



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição  
Doutorado em Ciências Nutricionais

**Associação entre vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico na gestação  
e desfechos neonatais: resultados de uma coorte brasileira**

**Camila Benaim Rodriguez**

Rio de Janeiro | Fevereiro de 2020



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição  
Doutorado em Ciências Nutricionais

**Associação entre vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico na gestação  
e desfechos neonatais: resultados de uma coorte brasileira**

**Camila Benaim Rodriguez**

Tese apresentado à banca examinadora para obtenção do título de doutor em Ciências Nutricionais do Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**Orientador:** Professor Dr. Gilberto Kac

Rio de Janeiro | Fevereiro de 2020

Rodriguez, Camila Benaim

Associação entre vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico na gestação e desfechos neonatais: resultados de uma coorte brasileira/Camila Benaim Rodriguez – Rio de Janeiro, 2020.

179f.:I1

Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Nutrição Josué de Castro. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Rio de Janeiro, 2020.

Orientador: Gilberto Kac

1. Gestação. 2. Metabolismo glicídico. 3 Vitamina D. 4. Estudos de coorte. 5. Peso ao nascer. 6. Prematuridade. - Teses. I. Kac, Gilberto. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro. III. Associação entre vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico na gestação e desfechos neonatais: resultados de uma coorte brasileira.

Gestação; Metabolismo glicídico; Vitamina D; Estudos de coorte; Peso ao nascer; Prematuridade.

**Associação entre vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico na gestação  
e desfechos neonatais: resultados de uma coorte brasileira**

**Camila Benaim Rodriguez**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais.

Aprovada por:

---

**Professora Dra. Márcia Regina Simas Torres Klein**  
Departamento de Nutrição Aplicada/Instituto de Nutrição  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro  
**Examinador**

---

**Professora Dra. Claudia Leite de Moraes**  
Departamento de Epidemiologia/Instituto de Medicina Social  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro  
**Examinador**

---

**Professor Dr. Antonio José Leal Costa**  
Departamento de Medicina Preventiva/ Instituto de Estudos em Saúde Coletiva  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
**Examinador**

---

**Professora Dra. Patrícia de Carvalho Padilha**  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
**Examinador**

---

**Professora Dra. Maria Beatriz Trindade de Castro**  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
**Revisor e Examinador**

---

**Professor Dr. Gilberto Kac**  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
**Orientador**

## **Dedicatória**

Dedico essa tese de doutorado à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã que sempre estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando.

## Agradecimentos

Agradecer sempre é um momento de reflexão. Durante essa fase da minha vida, muitas pessoas participaram da caminhada comigo, alguns presentes no meu dia a dia, outros à distância, torcendo no coração.

Obrigada Deus, que mesmo em momentos onde me perguntei se realmente existia, certamente não me abandonou. Há quem não acredite, mas sua presença é algo que se sente de uma forma inexplicável, que dá forças quando nada mais parece que vai te salvar.

A minha família, desde sempre me apoiando nas minhas decisões, aguentando minhas reclamações. Meus pais, Victor e Cláudia, obrigada por todo o suporte material e emocional, sei que não é fácil aguentar as crises, os questionamentos, as patadas gratuitas nos momentos onde meu estresse está num nível hard. Obrigada também por não me expulsarem de casa por eu já ter quase 30 e nem me cobrar em já andar com as minhas próprias pernas. Minha irmã e melhor amiga, Talita, os melhores conselhos sempre, o meu apoio incondicional, a sinceridade necessária e minha bússola, você sabe o quanto me sinto abençoada por ter você ao meu lado e, aquela que me deu o melhor presente da vida, meu sobrinho e afilhado Mateus. Esse garoto é minha luzinha, é meu alívio em todos os momentos, amor que transcende, não tem como não ficar feliz na presença dele, é o beijo e o abraço mais doce, mais puro, é vida. Ao meu cunhado, Márcio, sempre me incentiva a buscar opções, a não desistir da minha profissão, e a investir meu dinheiro! Afinal... a gente não sabe o dia de amanhã.

Aos meus amigos, não tenho uma lista gigante porque prefiro os poucos e bons. Tem a galera da Ilha, que agora já está se espalhando pelo mundo, mas são sempre casa, conforto e o que me faz lembrar de tantas fases da minha vida, desde a infância até os casamentos, são minha raiz. Meus amigos do observatório, convivemos mais que com nossas famílias, e assim, se tornam família também, especialmente a galera do submundo, digo, subsolo. Essa é uma galera cheia de atitude, com princípios genuínos! Poderia escrever sobre cada um, mas ocuparia muitas páginas. Cada um tem seu papel especial na minha vida.

E o que seria de nós sem o amor? Agradeço ao meu namorado, Rômulo, que apareceu de repente na minha vida e trouxe paz para o meu caos. Meu parceiro pra tudo, desde ficar em casa de preguiça até sair para as noites mais malucas! Sempre se

preocupa e quer me ouvir, sem julgamentos. Sem tempo pra discussões e problemas, trabalhamos com soluções e tranquilidade, mesmo entre Rio e São Paulo.

Agradeço a todas as participantes do projeto! Nada teríamos sem seus consentimentos e boa vontade em comparecer em cada consulta.

Obrigada também à banca avaliadora por toda paciência, profissionalismo e todas as recomendações para que esta tese seja um produto de qualidade.

