uma transferência de cálcio de aproximadamente 300 mg/dia para a produção de leite materno em situações de aleitamento exclusivo (KOVACS, KRONENBERG, 2001; O'BRIEN et al., 2006; BEZERRA, DONANGELO, 2007).

O aumento da necessidade de cálcio durante a gestação e lactação é primariamente alcançado por adaptações fisiológicas maternas. Essas adaptações são conhecidas principalmente a partir de estudos realizados em mulheres adultas, com pouca informação proveniente de estudos durante a gestação e lactação em adolescentes.

Na gestação há um aumento da eficiência da absorção intestinal de cálcio acompanhada pelo aumento das concentrações séricas de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Além disso, assim como observado em outros momentos fisiológicos, a absorção intestinal de cálcio também parece ser modulada pela ingestão habitual materna de cálcio, podendo chegar a uma eficiência de absorção de 50% no terceiro trimestre de gestação em mães habituadas à baixa ingestão (O'BRIEN et al., 2006). Nesse período, também ocorre um aumento da excreção urinária de cálcio como consequência da expansão do volume plasmático, e aumento da taxa de filtração glomerular. No entanto, em mulheres adultas, esse aumento parece ser limitado quando a ingestão de cálcio é baixa (RITCHIE et al., 1998; O'BRIEN et al., 2006; BEZERRA, DONANGELO, 2007; OLAUSSON et al., 2012). Outro mecanismo que pode contribuir para atender a demanda de cálcio da gestação é o aumento da remodelação óssea, aumentando a disponibilidade de cálcio circulante, e favorecendo assim o fornecimento de cálcio para o crescimento fetal (O'BRIEN et al., 2006; BEZERRA, DONANGELO, 2007; OLAUSSON et al., 2012). Há, no entanto, controvérsias sobre a ocorrência de perda óssea durante esse período. Ritchie e colaboradores (1998) não observaram mudanças na massa óssea materna durante a gestação em mulheres com ingestão de cálcio adequada. No entanto, Olausson e colaboradores (2008) ao avaliarem mudanças na massa óssea materna durante a gestação, observaram perdas ósseas de 1-4% no CMO e aDMO em sítios como o esqueleto total, coluna lombar e fêmur, independente da ingestão de cálcio materna.

Na lactação a eficiência da absorção intestinal de cálcio retorna a níveis semelhantes ao observado antes da gestação. No entanto, existem evidências de que a absorção intestinal de cálcio é mais eficiente em mulheres com baixa ingestão dietética de cálcio, sugerindo que a ingestão habitual de cálcio possa modular a eficiência da absorção durante a lactação (RITCHIE et al., 1998; O'BRIEN et al., 2006; BEZERRA, DONANGELO, 2007; OLAUSSON et al., 2012). Por outro lado, a excreção urinária de cálcio é reduzida, com aumento da reabsorção glomerular de cálcio, que parece ser ainda mais eficiente em mães adolescentes (BEZERRA et al., 2002), como forma de poupar cálcio para o organismo materno. O remodelação óssea é semelhante ou até mais intensa que no terceiro trimestre de gestação, diminuindo após 6 meses do parto (RITCHIE et al., 1998; O'BRIEN et al., 2006; BEZERRA, DONANGELO, 2007; OLAUSSON et al., 2012).

A elevada remodelação óssea durante a lactação resulta em perda óssea materna. Uma recente revisão da literatura apontou perdas ósseas significativas durante a lactação em mulheres, variando -0,5 a -1,0% no esqueleto total, -7,5 a 2,8% na coluna lombar e -4,2 a -1,5% no fêmur total (OLAUSSON et al., 2012). A magnitude das mudanças ósseas parece ser dependente da prática de amamentação adotada, onde mulheres que amamentam pelos primeiros 3 a 6 meses pós-parto apresentam perdas ósseas mais evidentes, quando comparadas a mulheres que amamentam por um curto período de tempo (OLAUSSON et al., 2012). Apesar disso, existem evidências de que a recuperação óssea materna é completa após o desmame, ao menos em mulheres adultas (LASKEY et al., 1998; OLAUSSON et al., 2012).

Em adolescentes há evidências de que as adaptações fisiológicas durante a gestação e a lactação podem não ser suficientes para garantir um acúmulo adequado de massa óssea materna, juntamente com um adequado crescimento fetal e a produção de leite (O'BRIEN, 2003; BEZERRA, 2004). Além disso, é possível que a perda óssea materna durante a lactação não seja totalmente recuperada após o desmame (BEZERRA et al., 2004).

O'Brien e colaboradores (2003) observaram que a eficiência da absorção intestinal de cálcio em mães adolescentes americanas com ingestão de cálcio adequada (~1200 mg/d) foi significativamente maior na gestação quando comparado ao início da lactação (3 a 4 semanas pós-parto). Além disso, foi observado no início da lactação que 33% das adolescentes estudadas apresentaram CMO total 8% menor do que o esperado para a idade, e que o Z score da coluna lombar foi associado positivamente com a ingestão dietética de cálcio durante a gestação. Os autores sugerem que em mães adolescentes, a absorção de cálcio também é

maior durante o terceiro trimestre de gestação comparado ao início do período pós-parto, e que um aumento na ingestão de cálcio durante a gestação parece minimizar a perda óssea de osso trabecular na coluna lombar.

A suplementação com cálcio durante a gestação parece não exercer efeito positivo sobre a perda óssea no período da lactação em mulheres adultas (KALKWARF et al., 1997; JARJOU et al., 2010). Jarjou e colaboradores (2010) observaram que a suplementação com 1500 mg de cálcio por dia durante a gestação em mulheres adultas da Gâmbia, com baixa ingestão habitual de cálcio (~300 mg Ca/dia) levou a perdas no CMO e DMO no quadril, e também a grande mobilização óssea da coluna lombar e rádio distal durante a lactação. Segundo os autores, uma possível explicação para os resultados inesperados seria que a suplementação com cálcio prejudicou o processo de adaptação metabólica a uma baixa ingestão de cálcio, que é observada nessas mulheres da Gâmbia.

Por outro lado, em estudo recente em mães adolescentes brasileiras com baixa ingestão dietética de cálcio (~600 mg/dia), Diogenes e colaboradores (2013) demonstraram que a suplementação com cálcio e vitamina D (600 mg Ca + 200 UI vitamina D/dia) resultou em um aumento de 7,9% do CMO na região da coluna lombar na 20ª semana de lactação, e diminuiu a taxa de perda da massa óssea no colo do fêmur durante as primeiras 20 semanas de lactação.

As adaptações fisiológicas durante a gestação e lactação são decorrentes de ajustes hormonais complexos que incluem, entre outros, os hormônios responsáveis pela homeostase de cálcio. As concentrações séricas de PTH parecem não se alterar durante a gestação, e na lactação são semelhantes ou ligeiramente reduzidas em relação aos valores anteriores a gestação (OLAUSSON et al., 2012). Porém, há evidências de que quando a ingestão dietética de cálcio é baixa, as concentrações séricas de PTH tendem a aumentar da gestação para a lactação, estando esse aumento associado com a conservação renal de cálcio (BEZERRA et al., 2002; ZAPATA et al., 2004).

Bezerra e colaboradores (2004) avaliaram longitudinalmente mudanças na massa óssea entre a lactação e o pós desmame em mães adolescentes brasileiras com baixa ingestão dietética habitual de cálcio. Foi observada uma associação positiva entre a concentração sérica de PTH e o aumento do CMO do esqueleto total e da DMO da coluna lombar, da lactação

para o período após o desmame, sugerindo que o PTH pode estar envolvido na homeostase do cálcio durante a lactação em mães adolescentes quando a ingestão de cálcio é baixa.

A concentração sérica de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  aumenta ao longo da gestação, sendo mais elevada ao final do período gestacional, quando comparada a concentração sérica do período pré-gestacional. Esse aumento resulta principalmente dos elevados níveis de peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP), que induz a atividade da  $1\alpha$ -hidroxilase, e que por sua vez, aumenta a síntese renal de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Já durante a lactação, a concentração sérica de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  retorna a níveis semelhantes ao observado no período pré-gestacional (OLAUSSEON et al., 2012).

Outras alterações hormonais durante a gestação e a lactação parecem estar envolvidas com o metabolismo de cálcio. Na gestação, a concentração de IGF-1 aumenta, e assim como a concentração de estrogênio, é associada positivamente com marcadores de formação e reabsorção óssea (OLAUSSEON et al., 2012), e inversamente associada ao balanço de cálcio no tecido ósseo materno (O'BRIEN et al., 2006). Na lactação, o aumento das concentrações de prolactina suprime o eixo hipotálamo-hipófise-ovário, resultando na diminuição das concentrações de estrogênio e amenorréia. Além disso, o estrogênio tem efeito direto sobre o metabolismo ósseo, já que estimula a formação de osteoblastos (OLAUSSEON et al., 2012).

#### **1.4 Influência de polimorfismos genéticos sobre a massa óssea na adolescência**

Embora vários fatores ambientais e fisiológicos afetem a aquisição óssea na adolescência, dentre eles, a ação hormonal (hormônios sexuais, vitamina D, GH e IGF-1), ingestão de cálcio e/ ou vitamina D, e atividade física, estima-se que a grande parte da variabilidade do pico de massa óssea (60-80%) seja determinada por fatores genéticos (GIROUX et al., 2010).

Cerca de 120 genes já foram associados com o metabolismo ósseo e respostas ósseas (XU et al., 2010), entre eles, genes que codificam proteínas, receptores para hormônios calciotrópicos e esteroides, proteínas de matriz óssea, e reguladores locais do metabolismo ósseo, como citocinas e fatores de crescimento (CUSACK, CASHMAN, 2003). Entre os genes mais amplamente estudados, destacam-se o do receptor de vitamina D (*vitamin D receptor* - VDR) e o do receptor de estrogênio (*estrogen receptor* – ER; XU et al., 2010).

Em adolescentes, a maior parte dos estudos que associam massa óssea e polimorfismos genéticos têm sido realizados com o gene do VDR. O VDR media as ações genômicas da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  e o gene do VDR é considerado um importante candidato na influência genética sobre a massa óssea (CUSACK, CASHMAN, 2003).

O VDR é uma proteína nuclear que pertence à família de fatores de transcrição, como os receptores de esteróides e do hormônio da tireóide, e media os efeitos da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  sobre a expressão gênica (ZMUDA, CAULEY, FERELL, 2000). O VDR é expresso em diversos tecidos, incluindo aqueles que participam mais diretamente da homeostase do cálcio como o epitélio intestinal, os rins, o tecido ósseo, entre outros tecidos, onde parece regular uma variedade de processos incluindo a proliferação e diferenciação celular (WHITFIELD et al., 2001).

No núcleo celular, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  se liga ao VDR, o que estimula o recrutamento do receptor de ácido retinóico (RXR) e a forma um heterodímero que facilita a interação deste complexo a regiões do DNA que respondem a vitamina D (elementos de resposta à vitamina D (VDRE, do inglês *vitamin D response element*), induzindo ou inibindo a transcrição gênica (WHITFIELD et al., 2001).

O gene que codifica o VDR está localizado no cromossomo 12 (12q13.11), contém 14 éxons e abrange aproximadamente 75 quilobases do DNA (WHITFIELD et al., 2001; XU et al., 2010). Mais de 245 polimorfismos já foram identificados no gene do VDR (NEJENTSEV et al., 2004; FANG et al., 2005) e têm sido investigados sob o ponto de vista da potencial associação com o metabolismo de cálcio e o metabolismo ósseo (UITTERLINDEN et al., 2004; XU et al., 2010), assim como com desfechos em saúde tais como osteoporose, osteoartrite, hiperparatiroidismo, câncer, diabetes, doenças renais e susceptibilidade a infecções (UITTERLINDEN et al., 2004).

Um polimorfismo é uma variante genética que aparece em pelo menos 1% da população. Essas alterações podem ocorrer tanto em regiões não-codificantes do gene (introns), não afetando a estrutura da proteína, como em regiões codificantes do gene (éxons), podendo ocasionar ou não alterações na sequência da proteína. Além disso, mudanças em regiões reguladoras do gene podem afetar a expressão gênica, e assim, a proteína a ser formada. Por exemplo, alterações na região 5'-promotora do gene podem afetar os padrões de expressão de RNA mensageiro (mRNA), enquanto variações na região 3' não traduzida

(UTR) de sequência gênica podem afetar a estabilidade do mRNA e a eficiência da tradução de proteínas.

Muitas vezes, esses polimorfismos criam ou extinguem locais no DNA reconhecidos por enzimas de restrição. A digestão com a enzima de restrição produz fragmentos de DNA com comprimentos diferentes, que podem ser detectados por eletroforese. A detecção dos polimorfismos com a utilização de enzimas de restrição é chamada de *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs).

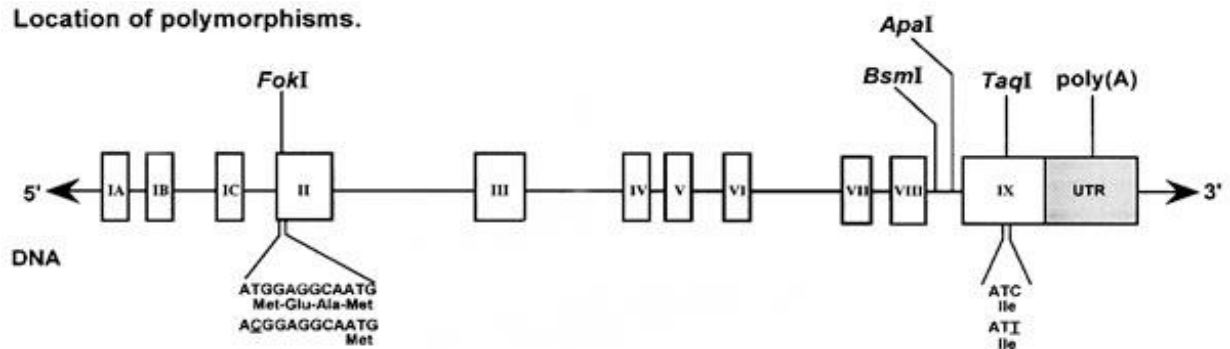
O baixo nível de recombinação numa determinada área do gene ao longo do tempo leva à presença de certos polimorfismos com um elevado grau de associação. Esta associação dentro de uma população é chamada de desequilíbrio de ligação. Altos níveis de desequilíbrio de ligação levam à formação de blocos de alelos, que quando estão presentes juntos são chamados de haplótipo. Em alguns casos, basta determinar a presença de alguns polimorfismos, para se conhecer a presença de todos os alelos associados com o haplótipo. Além disso, sabendo que o haplótipo carrega um alelo de risco, podem ser utilizadas diferentes técnicas para determinar que polimorfismo é verdadeiramente responsável pelo fenótipo observado (VALDIVIELSO, FERNANDEZ, 2006).

As principais associações entre polimorfismos no gene do VDR com a massa óssea encontram-se em regiões do gene reconhecidas pelas enzimas de restrição ApaI, BsmI, FokI e TaqI (CUSACK, CASHMAN, 2003) (**Figura 1**).

As enzimas de restrição ApaI e BsmI reconhecem substituições de nucleotídeos T>G (rs7975232) e G>A (rs1544410), respectivamente, no íntron que separa os éxons VIII e IX no gene do VDR. Esses polimorfismos se encontram em regiões não codificantes do gene, o que não afeta diretamente a estrutura da proteína VDR (ZMUDA, CAULEY, FERELL, 2000).

A presença da transição de uma timina por uma citosina (C>T) (rs10735810), no éxon II do gene que codifica o VDR é reconhecida pela enzima de restrição FokI. Indivíduos com o alelo C iniciam a tradução no segundo sítio ATG, o que resulta na ausência de três aminoácidos na proteína VDR. Em contraste, os indivíduos com o alelo T iniciam a tradução no primeiro local ATG e sintetizam a proteína VDR com seu comprimento completo (427 aminoácidos) e menor atividade transcricional (ZMUDA, CAULEY, FERELL, 2000; TIZAOUI et al., 2014).

A substituição de uma timina por uma citosina (T>C) (rs731236) no éxon 9 é reconhecida pela enzima de restrição TaqI, porém também não altera a expressão do gene do VDR ou a função do VDR (ZMUDA, CAULEY, FERELL, 2000).



**Figura 1** - Localização dos polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (VDR)

Fonte: Zmuda *et al*, 2000

Os polimorfismos reconhecidos pelas enzimas de restrição ApaI, BsmI e TaqI parecem não alterar a expressão do gene do VDR e a função do VDR. No entanto, associações desses polimorfismos com alterações fisiológicas podem ocorrer devido a um desequilíbrio de ligação com uma outra variação funcional no gene VDR, ou com outros genes intimamente ligados, podendo influenciar a estabilidade do mRNA e atividade transcricional (NEJENTSEV *et al.*; D'ALÉSIO *et al.*, 2005). Com relação ao polimorfismo reconhecido pela enzima de restrição FokI, estudos tem demonstrado que este polimorfismo não apresenta nenhuma ligação com qualquer um dos outros polimorfismos no gene do VDR (ECCLESHALL *et al.*, 1998; ZMUDA, CAULEY, FERELL, 2000; UITTERLINDEN *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos avaliando os polimorfismos reconhecidos pelas enzimas ApaI, BsmI, TaqI e FokI convencionaram que, ao invés do uso do genótipo em si, a presença do sítio de restrição para cada enzima seria representada pela letra minúscula inicial da enzima, enquanto a ausência seria representada por letra maiúscula (VAN DER LUIS *et al.*, 2003). Como exemplo, estudos realizados ao final da década de 90 e início dos anos 2000 adotaram a representação AA, Aa e aa para representar, respectivamente, o indivíduo homocigoto sem o sítio de restrição, o heterocigoto e o homocigoto com o sítio de restrição para a enzima ApaI nos dois alelos (MORRISON *et al.*, 1994).



Os estudos de associação entre polimorfismos no gene do VDR e a massa óssea tem observado resultados conflitantes entre as populações. Possivelmente, essas diferenças são causadas por fatores de confusão, como etnia, idade, interações genético-ambientais e os desequilíbrios de ligação localizados em diferentes regiões do gene (FALCHETTI et al., 2006).

Laaksonen e colaboradores (2004) avaliaram a relação entre o genótipo definido pela FokI e a massa óssea, em meninos e meninas finlandeses de 14 a 16 anos. Em meninas, não foram observadas diferenças na DMO do antebraço entre os genótipos. No entanto, em meninos, o genótipo Ff foi associado a maior DMO do antebraço. Além disso, os autores sugerem que a influência do componente genético sobre a DMO pode mudar com a idade, e que a associação entre fatores genéticos e maturação óssea é mais evidente em uma idade jovem, diminuindo lentamente na vida adulta devido aos efeitos do estilo de vida e perdas ósseas relacionadas à idade.

Abrams e colaboradores (2005) observaram que polimorfismos no gene do VDR reconhecidos pela enzima de restrição FokI estão associados com variações na absorção de cálcio no início da puberdade, com a massa óssea, e seu acréscimo durante a puberdade. Adolescentes americanos com o genótipo ff apresentaram absorção de cálcio e acréscimo de cálcio nos ossos 20% menor quando comparados aos adolescentes com o genótipo FF. Além disto, meninos e meninas com genótipo FF apresentaram maior estatura quando comparados àqueles com genótipo ff, e nos adolescentes com ingestão dietética de cálcio >800mg/dia, o genótipo FF também foi associado a maior DMO total.

Diogenes e colaboradores (2009) também demonstraram efeito de polimorfismos reconhecidos pela FokI na mineralização óssea nos estágios iniciais da puberdade em adolescentes brasileiros. Os adolescentes com genótipo Ff apresentaram maiores CMO, DMO e Z-score para DMO no esqueleto total.

Sanwalka e colaboradores (2013) estudaram a associação entre polimorfismos reconhecidos pelas enzimas de restrição FokI e BsmI no gene do VDR, e a massa óssea em adolescentes indianas na pós-menarca, entre 15 a 18 anos. Não foram observadas associações entre a massa óssea e os genótipos reconhecidos pela enzima FokI. No entanto, meninas com o genótipo BB apresentaram CMO total, AO total, DMO total e DMO da coluna lombar significativamente maiores, em comparação àquelas com genótipos Bb e bb.

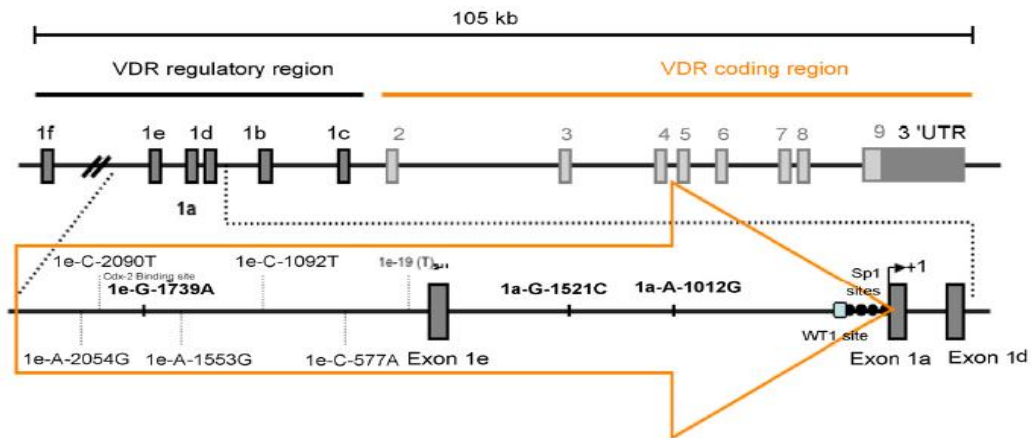
Em nutrizes adolescentes brasileiras com baixa ingestão de cálcio também foi observado associação de polimorfismos reconhecidos pelas enzimas de restrição ApaI, BsmI e TaqI no gene do VDR com a massa óssea e a concentração de cálcio no leite materno. Adolescentes com o genótipo aa e tt apresentaram maior DMO da coluna lombar, e CMO total, respectivamente. Além disso, as adolescentes com genótipo bb apresentaram maiores concentrações de cálcio no leite materno (BEZERRA et al., 2008).

Evidências sugerem que polimorfismos no gene do VDR detectados pelas enzimas de restrição BsmI, FokI e TaqI também influenciam as respostas ósseas à suplementação com vitamina D. Arabi e colaboradores (2009) avaliaram o impacto de polimorfismos no gene do VDR sobre a massa óssea, em resposta à suplementação com vitamina D em meninas adolescentes libanesas. Após um ano de suplementação, os polimorfismos reconhecidos pelas enzimas de restrição BsmI e TaqI foram associados com aumento de CMO, DMO e AO de diversos sítios ósseos, sendo esses aumentos menores nas adolescentes com os genótipos BB e tt.

Polimorfismos em regiões promotoras do gene também podem influenciar a expressão gênica, através de alterações na ligação do fator de transcrição, e conseqüentemente provocar mudanças na atividade de transcrição (D'ALÉSIO et al., 2005; JEHAN et al., 2007).

Vários polimorfismos funcionais foram identificados na região promotora do gene VDR, entre eles os SNPs 1012pb (rs4516035) e 1521pb (rs7139166), localizados na região promotora 1<sup>a</sup>, e que substituem os nucleotídeos A>G e G>C, respectivamente (**Figura 2**). O SNP 1012pb está localizado em uma região de ligação do fator de transcrição GATA, e já foi observado que a presença do alelo G reduz acentuadamente a ligação deste fator de transcrição ao DNA (FANG et al., 2005). Além disso, esse alelo também parece acarretar menor capacidade de transcrição do promotor do gene VDR em cultura de células (D'ALÉSIO et al., 2005) quando comparado à presença do alelo A.

D'Alésio e colaboradores (2005) estudaram 185 adolescentes francesas e observaram efeitos dos SNPs 1012pb e 1521pb sobre o estado de vitamina D, onde as adolescentes com genótipo GG e CC apresentaram menores níveis circulantes de 25(OH)D. Os autores sugerem que esse resultado é conseqüência da menor expressão do receptor de vitamina D nesses genótipos.



**Figura 2** - Localização dos polimorfismos na região promotora do gene do receptor de vitamina D (VDR)

Fonte: D'Alésio *et al*, 2005

Esterle e colaboradores (2009) estudaram como o perfil genético da região promotora do gene VDR influencia o efeito do consumo de leite e laticínios na aquisição óssea da coluna lombar, em meninas europeias pós-menarca. Foi observado efeito do polimorfismo 1012pb (A>G), onde meninas com o nucleotídeo G em pelo menos um alelo, apresentaram CMO, DMO e Z-score de DMO significativamente menores quando a ingestão média de cálcio era de 800 mg/dia, em comparação a adolescentes de mesmo genótipo com maior ingestão de cálcio (~1100mg/dia). Por outro lado, meninas com o nucleotídeo A nos dois alelos não apresentaram diferenças significativas na massa óssea, independente da ingestão média de cálcio. Dessa forma, variações no locus 1012pb na região promotora do gene VDR poderiam contribuir com as diferenças étnicas/populacionais no requerimento de cálcio na adolescência para a aquisição óssea.

Considerando a adolescência como um período crítico para a aquisição de massa óssea e que esta aquisição, por sua vez, pode ser influenciada pela ocorrência da gestação e lactação em adolescentes, pela ingestão de cálcio e vitamina D e por polimorfismos genéticos no receptor de vitamina D, torna-se relevante o estudo da influência de polimorfismos no gene do VDR sobre as adaptações ósseas em nutrizes adolescentes, suplementadas ou não com cálcio e vitamina D.

## 2. HIPÓTESES

- a) As adaptações do metabolismo de cálcio e do tecido ósseo características da lactação podem ser diferentes dependendo de variantes do gene VDR.
- b) As respostas do metabolismo de cálcio e do tecido ósseo na lactação, frente a uma suplementação de cálcio e vitamina D podem ser diferentes dependendo de variantes do gene VDR.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos geral

Avaliar a influência dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) sobre a massa óssea em nutrizes adolescentes.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar os polimorfismos reconhecidos pelas enzimas de restrição ApaI (rs7975232), BsmI (rs1544410), FokI (rs10735810) e TaqI (rs731236) no gene do receptor de vitamina D (VDR) em nutrizes adolescentes suplementadas ou não com cálcio e vitamina D durante a gestação.
- Determinar os polimorfismos 1521 pb (rs7139166) e 1012 pb (rs4516035) localizados na região promotora do gene do receptor de vitamina D (VDR).
- Avaliar a influência dos polimorfismos estudados sobre a massa óssea de nutrizes adolescentes suplementadas ou não com cálcio e vitamina D durante a gestação.
- Avaliar, em nutrizes adolescentes, a influência dos polimorfismos estudados sobre as respostas ósseas à suplementação com cálcio e vitamina D durante a gestação.