Por último e não menos importante, ao meu orientador. Obrigada Gilberto por todas as oportunidades que tive durante esses 7 anos no Observatório. Com toda certeza não teria vivido metade disso se não fosse desse grupo. Nem sempre foi fácil nossa relação, mas hoje posso dizer que nos conhecemos bem e aprendemos a lidar um com o outro. Obrigada pela paciência, por entender alguns momentos de fraqueza, e por não me deixar de desistir disso tudo. E obrigada por exigir tanto, isso nos prepara de maneira diferenciada pro futuro.

Enfim, mais uma etapa chega ao fim e a gratidão por cada um e cada história vivida é a sensação que domina. Obrigada!

Rio de Janeiro, fevereiro de 2020.

Camila Benaim Rodriguez

## **Epígrafe**

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”

(Paulo Freire)

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Classificação do estado de vitamina D (25(OH)D) segundo diversas agências reguladoras.....	<b>28</b>
<b>Quadro 2</b>	Resumo dos estudos vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico na gestação.....	<b>35</b>
<b>Quadro 3</b>	Classificação do peso ao nascer em valores absolutos.....	<b>36</b>
<b>Quadro 4</b>	Classificação do percentil de peso ao nascer em relação à IG.....	<b>36</b>
<b>Quadro 5</b>	Resumo estudos vitamina D gestacional e desfechos neonatais.....	<b>41</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Metabolismo da vitamina D exógena.....	<b>27</b>
<b>Figura 2</b>	Fluxograma de acompanhamento e avaliações realizadas nos estudos.....	<b>46</b>

### ARTIGO 1

<b>Figura 1</b>	Mudanças nos marcadores do metabolismo da glicose e adipocinas na gestação de acordo com o estado de vitamina D na linha de base, Rio de Janeiro/Brasil, 2009-2012  <i>Changes in glucose metabolism markers and adipokines throughout pregnancy according to vitamin D baseline status, Rio de Janeiro/Brazil, 2009-2012</i> .....	<b>79</b>
<b>Figura 2</b>	Mudanças nos marcadores do metabolismo da glicose e adipocinas de acordo com o estado de vitamina D na gestação, Rio de Janeiro/Brasil, 2009-2012  <i>Changes in glucose metabolism markers and adipokines according to vitamin D status throughout pregnancy, Rio de Janeiro/Brazil, 2009-2012</i> .....	<b>82</b>
<b>Figura suplementar</b>	O processo de recrutamento e seguimento das gestantes atendidas em um pré-natal público no Rio de Janeiro.  <i>The process of recruitment and follow-up of pregnant women attending at a public prenatal care in Rio de Janeiro</i> .....	<b>86</b>

### ARTIGO 2

<b>Figura 1</b>	O processo de recrutamento e seguimento das gestantes atendidas em um pré-natal público no Rio de Janeiro  <i>The process of recruitment and pregnancy follow-up of women attending at a public prenatal care in Rio de Janeiro</i> .....	<b>110</b>
<b>Figura 2</b>	Relação entre variação semanal da vitamina D e desfechos do nascimento  <i>Relationship between vitamin D weekly variation and birth outcomes</i> .....	<b>111</b>
<b>Figura suplementar</b>	Gráficos acíclicos direcionados para o estudo de vitamina D e peso ao nascer. Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2012  <i>Direct Acyclic Graph for a study of vitamin D and birth weight, Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2012</i> .....	<b>112</b>

## LISTA DE TABELAS

### **ARTIGO 1**

<b>Tabela 1</b>	Características da população de estudo na linha de base de acordo com o estado de suficiência de Vitamina D no primeiro trimestre da gestação  <i>Baseline characteristics of the study population according to vitamin D sufficiency status in first trimester of pregnancy.....</i>	<b>75</b>
<b>Tabela 2</b>	Concentrações dos marcadores de glicose e adipocinas da população de estudo de acordo com o estado de suficiência de Vitamina D no primeiro trimestre da gestação  <i>Markers of glucose and adipokines concentrations of the study population according to vitamin D sufficiency status in first trimester of pregnancy.....</i>	<b>76</b>
<b>Tabela 3</b>	Mudanças nos marcadores do metabolismo de glicose e adipocinas durante a gestação de acordo com o estado de suficiência de Vitamina D no primeiro trimestre da gestação, Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2011  <i>Markers of glucose metabolism and adipokines changes during pregnancy according to vitamin D sufficiency status in first trimester, Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.....</i>	<b>77</b>
<b>Tabela 4</b>	Marcadores do metabolismo de glicose e adipocinas de acordo com as mudanças de estado de suficiência de Vitamina D durante a gestação, Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2011  <i>Markers of glucose metabolism and adipokines according to vitamin D sufficiency status changes during pregnancy, Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.....</i>	<b>78</b>
<b>Tabela suplementar</b>	Características na linha de base de acordo com o estado de seguimento das gestantes de um centro de saúde pública na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2011  <i>Baseline characteristics according to follow-up status of pregnant women from a public health centre in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2012.....</i>	<b>85</b>

### **ARTIGO 2**

<b>Tabela 1</b>	Características maternas e neonatais de uma coorte do Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2011  <i>Maternal baseline and neonatal characteristics of a cohort from Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.....</i>	<b>107</b>
<b>Tabela 2</b>	Associação entre vitamina D e desfechos neonatais. Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2012.  <i>Association between vitamin D and birth outcomes. Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.....</i>	<b>108</b>

<b>Tabela 3</b>	Associação entre variação semanal de vitamina D e desfechos neonatais. Rio de Janeiro, Brasil, 2009-2012.	
	<i>Association between vitamin D weekly gestational variation and birth outcomes. Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2012.....</i>	<b>109</b>

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1</b>	Questionário geral de primeiro trimestre.....	<b>125</b>
<b>Anexo 2</b>	Questionário geral de segundo trimestre.....	<b>131</b>
<b>Anexo 2</b>	Questionário geral de terceiro trimestre.....	<b>136</b>
<b>Anexo 4</b>	Questionário de frequência alimentar.....	<b>141</b>
<b>Anexo 5</b>	Roteiro de análises (do-file) referente as análises do artigo 1.....	<b>148</b>
<b>Anexo 6</b>	Roteiro de análises (do-file) referente as análises do artigo 2.....	<b>156</b>
<b>Anexo 7</b>	Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	<b>163</b>
<b>Anexo 8</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	<b>164</b>
<b>Anexo 9</b>	Artigo 1.....	<b>167</b>

## **LISTA DE ANEXOS ONLINE**

[https://drive.google.com/drive/folders/1S110bbE6u1-fUSZNoZatHo79zChg\\_xBi?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1S110bbE6u1-fUSZNoZatHo79zChg_xBi?usp=sharing)

## LISTA DE ABREVIATURAS (bilíngue)

1,25(OH) <sub>2</sub> D	1- $\alpha$ ,25-diidroxi-vitamina D
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
95%CI	95% confidence interval
AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i>
AIG	Adequado para idade gestacional
AGA	<i>Adequate for gestational age</i>
AGS	<i>American Geriatrics Society</i>
AIG	Adequado para idade gestacional
BL	<i>Birth length</i>
BLUP	<i>Best linear unbiased prediction</i>
BMI	<i>Body mass index</i> /Índice de massa corporal
BW	<i>Birth weight</i>
CMSHB	Centro Municipal de Saúde Heitor Beltr
DAG	<i>Directed acyclic graphs</i> /Gráficos acíclicos direcionados
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DP	Desvio padrão
ES	<i>Endocrine Society Clinical Practice Guidelines</i>
FFQ	<i>Food frequency questionnaire</i>
GDM	<i>Gestational diabetes mellitus</i>
GIG	Grande para idade gestacional
HOMA-IR	<i>Homeostatic model assessment of insulin resistance</i> /Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina
IC95%	Intervalo de confiança 95%
INTERGROWTH-21 <sup>st</sup>	<i>International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21<sup>st</sup> Century</i>
IOF	<i>International Osteoporosis Foundation</i>
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
IQR	Intervalo interquartilar/ <i>interquartile range</i>
IRR	<i>Incidence-rate ratios</i>
IU	<i>International units</i>
LGA	<i>Large for gestational age</i>

LME	<i>Linear mixed effect</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PIG	Pequeno para idade gestacional
PN	Peso ao nascer
PTH	Paratormônio
QFA	Questionário de frequência alimentar
RAS	<i>Renin-angiotensin-aldosterone</i>
RN	Recém-nascido
SACN	<i>Scientific Advisory Committee on Nutrition</i>
SD	<i>Standard deviations</i>
SG	Semana gestacional
SGA	<i>Small for gestational age</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UI	Unidades internacionais
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>

## Sumário

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	17
<b>RESUMO.....</b>	19
<b>ABSTRACT .....</b>	21
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	23
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	25
2.1 Vitamina D .....	25
Aspectos gerais	25
Aspectos metabólicos	26
Pontos de corte da vitamina D sérica	28
2.2 Vitamina D na gestação .....	28
Recomendação e metabolismo	28
Vitamina D e metabolismo glicídico na gestação	30
Vitamina D e desfechos neonatais	36
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	42
<b>4. HIPÓTESES.....</b>	44
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	45
<b>6. MÉTODOS.....</b>	46
6.2 Desenho do estudo .....	46
6.2 Captação das gestantes .....	47
6.3 Critérios de elegibilidade.....	47
6.4 Critérios de exclusão .....	47
6.5 Coleta de dados.....	48
6.6 Variáveis do estudo .....	48
6.6.1 <i>Variável dependente</i>	48
6.6.2 <i>Variável independente</i>	49
6.6.3 <i>Co-variáveis</i>	49
6.6.4 <i>Análises estatísticas</i>	50
6.7 Aspectos éticos .....	53
<b>7. RESULTADOS .....</b>	54
7.1 Artigo 1 .....	55
7.2 Artigo 2.....	87
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	113
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	115
<b>10. ANEXOS .....</b>	124

## Apresentação

Essa tese deu origem a dois artigos científicos sobre a associação da vitamina D com o metabolismo glicídico na gestação e também com desfechos neonatais. Esses produtos foram resultados obtidos a partir de um estudo maior intitulado “*Saúde mental e estado nutricional na gestação e no pós-parto: estudo prospectivo com ensaio clínico randomizado aninhado*” que foi realizado no Centro Municipal de Saúde Heitor Beltrão (CMSHB), da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) do Rio de Janeiro.

A coleta de dados iniciada em 2009 e finalizada em 2013 foi realizada por alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutores que atuam no Observatório de Epidemiologia Nutricional do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC - UFRJ). Os estudos contaram com a participação e a colaboração de pesquisadores do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPUB - UFRJ) e da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). A análise das concentrações séricas de vitamina D foi realizada em parceria com o laboratório *Quest Diagnostics Nichols Institute* (San Juan Capistrano, CA, EUA) e foram intermediadas pelo Professor Michael Holick da Faculdade de Medicina da Universidade de Boston. Quando me inseri no grupo de pesquisa, a coleta de dados do campo já estava em fase final, mas participei das análises laboratoriais de alguns parâmetros bioquímicos e conduzi as análises estatísticas pertinentes aos artigos aqui apresentados. Também participei de diversas publicações não ligadas ao tema dessa tese.