## 4. MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido com as nutrízes adolescentes que participaram do projeto “Suplementação de cálcio associada à vitamina D durante a gestação de mães adolescentes: efeitos sobre a massa óssea materna e do recém-nascido”. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola da UFRJ (parecer nº 02/2009). A participação das adolescentes ocorreu após assinatura do termo de consentimento pela mesma e pelo responsável (**Apêndice A – Consentimento Livre e Esclarecido**). O presente trabalho fez parte de um estudo mais abrangente referente à Tese de Doutorado de Maria Eduarda Leão Diogenes Melo do Programa de Pós-Graduação de Ciências de Alimentos do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (DIOGENES, 2012; DIOGENES et al 2013). Deste modo, parte das etapas necessárias para o desenvolvimento do presente estudo já haviam sido realizadas e serão brevemente descritas a seguir.

### 4.1 Recrutamento das voluntárias e desenho experimental

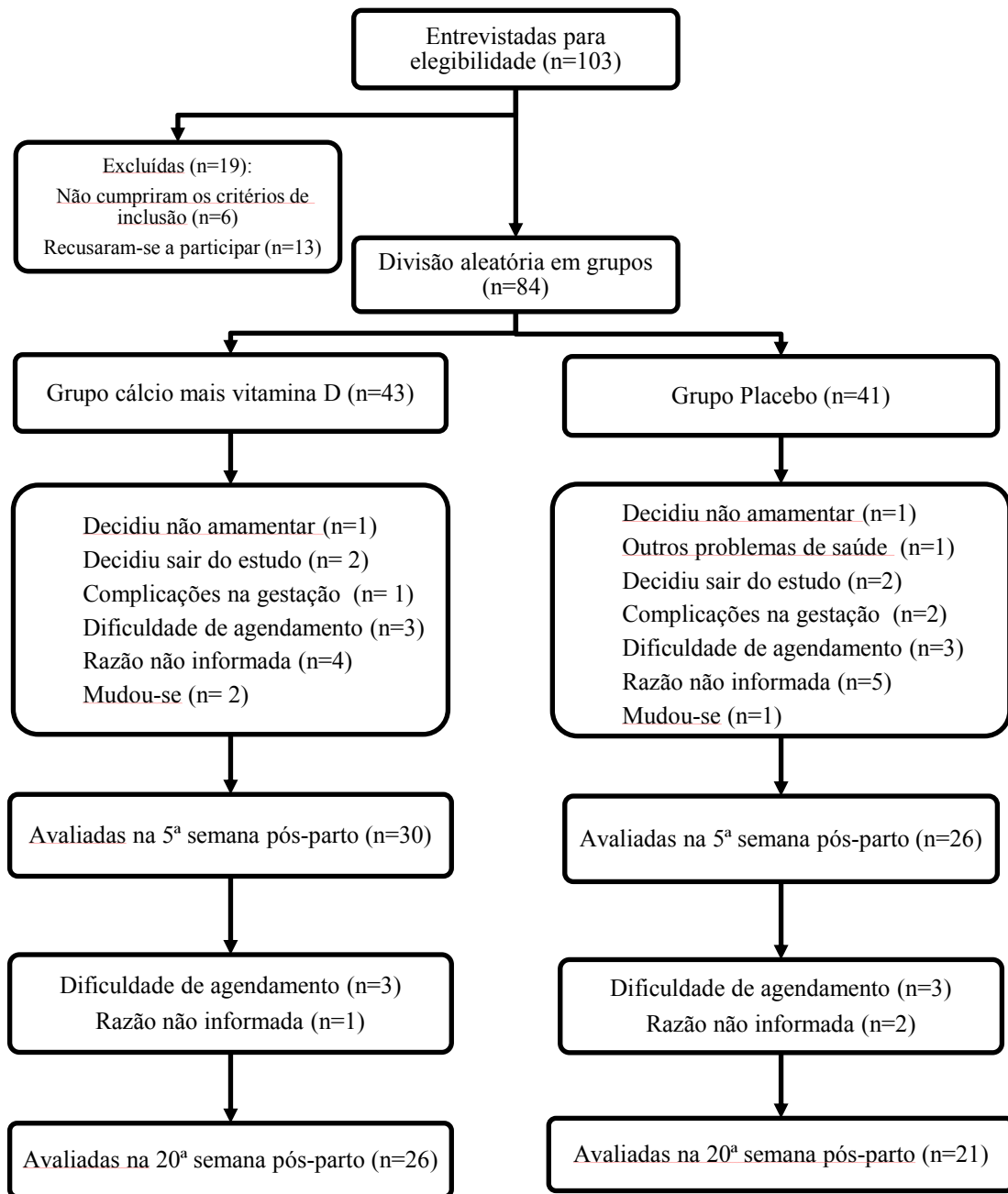
As gestantes foram recrutadas durante o atendimento pré-natal, na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro entre setembro de 2009 e junho de 2011, e deveriam obedecer aos seguintes critérios de inclusão: serem gestantes primíparas e grávidas de um único feto, com idade entre 14 e 19 anos, estar entre a 23<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana de gestação, sem doenças crônicas e/ou intercorrências clínicas durante a gestação, não fumantes, com intenção de amamentar de forma exclusiva ou predominante, e que não fizessem uso de suplementos nutricionais, exceto o suplemento de ferro e ácido fólico fornecido durante o acompanhamento pré-natal. No dia do recrutamento foi aplicado um questionário para obter informações demográficas, comportamentais, a história patológica pregressa da gestante e intercorrências durante a gestação (**Apêndice B – Questionário Inicial**).

As adolescentes recrutadas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: um grupo recebeu um suplemento contendo 600 mg de cálcio (na forma de carbonato de cálcio) mais 200 UI de vitamina D (na forma de colecalciferol, D<sub>3</sub>), e o outro recebeu placebo (comprimidos contendo celulose microcristalina e amido de milho), em um ensaio cego. A dose de 600 mg Ca/dia foi escolhida visando fornecer uma ingestão total diária de cálcio próxima a 1300 mg/dia (IOM, 1997), considerando uma dieta habitualmente pobre em cálcio observada em mães adolescentes brasileiras (500 mg/dia) (BEZERRA et al., 2004;

BEZERRA et al., 2002). A dose de 200UI de vitamina D diária foi utilizada visando fornecer a quantidade recomendada de vitamina D (AI) para gestantes adolescentes, preconizada na época do início do recrutamento das voluntárias (setembro, 2009) (IOM, 1997). Todas as voluntárias foram orientadas a ingerir 1 comprimido de suplemento de cálcio mais vitamina D ou placebo diariamente, diariamente no café da manhã da 26<sup>a</sup> semana gestacional (SG) ao parto. Os comprimidos de cálcio mais vitamina D ou placebo foram fornecidos mensalmente às voluntárias durante o pré-natal, e a adesão à suplementação foi controlada através da contagem dos comprimidos remanescentes a cada consulta pré-natal e eventualmente por contato telefônico com as voluntárias. Em média, 83% dos comprimidos fornecidos foram ingeridos, e nenhum efeito adverso foi reportado.

Amostras de sangue (20 mL) de cada voluntária foram coletadas pela manhã após jejum de oito horas, imediatamente antes do início da intervenção, e durante a lactação, na 5<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana pós-parto. As alíquotas de sangue total e soro foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises laboratoriais. Durante o pré-natal também foram obtidas informações sobre a ingestão dietética de cálcio e vitamina D, pelo menos mensalmente pela Nutricionista da equipe, e o aleitamento materno foi estimulado. A prática de aleitamento materno e as aferições da massa corporal total, estatura e medidas ósseas foram realizadas na 5<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana pós-parto (**Apêndice C – Evolução pós-parto**).

Das 76 gestantes adolescentes inicialmente recrutadas, 56 voluntárias foram acompanhadas até a quinta semana pós-parto ( $5\pm 2$  semanas), e destas, 47 voluntárias completaram o estudo até a vigésima semana pós-parto ( $20\pm 3$  semanas).



**Figura 3** - Diagrama de fluxo do recrutamento, randomização dos grupos, perdas e acompanhamento dos participantes do estudo

Adaptado de: Diogenes *et al*, 2013.



## 4.2 Avaliação da Massa Óssea e medidas antropométricas

A estatura e a massa corporal total foram aferidas através de um estadiômetro (SECA) e uma balança eletrônica calibrada (Filizola®).

O conteúdo mineral ósseo (CMO), área óssea (AO) e densidade mineral óssea (DMO) do esqueleto total, da região lombar da coluna vertebral (L1-L4) e fêmur (total e colo) foram avaliados no Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional do Instituto de Nutrição/UERJ pelo método de absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA), utilizando o equipamento Lunar iDXA e o software encore 2008 versão 12,20 (GE, Healthcare). O desempenho do equipamento foi avaliado através de calibrações diárias e semanais, que apresentaram coeficiente de variação de  $\leq 0,07\%$ . O percentual de adequação das medidas ósseas e o Z-score da DMO para o esqueleto total, coluna lombar e fêmur foram obtidos por comparação com uma população de referência pareada pela idade cronológica, gênero e etnia de acordo com a base de dados do fabricante. As mudanças ( $\Delta$ ) nas medidas ósseas do esqueleto total, coluna lombar e fêmur foram calculadas pelas diferenças entre as medidas obtidas na 20<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semana pós-parto.

## 4.3 Avaliação Bioquímica

As concentrações séricas de vitamina D, na forma de 25(OH)D, paratormônio (PTH) e fator de crescimento similar à insulina (IGF-1) foram analisadas por imunoensaio por quimiluminescência (Liaison, Diasorin, EUA). As concentrações de prolactina e estradiol no soro foram determinadas por imunoensaio enzimático - ELISA (Diasource, ImmunoAssays, EUA). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e quando o coeficiente de variação entre as duplicatas foi  $>10\%$ , as amostras foram reanalisadas.

## 4.4 Análise da ingestão dietética

A ingestão dietética basal de cálcio e vitamina D foi calculada a partir da análise de pelo menos três recordatórios de 24 horas aplicados ao longo do segundo e terceiro trimestre de gestação, por uma Nutricionista treinada (**Apêndice D – Recordatório de 24 horas**). A ingestão de cálcio foi analisada de acordo com a base de dados para alimentos brasileiros

(TACO, 2006) através do programa AVANUTRI (Versão Revolution 4.0). A ingestão de vitamina D foi analisada de acordo com a base de dados do USDA (<http://ndb.nal.usda.gov/>) para alimentos não processados, e de acordo com as informações nutricionais contidas nos rótulos para alimentos industrializados.

A principal etapa a realizada no presente estudo foi a determinação dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) para avaliação de sua influência sobre a massa óssea de nutrizes adolescentes e sobre as respostas ósseas frente à suplementação com cálcio e vitamina D.

#### **4.5 Determinação dos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR)**

Todas as etapas para a determinação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) no gene do VDR foram realizadas no Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) utilizando duas técnicas:

- RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição, do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), onde um polimorfismo de nucleotídeo único é localizado no sítio-alvo de uma enzima de restrição, que reconhece uma sequência-alvo de nucleotídeos específicos no DNA, e cliva a cadeia de DNA nesses pontos.
- PCR em tempo Real (RT-qPCR), metodologia que permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa.

Os polimorfismos rs7975232, rs1544410, rs10735810 e rs731236 foram determinados usando respectivamente as enzimas de restrição ApaI, BsmI, FokI e TaqI. Os polimorfismos localizados na região promotora do gene VDR rs4516035 (1012pb) e rs7139166 (1521pb) foram determinados por PCR em tempo real.

#### 4.5.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído a partir de alíquotas de sangue total armazenadas à -80° C utilizando kit comercial (*PureLinkGenomic DNA Kits – mini Kit – Invitrogen*). O processo de extração se baseia em três etapas:

- Lise de membranas e degradação de proteínas.
- Extração em solventes orgânicos.
- Purificação do DNA (eliminação de resíduos orgânicos).

Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas à -20°C.

#### 4.5.2 *Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*

##### 4.5.2.1 Amplificação das regiões de interesse

Cada amostra de DNA foi submetida a três reações de PCR. Para a amplificação da região (822 pb) contendo o sítio para BsmI foram utilizados os oligonucleotídeos 5'- CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA -3' (*forward*) e 5'- AAC CAG CGG AAG AGG TCA AGG G -3' (*reverse*). A amplificação da região (501 pb) contendo o sítio de reconhecimento das enzimas ApaI e TaqI foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos 5' - CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA - 3' (*forward*) e 5'- CAC TTC GAG CAC AAG GGG CGT TAG C - 3' (*reverse*). E para a amplificação da região (221 pb) contendo o sítio de reconhecimento da enzima FokI foram usados os oligonucleotídeos 5' – GGC CTG CTT GCT GTT CTT AC – 3' (*forward*) e 5' TGC TTC TTC TCC CTC CCT TT – 3' (*reverse*). O volume total de reação foi de 50 µL distribuídos entre o DNA, oligonucleotídeos (Lab Trade do Brasil), Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão e solução de MgCl<sub>2</sub> próprios da enzima (Invitrogen), deoxinucleotídeos (dNTPs, Invitrogen) e água Milli-Q. Cada amostra foi submetida a 35 ciclos de PCR num termociclador PTC-100 com programação de tempo/temperatura conforme o esquema a seguir:

- I) Desnaturação inicial: 5 minutos a 94° C

- II) 35 ciclos de:
  - a) desnaturação: 1 minuto a 94° C
  - b) anelamento: 1 minuto a 60° C
  - c) extensão: 1 minuto a 72° C
- III) Extensão final: 10 minutos a 72° C
- IV) Final: 0-4°C até o momento de estocagem das amostras em freezer

A verificação da amplificação do DNA foi realizada aplicando-se 10µL do produto de PCR em gel de agarose a 1.5%.

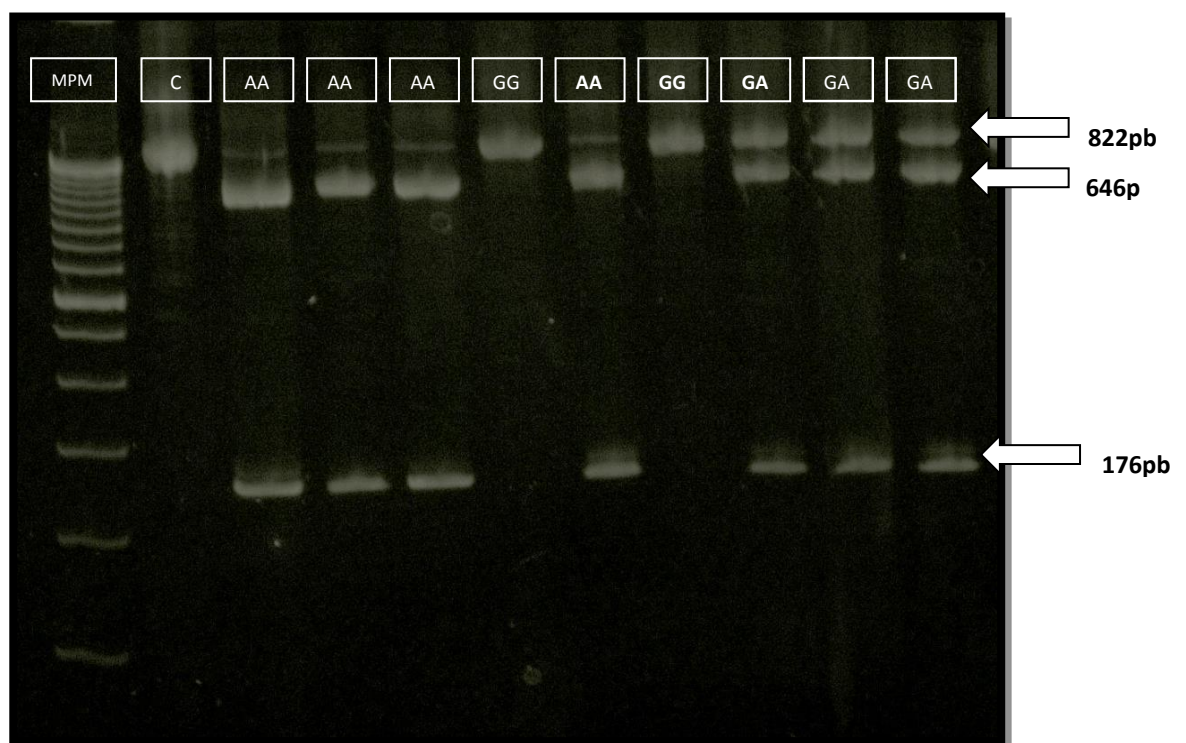
#### **4.5.2.2 Digestão com enzimas de restrição**

Os fragmentos de DNA amplificados foram separadamente incubados na presença de cada enzima de restrição e seus tampões próprios, de acordo com as especificações dos fabricantes.

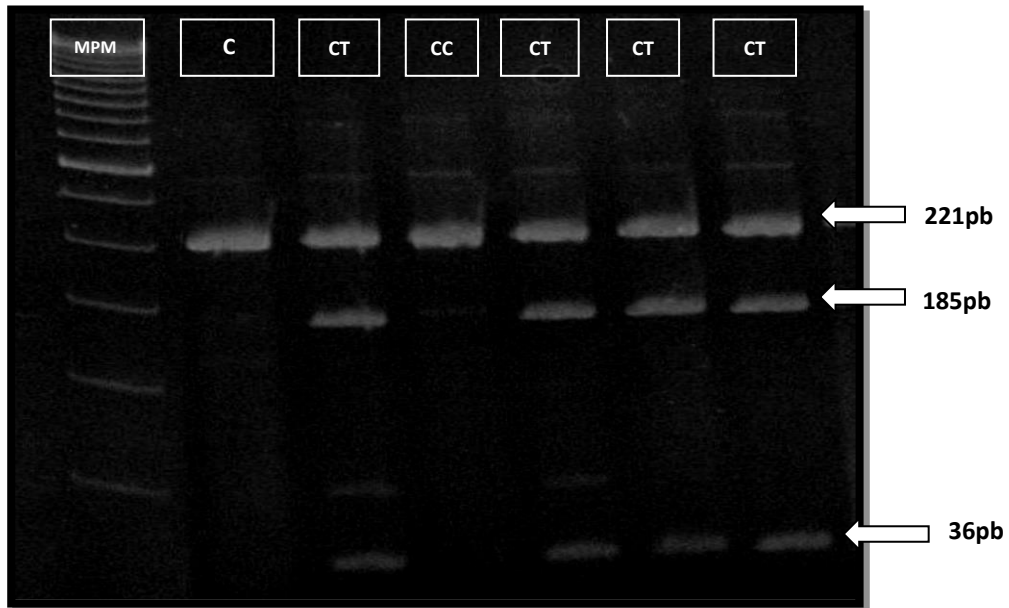
- a) Digestão com ApaI: 4 horas a 25°, e a reação foi parada com o aumento da temperatura para 65° C por 15 minutos;
- b) Digestão com BsmI: 2 horas a 65°, e a reação foi parada com o aumento da temperatura para 80° C por 20 minutos;
- c) Digestão com FokI: 1 hora a 37°, e a reação foi parada com o aumento da temperatura para 65° C por 20 minutos;
- d) Digestão com TaqI: 3 horas a 65°, e a reação foi parada com o aumento da temperatura para 80° C por 20 minutos.

#### 4.5.2.3 Identificação dos polimorfismos

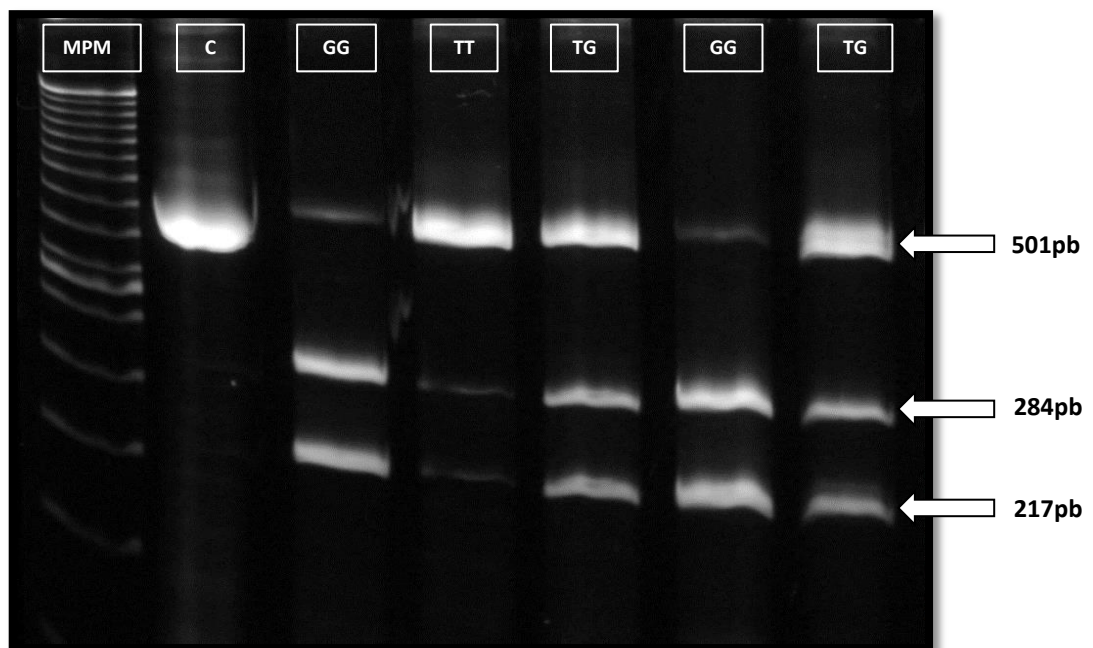
A separação dos fragmentos resultantes da digestão com cada enzima foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. O tamanho e a posição das bandas foram visualizados sob luz UV, permitindo a detecção da presença ou ausência do sítio de restrição para cada enzima. Uma amostra de DNA amplificado, porém não digerido, foi utilizada como controle para cada corrida. Os indivíduos homocigotos sem o sítio de restrição apresentaram apenas um fragmento de tamanho igual ao controle não digerido (822pb para BsmI, 501pb para ApaI e TaqI e 221pb para FokI). A presença do sítio de restrição nos dois alelos gerou dois fragmentos de 642 e 176 pb para BsmI, 217 e 284 pb para ApaI, 293 e 208 pb para TaqI e 36 e 185pb para FokI. Os indivíduos heterocigotos apresentaram 3 fragmentos, correspondendo a presença e ausência do sítio nos alelos.



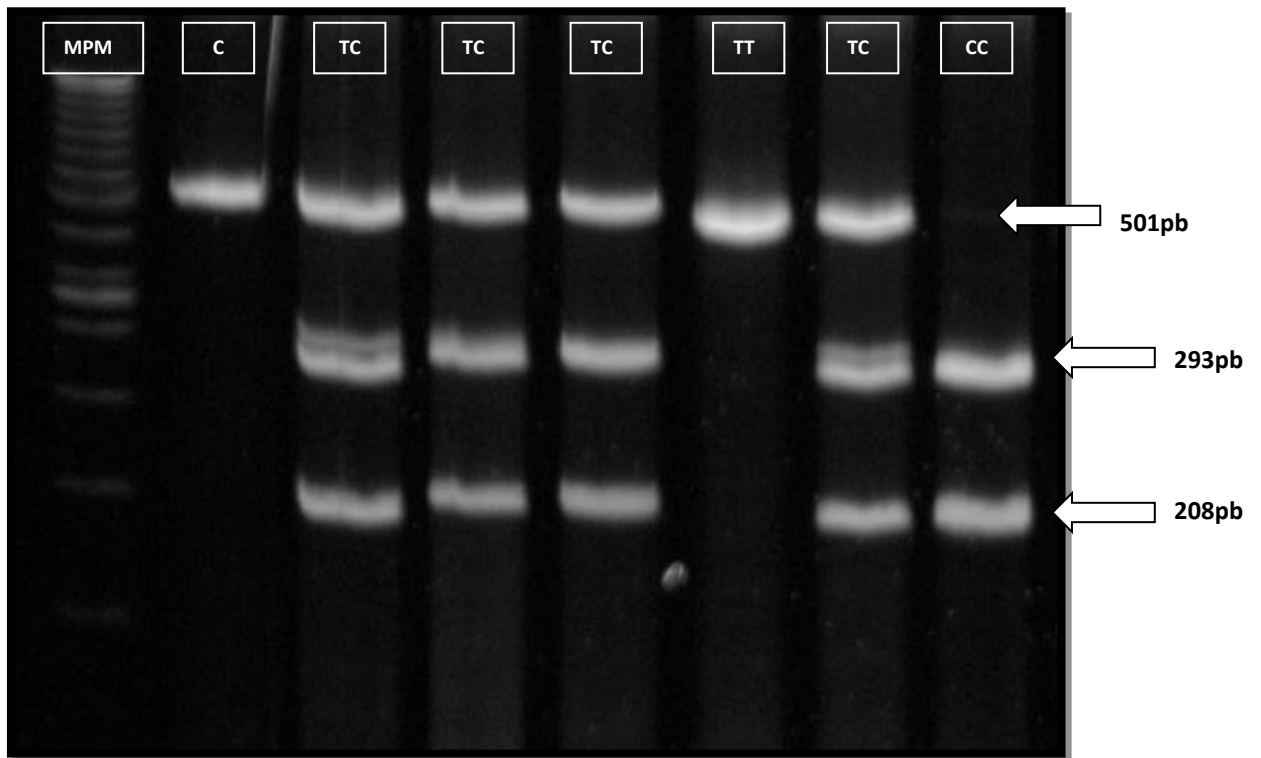
**Figura 4** - Resultado da digestão com a enzima de restrição BsmI (rs1544410, G>A). MPM - Marcador de peso molecular; C (controle) – produto de PCR não digerido.



**Figura 5** - Resultado da digestão com a enzima de restrição FokI (rs1544410, C>T). MPM - Marcador de peso molecular; C (controle) – produto de PCR não digerido.



**Figura 6** - Resultado da digestão com a enzima de restrição ApaI (rs7975232, T>G). MPM - Marcador de peso molecular; C (controle) – produto de PCR não digerido.