O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) com apoio dos seguintes editais: Programa Jovem Cientista do Nossa Estado (2008), Programa de Apoio a Grupos de Pesquisa Emergentes (2008), Programa de Auxílio à Pesquisa - APQ1 (2009) e Apoio às Instituições de Ensino e Pesquisa Sediadas no Estado do Rio de Janeiro (2010).

A tese está estruturada nas seguintes seções: resumo/*abstract*, introdução, revisão de literatura, justificativa, hipóteses, objetivos, métodos, resultados, considerações finais, referências e anexos.

Os resultados dos estudos estão apresentados no formato de dois artigos. O primeiro é intitulado “*Longitudinal Association of 25-Hydroxyvitamin D with Adipokines and Markers of Glucose Metabolism among Brazilian Pregnant Women*”, e foi publicado em 2019 na revista “*British Journal of Nutrition*”

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30588902>) A formatação do artigo obedeceu às regras específicas da revista.

O segundo artigo, “*Vitamin D during pregnancy and its association with birth outcomes: a Brazilian cohort*” será submetido à revista Qualis A1 em breve.

## Resumo

**Introdução:** Concentrações de vitamina D séricas inadequadas vêm sendo associadas a desfechos maternos e neonatais indesejados, como aumento da resistência à insulina, diabetes gestacional, menor peso ao nascer, recém-nascido (RN) pequenos para idade gestacional (PIG) e prematuridade. **Objetivos:** 1. Avaliar a associação entre o estado de vitamina D no primeiro trimestre da gestação e a taxa de variação nas concentrações séricas de glicose, insulina, adiponectina e leptina e de modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina (HOMA-IR) ao longo da gestação; 2. Avaliar a associação entre as concentrações séricas de vitamina D em cada trimestre gestacional e sua variação semanal ao longo da gestação e peso e comprimento ao nascer, índice de Apgar, PIG ou grandes para idade gestacional (GIG) e prematuridade. **Métodos:** foram utilizados dados de uma coorte prospectiva com mulheres acompanhadas em um Centro Municipal de Saúde no Rio de Janeiro, em quatro momentos, sendo três na gestação e um no pós-parto. No objetivo 1, as concentrações séricas de glicemia (analisadas por método colorimétrico enzimático), insulina, adiponectina e leptina (analisadas pelo método por ensaio imunoenzimático - ELISA) e o HOMA-IR (calculado) foram consideradas como variáveis de desfecho. Para o objetivo 2, as variáveis de desfechos neonatais foram peso (g) e comprimento (cm) ao nascer, índice de Apgar, obtidos da carteira de acompanhamento infantil. Além disso, os escores z de peso e comprimento ao nascer foram calculados com base na curva do *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21<sup>st</sup> Century* (INTERGROWTH-21<sup>st</sup>). Os percentis de peso ao nascer do INTERGROWTH-21<sup>st</sup> foram utilizados para classificação de PIG (<P10) e GIG (<P90). A prematuridade foi definida como idade gestacional (IG) no parto <37 semanas. Em ambos os objetivos, a variável de exposição foi a vitamina D [25(OH)D] sérica, a qual foi mensurada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa e foi considerada a exposição em ambos os objetivos. Para o objetivo 1, o estado de 25(OH)D foi classificado em suficiente e insuficiente de acordo com os pontos de corte do *Institute of Medicine* (>50 nmol/L e ≤50 nmol/L, respectivamente) e da *Endocrine Society* (>75 nmol/L e ≤75 nmol/L, respectivamente). Para o objetivo 2, a vitamina D foi avaliada em concentração sérica absoluta. As análises estatísticas incluíram modelos de regressão linear de efeito misto para dados longitudinais (objetivo 1) e modelos de regressão linear e de Poisson considerando a vitamina D forma contínua, trimestre a trimestre, e também sua variação semanal, isto é, longitudinalmente, sendo esta variação estimada pelo

modelo de melhor predição linear imparcial (objetivo 2). **Resultados:** Objetivo 1: gestantes com concentrações de 25(OH)D <75nmol/L no 1º trimestre de gestação apresentaram menores concentrações de insulina ( $\beta=-0,12$ ; IC95% -0,251, 0,009;  $P=0,069$ ) e adiponectina ( $\beta=-0,070$ ; IC95% -0,150, 0,010;  $P=0,085$ ) ao longo da gestação em comparação com aquelas com níveis de 25(OH)D  $\geq 75$  nmol/L. Gestantes com 25(OH)D <50 nmol/L no 1º trimestre de gestação apresentaram concentrações de leptina significativamente maiores do que aquelas com níveis de 25(OH)D  $\geq 50$  nmol/L ( $\beta=-2,532$ ; 95% CI -0,436, 5,551;  $P=0,094$ ). Objetivo 2: A vitamina D foi diretamente associada ao risco de nascimento prematuro em todos os trimestres gestacionais [1º trimestre: *incidence-rate ratios* (IRR) 1,018; IC95% 1,002; 1,033; 2º trimestre: IRR 1,051, IC95% 1,034; 1,068; 3º trimestre: IRR 1,037, IC95% 1,018; 1,056]. A variação semanal de vitamina D foi diretamente associada ao escore z de peso ao nascer ( $\beta$ : 0,350, IC95% 0,062; 0,638) risco de GIG (IRR: 1,975, IC95% 1,075; 3,628) e prematuridade (IRR: 7,050, IC95% 3,035; 16,378). Conclusão: Gestantes que iniciam a gestação com insuficiência de vitamina D (<75 nmol/L) apresentam menores concentrações séricas de insulina e adiponectina ao longo da gestação que aquelas com suficiência. Considerando-se o ponto de corte 50 nmol/L, gestantes insuficientes no 1º trimestre de gestação, apresentam maiores concentrações séricas de leptina ao longo da gestação. Em relação aos desfechos neonatais, quanto maiores as concentrações de vitamina D em cada trimestre gestacional, maior a chance de RN prematuro. E quanto maior a variação semanal da vitamina D na gestação, maiores os escores z de PN, chance de GIG e prematuridade.

**Palavras-chave:** Gestação; Metabolismo glicídico; Vitamina D; Estudos de coorte; Peso ao nascer; Prematuridade.

## **Abstract**

**Background:** Inadequate serum concentrations of vitamin D have been associated with maternal and neonatal undesired outcomes such as increased insulin resistance, gestational diabetes and such as lower birth weight, small for gestational age (SGA) newborns and prematurity. **Objectives:** 1. To assess the association between vitamin D status in the first trimester of gestation and rate of change of serum concentrations of glucose, insulin, adiponectin and leptin and homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) throughout pregnancy; 2. To evaluate the association between serum vitamin D concentrations in each gestational trimester and its weekly variation throughout pregnancy and birth weight and length, Apgar score, SGA or large for gestational age (LGA) newborns and prematurity. **Methods:** Data from a prospective cohort with women attended at a Municipal Health Center in Rio de Janeiro in four moments, three during pregnancy and one at postpartum. For objective 1, serum glucose concentrations (analyzed by enzymatic colorimetric method), insulin, adiponectin and leptin (analyzed by the method enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) and HOMA-IR (calculated) were the gestational outcomes. For objective 2, the neonatal outcomes were data on birth weight (BW, in g) and length (BL, in cm), Apgar Index (score), obtained from the child vaccination booklet. In addition, BW and BL z-scores were calculated based on the International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH-21st) curve. The BW percentiles (INTERGROWTH-21st) were used to classify SGA (<P10) and LGA (<P90). Prematurity was defined as gestational age at delivery <37 weeks. In both objectives, the exposure was serum vitamin D [25(OH)D], which was measured by the high efficiency liquid chromatography coupled to mass spectrometry. For objective 1, vitamin D status was classified as sufficient or insufficient according to the Institute of Medicine cut-off points ( $>50$  nmol/L and  $\leq 50$  nmol/L, respectively) and the Endocrine Society ( $>75$  nmol/L and  $\leq 75$  nmol/L, respectively). For objective 2, vitamin D was considered as absolute serum concentration. Statistical analyzes included mixed-effect linear regression models for longitudinal data (objective 1) and linear and Poisson regression models considering vitamin D continuously, trimester by trimester, and also its weekly variation, ie, longitudinally (objective 2). This variation is estimated by the best unbiased linear prediction model. **Results:** Objective 1: pregnant women with concentrations of 25(OH)D  $<75$  nmol/L presented lower concentrations of insulin ( $\beta=-0,12$ ; IC95% -0,251, 0,009;  $P=0,069$ ) and adiponectin

( $\beta=-0,070$ ; IC95% -0,150, 0,010;  $P=0,085$ ) during pregnancy than those with 25 (OH) D levels  $\geq 75$  nmol/L. Pregnant women with 25(OH)D  $<50$  nmol/L at baseline had significantly higher leptin concentrations than those with 25 (OH) D levels  $\geq 50$  nmol/L ( $\beta=-2.532$ ; 95% CI -0.436, 5.551;  $P=0.094$ ). Objective 2: Vitamin D was directly associated with the risk of preterm birth in all gestational trimesters [1<sup>st</sup> trimester: *incidence-rate ratios* (IRR) 1.018; IC95% 1.002; 1.033; 2<sup>nd</sup> trimester: IRR 1.051, IC95% 1.034; 1.068; 3<sup>rd</sup> trimester: IRR 1.037, IC95% 1.018; 1.056]. Weekly vitamin D variation was directly associated with BW z-score ( $\beta$ : 0.350, IC95% 0.062; 0,638), LGA (IRR: 1.975, IC95% 1.075; 3.628) and prematurity risk (IRR: 7.050, IC95% 3.035; 16.378). **Conclusion:** Pregnant women who begin pregnancy with vitamin D insufficiency ( $<75$  nmol/L) have lower serum insulin and adiponectin concentrations throughout pregnancy than those with sufficiency. Considering the 50 nmol/L cutoff point, insufficient pregnant women in the first trimester of pregnancy present higher serum leptin concentrations throughout pregnancy. Regarding neonatal outcomes, as higher vitamin D concentrations in each gestational trimester, greater the chance of premature neonates. And the higher weekly variation of vitamin D during pregnancy, higher the BW scores, chance of LGA and prematurity.