**Figura 7-** Resultado da digestão com a enzima de restrição TaqI (rs731236, T>C). MPM – Marcador de peso molecular; C (controle) – produto de PCR não digerido.

### 4.5.3 PCR em tempo Real

#### 4.5.3.1 Quantificação do DNA genômico

As amostras de DNA foram quantificadas por meio de espectrofotometria em um Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), e utilizadas as que apresentavam concentração de 20 a 30 ng/μL de DNA.

#### 4.5.3.2 Identificação dos polimorfismos

As genotipagens dos polimorfismos foram realizadas por reação de PCR em tempo real, utilizando um ensaio TaqMan (Applied, Biosystems). A técnica de genotipagem com o kit comercial TaqMan consiste no uso de sondas construídas especificamente para a ligação exclusiva nos dois sítios polimórficos a serem estudados (G>C, rs7139166-1521pb e A>G, rs4516035-1012pb). Cada alelo gera uma amplificação de DNA sinalizada pelo aumento de uma fluorescência alelo-específica. Com a utilização das sondas ligadas à diferentes fluoróforos, torna-se possível a observação, em tempo real, do conjunto alélico do indivíduo para um determinado SNP no genoma em uma única reação, não havendo necessidade de qualquer outro método posterior à reação de PCR.

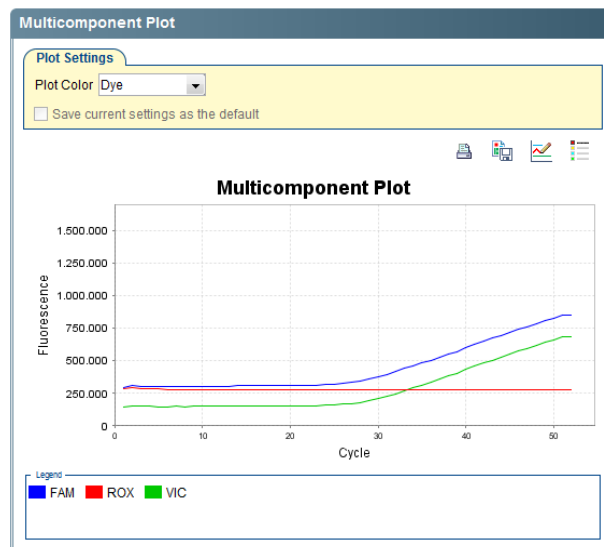
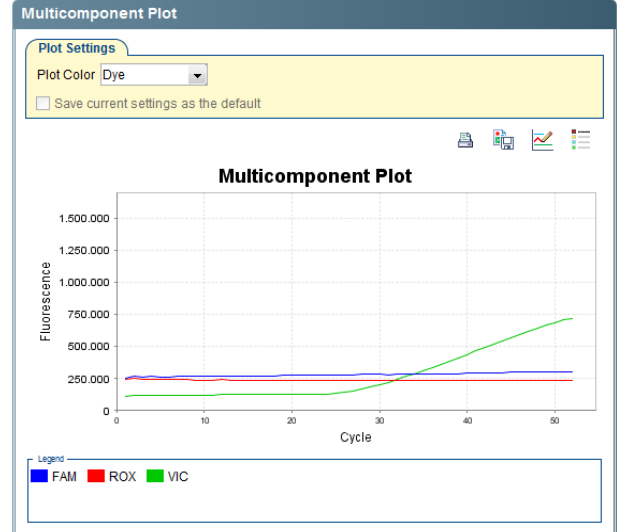
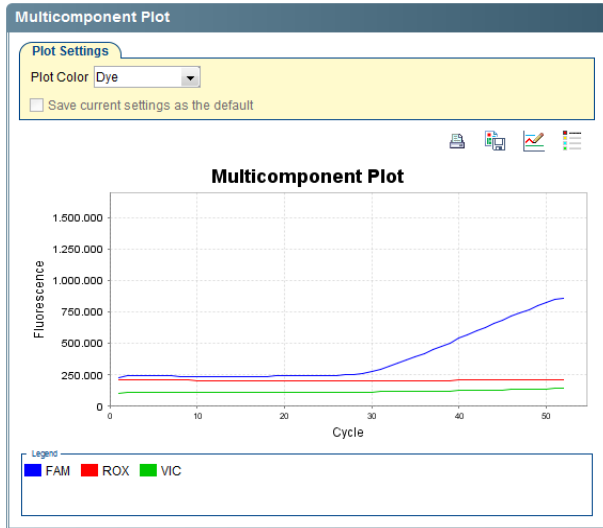
Para o polimorfismo 1521pb foi utilizada uma sonda com a sequência - GGA AGG ATC CCC TTG CCC AAA GCA T[C/G]G TGG GAA AGC TAG CGG TGA TTC TTG -, e para o polimorfismo 1012pb outra sonda com a sequência - GAT GAC CTC CTT TAG CCA GGG AAG A[C/T]A TTG CTA TTC GCC TCT TAC AGA GGA - (Applied, Biosystems). Ambas as sondas foram desenhadas e validadas pelo fabricante especificamente para esses polimorfismos. O volume total de reação foi de 10 μL distribuídos entre o DNA, sonda, TaqMan Master Mix (Applied, Biosystems) e água Milli-Q.

As reações foram conduzidas em um sistema de PCR ABI7500 (Life Technologies) com parâmetros de ciclagem padrão para ensaios TaqMan:

- I) Ativação da polimerase: 10 minutos a 95°
- II) 40 ciclos de:
  - a. desnaturação: 15 segundos a 95° C
  - b. anelamento e extensão: 1 minuto a 60° C



Os resultados brutos foram analisados com utilização do software SDS 2.3 (Life Technologies).



**Figura 8-** Genotipagem dos polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) através da reação de PCR em tempo real. Para o SNP rs7139166 (1521pb), fluorescência FAM corresponde ao alelo G e fluorescência VIC ao alelo C. Para o SNP rs4516035 (1012pp), fluorescência FAM corresponde ao alelo A e fluorescência VIC ao alelo G.

#### 4.6 Análises Estatísticas

As frequências alélicas e genóticas nas voluntárias foram avaliadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando-se o teste do qui-quadrado. O desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados também foi avaliado utilizando-se o teste do qui-quadrado. Comparações entre os grupos (suplementado *versus* placebo) das características gerais, medidas antropométricas e indicadores bioquímicos no momento basal (26<sup>a</sup> semana de gestação) foram realizadas por teste *t*, exceto para as concentrações séricas de 25(OH)D, realizada por análise de covariância (ANCOVA) após ajuste pela estação do ano.

A influência dos polimorfismos sobre os indicadores bioquímicos na 5<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana pós-parto foi avaliada por análise de covariância (ANCOVA) após ajuste pela suplementação e pela estação do ano apenas para as concentrações séricas de 25(OH)D. O efeito da suplementação (em 2 níveis), dos genótipos (em 3 níveis) e da interação entre eles sobre os indicadores bioquímicos em todos os tempos avaliados (26<sup>a</sup> semana gestacional, 5<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana pós-parto) e sobre as mudanças nestes indicadores da 5<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semana pós-parto foram avaliados por Two-way ANOVA, considerando as mesmas co-variáveis, seguido pelo pós-teste dos quadrados mínimos (LSD).

A influência dos polimorfismos sobre as medidas ósseas na 5<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana após o parto e sobre as mudanças nessas medidas da 5<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semana após o parto ( $\Delta$ ) foram avaliados por análise de covariância (ANCOVA) seguida pelo pós-teste dos quadrados mínimos (LSD). Foram consideradas como co-variáveis a suplementação, além de outras variáveis significativas previamente identificadas por análise de regressão linear múltipla com eliminação do tipo *backward* das variáveis não significativas, tal como descrito por Diogenes *et al* (2013).

Na análise de regressão linear múltipla foram consideradas como variáveis dependentes as medidas ósseas em cada tempo avaliado e das medidas ósseas no pós-parto ( $\Delta$ ). As variáveis independentes testadas foram: idade cronológica, massa corporal total, estatura, estação do ano, anos passados desde a menarca, dias após o parto, ingestão dietética de cálcio durante a gestação, e a prática de aleitamento materno (aleitamento materno exclusivo, predominante, complementar, ou aleitamento artificial exclusivo). Para as medidas ósseas na 20<sup>a</sup> semana pós-parto e para as mudanças ósseas no pós-parto ( $\Delta$ ), o retorno da menstruação e as mudanças na massa corporal total também foram incluídas como variáveis independentes. Além disto, para as

análises das mudanças ósseas no pós-parto, a medida óssea correspondente na 5ª semana após o parto também foi incluída como variável independente.

O efeito da suplementação (em 2 níveis), dos genótipos (em 3 níveis) e da interação entre eles sobre as medidas ósseas na 5ª e 20ª semana pós-parto, e sobre as mudanças nestas medidas da 5ª à 20ª semana pós-parto foram avaliados por Two-way ANOVA, considerando as mesmas co-variáveis significativas, seguida pelo pós-teste dos quadrados mínimos (LSD).

Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos, e valores de  $P$  entre 0,05 e 0,10 foram considerados tendências. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS Versão 17.0 (SPSS, Inc.).

## 5. RESULTADOS

As características gerais das gestantes adolescentes dos grupos placebo e suplementado com cálcio mais vitamina D no início do estudo são apresentadas na **Tabela 1**. Na 26ª semana gestacional, as adolescentes apresentaram em média 17 anos e já haviam se passado 5,3 anos desde a menarca. O índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional não foi diferente entre os grupos, estando adequado para a idade. As concentrações séricas de 25(OH)D foram em média de 59 nmol/L e 43% das gestantes adolescentes apresentaram concentrações séricas abaixo de 50 nmol/L, indicando insuficiência em vitamina D (HOLICK et al., 2011). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de 25(OH)D, IGF-1, PTH, Estradiol e Prolactina entre os grupos placebo e suplementado com cálcio e vitamina D.

A ingestão dietética de cálcio foi significativamente maior no grupo placebo em comparação ao grupo suplementado ( $P<0,05$ ; Tabela 1), e representou, em média no grupo todo, 47% da ingestão dietética recomendada para gestantes e nutrizes adolescentes (1300 mg/dia; IOM, 2011). Dessa forma, a ingestão dietética de cálcio foi sistematicamente considerada como um potencial fator de confusão em todas as comparações estatísticas feitas entre os grupos. A ingestão dietética de vitamina D foi em média 32UI/d no grupo todo, representando apenas aproximadamente 6% das recomendações de ingestão para gestantes e nutrizes adolescentes (IOM, 2011) e não diferiu entre os grupos.

**Tabela 1** - Características gerais das adolescentes no início do estudo (26ª semana gestacional)<sup>1</sup>

	Placebo (n=26)	Suplementado (n=30)	$P^2$
Idade (anos)	17,2 ± 1,0	16,8 ± 1,5	0,33
Período pós-menarca (anos)	5,3 ± 1,7	5,3 ± 2,1	0,91
IMC pré-gestacional (kg/m <sup>2</sup> )	20,9 ± 3,4	21,9 ± 3,4	0,47
25(OH)D no soro (nmol/L)	57,1±20,6	61,0±20,4	0,80
IGF-1 no soro (ng/mL)	275±89	273±88	0,94
PTH no soro (pg/dL)	37,5±17,0	40,0±17,0	0,56
Estradiol no soro (nmol/L)	13,4±9,5	13,4±9,3	0,99
Prolactina no soro (µg/L)	111±78	135±79	0,26
Ingestão dietética de cálcio (mg/d)	743 ± 457	500 ± 276	0,02
Ingestão dietética de vitamina D (UI/d)	32±38	32 ± 40	0,83

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±DP. n=26 no grupo placebo e n=30 no grupo suplementado, exceto para o IMC pré-gestacional (placebo, n=23; suplementado, n=28).

<sup>2</sup>Comparação entre os grupos placebo e suplementado por teste *t* não pareado para todas as variáveis, exceto para 25(OH)D no soro, avaliado por ANCOVA após ajuste pela estação do ano.

A frequência dos polimorfismos rs1544410 (BsmI), rs10735810 (FokI), rs7975232 (ApaI), rs731236 (TaqI), rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) são apresentadas na **Tabela 2**. Não houve diferença nas distribuições genótípicas entre os grupos placebo e suplementado com cálcio e vitamina D.

**Tabela 2** - Frequência dos genótipos avaliados nas nutrizes adolescentes

SNP	Frequência <sup>1</sup>						P <sup>2</sup>
	Placebo			Suplementado			
rs1544410 (BsmI) <sup>3</sup>	GG 6 (23%)	GA 17 (65%)	AA 3 (12%)	GG 3 (10%)	GA 22 (73%)	AA 5 (17%)	0,39
rs10735810 (FokI) <sup>3</sup>	CC 11 (42%)	CT 11 (42%)	TT 4 (16%)	CC 11 (37%)	CT 17(56%)	TT 2 (7%)	0,43
rs7975232 (ApaI) <sup>4</sup>	TT 9 (35%)	TG 13 (50%)	GG 4 (15%)	TT 6 (22%)	TG 19 (70%)	GG 2 (8%)	0,30
rs731236 (TaqI) <sup>4</sup>	TT 11 (42%)	TC 11 (42%)	CC 4 (8%)	TT 12 (44%)	TC 13 (48%)	CC 2 (8%)	0,65
rs7139166 (1521pb) <sup>4</sup>	GG 13 (50%)	GC 11(42%)	CC 2 (8%)	GG 13 (48%)	GC 10 (37%)	CC 4 (15%)	0,71
rs4516035 (1012pb) <sup>4</sup>	AA 13 (50%)	AG 11 (42%)	GG 2 (8%)	AA 13 (48%)	AG 10 (37%)	GG 4 (15%)	0,71

<sup>1</sup> Frequência apresentada como *n* e percentual nos parênteses;

<sup>2</sup> Comparação entre os grupos por teste do qui-quadrado;

<sup>3</sup> *n*=56;

<sup>4</sup> *n*=53.

As distribuições dos genótipos determinados pelos polimorfismos rs10735810 (FokI), rs7975232 (ApaI), rs731236 (TaqI), rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) ( $P>0,05$ ) seguiram o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apenas a distribuição dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs1544410 (BsmI;  $\chi^2=8,66$ ;  $P<0,05$ ) não seguiu o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os polimorfismos rs7139166 (G>C, 1521pb) e rs4516035 (A>G, 1012pb) estão em completo desequilíbrio de ligação ( $P<0,0001$ ). Dessa forma, nossos resultados envolvendo os polimorfismos da região promotora do gene VDR serão tratados sob a forma das combinações genóticas 1521GG/1012AA, 1521GC/1012AG e 1521CC/1012GG. Os genótipos determinados pelos polimorfismos rs7975232 (T>G, ApaI), rs1544410 (G>A, BsmI) e rs731236 (T>C, TaqI) também se apresentaram em desequilíbrio de ligação ( $P<0,004$ ).

A influência dos SNPs estudados sobre as concentrações séricas de IGF-1, iPTH, 25(OH)D, Prolactina e Estradiol na 5ª e na 20ª semana pós parto é apresentada nas **Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7**. Diferenças nas concentrações séricas de prolactina entre os genótipos determinados pelo SNP rs731236 (TaqI) foram observadas na 5ª semana pós-parto ( $P=0,05$ , Tabela 6). Nutrizes com o genótipo TT apresentaram maiores concentrações séricas de prolactina quando comparadas a nutrizes com genótipo CC. Resultados semelhantes foram observados na 20ª semana pós-parto, no entanto com menor significância estatística ( $P=0,08$ ). Para os outros indicadores hormonais não houve diferença significativa entre os genótipos para nenhum dos polimorfismos estudados, tanto na 5ª quanto na 20ª semana pós-parto ( $P>0,05$ ).

**Tabela 3** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs1544410 (BsmI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5ª e 20ª semanas pós-parto<sup>1</sup>

	Genótipos			P <sup>2</sup>
	GG	GA	AA	
<b>IGF-1 no soro (ng/mL)</b>				
5 sem. pós-parto	244±21 [9]	229±10 [39]	246±22 [8]	0,68
20 sem. pós-parto	277±20 [9]	286±10 [32]	316±24 [6]	0,47
<b>iPTH no soro (pg/dL)</b>				
5 sem. pós-parto	40,8±12,9 [9]	58,7±6,1 [39]	39,5±13,5 [8]	0,26
20 sem. pós-parto	53,7±9,9 [9]	63,2±5,2 [32]	44,3±12,0 [6]	0,30
<b>25(OH)D no soro (nmol/L)</b>				
5 sem. pós-parto	76,5±10,0 [9]	66,6±4,8 [39]	59,5±11,2 [8]	0,51
20 sem. pós-parto	68,2±7,5[9]	60,1±3,8 [32]	51,8±8,9 [6]	0,38
<b>Prolactina no soro (µg/L)</b>				
5 sem. pós-parto	56,7±34,6 [9]	104,8±16,6 [39]	72,6±36,7 [8]	0,39
20 sem. pós-parto	47,2±12,4 [9]	37,8±6,7 [31]	29,4±15,1[6]	0,65
<b>Estradiol no soro (nmol/L)</b>				
5 sem. pós-parto	0,15±0,02 [9]	0,12±0,01 [38]	0,14±0,02 [8]	0,23
20 sem. pós-parto	NA	NA	NA	-

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±EP; *n* nos colchetes; NA- não avaliado.

<sup>2</sup> Comparação entre os genótipos por ANCOVA, após ajuste pela suplementação para todas as variáveis, exceto para 25(OH)D no soro, ajustado pela suplementação e estação do ano.

**Tabela 4** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs10735810 (FokI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizas adolescentes na 5ª e 20ª semanas pós-parto<sup>1</sup>

	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	CC	CT	TT	
IGF-1 no soro (ng/mL)				
5 sem. pós-parto	239±13 [22]	228±12 [28]	239±25 [6]	0,82
20 sem. pós-parto	294±14 [19]	280±12 [24]	312±30 [4]	0,52
iPTH no soro (pg/dL)				
5 sem. pós-parto	51,9±8,3 [22]	52,2±7,4 [28]	61,6±16,1 [6]	0,85
20 sem. pós-parto	58,1±6,9 [19]	61,6±6,1 [24]	47,4±14,9 [4]	0,67
25(OH)D no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	60,8±6,4 [22]	73,6±5,6 [28]	60,5±12,2 [6]	0,28
20 sem. pós-parto	59,5±5,1 [19]	62,5±4,5 [24]	53,9±11,0 [4]	0,75
Prolactina no soro (µg/L)				
5 sem. pós-parto	68,5±21,6 [22]	120,5±19,1 [28]	48,9±41,3 [6]	0,12
20 sem. pós-parto	46,8±8,4 [19]	32,7±7,7 [23]	32,7±18,4 [4]	0,44
Estradiol no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	0,14±0,01 [21]	0,12±0,01 [28]	0,12±0,02 [6]	0,40
20 sem. pós-parto	NA	NA	NA	-

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±EP; *n* nos colchetes; NA- não avaliado.

<sup>2</sup> Comparação entre os genótipos por ANCOVA, após ajuste pela suplementação, exceto para 25(OH)D no soro, ajustado pela suplementação e estação do ano.



**Tabela 5** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs7975232 (ApaI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5ª e 20ª semanas pós-parto<sup>1</sup>

	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	TT	TG	GG	
IGF-1 no soro (ng/mL)				
5 sem. pós-parto	230±16 [15]	237±11 [32]	227±26 [6]	0,90
20 sem. pós-parto	281±17 [13]	287±12 [25]	305±25 [6]	0,73
iPTH no soro (pg/dL)				
5 sem. pós-parto	49,4±10,2 [15]	56,3±7,0 [32]	51,5±16,1 [6]	0,85
20 sem. pós-parto	57,7±8,7 [13]	57,3±6,3 [25]	63,0±12,8 [6]	0,92
25(OH)D no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	70,0±8,0 [15]	65,6±5,4 [32]	74,1±12,9 [6]	0,79
20 sem. pós-parto	66,6±6,4 [13]	60,2±4,5 [25]	57,0±9,3 [6]	0,63
Prolactina no soro (µg/L)				
5 sem. pós-parto	81,9±26,4 [15]	88,1±18,1 [32]	180,4±41,8 [6]	0,11
20 sem. pós-parto	45,8±10,6 [13]	35,7±7,8 [24]	38,1±15,6 [6]	0,74
Estradiol no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	0,14±0,01 [15]	0,12±0,01 [31]	0,12±0,02 [6]	0,37
20 sem. pós-parto	NA	NA	NA	-

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±EP; *n* nos colchetes; NA- não avaliado.

<sup>2</sup> Comparação entre os genótipos por ANCOVA, após ajuste pela suplementação, exceto para 25(OH)D no soro, ajustado pela suplementação e estação do ano.

**Tabela 6** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs731236 (TaqI) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5ª e 20ª semanas pós-parto<sup>1</sup>

	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	TT	TC	CC	
IGF-1 no soro (ng/mL)				
5 sem. pós-parto	216±13 [23]	253±12 [24]	225±25 [6]	0,13
20 sem. pós-parto	283±14 [19]	299±14 [19]	263±26 [6]	0,43
iPTH no soro (pg/dL)				
5 sem. pós-parto	50,1±8,1 [23]	60,0±7,9 [24]	43,3±16,0 [6]	0,54
20 sem. pós-parto	61,2±7,1 [19]	55,3±7,0 [19]	58,1±12,7 [6]	0,84
25(OH)D no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	68,8±6,5 [23]	64,4±6,3 [24]	77,4±12,5 [6]	0,64
20 sem. pós-parto	54,9±4,9 [19]	65,4±4,9 [19]	71,2±8,8 [6]	0,18
Prolactina no soro (µg/L)				
5 sem. pós-parto	132,6±21,0 <sup>a</sup> [23]	79,2±20,6 <sup>a,b</sup> [24]	30,7±41,2 <sup>b</sup> [6]	<b>0,05</b>
20 sem. pós-parto	40,1±8,3 [19]	28,6±8,5 [18]	14,8±7,9 [6]	0,08
Estradiol no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	0,12±0,01 [23]	0,13±0,01 [23]	0,14±0,02 [6]	0,64
20 sem. pós-parto	NA	NA	NA	-

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±EP; *n* nos colchetes; NA- não avaliado.

<sup>2</sup> Comparação entre os genótipos por ANCOVA, após ajuste pela suplementação, exceto para 25(OH)D no soro, ajustado pela suplementação e estação do ano. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os genótipos (pós-teste LSD).

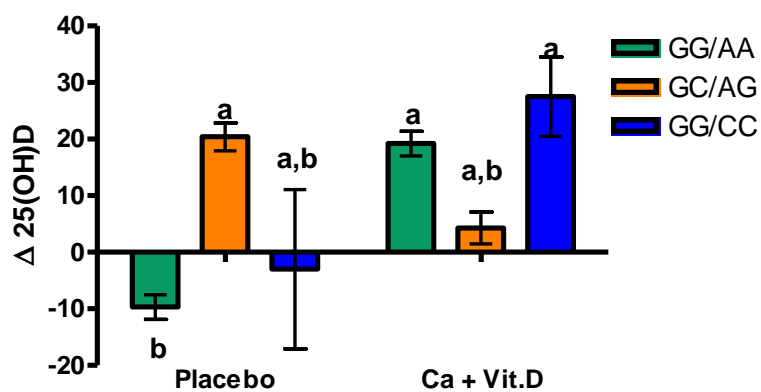
**Tabela 7** - Efeito dos genótipos determinados pelos polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre os indicadores bioquímicos nas nutrizes adolescentes na 5ª e 20ª semanas pós-parto<sup>1</sup>

	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	GG/AA	GC/AG	CC/GG	
IGF-1 no soro (ng/mL)				
5 sem. pós-parto	223±12 [26]	247±14 [21]	232±26 [6]	0,43
20 sem. pós-parto	295±13 [21]	282±14 [18]	275±27 [5]	0,74
iPTH no soro (pg/dL)				
5 sem. pós-parto	52,1±7,7 [26]	54,1±8,6 [21]	60,4±16,1 [6]	0,90
20 sem. pós-parto	61,7±6,6 [21]	58,6±7,2 [18]	42,1±13,6 [5]	0,44
25(OH)D no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	63,9±5,9 [26]	70,8±6,6 [21]	73,8±12,4 [6]	0,65
20 sem. pós-parto	59,6±4,8 [21]	61,2±5,2 [18]	72,1±10,2 [5]	0,54
Prolactina no soro (µg/L)				
5 sem. pós-parto	116,6±20,6 [26]	77,4±22,9 [21]	79,7±42,9 [6]	0,41
20 sem. pós-parto	34,8±8,5 [20]	45,5±9,0 [18]	33,4±17,0 [5]	0,65
Estradiol no soro (nmol/L)				
5 sem. pós-parto	0,13±0,01 [26]	0,11±0,01 [20]	0,14±0,02 [6]	0,42
20 sem. pós-parto	NA	NA	NA	-

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±EP; *n* nos colchetes; NA- não avaliado.

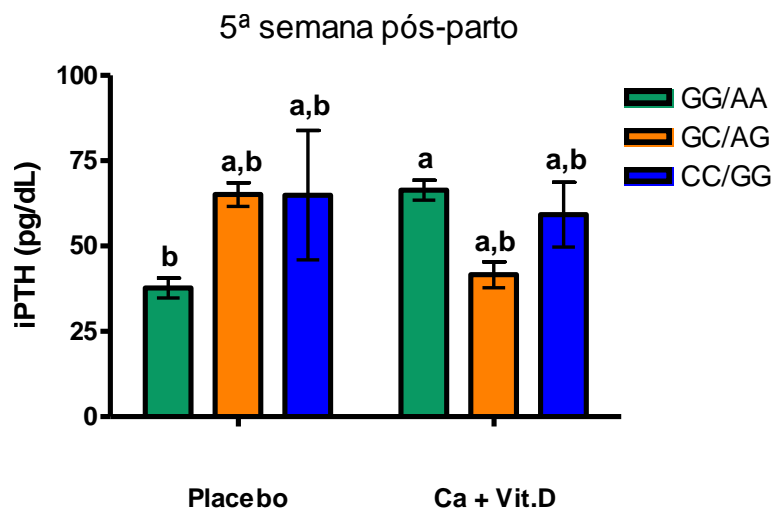
<sup>2</sup> Comparação entre os genótipos por ANCOVA, após ajuste pela suplementação, exceto para 25(OH)D no soro, ajustado pela suplementação e estação do ano.