**Key words:** Pregnancy; Glucose Metabolism; Vitamin D; Cohort studies, Birth weight, Preterm birth.

## 1. Introdução

A gestação é um período no qual os requerimentos energéticos e de nutrientes estão aumentados devido às mudanças fisiológicas e metabólicas no organismo materno, como aumento de volume plasmático, de tecido adiposo e perfil diferenciado de secreção de hormônios (CATALANO; ROMAN-DRAGO; AMINI; SIMS, 1998; KING, 2000). Essas modificações são necessárias para propiciar o adequado desenvolvimento e crescimento fetal. O organismo materno induz o aumento do consumo de alimentos, aumenta a absorção dos nutrientes provenientes da dieta e a produção de enzimas necessárias para a conversão de substratos, como é o caso da  $1\alpha$ -hidroxilase, responsável pela conversão da vitamina D na sua forma ativa, com a finalidade de atender a demanda materna e fetal. (KIELY; ZHANG; KINSELLA; KHASHAN *et al.*, 2016; KING, 2000; ZEHNDER; EVANS; KILBY; BULMER *et al.*, 2002)

A vitamina D pode ser considerada um pré, pró-hormônio ou hormônio dependendo de sua forma e pode ser obtida por algumas fontes dietéticas como leite, derivados e peixes gordos como arenque e salmão (HOLICK, 2008; RAJAKUMAR, 2003), porém a principal via de produção da vitamina D é endógena e depende de exposição solar (HOLICK, 2008). Estudos têm revelado que a prevalência de hipovitaminose D é alta, atingindo de 30 a 90% da população em países em desenvolvimento, inclusive em países com alta incidência solar (ARABI; EL RASSI; EL-HAJJ FULEIHAN, 2010; PEREIRA-SANTOS; SANTOS; CARVALHO; SANTOS *et al.*, 2018; UNGER; CUPPARI; TITAN; MAGALHÃES *et al.*, 2010). Portanto, o não atendimento à recomendação dietética dessa vitamina (via exógena), ou quando a produção endógena é baixa, pode resultar em concentrações séricas inadequadas (insuficiência ou deficiência), o que pode prejudicar algumas funções no organismo.

Diversos estudos têm observado que concentrações séricas adequadas de vitamina D podem diminuir o risco de diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e melhorar o quadro de resistência à insulina (PÉREZ-LÓPEZ; PASUPULETI; MEZONES-HOLGUIN; BENITES-ZAPATA *et al.*, 2015; SOHEILYKHAH; MOJIBIAN; MOGHADAM; SHOJAODDINY-ARDEKANI, 2013). Há evidências de que a vitamina D tem o potencial de aumentar a secreção de insulina por meio do estímulo às células beta pancreáticas e também, indiretamente, por estímulo da adiponectina ou inibição da leptina (STIVELMAN; RETNAKARAN, 2012; TRIUNFO; LANZONE; LINDQVIST, 2017).

Além disso, a vitamina D apresenta características antiinflamatórias, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, o que também contribui para melhorar a sensibilidade à insulina (TAO; YUAN; MAO; CHEN *et al.*, 2017). Essa propriedade da vitamina D é importante também na redução de risco de desfechos fetais indesejáveis como prematuridade, nascimento de recém-nascidos (RN) pequenos para idade (PIG) gestacional ou de baixo peso ao nascer (BPN) (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; RAMIRO-CORTIJO; REYES-HERNÁNDEZ; LÓPEZ DE PABLO *et al.*, 2018).

Embora haja evidências da associação da carência de vitamina D com desfechos como a pré-eclâmpsia e o DMG BPN e a prematuridade, (AMEGAH; KLEVOR; WAGNER, 2017; LAU; GUNTON; ATHAYDE; BYTH *et al.*, 2011), os pontos de corte para avaliação das concentrações séricas de vitamina D no período gestacional não estão bem estabelecidos. Logo, diferentes critérios são adotados nos estudos sendo os pontos de corte do Instituto de Medicina Americano (MEDICINE, 2011) e da Sociedade Americana de Endocrinologia os mais comumente empregados (HOLICK; BINKLEY; BISCHOFF-FERRARI; GORDON *et al.*, 2011).

Desta forma, nesta tese serão investigadas as associações entre vitamina D, marcadores do metabolismo glicídico e adipocinas em uma coorte de gestantes. Também será avaliado se há associação entre vitamina D em cada trimestre da gestação assim como sua variação semanal e os desfechos neonatais de peso e comprimento ao nascer, índice de Apgar, ocorrência de RN PIG ou grandes para IG (GIG) e prematuridade.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1 Vitamina D

#### *Aspectos gerais*

Vitamina D é um termo abrangente para um grupo de moléculas denominadas secosteróis, isto é, compostos derivados de esteróides. Esta vitamina pode ser encontrada sob as formas de ergocalciferol ou vitamina D2 (origem vegetal) e de colecalciferol ou vitamina D3 (origem animal) (CASTRO, 2011).