Não foram observadas interações significativas entre a suplementação e os SNPs estudados sobre as concentrações séricas de 25(OH)D das mães adolescentes na 5ª e na 20ª semana pós-parto (dados não apresentados). No entanto, foi observada interação ( $P < 0,05$ ) entre a suplementação e os polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre as mudanças nas concentrações de 25(OH)D da 26ª semana gestacional (SG) para a 5ª semana pós-parto (SPP) [ $\Delta 25(\text{OH})\text{D} = 5^{\text{a}}\text{SPP} - 26^{\text{a}}\text{SG}$ ] (**Figura 9**). A mudança nas concentrações séricas de 25(OH)D da gestação para a lactação nas nutrizes adolescentes suplementadas com cálcio e vitamina D foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) das mudanças observadas no grupo placebo apenas para aquelas que possuem a combinação genotípica 1521GG/1012AA ( $19,2 \pm 28,1$  vs.  $-9,7 \pm 28,1$ ; respectivamente). Também foi observada interação significativa entre a suplementação e os SNPs rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre as concentrações de PTH na 5ª e 20ª semana após o parto (**Figura 10**). Na 5ª semana pós-parto as concentrações séricas de PTH nas nutrizes com a combinação genotípica 1521GG/1012AA que receberam suplemento tenderam a ser maiores do que nas nutrizes de mesma combinação genotípica que receberam placebo ( $64,6 \pm 37,9$  vs.  $37,7 \pm 37,9$ , respectivamente;  $P = 0,07$ ; Figura 10.A). Esta diferença observada foi significativa na 20ª semana pós-parto ( $P = 0,02$ ; Figura 10.B). Nutrizes suplementadas com a combinação genotípica 1521GG/1012AA apresentaram maiores concentrações séricas de PTH na 20ª semana pós-parto, quando comparadas as nutrizes de mesma combinação genotípica que receberam placebo ( $73,3 \pm 28,3$  vs.  $49,0 \pm 27,9$ , respectivamente).

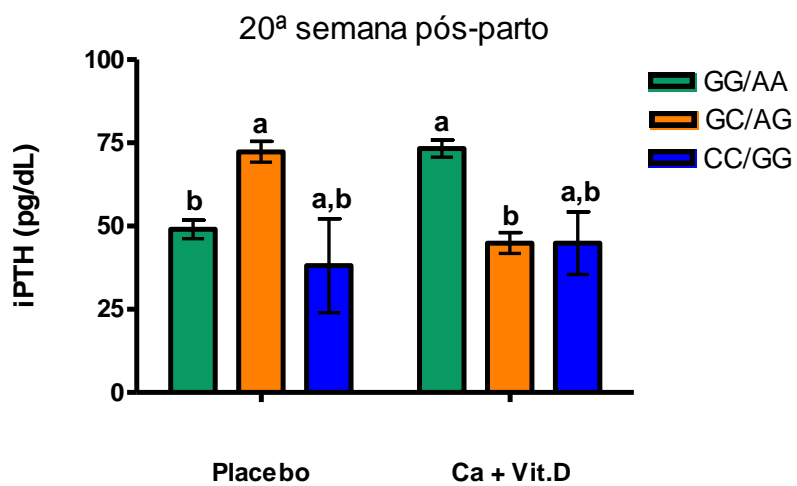


**Figura 9** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre a variação nas concentrações séricas de 25(OH)D entre a 26ª semana gestacional e a 5ª semana pós-parto. Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos  $P < 0,05$ .

(A)



(B)



**Figura 10** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre a variação nas concentrações séricas de PTH na 5ª semana pós-parto (A) e na 20ª semana pós-parto (B). Valores apresentados como média±EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos  $P < 0,05$ .

O efeito dos polimorfismos estudados sobre as medidas ósseas na 5ª e na 20ª semana pós-parto é apresentado nas **Tabelas 8, 9, 10, 11, 12**. Somente os SNPs rs7139166 (1521pb, Tabela 12) e rs4516035 (1012pb) apresentaram efeito sobre o CMO do colo do fêmur, no entanto, sem significância estatística ( $P=0,05$ ). Nutrizes com a combinação genotípica 1521CC/1012GG tiveram maior CMO do colo do fêmur, quando comparadas a nutrizes com a mesma combinação genotípica 1521GC/1012AG (Tabela 12). Outros genótipos tenderam ( $P\leq 0,10$ ) a apresentar efeito sobre os parâmetros ósseos estudados, no entanto não atingiram significância estatística.

As mudanças nas medidas ósseas da 5ª semana pós-parto para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta = 20^{\text{a}}\text{SPP} - 5^{\text{a}}\text{SPP}$ ) sofreram influência significativa dos SNPs rs10735810 (FokI), rs7975232 (ApaI), rs731236 (TaqI), rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) ( $P < 0,07$ ) (**Figuras 11 a 14**). Para o SNP rs10735810 (FokI), nutrizes com o genótipo CC apresentaram em média menores perdas no CMO no corpo total comparadas àquelas com genótipo CT e TT ( $P=0,005$ ) (Figura 11.A), e também tenderam a apresentar menores reduções na DMO no fêmur total comparadas àquelas nutrizes com genótipo TT ( $P=0,07$ ) (Figura 11.B). Considerando o SNP rs7975232 (ApaI), nutrizes com o genótipo TG tenderam a apresentar menores perdas na DMO no corpo total ( $P=0,07$ ) comparadas as nutrizes com genótipo GG (Figura 12). Para o polimorfismo rs731236 (TaqI), diferenças significativas entre os genótipos foram observadas para as medidas ósseas no colo do fêmur (Figura 13, gráficos **A,B,C**;  $P < 0,05$ ). Nutrizes com o genótipo TC apresentaram maior perda de AO em comparação às nutrizes com genótipo TT ( $P=0,01$ ) (Figura 13.A) e menores reduções ( $P < 0,01$ ) de DMO e de Zscore de DMO em relação às nutrizes com genótipo TT e CC (Figura 13, B e C). Considerando os SNPs rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb), as nutrizes com a combinação genotípica 1521GG/1012AA apresentaram, em média, um incremento no Zscore na DMO no colo do fêmur da 5ª a 20ª semana pós-parto, enquanto as nutrizes com as combinações genotípicas 1521GC/AG e 1521CC/1012GG apresentaram uma redução nesta medida óssea ( $P=0,07$ ) (Figura 14).

**Tabela 8** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs1544410 (BsmI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5ª e na 20ª semana pós-parto<sup>1</sup>

	5ª semana pós-parto				20ª semana pós-parto			
	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	GG (n=9)	GA (n=39)	AA (n=8)		GG (n=9)	GA (n=32)	AA (n=6)	
<b>Corpo Total</b>								
CMO (g)	2045±205	2145±203	2007±222	0,17	1976±214	2089±215	2026±219	0,37
AO (cm <sup>2</sup> )	1975±70	1982±68	1984±70	0,95	1967±55	1957±52	1952±53	0,86
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,044±0,093	1,075±0,096	1,020±0,098	0,29	1,026±0,096	1,060±0,096	1,029±0,095	0,55
Zscore DMO	-0,36±0,99	-0,12±0,99	-0,61±1,07	0,47	-0,60±1,10	-0,30±1,10	-0,56±1,12	0,71
<b>Coluna Lombar</b>								
CMO (g)	48,8±8,8	52,1±8,7	52,2±9,0	0,59	49,0±8,7	52,0±16,4	48,5±8,7	0,51
AO (cm <sup>2</sup> )	48,3±3,6	47,5±3,5	49,3±3,6	0,40	47,7±3,8	47,5±3,8	48,5±3,8	0,84
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,000±0,141	1,089±0,137	1,084±0,141	0,24	0,986±0,132	1,094±0,130	1,039±0,134	0,10
Zscore DMO	-1,35±1,06	-0,82±1,04	-0,87±1,06	0,41	-1,54±1,01	-0,82±1,00	-1,14±0,99	0,17
<b>Femur Total</b>								
CMO (g)	27,5±4,0	28,6±4,0	26,6±4,0	0,37	26,0±3,9	27,6±3,9	24,6±4,0	0,21
AO (cm <sup>2</sup> )	26,8±1,2	27,6±1,2	27,2±1,3	0,25	26,8±1,4	27,2±1,4	27,1±1,4	0,77
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,030±0,141	1,039±0,143	0,955±0,159	0,37	0,979±0,147	1,006±0,147	0,929±0,149	0,51
Zscore DMO	0,14±1,11	0,18±1,10	-0,44±1,18	0,41	-0,27±1,18	-0,12±1,17	-0,629±1,20	0,64
<b>Colo do Femur</b>								
CMO (g)	4,4±0,5	4,5±0,5	4,3±0,5	0,56	4,1±0,5	4,3±0,5	3,9±0,5	0,27
AO (cm <sup>2</sup> )	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	0,72	4,2±0,2	4,2±0,2	4,1±0,2	0,77
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,052±0,132	1,055±0,131	1,022±0,138	0,84	0,992±0,126	1,014±0,124	0,946±0,130	0,48
Zscore DMO	0,38±1,02	0,35±1,01	0,15±1,09	0,88	-0,08±1,00	0,022±0,99	-0,410±1,02	0,63

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±DP. <sup>2</sup>Comparação entre os genótipos por ANCOVA, usando como co-variáveis a suplementação e os preditores significativos tal como descrito por Diogenes et al, 2013.



**Tabela 9** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs10735810 (FokI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5ª e na 20ª semana pós-parto<sup>1</sup>

	5ª semana pós-parto				20ª semana pós-parto			
	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	CC (n=22)	CT (n=28)	TT (n=6)		CC (n=19)	CT (n=14)	TT (n=4)	
<b>Corpo Total</b>								
CMO (g)	2101 ± 205	2094±228	2209±211	0,47	2078±216	2046±166	2048±222	0,12
AO (cm <sup>2</sup> )	1967±66	1987±74	2002±68	0,42	1963±50	1952±38	1971±52	0,67
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,061±0,094	1,060±0,100	1,093±0,095	0,71	1,045±0,096	1,052±0,075	1,056±0,098	0,96
Zscore DMO	-0,29±0,99	-0,28±1,11	0,20±1,02	0,55	-0,39±1,10	-0,41±0,84	-0,22±1,12	0,95
<b>Coluna Lombar</b>								
CMO (g)	50,7±8,6	51,5±9,7	55,3±8,6	0,52	50,4±8,4	51,8±6,4	48,7±7,6	0,73
AO (cm <sup>2</sup> )	47,1±3,5	48,0±3,9	49,9±3,6	0,25	47,3±3,8	48,123±6,4	46,6±3,9	0,66
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,069±0,141	1,070±0,160	1,113±0,144	0,79	1,058±0,139	1,078±0,105	1,037±0,138	0,81
Zscore DMO	-1,01±1,04	-0,95±1,66	-0,41±1,05	0,45	-1,10±1,03	-0,93±0,80	-0,969±1,03	0,86
<b>Femur Total</b>								
CMO (g)	28,0±3,8	27,6±4,3	31,1±4,0	0,18	27,1±4,0	26,5±3,1	28,0±4,1	0,77
AO (cm <sup>2</sup> )	27,4±1,2	27,3±1,4	27,6±1,3	0,89	27,3±1,4	27,0±1,0	27,0±1,4	0,78
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,019±0,141	1,018±0,160	1,086±0,142	0,55	0,989±0,148	0,989±0,116	1,009±0,150	0,97
Zscore DMO	0,01±1,09	0,03±1,23	0,59±1,11	0,50	-0,25±1,19	-0,23±0,90	-0,01±1,19	0,93
<b>Colo do Femur</b>								
CMO (g)	4,4±0,5	4,4±0,5	4,9±0,5	0,09	4,2±0,5	4,2±0,4	4,3±0,5	0,95
AO (cm <sup>2</sup> )	4,1±0,2	4,3±0,2	4,2±0,2	0,08	4,2±0,2	4,2±0,1	4,2±0,2	0,48
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,063±0,127	1,029±0,142	1,099±0,127	0,41	1,014±0,130	0,987±0,097	1,030±0,130	0,72
Zscore DMO	0,39±0,98	0,19±1,11	0,73±1,00	0,45	0,01±1,01	-0,15±0,76	0,26±1,02	0,71

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±DP. <sup>2</sup>Comparação entre os genótipos por ANCOVA, usando como co-variáveis a suplementação e os preditores significativos tal como descrito por Diogenes et al, 2013.

**Tabela 10** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs7975232 (ApaI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5ª e na 20ª semana pós-parto<sup>1</sup>

	5ª semana pós-parto				20ª semana pós-parto			
	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	TT (n=15)	TG (n=32)	GG (n=6)		TT (n=13)	TG (n=25)	GG (n=6)	
<b>Corpo Total</b>								
CMO (g)	2054±212	2113±206	2185±225	0,47	2016±216	2056±217	2109±215	0,67
AO (cm <sup>2</sup> )	1988±69	1977±68	1980±72	0,89	1970±52	1952±53	1939±52	0,43
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,040±0,093	1,065±0,090	1,084±0,095	0,56	1,028±0,094	1,052±0,090	1,069±0,093	0,63
Zscore DMO	-0,39±1,03	-0,24±1,00	0,11±1,09	0,66	-0,47±1,07	-0,45±1,07	-0,04±1,05	0,67
<b>Coluna Lombar</b>								
CMO (g)	50,4±8,7	51,2±8,7	53,6±8,7	0,74	60,0±8,1	49,7±8,0	52,0±8,1	0,80
AO (cm <sup>2</sup> )	48,3±3,7	47,5±3,6	46,6±3,8	0,63	48,6±3,5	46,9±3,5	46,2±3,5	0,25
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,041±0,139	1,071±0,141	1,152±0,142	0,27	1,000±0,137	1,077±0,135	1,133±0,132	0,10
Zscore DMO	-1,08±1,06	-0,95±1,06	-0,42±1,07	0,44	-1,27±1,02	-0,98±0,99	-0,70±0,97	0,50
<b>Femur Total</b>								
CMO (g)	27,8±4,0	27,9±3,9	29,6±4,1	0,64	26,7±4,0	26,7±4,1	27,3±4,0	0,94
AO (cm <sup>2</sup> )	27,5±1,3	25,2±1,2	28,0±1,3	0,35	27,5±1,4	27,0±1,4	27,0±1,3	0,44
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,019±0,139	1,020±0,141	1,042±0,144	0,93	0,972±0,144	0,986±0,145	1,024±0,144	0,76
Zscore DMO	0,05±1,10	0,03±1,08	0,25±1,12	0,91	-0,32±1,13	-0,29±1,14	0,05±1,13	0,78
<b>Colo do Femur</b>								
CMO (g)	4,4±0,5	4,4±0,5	4,6±0,5	0,49	4,2±0,5	4,1±0,5	4,3±0,4	0,61
AO (cm <sup>2</sup> )	4,3±0,2	4,3±0,2	4,3±0,2	0,12	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	0,77
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,049±0,132	1,047±0,130	1,050±0,135	0,99	0,993±0,129	1,000±0,130	1,012±0,130	0,95
Zscore DMO	0,37±1,03	0,28±1,01	0,36±1,05	0,95	-0,06±1,02	-0,10±1,02	0,05±1,01	0,95

Valores apresentados como média±DP. <sup>2</sup>Comparação entre os genótipos por ANCOVA, usando como co-variáveis a suplementação e os preditores significativos tal como descrito por Diogenes et al, 2013.

**Tabela 11** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs731236 (TaqI) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5ª e na 20ª semana pós-parto<sup>1</sup>

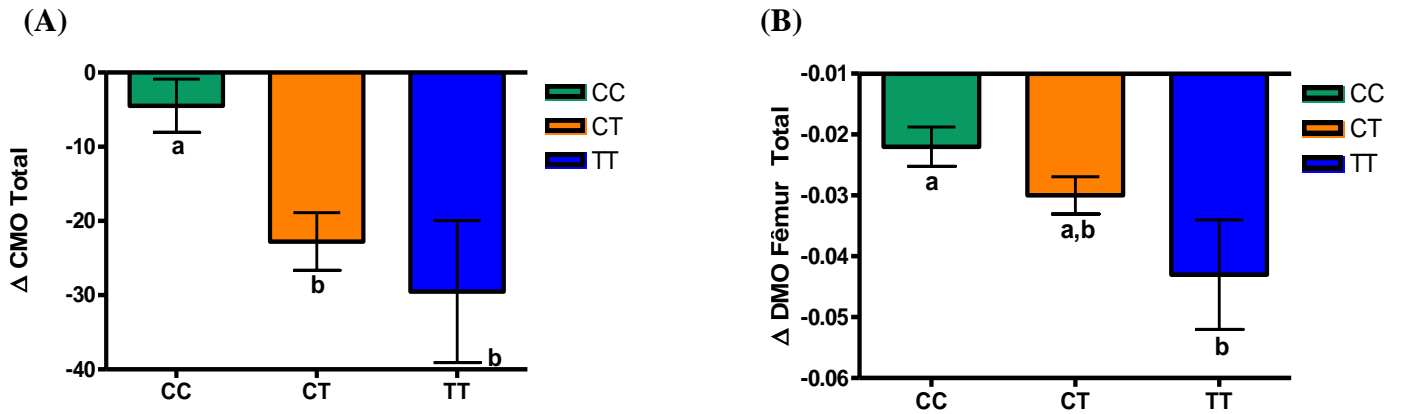
	5ª semana pós-parto				20ª semana pós-parto			
	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>	Genótipos			<i>P</i> <sup>2</sup>
	TT(n=23)	TC(n=24)	CC(n=6)		TT (n=19)	TC (n=19)	CC (n=6)	
<b>Corpo Total</b>								
CMO (g)	2142±224	2105±222	1962±211	0,20	2081±214	2043±220	1983±231	0,62
AO (cm <sup>2</sup> )	1993±70	1969±71	1978±73	0,50	1954±54,2	1955±56,0	1961±58,0	0,96
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,062±0,959	1,066±0,980	1,027±0,955	0,67	1,057±0,091	1,047±0,091	1,015±0,095	0,64
Zscore DMO	-0,13±1,08	-0,26±1,06	-0,59±1,04	0,64	-0,38±1,05	-0,37±1,05	-0,523±1,09	0,96
<b>Coluna Lombar</b>								
CMO (g)	52,0±8,8	51,1±9,2	49,0±9,4	0,75	50,6±8,3	50,0±8,6	51,2±9,2	0,95
AO (cm <sup>2</sup> )	47,7±3,8	47,1±3,9	49,4±4,0	0,47	46,6±3,5	47,4±3,7	49,2±3,8	0,33
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,093±0,139	1,077±0,142	0,969±0,144	0,18	1,061±0,122	1,094±0,122	0,964±0,120	0,09
Zscore DMO	-0,85±1,04	-0,83±1,06	-1,61±1,09	0,28	-1,03±0,93	-0,82±0,93	-1,65±0,93	0,18
<b>Femur Total</b>								
CMO (g)	28,6±4,1	27,9±4,0	26,7±4,1	0,59	26,6±4,0	27,2±4,0	25,9±4,1	0,76
AO (cm <sup>2</sup> )	27,8±1,3	27,0±1,3	27,7±1,3	0,16	27,1±1,4	27,0±1,4	27,4±1,5	0,86
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,012±0,144	1,043±0,147	0,984±0,142	0,63	0,985±0,144	0,996±0,144	0,963±0,149	0,89
Zscore DMO	-0,06±1,11	0,11±1,12	-0,18±1,12	0,85	-0,27±1,13	-0,19±1,14	-0,39±1,18	0,93
<b>Colo do Femur</b>								
CMO (g)	4,5±0,5	4,4±0,5	4,2±0,5	0,65	4,2±0,5	4,1±0,5	4,2±0,5	0,88
AO (cm <sup>2</sup> )	4,2±0,2	4,1±0,2	4,3±0,2	0,59	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	0,83
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,046±0,139	1,059±0,137	1,013±0,135	0,77	0,997±0,130	1,009±0,131	0,978±0,135	0,88
Zscore DMO	0,32±1,07	0,35±1,08	0,10±1,06	0,88	-0,08±1,01	-0,03±1,02	-0,18±1,06	0,95

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±DP. <sup>2</sup>Comparação entre os genótipos por ANCOVA, usando como co-variáveis a suplementação e os preditores significativos tal como descrito por Diogenes et al, 2013.

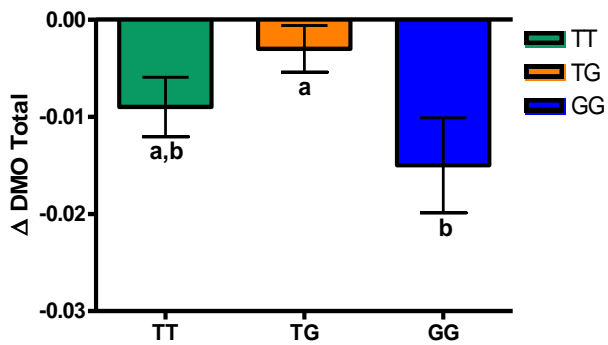
**Tabela 12** - Efeito dos genótipos determinados pelos polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre os indicadores ósseos das adolescentes estudadas na 5ª e na 20ª semana pós-parto<sup>1</sup>

	5ª semana pós-parto				20ª semana pós-parto			
	Genótipos			P <sup>2</sup>	Genótipos			P <sup>2</sup>
	GG/AA (n=26)	GC/AG (n=21)	CC/GG (n=6)		GG/AA (n=21)	GC/AG (n=18)	CC/GG (n=5)	
<b>Corpo Total</b>								
CMO (g)	2118±207	2069±207	2171±211	0,53	2066±209	2006±211	2156±216	0,36
AO (cm <sup>2</sup> )	1989±66	1963±66	2006±68	0,27	1952±54	1955±55	1967±54	0,85
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,062±0,092	1,053±0,091	1,077±0,095	0,86	1,053±0,092	1,038±0,093	1,057±0,100	0,86
Zscore DMO	-0,23±0,99	-0,37±0,99	0,15±1,01	0,54	0,36±1,02	-0,58±1,03	0,11±1,06	0,43
<b>Coluna Lombar</b>								
CMO (g)	53,2±8,3	48,6±8,4	52,0±8,5	0,18	52,0±8,0	48,4±8,4	51,7±8,2	0,44
AO (cm <sup>2</sup> )	48,4±3,5	46,3±3,5	48,7±3,6	0,12	47,8±3,4	46,4±3,4	48,9±3,6	0,28
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,095±0,143	1,034±0,142	1,104±0,144	0,30	1,084±0,124	1,023±0,127	1,111±0,127	0,25
Zscore DMO	-0,81±1,05	-1,15±1,06	-0,67±1,08	0,47	-0,90±0,92	-1,32±0,94	0,51±0,96	0,19
<b>Femur Total</b>								
CMO (g)	28,5±3,8	27,2±3,8	29,5±3,9	0,33	27,0±3,9	25,9±2,9	29,0±4,0	0,28
AO (cm <sup>2</sup> )	27,5±1,2	27,2±1,2	27,5±1,2	0,72	27,1±1,3	27,0±1,3	27,7±1,4	0,52
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,031±0,138	0,997±0,137	1,077±0,139	0,42	0,995±0,137	0,957±0,140	1,058±0,143	0,37
Zscore DMO	0,12±1,05	-0,15±1,06	0,52±1,08	0,38	-0,20±1,10	0,47±1,11	0,35±1,13	0,36
<b>Colo do Femur</b>								
CMO (g)	4,5±0,5	4,2±0,5	4,7±0,5	0,10	4,3±0,4 <b>a,b</b>	4,0±0,4 <b>b</b>	4,6±0,5 <b>a</b>	<b>0,05</b>
AO (cm <sup>2</sup> )	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	0,96	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	0,92
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	1,064±0,122	1,007±0,124	1,124±0,125	0,10	1,009±0,124	0,966±0,123	1,084±0,131	0,19
Zscore DMO	0,43±0,96	-0,01±0,96	0,90±0,98	0,10	-0,01±0,98	-0,32±0,97	0,59±1,03	0,20

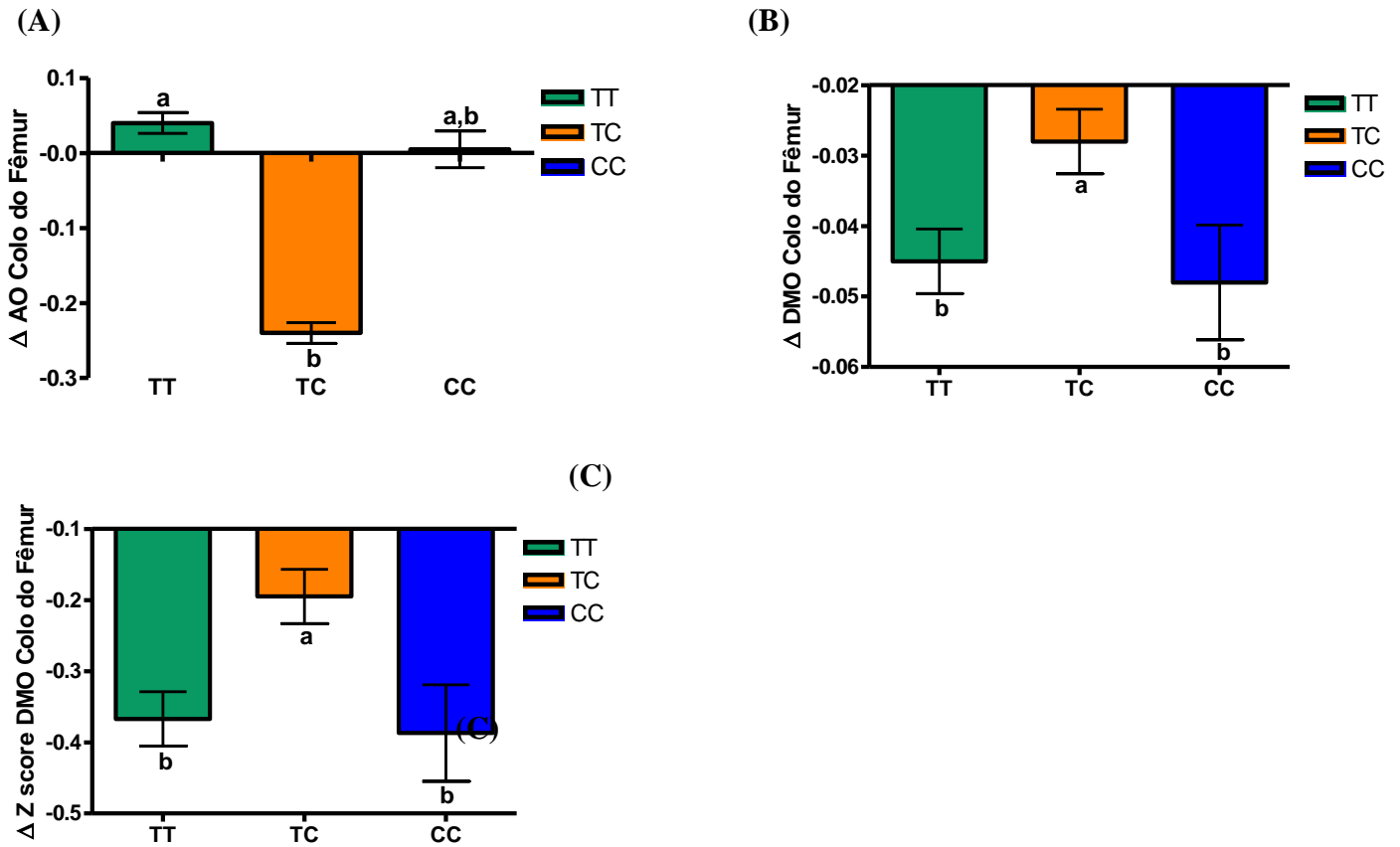
<sup>1</sup>Valores apresentados como média±DP. <sup>2</sup>Comparação entre os genótipos por ANCOVA, usando como co-variáveis a suplementação e os preditores significativos tal como descrito por Diogenes et al, 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os genótipos (pós-teste LSD).