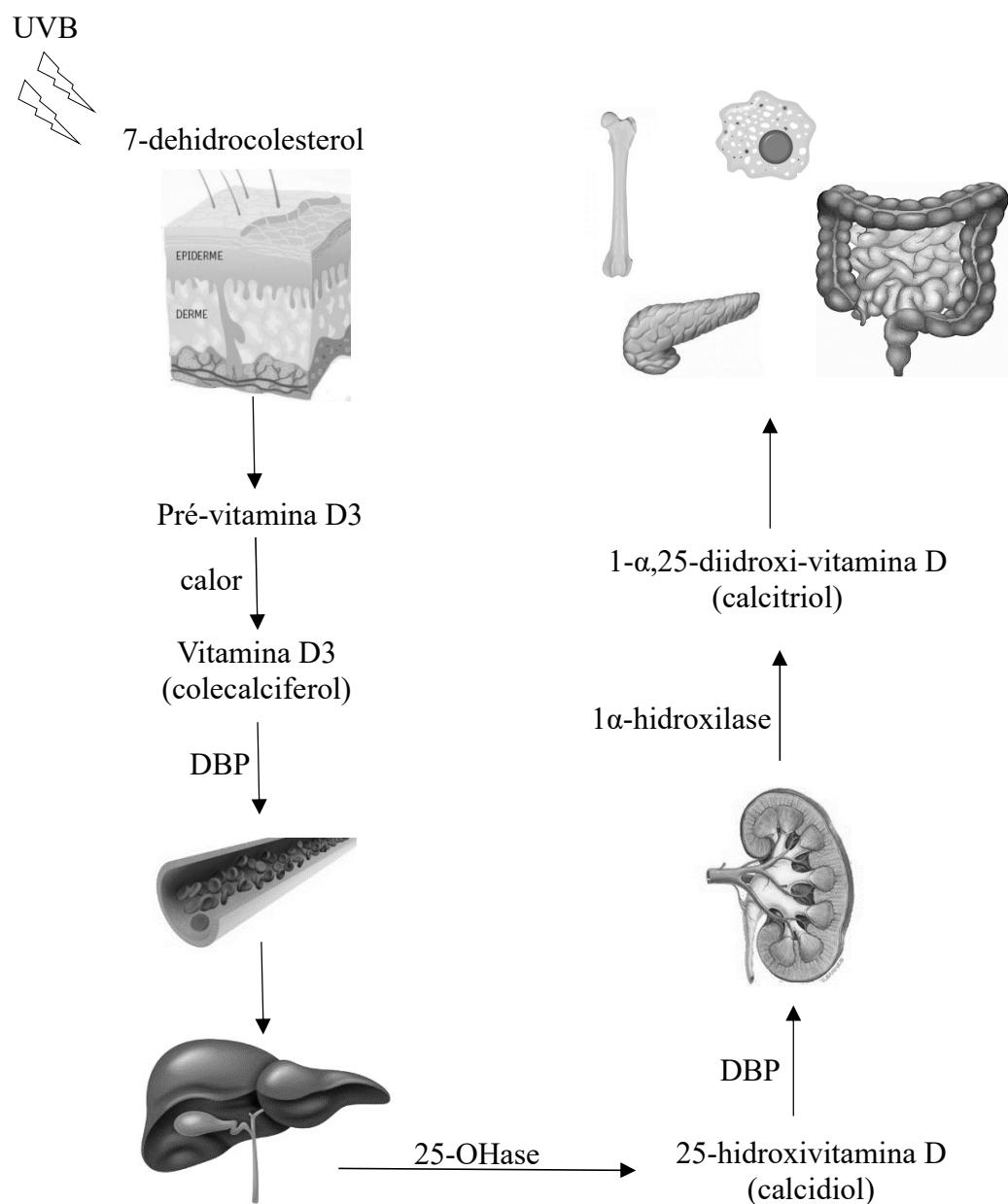
A literatura aponta que o principal papel da vitamina D envolve a regulação da homeostase do cálcio e do fósforo no organismo. A deficiência de vitamina D pode levar a problemas ósseos importantes como raquitismo na infância e osteomalácia/osteoporose na vida adulta (MAEDA; BORBA; CAMARGO; SILVA *et al.*, 2014). Contudo, devido à identificação de diferentes sítios celulares com receptores para este metabólito, as pesquisas sobre a atuação da vitamina D vêm incorporando uma gama de outras investigações em diferentes sistemas orgânicos que não o ósseo (KIELY; HEMMINGWAY; O'CALLAGHAN, 2017).

Aproximadamente 20% da demanda de vitamina D é obtida a partir do consumo alimentar, pois este nutriente é escasso nos alimentos, sendo a recomendação de ingestão dietética de vitamina D de 600 unidades internacionais (UI) diárias para mulheres adultas (HOLICK, 2008; SASSI; TAMONE; D'AMELIO, 2018; NORMAN; BOUILLOU, 2010). A principal forma de obtenção da vitamina D é por meio da síntese endógena, a qual é dependente da exposição da pele à radiação solar ultravioleta B (UVB) no comprimento de onda dentro da faixa de 290 a 315 nanômetros (CASTRO, 2011). Esse comprimento de onda é mais comum entre os países mais próximos à linha do Equador, como o Brasil, que se beneficiam, pois a camada atmosférica é menor, assim como a interferência nos comprimentos de onda dos raios UVB. Contudo, em uma meta-análise realizada em 2018 apenas com estudos brasileiros, foram observadas prevalências de deficiência e insuficiência de vitamina D similares àquelas de países com menor incidência solar, sendo as regiões Sul e Sudeste as mais atingidas (PEREIRA-SANTOS; SANTOS; CARVALHO; SANTOS *et al.*, 2018). A estação do ano é outro fator determinante das prevalências de deficiência de vitamina D. Nos meses de verão, o ângulo de incidência dos raios solares na terra é menor e, portanto, a radiação UVB é mais intensa (WEBB; KLINE; HOLICK, 1988), o que favorece a produção da vitamina D no organismo.

### *Aspectos metabólicos*

Quando a pele é exposta ao sol, os raios solares UVB possuem a capacidade de penetrar nas camadas mais profundas da epiderme, na qual se encontra o precursor da vitamina D3, o 7-dehidrocolesterol. Após o contato do sol com a pele, tem início o processo de fotólise deste componente. Esse processo propicia a quebra da ligação entre os carbonos 9 e 10 do anel B do ciclo pentanoperidofenantreno. Assim, origina-se a molécula secosteroide, denominada pré-vitamina D3, que tem como característica um dos anéis rompidos. Devido a sua instabilidade diante de temperatura elevada, essa substância sofre isomerização e uma forma mais estável é obtida, a vitamina D3 (colecalciferol), a qual é secretada para o meio extracelular, porém sem exercer efeitos metabólicos nesta etapa. Quando a vitamina D chega ao sangue (meio extracelular), o colecalciferol e o ergosterol são transportados pela proteína ligadora da vitamina D, do inglês *vitamin D binding protein* (DBP). Ao alcançar o fígado, ambas as formas sofrem hidroxilação no carbono 25, originando então a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol [(25(OH)D3, se de origem animal ou por exposição solar, e 25(OH)D2, se de origem vegetal)]. Após esse processo, o calcidiol é carreado novamente pela DBP até chegar aos rins (CASTRO, 2011; WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012) (**Figura 1**).