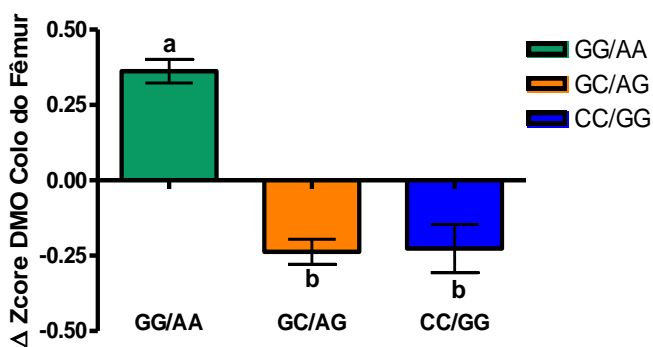
**Figura 11** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs10735810 (FokI) sobre variações ósseas da 5<sup>a</sup> para a 20<sup>a</sup> semana pós-parto. Valores apresentados como média±DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos P<0,05.



**Figura 12** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs7975232 (ApaI) sobre variações ósseas da 5<sup>a</sup> para a 20<sup>a</sup> semana pós-parto. Valores apresentados como média±DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos P<0,05.



**Figura 13** - Efeito dos genótipos determinados pelo polimorfismo rs731236 (TaqI) sobre variações ósseas da 5ª para a 20ª semana pós-parto. Valores apresentados como média±DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos  $P < 0,05$ .



**Figura 14** - Efeito dos genótipos determinados pelos polimorfismos rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) sobre variações ósseas da 5ª para a 20ª semana pós-parto. Valores apresentados como média±DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos  $P < 0,05$ .

A influência da suplementação com cálcio e vitamina D sobre os parâmetros ósseos avaliados nos diferentes momentos do estudo nesta mesma população foi previamente descrita por Diogenes e colaboradores (2013) e não será explorada no presente trabalho. A interação entre a suplementação e os diferentes polimorfismos estudados sobre as medidas ósseas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto (delta) foi avaliada após ajustes para os preditores significativos para cada parâmetro ósseo, tal como descrito por Diogenes et al., 2013 (**Tabelas 13 a 28**). Foram observadas interações significativas entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre as medidas ósseas avaliadas em esqueleto total (Tabelas 13 a 16), em fêmur total (Tabelas 21 a 24) e no colo do fêmur (Tabelas 25 a 28).

No esqueleto total, o CMO foi influenciado pela interação entre o SNP rs1544410 (BsmI) e a suplementação ( $P < 0,05$ ). Apenas as nutrizes com o genótipo GA suplementadas com cálcio e vitamina D apresentaram maior CMO na 20ª semana pós-parto quando comparadas a nutrizes de mesmo genótipo que receberam placebo (Tabela 13). A AO e o Z score de esqueleto total foram influenciados pela interação entre a suplementação e os SNPs rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) ( $P < 0,05$ ) (Tabelas 14 e 16). As nutrizes suplementadas e com a combinação genotípica 1521GG/1012AA tiveram maior redução de AO e menor redução de Z score da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $P = 0,03$ ) quando comparadas a nutrizes 1521GG/1012AA que receberam placebo (Tabelas 14 e 16). Por outro lado, nutrizes suplementadas e com a combinação genotípica 1521GC/1012AG tiveram maior redução de Z score da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $P = 0,03$ ) quando comparadas a nutrizes 1521GC/1012AG que receberam placebo (Tabela 16).

**Tabela 13** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	CMO Total (g)						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	Gen X Sup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	2045±204[6]	2110±207[17]	2100±207[3]	2028±219[3]	2171±202[22]	1978±213[5]	0,27	0,79	0,58
20 sem. pós-parto	1996±197 <b>a,b</b> [6]	1981±205 <b>a</b> [13]	2267±200 <b>a,b</b> [2]	1948±204 <b>a,b</b> [3]	2156±197 <b>b</b> [19]	1927±200 <b>a</b> [4]	0,43	0,37	<b>0,02</b>
$\Delta$	-14,3±22,0[6]	-21,3±22,4[13]	0,4±21,8[2]	-33,7±23,3[3]	-13,1±21,8[19]	-9,2±22,2[4]	0,29	0,44	0,27
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	2082±213[11]	2042±215[11]	2233±213[4]	2118±210[11]	2127±210[17]	2183±215[2]	0,49	0,75	0,79
20 sem. pós-parto	2026±205[10]	1977±220[9]	2102±218[2]	2135±217[9]	2091±224[15]	1982±225[2]	0,79	0,69	0,61
$\Delta$	-6,4±19,9[10]	-24,4±20,1[9]	-38,2±20,2[2]	-2,6±19,3[9]	-21,6±20,0[15]	-21,1±19,7[2]	0,01	0,33	0,80
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	1997±224[9]	2132±204[13]	2097±217[4]	2126±215[6]	2108±206[19]	2331±210[2]	0,40	0,14	0,28
20 sem. pós-parto	1965±216[8]	2056±223[9]	2032±222[4]	2072±220[5]	2069±218[16]	2222±221[2]	0,62	0,21	0,66
$\Delta$	-22,5±23,4[8]	-10,1±24,5[9]	-22,6±21,5[4]	-19,3±23,7[5]	-10,9±21,7[16]	-32,6±21,2[2]	0,22	0,76	0,85
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	2102±222[11]	2108±226[11]	1948±228[4]	2175±216[12]	2107±215[13]	1972±218[2]	0,24	0,69	0,84
20 sem. pós-parto	2067±213[8]	1954±234[9]	2030±223[4]	2100±212[11]	2112±214[10]	1878±218[2]	0,46	0,89	0,34
$\Delta$	-13,5±21,6[8]	-24,1±21,6[9]	-13,0±21,3[4]	-18,1±21,2[11]	-5,5±21,8[10]	-33,4±22,5[2]	0,71	0,80	0,11
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	2065±211[13]	2080±209[11]	2220±207[2]	2172±215[13]	2052±218[10]	2154±213[4]	0,44	0,95	0,48
20 sem. pós-parto	2013±216[10]	1979±216[9]	2176±214[2]	2114±216[11]	2029±214[9]	2149±223[3]	0,36	0,61	0,83
$\Delta$	-23,1±21,3[10]	-11,1±21,8[9]	-16,6±22,6[2]	-14,7±22,3[11]	-19,1±22,3[9]	-0,06±22,0[3]	0,62	0,52	0,43

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).



**Tabela 14** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	AO Total (cm <sup>2</sup> )						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	2006±66[6]	1979±69[17]	1977±69[3]	1914±69[3]	1984±66[22]	1989±69[5]	0,70	0,30	0,17
20 sem. pós-parto	1984±56[6]	1950±53[13]	1986±51[2]	1932±54[3]	1961±52[19]	1938±52[5]	0,97	0,16	0,20
$\Delta$	-11,1±20,4[6]	-3,8±19,5[13]	9,7±19,1[2]	6,7±19,4[3]	-2,0±19,5[19]	-4,4±19,0[4]	0,82	0,82	0,35
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	1970±68[11]	1983±70[11]	2024±69[4]	1963±68[11]	1992±70[17]	1960±70[2]	0,53	0,38	0,56
20 sem. pós-parto	1958±50[10]	1954±50[9]	2026±50[2]	1969±49[9]	1950±51[15]	1913±51[2]	0,68	0,10	0,10
$\Delta$	2,2±19,0[10]	-11,4±19,2[9]	-2,2±18,7[2]	3,6±18,7[9]	-4,5±19,0[15]	-5,8±18,9[2]	0,18	0,84	0,82
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	1998±71[9]	1977±72[13]	1991±74[4]	1976±70[6]	1976±71[19]	1965±70[2]	0,89	0,51	0,86
20 sem. pós-parto	1975±53[8]	1956±61[9]	1945±54[4]	1964±55[5]	1947±55[16]	1932±54[2]	0,48	0,62	0,99
$\Delta$	-7,7±19,1[8]	-0,3±21,9[9]	-3,0±19,2[4]	1,1±20,2[5]	-5,2±19,8[16]	1,6±19,1[2]	0,97	0,71	0,59
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	1991±67[11]	1969±71[11]	2018±70[4]	1995±68[12]	1968±66[13]	1904±67[2]	0,42	0,12	0,16
20 sem. pós-parto	1964±51[8]	1943±64[9]	1993±54[4]	1946±52[11]	1963±52[10]	1908±55[2]	0,98	0,20	0,11
$\Delta$	3,6±18,3[8]	-9,5±20,9[9]	-12,3±18,5[4]	-8,0±18,9[11]	1,9±18,7[10]	12,7±18,5[2]	0,90	0,27	0,09
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	1985±58[13]	1986±58[11]	1974±65[2]	1993±63[13]	1953±62[10]	2019±58[4]	0,28	0,97	0,21
20 sem. pós-parto	1960±58[10]	1966±50[9]	1953±53[2]	1944±55[11]	1945±55[9]	1976±55[3]	0,90	0,83	0,73
$\Delta$	3,5±17,8 <b>a</b> [10]	-10,8±18,5 <b>a,b</b> [9]	-11,8±18,1 <b>a,b</b> [2]	-11,1±18,1 <b>b</b> [11]	3,2±18,2 <b>a</b> [9]	9,8±17,5 <b>a</b> [3]	0,95	0,33	<b>0,03</b>

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).

**Tabela 15** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	DMO Total (g/cm <sup>2</sup> )						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	1,029±0,097[6]	1,054±0,093[17]	1,071±0,101[3]	1,063±0,101[3]	1,090±0,099[22]	0,998±0,098[5]	0,55	0,99	0,34
20 sem. pós-parto	1,016±0,094[6]	1,015±0,094[13]	1,091±0,100[2]	1,042±0,999[3]	1,090±0,095[19]	1,003±0,100[4]	0,83	0,92	0,25
$\Delta$	-0,002±0,012[6]	-0,007±0,014[13]	-0,005±0,013[2]	-0,014±0,012[3]	-0,007±0,013[19]	-0,006±0,012[4]	0,95	0,41	0,48
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	1,042±0,100[11]	1,040±0,093[11]	1,103±0,094[4]	1,070±0,100[11]	1,074±0,093[17]	1,069±0,096[2]	0,81	0,78	0,75
20 sem. pós-parto	1,015±0,100[10]	1,16±0,096[9]	1,052±0,096[2]	1,080±0,100[9]	1,074±0,997[15]	1,060±0,997[2]	0,98	0,26	0,87
$\Delta$	-0,002±0,013[10]	-0,005±0,012[9]	-0,019±0,013[2]	-0,004±0,012[9]	-0,010±0,012[15]	-0,007±0,013[2]	0,27	0,69	0,45
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	1,022±0,095[9]	1,071±0,090[13]	1,040±0,093[4]	1,060±0,097[6]	1,064±0,090[19]	1,162±0,093[2]	0,44	0,13	0,29
20 sem. pós-parto	0,989±0,094[8]	1,046±0,091[9]	1,020±0,095[4]	1,072±0,099[5]	1,065±0,091[16]	1,136±0,092[2]	0,60	0,05	0,43
$\Delta$	-0,008±0,013[8]	0,001±0,012[9]	-0,012±0,012[4]	0,010±0,013[5]	-0,005±0,012[16]	-0,019±0,012[2]	0,09	0,28	0,89
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	1,039±0,099[11]	1,072±0,099[11]	1,010±0,100[4]	1,080±0,093[12]	1,065±0,099[13]	1,053±0,098[2]	0,47	0,73	0,69
20 sem. pós-parto	1,029±0,095[8]	1,021±0,094[9]	0,990±0,105[4]	1,083±0,096[11]	1,071±0,100[10]	1,037±0,101[2]	0,67	0,21	0,99
$\Delta$	-0,009±0,013[8]	-0,003±0,012[9]	-0,003±0,013[4]	-0,008±0,013[11]	-0,005±0,013[10]	-0,017±0,012[2]	0,37	0,31	0,49
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	1,041±0,093[13]	1,047±0,095[11]	1,118±0,093[2]	1,082±0,091[13]	1,059±0,096[10]	1,060±0,096[4]	0,74	0,96	0,51
20 sem. pós-parto	-0,717±1,041[10]	-1,035±1,084[9]	0,062±1,077[2]	-0,045±1,044[11]	-0,159±1,063[9]	0,228±1,091[3]	0,41	0,18	0,80
$\Delta$	-0,012±0,012[10]	0,001±0,013[9]	0,000±0,012[2]	-0,005±0,013[11]	-0,009±0,012[9]	-0,009±0,012[3]	0,53	0,37	0,10

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

**Tabela 16** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	Zscore DMO Total						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	-0,55±0,98[6]	-0,40±1,01[17]	-0,20±1,07[3]	-0,15±0,99[3]	0,09±0,98[22]	-0,75±1,03[5]	0,72	0,73	0,44
20 sem. pós-parto	-0,83±1,01[6]	-0,95±1,06[13]	0,28±1,01[2]	-0,09±1,04[3]	0,13±1,02[19]	-0,88±1,03[4]	0,96	0,59	0,07
$\Delta$	-0,05±0,15[6]	-0,09±0,15[13]	-0,08±0,15[2]	-0,22±0,14[3]	-0,10±0,15[19]	-0,09±0,14[4]	0,74	0,27	0,38
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	-0,41±0,76[11]	-0,75±1,01[11]	0,39±1,01[4]	-0,19±0,76[11]	0,02±0,99[17]	-0,00±1,00[2]	0,52	0,57	0,41
20 sem. pós-parto	-0,73±1,08[10]	-0,99±1,12[9]	-0,39±1,08[2]	-0,04±1,07[9]	-0,06±1,09[15]	0,09±1,09[2]	0,79	0,12	0,90
$\Delta$	-0,03±0,14[10]	-0,10±0,14[9]	-0,26±0,14[2]	-0,08±0,13[9]	-0,13±0,14[15]	-0,17±0,14[2]	0,11	0,96	0,62
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	-0,70±1,05[9]	-0,28±1,01[13]	-0,33±1,07[4]	-0,04±1,00[6]	-0,15±1,01[19]	0,76±1,03[2]	0,58	0,09	0,49
20 sem. pós-parto	-1,07±1,04[8]	-0,66±1,11[9]	-0,48±1,06[4]	0,22±1,10[5]	-0,19±1,05[16]	0,40±1,06[2]	0,73	0,04	0,54
$\Delta$	-0,12±0,15[8]	-0,00±0,15[9]	-0,15±0,14[4]	-0,16±0,14[5]	-0,09±0,14[16]	-0,15±0,14[2]	0,13	0,42	0,79
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	-0,29±1,08[11]	-0,42±1,12[11]	-0,87±1,06[4]	0,04±1,06[12]	-0,11±1,02[13]	-0,24±1,02[2]	0,71	0,24	0,95
20 sem. pós-parto	-0,51±1,05[8]	-0,99±1,07[9]	-0,89±1,09[4]	-0,22±1,05[11]	0,19±1,09[10]	-0,18±1,07[2]	0,95	0,08	0,45
$\Delta$	-0,12±0,15[8]	-0,05±0,15[9]	-0,06±0,14[4]	-0,12±0,15[11]	-0,12±0,15[10]	0,21±0,14[2]	0,81	0,25	0,32
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	0,53±1,00[13]	-0,49±1,00[11]	0,52±1,0[2]	0,07±1,04[13]	-0,26±1,01[10]	0,04±1,03[4]	0,41	0,75	0,51
20 sem. pós-parto	-0,72±1,04[10]	-1,03±1,08[9]	0,06±1,08[2]	-0,04±1,04[11]	-0,16±1,06[9]	0,29±1,09[3]	0,41	0,18	0,80
$\Delta$	-0,15±0,14 <b>a</b> [10]	-0,02±0,14 <b>b</b> [9]	0,00±0,14 <b>a,b</b> [2]	-0,06±0,14 <b>b</b> [11]	-0,16±0,14 <b>a</b> [9]	-0,15±0,14 <b>a,b</b> [3]	0,89	0,23	<b>0,03</b>

Valores apresentados como média±DP; n nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de P obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).

Na região da coluna lombar, houve apenas uma tendência de interação entre o SNP rs731236 (TaqI) e a suplementação sobre a variação no Z score da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $P=0,06$ ). Nas nutrízes que receberam placebo, a variação observada no Z score da 5ª para a 20ª semana foi em média semelhante entre os genótipos. Por outro lado, no grupo suplementado, apenas as nutrízes com o genótipo TT apresentaram redução do Z score da 5ª para a 20ª semana pós-parto (Tabela 20).

**Tabela 17** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	CMO L1-L4 (g)						P			
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup	
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA				
	5 sem. pós-parto	46,3±8,7[6]	49,1±8,8[17]	56,6±8,6[3]	52,1±9,3[3]	54,7±8,5[22]	49,8±9,1[5]	0,65	0,62	0,22
	20 sem. pós-parto	46,4±8,1[6]	48,0±8,1[13]	49,0±8,7[2]	56,0±9,3[3]	54,6±7,8[19]	48,4±8,4[4]	0,82	0,14	0,57
	$\Delta$	0,35±1,73[6]	0,37±1,85[13]	0,94±1,74[2]	0,22±1,77[3]	0,18±1,85[19]	0,19±1,72[4]	0,94	0,62	0,94
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT				
	5 sem. pós-parto	48,3±8,8[11]	48,5±8,7[11]	54,2±8,7[4]	52,8±8,7[11]	54,1±9,1[17]	54,6±9,0[2]	0,67	0,26	0,84
	20 sem. pós-parto	47,4±8,2[10]	47,9±8,1[9]	44,1±8,4[2]	53,5±8,1[9]	54,4±8,3[15]	52,6±8,4[2]	0,82	0,04	0,97
	$\Delta$	0,50±1,77[10]	0,57±1,77[9]	-0,72±1,69[2]	-0,07±1,70[9]	0,31±1,75[15]	0,5±1,74[2]	0,81	0,86	0,63
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG				
	5 sem. pós-parto	46,9±8,9[9]	51,7±9,0[13]	47,8±8,8[4]	54,3±9,1[6]	51,6±8,6[19]	63,3±8,5[2]	0,59	0,02	0,17
	20 sem. pós-parto	46,2±8,3[8]	48,2±8,4[9]	45,7±8,4[4]	56,0±8,8[5]	52,1±7,9[16]	59,9±8,0[2]	0,77	0,01	0,38
	$\Delta$	0,38±1,77[8]	0,64±1,93[9]	-0,08±1,79[4]	-0,15±1,89[5]	0,05±1,77[16]	0,75±1,84[2]	0,94	0,89	0,73
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC				
	5 sem. pós-parto	48,2±8,5[11]	52,1±9,1[11]	45,5±9,4[4]	55,5±8,9[12]	50,7±8,8[13]	53,0±9,2[2]	0,83	0,17	0,20
	20 sem. pós-parto	44,2±7,8[8]	51,1±8,5[9]	42,4±8,9[4]	54,1±7,8[11]	52,1±7,8[10]	59,4±8,8[2]	0,68	0,007	0,11
	$\Delta$	-0,04±1,74[8]	0,74±1,73[9]	0,30±1,72[4]	-0,53±1,74[11]	0,65±1,76[10]	0,94±1,71[2]	0,20	0,98	0,79
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG				
	5 sem. pós-parto	50,7±8,6[13]	47,1±8,5[11]	52,7±8,5[2]	55,7±8,6[13]	49,8±8,6[10]	52,5±8,8[2]	0,18	0,40	0,79
	20 sem. pós-parto	47,9±8,9[10]	45,8±8,5[9]	49,3±8,1[2]	55,3±8,0[11]	50,9±8,4[9]	53,9±8,4[2]	0,51	0,07	0,88
	$\Delta$	0,52±1,68[10]	0,11±1,84[9]	0,52±1,76[2]	-0,17±1,82[11]	-0,08±1,72[9]	1,84±1,75[2]	0,43	0,84	0,52

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

**Tabela 18** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	AO L1-L4 (cm <sup>2</sup> )						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	45,9±3,6[6]	45,7±3,6[17]	49,1±3,5[3]	51,4±3,8[3]	49,0±3,5[22]	49,6±3,7[5]	0,31	0,02	0,46
20 sem. pós-parto	45,8±3,6[6]	45,8±3,5[13]	48,006±3,6[2]	52,1±3,9[3]	48,6±3,5[22]	48,5±3,6[4]	0,45	0,03	0,41
$\Delta$	0,32±1,23[6]	0,29±1,23[13]	0,76±1,23[2]	0,43±1,23[3]	0,27±1,23[19]	0,89±1,23[4]	0,65	0,88	0,99
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	46,0±3,4[11]	45,4±3,6[11]	49,0±3,5[4]	47,9±3,6[11]	50,1±3,5[17]	50,1±3,6[2]	0,34	0,04	0,31
20 sem. pós-parto	46,2±3,5[10]	46,6±3,5[9]	42,9±3,6[2]	48,5±3,6[9]	49,0±3,6[15]	49,9±3,7[2]	0,77	0,01	0,50
$\Delta$	0,18±1,23[10]	0,67±1,23[9]	-0,28±1,22[2]	0,35±1,23[9]	0,36±1,23[15]	0,74±1,22[2]	0,78	0,54	0,56
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	46,1±4,0[9]	46,8±3,8[13]	44,3±3,8[4]	50,6±3,9[6]	48,4±3,6[19]	49,5±3,6[2]	0,70	0,01	0,44
20 sem. pós-parto	47,0±3,7[8]	46,3±3,6[9]	43,6±3,5[4]	50,2±3,7[5]	47,8±3,4[16]	49,8±3,4[2]	0,40	0,008	0,41
$\Delta$	0,18±1,27[8]	0,40±1,27[9]	0,55±1,28[4]	0,43±1,28[5]	0,33±1,27[16]	0,70±1,28[2]	0,89	0,82	0,93
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	46,1±3,7[11]	46,0±4,0[11]	47,0±4,0[4]	49,2±3,9[12]	48,3±3,8[13]	52,5±3,9[2]	0,41	0,004	0,67
20 sem. pós-parto	44,6±3,5[8]	47,0±3,8[9]	46,9±3,8[4]	48,3±3,6[11]	48,0±3,7[10]	52,2±3,8[2]	0,23	0,02	0,40
$\Delta$	-0,09±1,25[8]	0,79±1,25[8]	0,22±1,25[4]	0,29±1,24[11]	0,47±1,25[10]	0,44±1,25[2]	0,64	0,76	0,98
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	46,7±3,5[13]	45,4±3,6[11]	46,2±3,5[2]	50,1±3,6[13]	47,2±3,6[10]	50,5±3,7[4]	0,12	0,01	0,66
20 sem. pós-parto	46,9±3,5[13]	44,7±3,6[9]	47,7±3,6[2]	48,5±3,6[11]	48,0±3,7[9]	50,1±3,7[3]	0,28	0,07	0,78
$\Delta$	0,60±1,26[10]	-0,01±1,27[9]	0,70±1,26[2]	0,33±1,08[11]	0,40±1,19[9]	0,56±0,96[3]	0,72	0,99	0,70

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

**Tabela 19** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	DMO L1-L4 (g/cm <sup>2</sup> )						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	1,007±0,137[6]	1,057±0,136[17]	1,164±0,137[3]	0,975±0,138[3]	1,115±0,136[22]	1,039±0,140[5]	0,19	0,50	0,22
20 sem. pós-parto	0,963±0,130[6]	1,024±1,409[13]	1,066±0,136[2]	1,036±0,140[3]	1,142±0,122[19]	1,020±0,132[4]	0,24	0,39	0,44
$\Delta$	-0,004±0,029[6]	0,000±0,029[13]	0,000±0,028[2]	-0,004±0,029[3]	0,004±0,030[19]	-0,019±0,028[4]	0,67	0,69	0,72
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	1,045±0,146[11]	1,049±0,143[11]	1,117±0,144[4]	1,091±0,142[11]	1,087±0,144[17]	1,083±0,144[2]	0,89	0,74	0,84
20 sem. pós-parto	1,008±0,136[10]	1,010±0,132[9]	0,989±0,137[2]	1,113±0,135[9]	1,120±0,132[15]	1,078±0,133[2]	0,92	0,06	0,99
$\Delta$	0,006±0,028[10]	-0,007±0,030[9]	-0,012±0,028[2]	-0,008±0,027[9]	0,004±0,027[15]	-0,009±0,028[2]	0,80	0,99	0,32
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	1,026±0,141[9]	1,072±0,141[13]	1,092±0,143[4]	1,057±0,142[6]	1,075±0,142[19]	1,255±0,141[2]	0,19	0,20	0,49
20 sem. pós-parto	0,949±0,135[8]	1,053±0,130[9]	1,032±0,127[4]	1,101±0,139[5]	1,100±0,126[16]	1,209±0,125[2]	0,34	0,01	0,43
$\Delta$	-0,007±0,030[8]	0,002±0,031[9]	0,001±0,029[4]	-0,012±0,031[5]	0,000±0,029[16]	-0,003±0,030[2]	0,64	0,76	0,98
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	1,051±0,139[11]	1,102±0,140[11]	0,955±0,143[4]	1,132±0,138[12]	1,059±0,139[13]	0,981±0,139[2]	0,2	0,67	0,32
20 sem. pós-parto	0,999±0,120[8]	1,075±0,119[9]	0,870±0,124[4]	1,111±0,122[11]	1,116±0,119[10]	1,101±0,130[2]	0,17	0,01	0,31
$\Delta$	0,001±0,028[8]	-0,006±0,027[9]	0,001±0,028[4]	-0,017±0,027[11]	0,011±0,028[10]	0,011±0,027[2]	0,41	0,76	0,15
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	1,075±0,143[13]	1,025±1,43[11]	1,142±0,143[2]	1,114±0,143[13]	1,044±0,143[10]	1,089±0,148[4]	0,28	0,97	0,79
20 sem. pós-parto	1,039±0,129[10]	0,967±0,126[9]	1,077±0,128[2]	1,124±0,127[11]	1,076±0,133[9]	1,144±0,132[3]	0,26	0,07	0,93
$\Delta$	-0,004±0,027[10]	0,002±0,031[9]	-0,009±0,028[2]	-0,006±0,029[11]	-0,008±0,028[9]	0,026±0,028[3]	0,64	0,51	0,30

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

**Tabela 20** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar (L1-L4) das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	Zscore DMO L1-L4						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	-1,44±1,03[6]	-1,10±1,03[17]	-0,33±1,03[3]	-1,31±1,04[3]	-0,59±1,03[22]	-1,17±1,05[5]	0,40	0,86	0,26
20 sem. pós-parto	-1,65±0,95[6]	-1,38±0,94[13]	-1,02±1,03[2]	-1,33±0,95[3]	-0,44±0,94[19]	-1,20±0,98[4]	0,32	0,39	0,44
$\Delta$	-0,04±0,23[6]	-0,04±0,24[13]	0,27±0,23[2]	-0,01±0,23[3]	-0,02±0,24[19]	-0,18±0,23[4]	0,91	0,55	0,58
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	-1,24±1,07[11]	-1,16±1,06[11]	-0,52±1,06[4]	-0,81±1,06[11]	-0,77±1,05[17]	-0,42±1,06[2]	0,55	0,41	0,95
20 sem. pós-parto	-1,44±1,01[10]	-1,50±1,00[9]	-1,30±0,99[2]	-0,73±0,99[9]	-0,58±0,99[15]	-0,66±0,99[2]	0,98	0,06	0,93
$\Delta$	0,02±0,24[10]	-0,08±0,23[9]	-0,08±0,23[2]	-0,11±0,23[9]	-0,01±0,23[15]	-0,08±0,22[2]	0,96	0,83	0,40
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	-1,31±1,06[9]	-0,99±1,06[13]	-0,89±1,08[4]	-0,81±1,07[6]	-0,88±1,07[19]	0,33±1,06[2]	0,34	0,12	0,51
20 sem. pós-parto	-1,63±1,00[8]	-1,31±0,99[19]	-1,21±0,99[4]	-0,93±1,00[5]	0,67±0,99[16]	-0,07±0,98[2]	0,47	0,03	0,87
$\Delta$	-0,02±0,25[8]	-0,05±0,23[9]	-0,02±0,24[4]	-0,04±0,25[5]	-0,06±0,24[16]	-0,12±0,25[2]	0,93	0,64	0,95
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	-1,15±1,10[11]	-0,74±1,06[11]	-1,92±1,08[4]	-0,57±1,00[12]	-0,88±1,05[13]	-1,18±1,06[2]	0,37	0,29	0,43
20 sem. pós-parto	-1,46±0,95[8]	-1,07±0,94[9]	-2,17±0,95[4]	-0,65±0,96[11]	-0,60±0,94[10]	-1,01±0,95[2]	0,27	0,03	0,73
$\Delta$	0,01±0,22 <b>a,b</b> [8]	-0,07±0,22 <b>a,b</b> [9]	-0,01±0,23 <b>a,b</b> [4]	-0,20±0,22 <b>b</b> [11]	0,05±0,21 <b>a</b> [10]	0,11±0,21 <b>a</b> [2]	0,31	0,86	<b>0,06</b>
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	-0,99±1,08[13]	-1,33±1,07[11]	-0,41±1,07[2]	-0,64±1,07[13]	-0,97±1,08[10]	-0,75±1,10[4]	0,43	0,74	0,78
20 sem. pós-parto	-1,17±0,97[10]	-1,78±0,95[9]	-0,92±0,96[2]	-0,64±0,96[11]	-0,90±0,96[9]	-0,14±0,96[3]	0,20	0,05	0,85
$\Delta$	-0,3±0,23[10]	-0,02±0,24[9]	-0,08±0,23[2]	-0,12±0,24[11]	-0,08±0,23[9]	0,21±0,23[3]	0,48	0,58	0,26

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).



No fêmur total, os SNPs rs1544410 (BsmI), rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) interagiram significativamente com a suplementação sobre as mudanças na AO da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $P=0,05$  e  $P=0,02$ , respectivamente) (Tabela 22). Para o SNP rs1544410 (BsmI) houve diferença significativa entre os grupos placebo e suplementado para as nutrizes com o genótipo GG, sendo as que receberam suplemento durante a gestação aquelas que apresentaram maior redução de AO da 5ª para a 20ª semana pós-parto. Para os SNPs rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb), as nutrizes com a combinação genotípica 1521GC/1012AG suplementadas com cálcio e vitamina D apresentaram maior redução na AO da 5ª para a 20ª semana pós-parto, quando comparadas a nutrizes de mesma combinação genotípica que receberam placebo ( $P=0,02$ ). Por outro lado, nas nutrizes com a combinação genotípica 1521GG/1012AA foi observado incremento na AO da 5ª para a 20ª semana pós-parto apenas naquelas que receberam suplementação de cálcio e vitamina D durante a gestação.

**Tabela 21** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	CMO Fêmur Total (g)						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	27,5±3,9[6]	28,2±3,9[17]	28,6±3,9[3]	27,5±3,9[3]	29,0±3,9[22]	25,4±4,0[5]	0,52	0,56	0,44
20 sem. pós-parto	26,0±3,9[6]	26,2±3,9[13]	27,5±3,9[2]	26,1±3,9[3]	28,5±3,8[22]	23,3±3,9[4]	0,47	0,67	0,20
$\Delta$	-0,40±0,6[6]	-0,89±0,6[13]	-0,54±0,6[2]	-1,12±0,6[3]	-0,65±0,6[19]	-0,31±0,6[4]	0,48	0,70	0,14
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	27,6±4,0[11]	27,5±4,1[11]	30,50±4,0[4]	28,3±4,0[11]	27,8±4,0[17]	31,8±3,9[2]	0,20	0,58	0,97
20 sem. pós-parto	25,9±4,1[10]	26,5±4,1[9]	26,9±4,1[2]	28,4±4,1[9]	26,6±4,1[15]	29,1±4,1[2]	0,76	0,34	0,64
$\Delta$	-0,66±0,61[10]	-0,65±0,60[9]	-1,06±0,59[2]	-0,43±0,59[9]	-0,77±0,61[15]	-0,99±0,62[2]	0,32	0,80	0,65
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	26,9±4,0[9]	28,6±3,9[13]	28,6±4,0[4]	29,3±3,8[6]	27,4±3,9[19]	31,3±3,8[2]	0,57	0,35	0,25
20 sem. pós-parto	25,4±4,0[8]	27,1±4,0[9]	26,4±4,1[4]	28,4±4,0[5]	26,3±4,0[16]	28,6±4,1[2]	0,95	0,31	0,45
$\Delta$	-0,59±0,61[8]	-0,80±0,64[9]	-0,69±0,63[4]	-0,92±0,63[5]	-0,55±0,61[16]	-0,91±0,62[2]	0,89	0,66	0,36
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	28,5±4,0[11]	27,9±4,1[11]	26,6±4,1[4]	28,7±4,1[12]	27,9±4,0[13]	26,9±4,0[2]	0,63	0,93	0,99
20 sem. pós-parto	26,4±4,0[8]	26,3±4,0[9]	26,0±4,2[4]	26,7±4,0[11]	28,1±4,1[10]	25,3±4,1[2]	0,74	0,76	0,78
$\Delta$	-0,83±0,63[8]	-0,56±0,67[9]	-0,73±0,64[4]	-0,70±0,61[11]	-0,52±0,63[10]	-1,12±0,63[2]	0,43	0,75	0,69
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	28,3±3,9[13]	27,6±3,9[11]	28,1±3,9[2]	28,7±4,0[13]	26,6±3,9[10]	30,2±4,0[4]	0,37	0,70	0,66
20 sem. pós-parto	26,8±3,9[10]	25,6±3,9[9]	26,5±3,9[2]	27,2±3,9[11]	26,0±3,9[9]	31,0±4,1[3]	0,35	0,24	0,57
$\Delta$	-0,99±0,57[10]	-0,28±0,57[9]	-1,13±0,57[2]	-0,66±0,59[11]	-0,65±0,56[9]	-0,70±0,59[3]	0,11	0,56	0,13

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

**Tabela 22** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	AO Fêmur Total (cm <sup>2</sup> )						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
	5 sem. pós-parto	26,90±1,2[6]	28,1±1,3[17]	27,3±1,3[3]	27,1±1,3[3]	27,1±1,3[5]	0,41	0,42	0,39
	20 sem. pós-parto	26,8±1,4[6]	27,6±1,4[13]	27,5±1,4[2]	27,0±1,4[3]	27,0±1,4[4]	0,76	0,52	0,77
$\Delta$	0,30±0,30 <b>a</b> [6]	-0,04±0,10 <b>b</b> [13]	0,14±0,3 <b>a,b</b> [2]	-0,21±0,30 <b>b</b> [3]	0,10±0,30 <b>a,b</b> [19]	0,39±0,30 <b>a</b> [4]	0,30	0,74	<b>0,05</b>
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
	5 sem. pós-parto	27,4±1,2[11]	28,1±1,2[11]	27,7±1,2[4]	27,5±1,2[11]	27,7±1,3[2]	0,91	0,32	0,15
	20 sem. pós-parto	27,0±1,3[10]	27,7±1,3[9]	27,7±1,3[2]	27,7±1,3[9]	26,4±1,4[2]	0,89	0,27	0,08
$\Delta$	0,01±0,35[10]	0,11±0,36[9]	0,24±0,35[2]	0,10±0,35[9]	0,10±0,36[15]	-0,05±0,36[2]	0,89	0,63	0,58
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
	5 sem. pós-parto	27,6±1,3[9]	27,6±1,2[13]	28,5±1,3[4]	27,7±1,3[6]	27,4±1,2[2]	0,38	0,23	0,59
	20 sem. pós-parto	27,6±1,3[8]	27,2±1,4[9]	27,1±1,4[4]	27,5±1,4[5]	26,5±1,4[2]	0,44	0,46	0,91
$\Delta$	0,05±0,34[8]	0,06±0,35[9]	0,15±0,34[4]	-0,11±0,34[5]	0,13±0,33[16]	0,01±0,34[2]	0,57	0,55	0,59
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
	5 sem. pós-parto	28,2±1,3[11]	27,0±1,4[11]	28,1±1,3[4]	27,4±1,2[12]	27,1±1,3[2]	0,15	0,14	0,63
	20 sem. pós-parto	27,4±1,4[8]	27,1±1,5[9]	27,7±1,4[4]	26,8±1,4[11]	27,1±1,4[2]	0,88	0,39	0,92
$\Delta$	0,02±0,33[8]	0,16±0,36[9]	0,01±0,35[4]	0,18±0,33[11]	-0,04±0,33[10]	-0,09±0,34[2]	0,70	0,71	0,28
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
	5 sem. pós-parto	27,8±1,2[13]	27,7±1,2[11]	27,0±1,2[2]	27,3±1,3[13]	27,6±1,3[4]	0,68	0,50	0,37
	20 sem. pós-parto	27,5±1,3[10]	27,3±1,3[9]	27,0±1,3[2]	26,7±1,3[11]	28,2±1,3[3]	0,68	0,96	0,29
$\Delta$	-0,52±0,30 <b>b</b> [10]	0,26±0,30 <b>c</b> [9]	-0,10±0,30 <b>a,b,c</b> [2]	0,22±0,30 <b>a,c</b> [11]	-0,04±0,30 <b>b</b> [9]	-0,17±0,31 <b>a,b</b> [3]	0,31	0,79	<b>0,02</b>

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).

**Tabela 23** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	DMO Fêmur Total (g/cm <sup>2</sup> )						P			
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup	
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA				
	5 sem. pós-parto	1,025±0,137[6]	0,997±0,140[17]	1,038±0,148[2]	1,019±0,138[3]	1,071±0,136[22]	0,922±0,143[5]	0,68	0,74	0,23
	20 sem. pós-parto	0,973±0,139[6]	0,932±0,144[13]	1,040±0,141[2]	0,987±0,142[3]	1,055±0,139[19]	0,881±0,142[4]	0,88	0,90	0,10
$\Delta$	-0,028±0,017[6]	-0,033±0,018[13]	-0,023±0,018[2]	-0,039±0,017[3]	-0,024±0,017[19]	-0,018±0,018[4]	0,47	0,87	0,42	
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT				
	5 sem. pós-parto	0,999±0,143[11]	0,990±0,143[11]	1,078±0,142[4]	1,036±0,143[11]	1,041±0,144[17]	1,075±0,146[2]	0,66	0,57	0,93
	20 sem. pós-parto	0,959±0,152[10]	0,944±0,153[9]	0,969±0,151[2]	1,023±0,150[9]	1,015±0,151[15]	1,053±0,151[2]	0,92	0,23	0,99
$\Delta$	-0,026±0,019[10]	-0,032±0,018[9]	-0,053±0,017[2]	-0,019±0,018[9]	-0,028±0,019[15]	-0,034±0,017[2]	0,07	0,15	0,71	
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG				
	5 sem. pós-parto	0,983±0,141[9]	1,030±0,139[13]	1,000±0,142[4]	1,057±0,140[6]	1,021±0,139[19]	1,116±0,141[2]	0,87	0,24	0,48
	20 sem. pós-parto	0,917±0,144[8]	0,976±0,144[9]	0,985±0,146[4]	1,037±0,145[5]	1,002±0,145[16]	1,067±0,147[2]	0,80	0,17	0,65
$\Delta$	-0,027±0,019[8]	-0,033±0,019[9]	-0,030±0,018[4]	0,033±0,019[5]	-0,021±0,019[16]	-0,034±0,018[2]	0,84	0,97	0,31	
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC				
	5 sem. pós-parto	1,006±0,147[11]	1,023±0,149[11]	0,978±0,145[4]	1,035±0,140[12]	1,043±0,141[13]	0,995±0,141[2]	0,80	0,65	0,99
	20 sem. pós-parto	0,975±0,144[8]	0,938±0,145[9]	0,951±0,149[4]	0,998±0,144[11]	1,049±0,145[10]	0,955±0,145[2]	0,86	0,39	0,58
$\Delta$	-0,032±0,017[8]	-0,031±0,018[9]	-0,027±0,018[4]	-0,031±0,0116[11]	-0,015±0,018[10]	-0,044±0,017[2]	0,22	0,97	0,13	
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG				
	5 sem. pós-parto	1,013±0,139[13]	0,994±0,139[11]	1,062±0,138[2]	1,049±0,138[13]	0,998±0,140[10]	1,091±0,143[4]	0,45	0,64	0,93
	20 sem. pós-parto	0,966±0,142[10]	0,932±0,144[9]	0,996±0,143[2]	1,022±0,143[11]	0,980±0,143[10]	1,108±0,149[3]	0,42	0,19	0,91
$\Delta$	-0,032±0,019[10]	-0,026±0,019[9]	-0,038±0,018[2]	-0,030±0,019[11]	-0,023±0,018[9]	-0,014±0,018[3]	0,61	0,19	0,52	

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

**Tabela 24** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	Zscore DMO Fêmur Total						P			
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup	
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA	0,72	0,77	0,25	
	5 sem. pós-parto	0,11±1,08[6]	-0,15±1,10[17]	0,17±1,17[3]	0,03±1,09[3]	0,43±1,08[22]				-0,68±1,12[5]
	20 sem. pós-parto	-0,31±0,13[6]	-0,70±1,14[13]	0,22±1,13[2]	-0,20±1,14[3]	0,26±1,12[19]				-0,99±1,14[4]
	$\Delta$	-0,23±0,18[6]	-0,27±0,18[13]	-0,12±0,18[2]	-0,30±0,18[3]	-0,25±0,18[19]				-0,16±0,18[4]
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT	0,60	0,55	0,94	
	5 sem. pós-parto	-0,15±1,12[11]	-0,18±1,11[11]	0,52±1,12[4]	0,15±1,11[11]	0,21±1,11[17]				0,53±1,13[2]
	20 sem. pós-parto	-0,49±1,20[10]	-0,55±1,20[9]	-0,29±1,20[2]	0,03±1,20[9]	-0,04±1,19[15]				0,34±1,20[2]
	$\Delta$	-0,21±0,18[10]	-0,24±0,17[9]	-0,35±0,17[2]	-0,15±0,17[9]	-0,28±0,18[15]				-0,32±0,17[2]
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG	0,26	0,84	0,55	
	5 sem. pós-parto	-0,20±1,10[9]	0,70±1,09[13]	-0,06±1,11[4]	0,35±1,09[6]	0,03±1,09[19]				0,77±1,11[2]
	20 sem. pós-parto	-0,74±1,14[8]	-0,41±1,14[9]	-0,15±1,16[4]	0,19±1,15[5]	-0,14±1,15[16]				0,18±1,16[2]
	$\Delta$	-0,18±0,18[8]	-0,27±0,18[9]	0,25±0,18[4]	-0,27±0,18[5]	-0,20±0,17[16]				-0,47±0,17[2]
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC	0,86	0,68	0,99	
	5 sem. pós-parto	-0,03±1,15[11]	0,01±1,16[11]	-0,24±1,13[4]	0,15±1,10[12]	0,22±1,10[13]				-0,15±1,11
	20 sem. pós-parto	-0,28±1,13[8]	-0,69±1,13[9]	-0,48±1,17[4]	-0,22±1,13[11]	0,26±1,14[10]				-0,47±1,14
	$\Delta$	-0,24±0,18[8]	-0,24±0,17[9]	-0,23±0,17[4]	-0,32±0,17[11]	-0,12±0,18[10]				-0,34±0,17
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG	0,40	0,66	0,95	
	5 sem. pós-parto	-0,01±1,08[13]	-0,18±1,09[11]	0,43±1,08[2]	0,24±1,08[13]	-0,13±1,09[10]				0,62±1,11
	20 sem. pós-parto	-0,38±1,12[10]	-0,71±1,13[9]	-0,11±1,12[2]	-0,04±1,12[11]	-0,26±1,13[9]				0,73±1,17
	$\Delta$	-0,25±0,19[10]	-0,20±0,19[9]	-0,27±0,18[2]	-0,33±0,19[11]	-0,18±0,18[9]				-0,13±0,18

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

No colo do fêmur, os SNPs rs1544410 (BsmI), rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) interagiram com a suplementação sobre o CMO (Tabela 25). Para o SNP rs1544410 (BsmI), nutrízes com genótipo GA suplementadas apresentaram maior CMO ( $P=0,05$ ) na 20ª semana pós-parto, quando comparadas a nutrízes com o mesmo genótipo que receberam placebo. Considerando os SNPs rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb), somente houve diferença significativa entre os grupos placebo e suplementado para as nutrízes com a combinação genotípica 1521CC/1012GG, sendo aquelas que receberam suplemento as que apresentaram menor perda no CMO da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $P=0,008$ ) (Tabela 25). Também foi observada interação entre o SNP rs10735810 (FokI) e a suplementação sobre a AO do colo do fêmur. Nutrízes com genótipo CT que receberam suplemento apresentaram um decréscimo na AO da 5ª para a 20ª semana pós-parto, enquanto as a nutrízes de mesmo genótipo que receberam placebo apresentaram um incremento nesta medida óssea ( $P=0,03$ ) (Tabela 26). A DMO do colo do fêmur foi influenciada pela interação entre os SNPs rs7139166 (1521pb) e rs4516035 (1012pb) e a suplementação. Nutrízes suplementadas com as combinações genotípicas 1521GG/1012AA e 1521CC/1012GG tiveram menor perda de DMO da 5ª para a 20ª semana pós-parto, quando comparadas a nutrízes de mesma combinação genotípica que receberam placebo ( $P=0,008$ ) (Tabela 27).

**Tabela 25** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o conteúdo mineral ósseo (CMO) do colo do fêmur das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	CMO Colo do Fêmur (g)						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	4,4±0,5[6]	4,4±0,5[17]	4,7±0,5[3]	4,5±0,5[3]	4,5±0,5[22]	4,0±0,5[5]	0,45	0,81	0,10
20 sem. pós-parto	4,1±0,4 <b>a,b</b> [6]	4,0±0,5 <b>a</b> [13]	4,4±0,4 <b>2a,b</b> [2]	4,1±0,5 <b>a,b</b> [3]	4,4±0,4 <b>b</b> [19]	3,7±0,5 <b>a</b> [4]	0,69	0,55	<b>0,05</b>
$\Delta$	-0,15±1,2[6]	-0,18±1,1[13]	-0,26±0,11[2]	-0,19±0,11[3]	-0,12±1,1[19]	-0,17±0,11[4]	0,44	0,40	0,50
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	4,4±0,5[11]	4,3±0,5[11]	4,8±0,5[4]	4,4±0,5[11]	4,4±0,5[17]	5,0±0,5[2]	0,10	0,56	0,82
20 sem. pós-parto	4,1±0,5[10]	4,0±0,5[9]	4,2±0,5[2]	4,3±0,5[9]	4,3±0,5[15]	4,3±0,5[2]	0,89	0,42	0,95
$\Delta$	-0,18±0,10[10]	-0,16±0,11[9]	-0,26±0,10[2]	-0,07±0,11[9]	-0,17±0,10[15]	-0,19±0,10[2]	0,16	0,19	0,14
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	4,2±0,5[9]	4,5±0,4[13]	4,5±0,5[4]	4,8±0,5[6]	4,3±0,5[19]	4,8±0,5[2]	0,47	0,27	0,12
20 sem. pós-parto	4,1±0,5[8]	4,0±0,5[9]	4,3±0,4[4]	4,5±0,5[5]	4,2±0,5[16]	4,2±0,5[2]	0,65	0,37	0,57
$\Delta$	-0,17±0,11[8]	-0,22±0,12[9]	-0,14±0,11[4]	-0,10±0,11[5]	-0,11±0,11[16]	-0,25±0,11[2]	0,55	0,56	0,15
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	4,5±0,5[11]	4,4±0,5[11]	4,1±0,6[4]	4,4±0,5[12]	4,4±0,5[13]	4,4±0,5[2]	0,78	0,60	0,83
20 sem. pós-parto	4,2±0,4[8]	3,9±0,5[9]	4,2±0,5[4]	4,2±0,4[11]	4,3±0,5[10]	4,1±0,5[2]	0,83	0,65	0,30
$\Delta$	-0,16±0,10[8]	-0,19±0,12[9]	-0,20±0,11[4]	-0,14±0,11[11]	-0,08±0,11[10]	-0,25±0,11[2]	0,23	0,47	0,25
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	4,5±0,5[13]	4,2±0,5[11]	4,6±0,5[2]	4,5±0,5[13]	4,2±0,5[10]	4,7±0,5[4]	0,12	0,88	0,97
20 sem. pós-parto	4,2±0,4[10]	3,9±0,4[9]	4,2±0,4[2]	4,3±0,4[11]	4,1±0,4[9]	4,9±0,5[3]	0,07	0,09	0,39
$\Delta$	-0,23±0,10 <b>c</b> [10]	-0,09±0,10 <b>a,b</b> [9]	-0,28±0,10 <b>c,d</b> [2]	-0,15±0,10 <b>a,c</b> [11]	-0,13±0,10 <b>a,b,d</b> [9]	-0,02±0,10 <b>b</b> [3]	0,05	0,01	<b>0,008</b>

Valores apresentados como média±DP; n nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de P obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).

**Tabela 26** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a área óssea (AO) do colo do fêmur das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	AO Colo do Fêmur (cm <sup>2</sup> )						<i>P</i>		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	4,1±0,2[6]	4,3±0,2[17]	4,2±0,2[3]	4,3±0,2[3]	4,2±0,2[22]	4,1±0,2[5]	0,85	0,93	0,45
20 sem. pós-parto	4,2±0,2[6]	4,2±0,2[13]	4,1±0,2[2]	4,2±0,2[3]	4,2±0,2[19]	4,1±0,2[4]	0,80	0,93	0,99
$\Delta$	0,03±0,7[6]	0,01±0,11[13]	0,3±0,07[2]	-0,55±0,07[3]	0,01±0,07[19]	0,02±0,7[4]	0,64	0,27	0,27
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	4,1±0,2[11]	4,3±0,2[11]	4,3±0,2[4]	4,1±0,2[11]	4,2±0,2[17]	4,2±0,2[2]	0,07	0,68	0,78
20 sem. pós-parto	4,1±0,2[10]	4,3±0,2[9]	4,3±0,2[4]	4,2±0,2[9]	4,2±0,2[15]	4,0±0,2[2]	0,44	0,24	0,18
$\Delta$	-0,01±0,06 <b>a,b</b> [10]	0,04±0,06 <b>a</b> [9]	0,01±0,6 <b>a,b</b> [2]	0,04±0,06 <b>a</b> [9]	-0,01±0,06 <b>b</b> [15]	-0,03±0,06 <b>a,b</b> [2]	0,78	0,52	<b>0,03</b>
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	4,3±0,2[9]	4,1±0,2[13]	4,4±0,3[4]	4,2±0,2[6]	4,2±0,2[19]	4,3±0,3[2]	0,14	0,53	0,59
20 sem. pós-parto	4,3±0,2[8]	4,1±0,3[9]	4,3±0,2[4]	4,2±0,2[5]	4,2±0,2[16]	4,1±0,2[2]	0,71	0,56	0,58
$\Delta$	0,02±0,06[8]	-0,01±0,07[9]	0,04±0,07[4]	-0,02±0,07[5]	0,01±0,07[16]	-0,02±0,06[2]	0,93	0,36	0,26
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	4,2±0,2[11]	4,2±0,3[11]	4,3±0,3[4]	4,2±0,2[12]	4,2±0,2[13]	4,3±0,2[2]	0,7	0,6	0,93
20 sem. pós-parto	4,2±0,2[8]	4,1±0,3[9]	4,3±0,2[4]	4,2±0,2[11]	4,2±0,2[10]	4,1±0,2[2]	0,93	0,48	0,6
$\Delta$	0,04±0,06[8]	-0,03±0,07[9]	0,02±0,06[4]	0,04±0,06[11]	-0,02±0,06[10]	-0,06±0,06[2]	0,01	0,26	0,26
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	4,3±0,2[13]	4,2±0,2[11]	4,1±0,2[2]	4,1±0,2[13]	4,2±0,2[10]	4,2±0,2[4]	0,86	0,80	0,36
20 sem. pós-parto	4,3±0,2[10]	4,2±0,2[9]	4,1±0,2[2]	4,1±0,2[11]	4,2±0,2[9]	4,3±0,2[3]	0,98	0,63	0,15
$\Delta$	0,00±0,06[10]	0,05±0,07[9]	-0,04±0,06[2]	0,01±0,07[11]	-0,01±0,07[9]	0,00±0,07[3]	0,48	0,850	0,19

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).



**Tabela 27** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre a densidade mineral óssea (DMO) do colo do fêmur das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	DMO Colo do Fêmur (g/cm <sup>2</sup> )						P			
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup	
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA				
	5 sem. pós-parto	1,053±0,125[6]	1,020±0,128[17]	1,125±0,137[3]	1,040±0,126[3]	1,079±0,127[22]	0,977±0,130[5]	0,99	0,45	0,14
	20 sem. pós-parto	0,990±0,125[6]	0,962±0,126[13]	1,061±0,126[2]	0,990±0,126[3]	1,049±0,122[19]	0,896±0,124[4]	0,87	0,60	0,10
$\Delta$	-0,042±0,019[6]	-0,044±0,018[13]	-0,078±0,020[2]	-0,047±0,021[3]	-0,030±0,017[19]	-0,036±0,020[4]	0,09	0,03	0,15	
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT				
	5 sem. pós-parto	1,055±0,129[11]	1,004±0,129[11]	1,096±0,128[4]	1,069±0,129[11]	1,048±0,128[17]	1,088±0,131[2]	0,45	0,71	0,88
	20 sem. pós-parto	1,004±0,130[10]	0,956±0,129[9]	0,978±0,130[2]	1,025±0,135[9]	1,005±0,128[15]	1,082±0,131[2]	0,63	0,26	0,84
$\Delta$	-0,044±0,022[10]	-0,047±0,021[9]	-0,062±0,021[2]	-0,028±0,021[9]	-0,036±0,019[15]	-0,031±0,021[2]	0,61	0,02	0,66	
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG				
	5 sem. pós-parto	1,006±0,130[9]	1,070±0,128[13]	1,031±0,131[4]	1,108±0,129[6]	1,033±0,129[19]	1,088±0,130[2]	0,98	0,38	0,24
	20 sem. pós-parto	0,943±0,131[8]	1,007±0,129[9]	0,998±0,131[4]	1,061±0,133[5]	1,003±0,130[16]	1,020±0,132[2]	0,36	0,99	0,44
$\Delta$	-0,041±0,021[8]	-0,050±0,021[9]	-0,046±0,021[4]	-0,029±0,021[5]	-0,029±0,021[16]	-0,050±0,021[2]	0,52	0,21	0,46	
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC				
	5 sem. pós-parto	1,049±0,138[11]	1,045±0,139[11]	1,008±0,136[4]	1,053±0,132[12]	1,061±0,132[13]	1,023±0,132[2]	0,84	0,8	0,98
	20 sem. pós-parto	0,994±0,132[8]	0,974±0,133[9]	0,966±0,138[4]	1,003±0,132[11]	1,043±0,139[10]	0,974±0,132[2]	0,85	0,55	0,78
$\Delta$	-0,050±0,019[8]	-0,041±0,019[9]	-0,053±0,019[4]	-0,040±0,019[11]	-0,016±0,020[10]	-0,050±0,019[2]	0,01	0,08	0,38	
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG				
	5 sem. pós-parto	1,055±0,126[13]	1,004±0,126[11]	1,148±0,125[2]	1,072±0,125[13]	1,009±0,127[10]	1,113±0,130[4]	0,10	0,92	0,91
	20 sem. pós-parto	0,994±0,126[10]	0,950±0,131[9]	1,038±0,129[2]	1,023±0,128[11]	0,979±0,129[9]	1,119±0,134[3]	0,23	0,34	0,92
$\Delta$	-0,054±0,019 <b>b</b> [10]	-0,032±0,021 <b>a,c</b> [9]	-0,071±0,018 <b>b</b> [2]	-0,037±0,019 <b>a</b> [11]	-0,032±0,018 <b>a</b> [9]	-0,007±0,019 <b>c</b> [3]	0,14	0,01	<b>0,008</b>	

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os subgrupos (pós-teste LSD).

**Tabela 28** - Interação entre a suplementação e os polimorfismos estudados sobre o Z score da densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total das adolescentes estudadas na 5ª semana, na 20ª semana e na variação da 5ª para a 20ª semana pós-parto ( $\Delta$ )

SNP	Zscore DMO Colo do Fêmur						P		
	Placebo			Ca + Vit. D			Gen	Sup	GenXSup
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA	GG	GA	AA			
5 sem. pós-parto	0,39±0,98[6]	0,08±1,01[17]	0,86±1,07[3]	0,28±0,99[3]	0,55±0,98[22]	-0,16±1,02[5]	0,99	0,52	0,18
20 sem. pós-parto	-0,10±0,99[6]	-0,36±0,99[13]	0,42±1,00[2]	-0,08±1,00[3]	0,28±0,98[19]	-0,77±0,99[4]	0,96	0,63	0,15
$\Delta$	-0,35±0,19[6]	-0,30±0,19[13]	-0,50±0,18[2]	-0,27±0,18[3]	-0,26±0,19[19]	-0,35±0,19[4]	0,27	0,22	0,79
rs10735810 (FokI)	CC	CT	TT	CC	CT	TT			
5 sem. pós-parto	0,31±1,01[11]	-0,00±1,00[11]	0,71±1,00[4]	0,46±1,01[11]	0,34±1,00[17]	0,63±1,02[2]	0,52	0,70	0,89
20 sem. pós-parto	-0,07±1,02[10]	-0,35±1,03[9]	-0,16±1,02[2]	0,10±1,06[9]	-0,04±1,02[15]	0,68±1,04[2]	0,65	0,28	0,84
$\Delta$	-0,32±0,18[10]	-0,32±0,18[9]	-0,45±0,18[2]	-0,19±0,18[9]	-0,34±0,18[15]	-0,20±0,18[2]	0,39	0,10	0,25
rs7975232 (ApaI)	TT	TG	GG	TT	TG	GG			
5 sem. pós-parto	0,05±1,02[9]	0,41±1,00[13]	0,22±1,03[4]	0,80±1,01[6]	0,20±1,01[19]	0,62±1,02[2]	0,92	0,4	0,32
20 sem. pós-parto	-0,44±1,03[8]	-0,08±1,02[9]	0,01±1,03[4]	0,45±1,05[5]	-0,07±1,02[16]	-0,03±1,04[2]	0,97	0,47	0,48
$\Delta$	-0,32±0,18[8]	-0,34±0,18[9]	-0,32±0,18[4]	-0,18±0,18[5]	-0,25±0,18[16]	-0,55±0,18[2]	0,15	0,94	0,14
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC	TT	TC	CC			
5 sem. pós-parto	0,36±1,07[11]	0,21±1,08[11]	0,07±1,06[4]	0,35±1,02[12]	0,41±1,03[13]	0,16±1,03[2]	0,90	0,80	0,94
20 sem. pós-parto	0,35±0,91[8]	0,21±0,98[9]	0,07±1,06[4]	0,35±0,98[11]	0,41±0,90[10]	0,16±1,03[2]	0,90	0,79	0,94
$\Delta$	-0,35±0,16[8]	-0,28±0,16[9]	-0,42±0,16[4]	-0,37±0,16[11]	-0,12±0,16[10]	-0,35±0,16[2]	0,01	0,25	0,26
rs7139166/ rs4516035 (1521pb/1012pb)	GG/AA	GC/AG	CC/GG	GG/AA	GC/AG	CC/GG			
5 sem. pós-parto	0,38±0,98[13]	-0,05±0,98[11]	1,08±0,97[2]	0,48±0,97[13]	0,04±0,99[10]	0,82±1,01[4]	0,95	0,10	0,92
20 sem. pós-parto	-0,08±0,99[10]	-0,48±1,03[9]	0,29±1,01[2]	0,05±1,00[11]	-0,19±1,01[9]	0,84±1,05[3]	0,24	0,40	0,91
$\Delta$	-0,38±0,17[10]	-0,25±0,17[9]	-0,45±0,17[2]	-0,34±0,17[11]	-0,22±0,17[9]	-0,08±0,18[3]	0,08	0,02	0,12

Valores apresentados como média±DP; *n* nos colchetes;  $\Delta$ = variação na medida óssea da 5 a 20 semana pós-parto. Valores de *P* obtidos por ANCOVA, usando co-variáveis significativas tal como descrito por Diogenes, et al. 2013.

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho buscamos estudar alguns dos principais fatores capazes de influenciar a mineralização óssea durante adolescência, considerada um período crítico para aquisição óssea. Partimos do conhecimento prévio da existência de perda óssea durante a lactação em adolescentes (assim como observado em mulheres adultas), possivelmente agravado pela baixa ingestão de cálcio e/ou o estado nutricional de vitamina D insuficiente. Buscamos acrescentar conhecimento no que diz respeito à possível contribuição de fatores genéticos neste contexto. Para tanto, estudamos alguns polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR), que tem sido amplamente estudado pelo seu potencial papel no metabolismo ósseo.

A ingestão dietética de cálcio e vitamina D na gestação das adolescentes estudadas representou, em média, apenas 47% e 6%, respectivamente, da ingestão dietética recomendada para nutrizes adolescentes (1300mg/dia e 600UI, respectivamente; IOM, 2011). Estes resultados eram esperados, considerando a elevada prevalência de inadequação na ingestão dietética de cálcio e vitamina D previamente descrita em meninas brasileiras durante a adolescência (MARTINI et al., 2013; PETERS et al., 2009) e durante a gestação e lactação (BEZERRA et al., 2002; BEZERRA et al., 2004; DIOGENES et al., 2013). Para o grupo suplementado, o aporte adicional de cálcio e de vitamina D fornecido resultou em uma ingestão diária total de cerca de 1100 mg de cálcio e de cerca de 230 UI de vitamina D.

No início do estudo, por volta da metade da gestação, 43% das adolescentes apresentaram concentrações séricas de 25(OH)D inferiores a 50 nmol/L, indicando insuficiência em vitamina D (HOLICK et al., 2011). A elevada prevalência de insuficiência em vitamina D durante a gestação tem sido observada (BRANON, PICCIANO, 2011; HALILOGLU et al., 2011), especialmente em adolescentes (YOUNG et al., 2012; DAVIS et al., 2010, DIOGENES et al., 2013). Aparentemente a insuficiência de vitamina D está associada à maior reabsorção óssea durante a gestação (HALILOGLU et al., 2011), embora a relação entre o estado materno em vitamina D e a massa óssea durante a gestação ainda seja pouco compreendida (BRANNON, PICCIANO, 2011).

O gene do receptor de vitamina D (VDR) tem sido extensivamente estudado por seu potencial papel no metabolismo ósseo, e diversos estudos tem observado associações entre polimorfismos neste gene e a massa óssea (XU et al., 2010; MITCHELL, YERGES-ARMSTRONG, 2011). Neste trabalho observamos a influência de polimorfismos no gene do

VDR sobre as adaptações ósseas da lactação em mães adolescentes, suplementadas ou não com cálcio e vitamina D.

Os primeiros estudos avaliando os polimorfismos no gene do VDR reconhecidos pelas enzimas ApaI, BsmI, TaqI e FokI convencionaram que, ao invés do uso do genótipo em si demonstrando a troca de um nucleotídeo, a presença do sítio de restrição para cada enzima seria representada pela letra minúscula inicial da enzima, enquanto a ausência seria representada por letra maiúscula (VAN DER LUIS et al., 2003). No nosso estudo os polimorfismos foram identificados utilizando genotipagem que representa a troca de um nucleotídeo, a partir das informações de bancos de dados genômicos (Esemble e dbSNP). Para fins de comparação dos nossos resultados com os dados da literatura, fizemos a conversão dos genótipos identificados de acordo com reconhecimento dos sítios de restrição tal como descrito a seguir:

- 1) rs7975232 (T>G, enzima ApaI): TT = AA, TG = Aa, GG = aa;
- 2) rs1544410 (G>A, enzima BsmI): GG = BB, GA = Bb, AA = bb;
- 3) rs10735810 (C>T, enzima FokI): CC = FF, CT = Ff, TT = ff;
- 4) rs731236 (T>C, enzima TaqI): TT = TT TC = Tt CC = tt .

No nosso estudo, os genótipos heterozigotos foram os mais freqüentes para os SNPs reconhecidos pelas enzimas de restrição ApaI (TG, 60%), BsmI (GA, 69%), TaqI (TC, 45%) e FokI (TC, 50%), enquanto para os polimorfismos 1521pb e 1012pb, os homozigotos GG (49%) e AA (49%) foram, respectivamente, os genótipos mais freqüentes. Nossos achados se assemelharam à freqüência global descrita em bancos genômicos (“ALL”, Esemble; Hapmap) e, em especial, às freqüências observadas em populações norte-americana e/ou européias. A freqüência dos genótipos estudados seguiu o equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para o SNP determinado pela enzima BsmI, o que pode ter sido observado em consequência do tamanho amostral (WANG, SHETE, 2012; BOSCO et al., 2012). A distribuição dos genótipos não diferiu entre os grupos placebo e suplementado com cálcio e vitamina D.

Os genótipos determinados pelos SNPs rs7139166 (G>C, 1521pb) e rs4516035 (A>G, 1012pb) se apresentaram em completo desequilíbrio de ligação ( $P < 0,0001$ ), e foi observada a formação das combinações genóticas 1521GG/1012AA, 1521GC/1012AG e 1521CC/1012GG. Em concordância com os nossos achados, Lin e colaboradores (2012)

também encontraram completo desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos 1521pb e 1012pb em mulheres asiáticas, assim como outros trabalhos também observaram a formação de combinações genóticas entre os genótipos determinados por esses polimorfismos (D'ALÉSIO et al., 2005; LIN et al., 2012). Os genótipos determinados pelos polimorfismos rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI) e rs731236 (TaqI) também se apresentaram em desequilíbrio de ligação, o que já foi observado em outros estudos (LEVIN et al., 2012; FANG et al., 2005; NEJENTSEV et al., 2004).

Poucos estudos têm observado associação entre polimorfismos no gene do VDR e os níveis circulantes de IGF-1 (D'ALÉSIO et al., 2005; BEZERRA et al., 2008). D'Alésio e colaboradores (2005) encontraram associação entre as concentrações de IGF-1 e os SNPs 1521pb e 1012pb, onde adolescentes francesas com os haplótipos 1521CC/1012GG apresentaram menores níveis circulantes deste hormônio. O IGF-1 é um regulador ósseo (DAVIES, EVANS, GREGORY, 2005) com implicações no *turnover* ósseo e no balanço de cálcio do tecido ósseo não só durante a adolescência (LIBANITI et al., 1999), como também durante a gestação e lactação (KALKWARF et al., 2006; O'BRIEN et al., 2006). Bezerra e colaboradores (2008) observaram em nutrízes adolescentes que as mães com o genótipo CC (*tt*) para o SNP determinado pela enzima TaqI apresentaram maiores concentrações de IGF-1, quando comparadas às nutrízes com os genótipos TT (*TT*) e TC (*Tt*). Diferentemente desses achados, no nosso estudo, nenhuma associação entre os polimorfismos estudados e as concentrações séricas de IGF-1 na 5<sup>a</sup> e na 20<sup>a</sup> semana pós-parto foram observadas.

As concentrações séricas de prolactina nas nutrízes estudadas sofreram influência do SNP determinado pela enzima TaqI. Ainda que em nossas análises o nível de significância tenha sido marginal ( $P=0,05$ ), na 5<sup>a</sup> semana pós-parto, nutrízes com o genótipo TT (*TT*) apresentaram maiores concentrações séricas de prolactina quando comparadas a nutrízes com genótipo CC (*tt*), e esta diferença tendeu a permanecer na 20<sup>a</sup> semana pós-parto. Nossos resultados sugerem um potencial papel do SNP reconhecido pela TaqI no gene do VDR sobre a síntese e/ou secreção de prolactina. De fato, já foi observado que a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , via ligação com o seu receptor VDR, parece regular a expressão gênica da prolactina em células hipofisárias (DENG et al., 2009).

Os SNPs 1521pb e 1012pb já foram associados às concentrações séricas de  $25(\text{OH})\text{D}$  (D'ALÉSIO et al., 2005; JEHAN et al., 2010; LIN et al., 2011). D'Alésio e colaboradores (2005) observaram que adolescentes francesas com a combinação genotípica 1521CC/1012GG

apresentaram as menores concentrações séricas de 25(OH)D. De forma semelhante, Jehan e colaboradores (2010) também em estudo com adolescentes observaram que aquelas que tinham o genótipo GG para o SNP 1012pb apresentaram menores concentrações de 25(OH)D, quando comparadas às adolescentes de genótipo AG. No nosso estudo, não foi observada influência de SNPs sobre as concentrações séricas de 25(OH)D nas nutrizes na 5ª e na 20ª semana pós-parto, assim como não foram observadas interações significativas entre a suplementação e os SNPs estudados sobre as concentrações séricas de 25(OH)D nos mesmos períodos. No entanto, observamos uma interação entre a suplementação e os SNPs 1521pb e 1012pb sobre as mudanças nas concentrações de 25(OH)D da 26ª semana gestacional para a 5ª semana pós-parto. Apenas nas nutrizes adolescentes com a combinação genotípica 1521GG/1012AA, aquelas suplementadas durante a gestação apresentaram maior incremento nas concentrações de 25(OH)D da 26ª semana gestacional para a 5ª semana pós-parto em relação às nutrizes de mesma combinação genotípica que receberam placebo. Em estudo prévio nesta mesma amostra, Diogenes e colaboradores (2013) observaram que nutrizes suplementadas com cálcio e vitamina D durante a gestação apresentaram maiores concentrações séricas de 25(OH)D na lactação quando comparadas ao grupo que recebeu placebo. Esses resultados em conjunto, sugerem um possível papel modulador do VDR sobre as respostas à suplementação com cálcio e vitamina D, e que as adolescentes brasileiras com a combinação genotípica 1521GG/1012AA parecem ser mais responsivas a uma suplementação com vitamina D durante a gestação. Há evidências de que as respostas aos estoques corporais de 25(OH)D podem ser moduladas por variações genéticas no gene do VDR. Por exemplo, uma determinada variante genética pode resultar em maior afinidade do VDR para a 1,25(OH)<sub>2</sub>D ou maior atividade do VDR, o que poderia conferir uma proteção do organismo frente a situações de baixa concentração sérica de 25(OH)D [indicando pouca oferta do substrato 25(OH)D] (LEVIN et al, 2012). Por outro lado, outras variantes genéticas do VDR podem necessitar de maior oferta de 25(OH)D.

Diversos estudos observaram influência do SNP reconhecido pela enzima ApaI sobre a massa óssea em diferentes populações (BELL et al., 2001; LORENTZON et al., 2001; BEZERA et al., 2008). No presente estudo, nutrizes adolescentes com o genótipo GG (*aa*) tenderam a apresentar menor perda de DMO total da 5ª para a 20ª semana pós-parto quando comparadas a nutrizes de genótipo TG (*Aa*). Consistente com os nossos achados, Bezerra e colaboradores (2008) observaram que nutrizes adolescentes brasileiras com o genótipo GG (*aa*) apresentaram maior DMO da coluna lombar.

Para o SNP determinado pela enzima TaqI, o genótipo TT (*TT*) parece estar associado a melhor estado ósseo em diferentes populações (MCDONALD et al., 2006; ARABI et al., 2009). Em um estudo, realizado com mulheres na pré e pós-menopausa, aquelas com o genótipo TT (*TT*) apresentaram maior DMO na região lombar (MCDONALD et al., 2006). Consistente com esses achados, Arabi e colaboradores (2009), observaram que as adolescentes libanesas com o genótipo TT (*TT*) apresentaram maior CMO total e da coluna lombar, e também maior DMO total e do antebraço quando comparadas as adolescentes com o genótipo CC (*tt*). Em contraste, nossos resultados da avaliação das alterações da massa óssea das adolescentes durante a lactação sugerem que a perda óssea característica desse período é menos acentuada nas mães com genótipo TC (*Tt*) em comparação às mães com genótipo TT (*TT*). Apesar da maior perda de AO no colo do fêmur da 5ª para a 20ª semana pós-parto nas nutrizes com genótipo TC (*Tt*), essas nutrizes apresentaram menor decréscimo tanto na DMO quanto no Z score da DMO do colo do fêmur neste período avaliado.

O SNP reconhecido pela FokI influencia o tamanho e a atividade da proteína VDR (ZMUDA, CAULEY, FERELL, 2000; FANG et al., 2005) de forma que indivíduos com o alelo C sintetizam uma proteína VDR três aminoácidos menor e mais ativa (ZMUDA, CAULEY, FERELL, 2000). No nosso estudo, observamos que as nutrizes com o genótipo CC (*FF*) apresentaram menor redução do CMO total da 5ª para a 20ª semana pós-parto, em comparação a nutrizes de genótipo CT (*Ff*), consistente com uma relativa vantagem desse genótipo CC (*FF*) em termos de preservação da massa óssea durante a lactação. De fato, o genótipo CC (*FF*) tem sido associado à maior massa óssea em diferentes populações (ABRAMS et al., 2005; FLACHETTI et al., 2006; BO et al., 2011), incluindo adolescentes (ABRAMS et al., 2005).

O SNP reconhecido pela enzima de restrição BsmI tem sido associado a medidas de DMO, no entanto os estudos apresentam resultados controversos ao apontar qual seria o genótipo mais benéfico (MCDONALD et al., 2006; ARABI et al., 2009; JIA et al., 2013; SANWALKA et al., 2013). Em recente meta-análise, Jia e colaboradores (2013) observaram em mulheres na pós-menopausa, associação do genótipo AA (*bb*) com o menor risco de osteoporose. Por outro lado, em adolescentes indianas, o genótipo GG (*BB*) foi associado a maior CMO, AO e DMO total em relação aos demais genótipos (SANWALKA et al., 2013). No nosso estudo, não foi observado efeito isolado desse SNP sobre os indicadores ósseos das nutrizes adolescentes estudadas. A possível razão para os resultados controversos, é que a

relação entre polimorfismos genéticos e a massa óssea pode variar ao longo da vida (WOOD, FLEET, 1998). Além disso, esse polimorfismo está localizado em região intrônica, e possíveis associações com a massa óssea pode ocorrer em razão de um desequilíbrio de ligação com outras variantes funcionais no gene do VDR (FANG et al, 2005; NEJENTSEV et al, 2004)

Polimorfismos em regiões promotoras do gene também podem influenciar a expressão gênica, através de alterações na ligação do fator de transcrição, e conseqüentemente provocar mudanças na atividade de transcrição de mRNA (D'ALÉSIO et al., 2005; FANG et al., 2005; JEHAN et al., 2007). Poucos estudos associaram os SNPs 1521pb e 1012pb da região promotora do gene VDR as medidas ósseas. D'Alésio e colaboradores (2005) observaram que adolescentes francesas com a combinação genotípica 1521GG/1012AA tenderam a ter uma maturação óssea mais avançada e maior DMO total. Em concordância com esses achados, no nosso estudo, as nutrizes que apresentaram a combinação genotípica 1521GG/1012AA foram mais capazes de preservar a DMO de colo do fêmur da 5<sup>a</sup> para a 20<sup>a</sup> semana pós-parto, sugerindo que os SNPs 1521pb e 1012pb da região promotora do gene VDR parecem modular as mudanças na massa óssea em resposta a lactação.

Em estudo anterior, Diogenes e colaboradores (2013) demonstraram que as mães adolescentes que fazem parte do presente estudo que receberam suplementação com cálcio associado à vitamina D (600 mg/d+200UI) durante o último trimestre de gestação tiveram menores perdas ósseas na lactação, especialmente na coluna lombar, durante as primeiras 20 semanas após o parto. Além da investigação do efeito isolado dos polimorfismos no gene do VDR, no presente trabalho também buscamos investigar a possível interação desses polimorfismos com a suplementação com cálcio e vitamina D sobre a massa óssea de nutrizes adolescentes.

Na região da coluna lombar, os polimorfismos estudados não influenciaram as respostas ósseas observadas por Diogenes e colaboradores (2013). Observamos apenas uma tendência de interação entre o SNP reconhecido pela TaqI e a suplementação realizada, que consistiu na menor perda óssea nesta região em nutrizes suplementadas com o genótipo TC (*Tt*) quando comparada à perda óssea de nutrizes suplementadas com o genótipo TT (*TT*). Dessa forma, nossos resultados sugerem que o efeito da suplementação com cálcio e vitamina D durante a gestação, sobre a perda óssea na coluna lombar durante a lactação independe dos polimorfismos estudados no gene VDR. No entanto, nossos resultados apontam para um



possível efeito modulador de alguns dos polimorfismos estudados sobre as respostas ósseas frente à suplementação realizada em outros sítios ósseos estudados.

Abordagens semelhantes de investigação da interação entre polimorfismos e ingestão habitual de nutrientes ou respostas à intervenções nutricionais sobre a massa óssea já foram realizadas anteriormente. Em relação ao SNP reconhecido pela enzima FokI, já foi observado que adolescentes americanos com o genótipo CC (*FF*) apresentaram maior DMO total quando comparados a aqueles com o genótipo TT (*ff*) apenas quando a ingestão dietética de cálcio era maior que 800 mg/dia (ABRAMS et al., 2005). BO e colaboradores (2011) também observaram associação do genótipo CC (*FF*) com a suplementação de cálcio sobre as medidas ósseas. Nutrizes chinesas com o genótipo CC (*FF*), e suplementadas durante a lactação com 600 mg/dia de cálcio durante um ano apresentaram ao final da intervenção maior DMO coluna lombar em comparação ao genótipo TT (*ff*), e melhor recuperação óssea quando comparadas a nutrizes de mesmo genótipo que receberam placebo. No presente estudo também observamos uma interação entre a suplementação e o SNP reconhecido pela FokI, sendo o genótipo CC (*FF*) mais responsivo à suplementação para a área óssea do colo do fêmur, em comparação ao genótipo CT (*Ff*).

Bezerra e colaboradores (2008) não observaram efeito isolado do SNP reconhecido pela enzima BsmI sobre os indicadores ósseos em nutrizes adolescentes brasileiras. No entanto, no presente trabalho observamos interação desse polimorfismo com a suplementação com cálcio e vitamina D. Nutrizes com o genótipo GA (*Bb*) que receberam suplemento apresentaram maior CMO total e maior CMO do colo do fêmur na 20ª semana pós-parto quando comparadas a aquelas de mesmo genótipo que receberam placebo.

Os SNPs que mais apresentaram efeito modulador sobre a suplementação realizada foram àqueles localizados na região promotora do gene do VDR. Estudando o SNP 1012pb em adolescentes europeias, Esterle e colaboradores (2009) observaram que os genótipos AG e GG foram associados a menores CMO, DMO e Z score da coluna lombar naquelas com ingestão média de cálcio de 800 mg/dia, em comparação a adolescentes de mesmo genótipo com maior ingestão dietética de cálcio (~1100mg/dia). Além disso, nas adolescentes com o genótipo AA, os autores não observaram influência da ingestão de cálcio sobre o CMO e DMO da coluna lombar. No presente estudo, também observamos uma associação entre os SNPs localizados na região promotora do gene VDR e a suplementação de forma a influenciar conjuntamente a massa óssea. Nutrizes suplementadas com a combinação genotípica

1521GG/1012AA tiveram maior redução de AO total e menor redução de Z score da DMO total da 5<sup>a</sup> para a 20<sup>a</sup> semana pós-parto, quando comparadas às nutrízes suplementadas com outras combinações genotípicas, bem como quando comparadas a nutrízes de mesma combinação genotípica que receberam placebo. Além disso, nutrízes suplementadas com a combinação genotípica 1521GG/1012AA apresentaram incremento na AO do fêmur total e menor decréscimo da DMO no colo do fêmur, em comparação a nutrízes de mesma combinação genotípica que receberam placebo. O fato da combinação genotípica 1521GG/1012AA suplementada ter apresentado maior redução de área óssea total tanto em relação as demais combinações genotípicas suplementadas quanto em relação a mesma combinação genotípica que recebeu placebo, sugere uma parada da expansão óssea consistente com o efeito da gestação e da lactação na adolescência. No entanto, para as nutrízes que apresentam essa combinação genotípica a redução na área óssea não foi observada nos sítios ósseos críticos avaliados (exemplo, coluna lombar e fêmur). Além disso, para essas nutrízes a suplementação parece ter sido capaz de preservar a mineralização óssea no colo do fêmur, considerado um sítio ósseo de grande mobilização em períodos de elevada demanda de cálcio pelo organismo.

Consistente com um possível papel do PTH na regulação desse fenômeno, na 5<sup>a</sup> semana pós-parto as concentrações séricas de PTH nas nutrízes de combinação genotípica 1521GG/1012AA que receberam suplemento tenderam a ser maiores do que nas nutrízes de mesma combinação genotípica que receberam placebo, sendo esta diferença significativa na 20<sup>a</sup> semana pós-parto. É possível que as maiores concentrações de PTH nessas nutrízes tenham resultado em maior estímulo à mobilização óssea com conseqüente perda óssea total (tal como sugerido pelos dados de redução da área óssea total) que, no entanto, não foi observada nos sítios ósseos críticos avaliados.

Já foi observado que o SNP 1012pb está localizado em uma região de ligação do fator de transcrição GATA, e que indivíduos com o alelo G apresentaram menor ligação deste fator de transcrição ao DNA e conseqüentemente menor atividade de transcrição dessa região promotora do gene VDR (FANG et al., 2005). Por outro lado, indivíduos com o alelo A apresentaram maior atividade de transcrição do promotor do gene VDR em cultura de células (D'ALÉSIO et al., 2005). No nosso estudo, as nutrízes com o genótipo 1012AA apresentaram menor perda óssea da 5<sup>a</sup> a 20<sup>a</sup> semana pós-parto, especialmente quando suplementadas com cálcio e vitamina D. Embora os mecanismos envolvidos nesta associação não estejam claros,

é possível que as nutrizes com esta combinação genotípica, tenham apresentado uma maior expressão da proteína VDR e em consequência, maior modulação do metabolismo ósseo em favor da preservação de massa óssea materna, particularmente frente a maior oferta de cálcio e vitamina D.

Nosso estudo demonstrou que polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (rs10735810, FokI e rs731236, TaqI), especialmente os localizados na região promotora deste gene (rs7139166, 1521pb; e rs4516035, 1012pb) influenciaram as perdas ósseas durante as 20 primeiras semanas de lactação em mães adolescentes brasileiras. Os genótipos CC (FokI) e TC (TaqI) parecem conferir uma relativa vantagem em termos de preservação de massa óssea no esqueleto total, sobretudo no colo do fêmur durante a lactação. Além disso, os polimorfismos 1521pb e 1012pb interagiram com a suplementação de cálcio e vitamina D durante a gestação, modificando as respostas ósseas nas primeiras 20 semanas pós-parto. As nutrizes com a combinação genotípica 1521GG/1012AA apresentaram menor decréscimo do Z score da DMO total e da DMO no colo do fêmur, e maior incremento da AO no fêmur total da 5ª para a 20ª semana pós-parto. Essas nutrizes (1521GG/1012AA) foram também as que apresentaram aumento nas concentrações de 25OHD da 26ª semana de gestação para a 5ª semana pós-parto em resposta a suplementação com vitamina D durante a gestação.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que polimorfismos no gene do VDR, especialmente aqueles localizados na região promotora do gene, podem influenciar tanto a massa óssea durante a lactação quanto as respostas ósseas maternas frente a uma suplementação com cálcio e vitamina D durante a gestação em adolescentes. A combinação genotípica 1521GG/1012AA parece ser a mais responsiva à suplementação com cálcio e vitamina D nas condições realizadas. Para as nutrizes com esta combinação genotípica, a suplementação parece ter contribuído para minimizar a perda óssea materna durante a lactação. Outros estudos são necessários para esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na modulação das respostas ósseas durante a lactação pelos polimorfismos no gene do receptor de vitamina D, em adolescentes suplementadas ou não com cálcio e vitamina D durante a gestação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARABI, A. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms modulate the skeletal response to vitamin D supplementation in healthy girls. **Bone**, v.45, n.6, p.1091-1097, 2009.
- ABRAMS, S.A. et al. Vitamin D Receptor *FokI* Polymorphisms Affect Calcium Absorption, Kinetics, and Bone Mineralization Rates During Puberty. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.20, n.6, 2005.
- BEZERRA F.F. et al. Pregnancy and Lactation Affect Markers of Calcium and Bone Metabolism Differently in Adolescent and Adult Women with Low Calcium Intakes. **Journal of Nutrition**, v.132, p.2183-2187, 2002.
- BEZERRA F.F. et al. Bone mass is recovered from lactation to postweaning in adolescent mother with low calcium intakes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.1322-1326, 2004.
- BEZERRA, F.F., DONANGELO, C.M. Pregnancy and lactation in adolescence: possible implications for calcium metabolism and bone mass. **Current Nutrition & Food Science**, v.1, n.3, p.265-275, 2005.
- BEZERRA, F.F., DONANGELO, C.M. Calcium homeostasis and bone mass during pregnancy and lactation in adult and adolescent women. **Perinatología y Reproducción Humana**, v.21, n.4, p.201-209, 2007.
- BEZERRA, F.F. et al. Bone mass and breast milk calcium concentration are associated with vitamin D receptor gene polymorphisms in adolescent mothers. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.277-281, 2008.
- BRANNON P.M.; PICCIANO M.F. Vitamin D in Pregnancy and Lactation in Humans. **The Annual Review of Nutrition**, v.31, p.89-115, 2011.
- CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v.3, p.S131-139, 2008.
- CUSACK, C.; CASHMAN, K.D. Impact of genetic variation on metabolic response of bone to diet. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.901-912, 2003.
- D'ALÉSIO, A. et al. Two single-nucleotide polymorphisms in the human vitamin D receptor promoter change protein-DNA complex formation and are associated with height and vitamin D status in adolescent girls. **Human Molecular Genetics**, v.14, n.22, 2005.
- DAVIES, J.H.; EVANS, B.A.; GREGORY, J.W. Bone mass acquisition in healthy children. *Archives of Disease in Childhood*, v.90, p.373-378, 2005.
- DAVIS L.M. et al. Vitamin D Insufficiency Is Prevalent among Pregnant African American Adolescents. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v.23, n.45-52, 2010.
- DENG, et al. Prolactin Blocks Nuclear Translocation of VDR by Regulating Its Interaction with BRCA1 in Osteosarcoma Cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.23, n.2, p.226-236, 2009.
- DIOGENES, M.E.L. et al. Vitamin D receptor gene *FokI* polymorphisms influence bone mass in adolescent football (soccer) players. *European Journal of Applied Physiology*, v.108, p.31-38, 2010.

DIOGENES, M.E.L. et al. Effect of calcium plus vitamin D supplementation during pregnancy in Brazilian adolescent mothers: a randomized, placebo-controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.98, p.82-91, 2013.

DOWTHWAITE, J.N., SCERPELLA, T.A. Distal radius geometry and skeletal strength indices after peripubertal artistic gymnastics. **Osteoporosis International**, v.22, n.1, 2011.

ECCLESHALL, T.R. et al. The Vitamin D Receptor Gene Start Codon Polymorphism: A Functional Analysis of *FokI* Variants. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.13, n.11, 1998.

EL-HAJJ, G. et al. Effect of Vitamin D Replacement on Musculoskeletal Parameters in School Children: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, n.2, p.405-412, 2006.

ESTERLE, L. et al. Higher Milk Requirements for Bone Mineral Accrual in Adolescent Girls Bearing Specific Caucasian Genotypes in the VDR Promoter. **Journal of bone and mineral research**, v.24, n.8, 2009.

Falchetti, A. et al. *FokI* polymorphism of the vitamin D receptor gene correlates with parameters of bone mass and turnover in a female population of the Italian island of Lampedusa. **Calcified tissue international**, v.80, n.1, p.15-20, 2006.

FANG, Y. et al. Promoter and 3'-Untranslated-Region Haplotypes in the Vitamin D Receptor Gene Predispose to Osteoporotic Fracture: The Rotterdam Study. **The American Journal of Human Genetics**, v.77, p.807-823, 2005.

GIROUX, S. et al. High-density polymorphisms analysis of 23 candidate genes for association with bone mineral density. **Bone**, v. 47, p.975-981, 2010.

HERNÁNDEZ-GIL, et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Histology and physiology of bone tissue**, v.11, E47-E51.

HEANEY R.P.; *Biologia óssea na saúde e na doença: Guia Didático*. In: *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*. Capítulo 83 pp 1417- 1429. 9ª ed. Editado por: Maurice E. Shills; James A Olson; Moshe Shike; A Catarine Ross. 2003.

HOLICK, M.F. et al. Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.96, n.7, p.1911-1930, 2011.

HALILOGLU, B. et al. Bone turnover and maternal 25(OH)vitamin D<sub>3</sub> levels during pregnancy and the postpartum period: should routine vitamin D supplementation be increased in pregnant women? **The European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.158, n.1, p.24-27, 2011.

HUNCHAREK, M., MUSCAT, J., KUPELNICK, B. Impact of dairy products and dietary calcium on bone-mineral content in children: Results of a meta-analysis. *Bone*, v.43, n.2, p.312-321, 2008.

IOM (Institute of Medicine). **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

JACKOWSKI, S.A. et al. Effect of maturational timing on bone mineral content accrual from childhood to adulthood: Evidence from 15 years of longitudinal data. **Bone**, v.48, p.1178-1185, 2011.

JARJOU, L.M.A. et al. Effect of calcium supplementation in pregnancy on maternal bone outcomes in women with a low calcium intake. . **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 92, p.450-457, 2010.

JEHAN, F., D'ALÉSIO, A., GARABÉDIAN, M. Exons and functional regions of the human vitamin D receptor gene around and within the main 1a promoter are well conserved among mammals. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.103, p.361-367, 2007.

KALKWARF, H.J. et al. The effect of calcium supplementation on bone density during lactation and after weaning. **The New England Journal of Medicine**, v.337, n.8, p.523-528, 1997.

KONTULAINEN, H.M. et al. Change in Cortical Bone Density and Its Distribution Differs between Boys and Girls during Puberty. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, n.7, p.2555-2561, 2006.

KOVACS C.S.; KRONENBERG H.M. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. **Endocrine Reviews**, v.18, n.6, p.832-872, 1997.

LAAKSONEN, M.M. et al. Vitamin D receptor gene start codon polymorphism (FokI) is associated with forearm bone mineral density and calcaneal ultrasound in Finnish adolescent boys but not in girls. **Journal of bone and mineral metabolism**, v.22, n.5, p.479-485, 2004.

LASKEY M.A. et al. Bone changes after 3mo of lactation: influence of calcium intake, breast-milk output, and vitamin D-receptor genotype. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, p.685-692, 1998.

LEEMING, D.J. et al. An update on biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.62, p.781-792, 2006.

LEVIN, G.P. et al. Genetic Variants and Associations of 25-Hydroxyvitamin D Concentrations With Major Clinical Outcomes. **JAMA**, v.308, n.18, p.1898-1905, 2012.

LIBANATI C. et al. Studies on the potential mediators of skeletal changes occurring during puberty in girls. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, p.2807-1814, 1999.

MACKELVIE, K.J. et al. A school-based exercise intervention augments bone mineral accrual in early pubertal girls. *The Journal of Pediatrics*, v.139, n.4, p.501-508, 2001.

MACDONALD, H.M. et al. Large-Scale Population-Based Study Shows No Evidence of Association Between Common Polymorphism of the VDR Gene and BMD in British Women. **Journal of bone and mineral metabolism**, v.21, p.151-162, 2006.

MARTINI, L.A. et al. Prevalence and correlates of calcium and vitamin D status adequacy in adolescents, adults, and elderly from the Health Survey-São Paulo. **Nutrition**, v.29, n.6, p.845-850, 2013.

MATKOVIC, V. Nutrition, genetics and skeletal development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.15, p.556-569, 1996.

MITCHELL, B.D.; YERGES-ARMSTRONG, L.M. The Genetics of bone loss: challenges and prospects. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v.96, n.5, p.1258-1268, 2011.

Morrison, N.A. et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**, v.367, p.284-287, 1994.

- MOURATIDOU, T. et al. Associations of Dietary Calcium, Vitamin D, Milk Intakes, and 25-Hydroxyvitamin D with Bone Mass in Spanish Adolescents: The HELENA Study. **Journal of Clinical Densitometry: Assessment of Skeletal Health**, v. 16, n. 1, p.110-117, 2013.
- NEJENTSEV, S. et al. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. **Human Molecular Genetics**, v.13, n.15, p.1633–1639, 2004.
- O'BRIEN K.O. et al. Calcium absorption is significantly higher in adolescents during pregnancy than in the early postpartum period. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.1188-93, 2003.
- O'BRIEN, K.O. et al. Bone calcium turnover during pregnancy and lactation in women with low calcium diets is associated with calcium intake and circulating insulin-like growth factor 1 concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.317-323, 2006.
- OLAUSSON H. et al. Prentice A. Calcium economy in human pregnancy and lactation. **Nutrition Research Reviews**, v.25, p. 40-67, 2012.
- PARFITT A.M. et al Structural and Cellular Changes During Bone Growth in Healthy Children. **Bone**, v.27, p.487– 494; 2000.
- PETERS B.S.E. et al. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.54, p.15–21, 2009.
- PRENTICE, A. et al. Nutrition and bone development. *Proceedings of The Nutrition Society*, v.65, n.4, p.348-360, 2007.
- RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v.45, n.8B, p.1353-1358, 1999.
- 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**, v.67, p.693-701, 1998.
- RIZZOLI, R. et al. Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. **Bone**, v.46, p.294–305, 2010.
- SAGGESE, G.; BARONCELLI, G.I.; BERTELLONI, S. Puberty and bone development. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.16, n.1, p. 53-64, 2002.
- SANWALKA, N. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mass indices in post-menarchal Indian adolescent girls. **Journal of bone and mineral metabolism**, n.31, p.108-115, 2013.
- TIZAOU, K. et al. Contribution of VDR polymorphisms to type 1 diabetes susceptibility: Systematic review of case–control studies and meta-analysis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.143, p.240-249, 2014.
- UITTERLINDEN, A.G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v.338, p.143-156, 2004.
- United States Department of Agriculture (USDA). National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list>.

- VAN DER SLUIS I.M. et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism Predicts Height and Bone Size, Rather Than Bone Density in Children and Young Adults. **Calcified Tissue International**, v.73, p.332–338, 2003.
- VALDIVIELSO, J.M.; FERNADÉZ, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. **Clinica Chimica Acta**, v.371, p.1-12, 2006.
- VANTAPARAST, H. et al. Calcium requirements for bone growth in Canadian boys and girls during adolescence. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p.575–580, 2009.
- WARD, K.A. et al. Postpartum bone status in teenage mothers assessed using peripheral quantitative computed tomography. **Journal of Clinical Densitometry: Assessment of Skeletal Health**, v. 12, n.2, p. 219-223, 2009.
- WEAVER, C.M. et al. Calcium retention estimated from indicators of skeletal status in adolescent girls and young women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, p.67-70, 1996.
- WELCH, J.M.; WEAVER, C.M. Calcium and exercise affect the growing skeleton. **Nutrition Reviews**, v.66, n.11, p.361-373, 2008.
- WHITFIELD G.K. et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.177, p.145–159, 2001.
- WHITING S.J. et al. Factors that Affect Bone Mineral Accrual in the Adolescent Growth Spurt. **Journal of Nutrition**, v.134, p.696S–700S, 2004.
- WINZENBERG, T. et al. Effects of calcium supplementation on bone density in healthy children: meta-analysis of randomized controlled trials. **BMJ**, 2006.
- WOOD R.J.; FLEET J.C. The Genetics of Osteoporosis: Vitamin D Receptor Polymorphisms. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.18, p.233-258, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Adolescent Health and Development, 2009. Disponível em: <[http://www.searo.who.int/en/Section13/Section1245\\_4980.htm](http://www.searo.who.int/en/Section13/Section1245_4980.htm)>, acessado em: 06 de junho de 2012.
- XU, X.H. et al. Molecular Genetic Studies of Gene Identification for Osteoporosis: The 2009 Update. **Endocrine Reviews**, v.31, n.4, p.447–505, 2010.
- YILMAZ, D. et al. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers, and growth parameters. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.23, p.476-482, 2005.
- Zapata C.L.V. et al. Calcium homeostasis during pregnancy and lactation in Brazilian women with low calcium intakes: a longitudinal study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.417-422, 2004.
- ZMUDA J.M.; CAULEY J.A.; FERRELL R.E. Molecular Epidemiology of Vitamin D Receptor Gene Variants. **Epidemiological Reviews**, v.22, p.203-217, 2000.



**APÊNDICE A - Consentimento Livre e Esclarecido****CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Este termo de consentimento refere-se à participação como voluntária no projeto de pesquisa “*Suplementação com cálcio durante a gestação de mães adolescentes: efeitos sobre a massa óssea, metabolismo de cálcio e do tecido ósseo*”.

O objetivo do projeto é estudar como a suplementação com cálcio e vitamina D durante a gestação em mães adolescentes poderia beneficiar a saúde óssea da mãe e do bebê e a composição do leite materno.

Este estudo está sendo realizado pela Nutricionista Maria Eduarda Leão Diogenes Melo sob a orientação da Dr<sup>a</sup>. Carmen Marino Donangelo, Professora da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da Dr<sup>a</sup>. Flávia Fioruci Bezerra, Professora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Participando deste estudo, você será solicitada a utilizar diariamente um suplemento de cálcio com vitamina D, ou placebo (amido de milho e celulose), durante 12 semanas, que lhe será fornecido gratuitamente; fazer três coletas de sangue e urina após jejum noturno; fornecer uma pequena quantidade de leite; e fazer dois exames de densitometria óssea e um no seu filho. Sua participação neste estudo não coloca em nenhum risco a sua saúde e nem a do seu filho. Como participante do estudo você receberá uma avaliação nutricional, os resultados das análises de laboratório, e exames gratuitos de densitometria óssea. A densitometria óssea é um exame simples, indolor, que ajuda a prevenir a osteoporose.

A participação neste estudo não é obrigatória e não contempla qualquer remuneração. Você pode desistir da participação no projeto a qualquer momento, sem qualquer constrangimento.

Os pesquisadores declaram que os resultados desta pesquisa não serão usados com fins comerciais e colocam-se a disposição para maiores esclarecimentos nos seguintes telefones: 2562-7352 (trabalho), 2549-6354 (residência), 7697-9428 (celular). Você poderá também entrar em contato com a Maternidade Escola-UFRJ pelo telefone 2285-7935 Ramal 261.

Declaro, para os devidos fins, que li e entendi o texto acima e concordo em participar, por livre e espontânea vontade, como voluntária deste projeto de pesquisa.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura da Voluntária: \_\_\_\_\_

Assinatura do Representante Legal: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B - Questionário Inicial**Contato 1 - Questionário inicial

Estudo de avaliação da massa óssea em gestantes adolescentes

**1. Identificação**

Amostra: \_\_\_\_\_ n° do prontuário: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade gestacional: \_\_\_\_\_ semanas

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Tel: \_\_\_\_\_ Tel para contato: \_\_\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

**Data provável do parto:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_**2. Triagem:**

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ (ano/meses)

Menarca: \_\_\_\_\_ (ano/meses)

Uso atual e/ou habitual de suplementos:  não  sim

Qual? \_\_\_\_\_ Há qto tempo? \_\_\_\_\_ Qtd: \_\_\_\_\_

Horário: \_\_\_\_\_

Uso atual de antiácidos:  não  sim

Qual? \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_ Quantidade: \_\_\_\_\_ Horário: \_\_\_\_\_

Primípara:  não  simPretende amamentar?  não  sim**3. Atual - Dados sobre a gestação:**Gestação planejada?  não  simIntercorrências até o presente momento?  não  anemia  hipertensão  náuseas edema  sangramentos  outros \_\_\_\_\_

Número e periodicidade de consultas pré-natal até o presente momento? \_\_\_\_\_

**3. Dados demográficos:**Cor:  branca  pardo  negroEstado civil:  casada  solteiraProfissão: \_\_\_\_\_ Está estudando: não  sim  Escolaridade: \_\_\_\_\_ Período (M/T/N): \_\_\_\_\_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

Saneamento básico:  não  sim

Casa:  própria  alugada

#### 4. Dados comportamentais:

Início de relações sexuais: \_\_\_\_\_ anos

Usou contraceptivos 1 ano antes da gestação?  não  sim

Qual?  Hormonal     barreira     camisinha     natural

Tabagismo:  não  sim      Quantidade diária: \_\_\_\_\_

Pratica alguma atividade física regular:  não  sim

Qual? \_\_\_\_\_      Frequência por semana \_\_\_\_\_      Horas por dia \_\_\_\_\_

Faz algum serviço doméstico:  não  sim

Qual? \_\_\_\_\_      Frequência por semana \_\_\_\_\_      Horas por dia \_\_\_\_\_

Tem o hábito de usar filtro solar?  não  sim

Qual? \_\_\_\_\_      Frequência por semana: \_\_\_\_\_      Passa quantas vezes ao dia? \_\_\_\_\_

Tem o hábito de tomar sol? :  não  sim

Frequência por semana \_\_\_\_\_      Horas por dia \_\_\_\_\_      Horário: \_\_\_\_\_

Quantas horas você dedica ao lazer (assistir TV, ouvir música, conversar com os amigos): \_\_\_\_

#### 5. História Clínica

**5.1 Familiar:** Casos de osteoporose na família? \_\_\_\_\_ Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

#### 5.2 Patológica Pgressa

DST (sífilis, HPV, gonorréia, herpes)     HIV       Hepatite (A) (B) (C)

Fratura óssea \_\_\_\_\_       Dç Parasitárias       Diabetes Tipo (I) (II)

Anemia       Alcoolismo       Drogas

**Data recomendada para o início da suplementação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Número de comprimidos colocados no pote:** \_\_\_\_\_

**Nome do bebê:** \_\_\_\_\_

**APÊNDICE C - Evolução Pós-Parto**Evolução do pós-parto

Estudo de avaliação da massa óssea em gestantes adolescentes

Amostra: \_\_\_\_\_ Código Suplemento: \_\_\_\_\_ nº do prontuário: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Contato 5 – Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**1. Informações sobre o parto (dados obtidos na caderneta de saúde da criança).**

Data do parto: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Parto:  normal  cesárea Indicação: \_\_\_\_\_ Idade gestacional: \_\_\_\_\_Nome do bebê: \_\_\_\_\_ Sexo:  Fem.  Masc.

Peso ao nascer: \_\_\_\_\_ g Comprimento: \_\_\_\_\_ cm Relação P/IG: \_\_\_\_\_

Perímetro cefálico: \_\_\_\_\_ cm Perímetro torácico: \_\_\_\_\_ cm

Índice de Apgar: \_\_\_/\_\_\_ (1° min/ 5° min)  PIG  AIG  GIG

Complicações durante o parto: \_\_\_\_\_

Data da alta hospitalar: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Peso do bebê na alta hospitalar: \_\_\_\_\_

**2. Informações sobre a mãe e o bebê (dados coletados no dia do 1° DXA).**

Peso da mãe pós-parto: \_\_\_\_\_ Kg ; Altura: \_\_\_\_\_ Ganho total de peso na gestação: \_\_\_\_\_ Kg

Peso do bebê: \_\_\_\_\_ (  aferido ou  estimado); Altura do bebê: \_\_\_\_\_Uso atual contraceptivos:  não  simQual:  Hormonal  barreira  camisinha  natural**Data de início do uso:** \_\_\_\_\_Até ao presente momento já teve algum sangramento ou retorno da menstruação:  não  sim**Data :** \_\_\_\_\_

Análise da coloração da pele da mãe:

- Constitutiva → L : \_\_\_\_\_ A: \_\_\_\_\_ B: \_\_\_\_\_

- Bronzeamento → L : \_\_\_\_\_ A: \_\_\_\_\_ B: \_\_\_\_\_

### 3. Práticas de amamentação

Aleitamento Materno:  Exclusivo  Predominante  Complementar  Não recebe leite materno

→ Alimentos fornecidos ao lactente:

Água  Suco de fruta  Chá  Outros

Data de início do aleitamento: \_\_\_\_\_ OBS:

Frequência/ Quantidade: \_\_\_\_\_