No sítio renal, principalmente nos túbulos renais proximais, ocorre uma nova hidroxilação no carbono 1 pela ação da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase, e então a forma ativa da vitamina D, isto é, aquela que exerce efeitos metabólicos, é originada e denominada 1- $\alpha$ ,25-diidroxi-vitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D ou calcitriol] (**Figura 1**). A regulação da expressão da 1- $\alpha$  hidroxilase é mediada pelos níveis séricos de paratormônio (PTH), o qual estimula a atividade dessa enzima quando há reduções séricas de cálcio, e outros fatores renais. Essa enzima também é encontrada em outros tecidos como células do sistema imune, células  $\beta$  pancreáticas, paratiroides, placenta, cérebro, entre outros. Por isso, acredita-se que a vitamina D atue em diversos sistemas orgânicos. Para que ocorra a ação biológica, as células têm que expressar o receptor da vitamina D, do inglês *vitamin D receptor* (VDR). Por meio da ligação da 1,25(OH)<sub>2</sub>D com o VDR, ocorre a regulação da expressão de diversos genes e indução de processos de sinalização intracelular (WACKER; HOLICK, 2013).



Fonte: CASTRO, 2011; WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012

**Figura 1.** Metabolismo da vitamina D exógena.

### Pontos de corte da vitamina D sérica

Para a avaliação dos níveis séricos de vitamina D, investiga-se a forma 25(OH)D, pois é o metabólito mais abundante e tem maior tempo de meia vida, sendo mais estável (HOLICK; BINKLEY; BISCHOFF-FERRARI; GORDON *et al.*, 2011). A definição do ponto de corte ideal para a suficiência de vitamina D ainda não está bem estabelecida. Diversas agências internacionais utilizam valores entre 30 e 100 nmol/L de 25(OH)D (**Quadro 1**). A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia recomenda valores >75 nmol/L para conferir benefícios mais evidentes em termos de doenças osteometabólicas e consequentemente menor risco de quedas. Os principais pontos de corte utilizados na literatura científica são os do *Institute of Medicine* (IOM, 2011) e da *Endocrine Society Clinical Practice Guidelines* (ES) (HOLICK; BINKLEY; BISCHOFF-FERRARI; GORDON *et al.*, 2011).

**Quadro 1.** Classificação do estado de vitamina D (25(OH)D) segundo diversas agências reguladoras.

Agências	Deficiência (nmol/L)	Insuficiência (nmol/L)	Suficiência (nmol/L)
IOM/Australia-New Zealand; Nordic and DACH countries; AAP	<30	30-<50	≥50
ES/IOF; AGS; SAHM; JSBMR; JES; Central Europe; UAE	<50	50-<75	≥75
SACN	----	----	≥25
Vitamin D Council	<50	50-<100	≥100

Adaptado de Bouillon, 2017 (BOUILLON, 2017) e Saggese *et al.*, 2018 (SAGGESE; VIERUCCI; PRODAM; CARDINALE *et al.*, 2018).

AAP: American Academy of Pediatrics; AGS: American Geriatrics Society; DACH: Deutschland (Germany), Austria and Confoederatio Helvetica (Switzerland) ES: Endocrine Society; IOF: International Osteoporosis Foundation; IOM: Institute of Medicine; JES: Japonese Endocrine Society; JSBMR: Japonese Society for Bone and Mineral Research; SACN: Scientific Advisory Committee on Nutrition; SAHM: Society for Adolescent Health and Medicine; UAE: United Arabian Emirates

## 2.2 Vitamina D na gestação

### Recomendação e metabolismo

Especificamente na gestação, as recomendações de ingestão de vitamina D e os respectivos pontos de corte séricos empregados não diferem da população adulta devido à

falta de evidências na literatura científica sobre a necessidade de pontos de corte diferenciados (KIELY; HEMMINGWAY; O'CALLAGHAN, 2017).

A conversão do colecalciferol a calcidiol não sofre mudanças, portanto seria plausível esperar que não fossem encontradas diferenças entre as concentrações séricas de 25(OH)D em diferentes momentos da gestação (WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012). No entanto, um estudo com dados da mesma coorte utilizada na presente tese encontrou uma tendência de evolução ascendente nas concentrações séricas de vitamina D ao longo da gestação (1º trimestre: 65nmol/L; 2º trimestre: ~79nmol/L; 3º trimestre: ~84nmol/L) (FIGUEIREDO; COCATE; ADEGOYE; FRANCO-SENA *et al.*, 2017). Um estudo realizado com gestantes colombianas saudáveis mostrou que as concentrações de 25(OH)D aumentam discretamente ao longo da gestação (1º trimestre: ~66nmol/L; 2º trimestre: ~75nmol/L; 3º trimestre: ~80nmol/L) e que a diferença foi significativa apenas entre o primeiro e terceiro trimestre ( $P<0,001$ ) (AGUDELO-ZAPATA; MALDONADO-ACOSTA; SANDOVAL-ALZATE; POVEDA *et al.*, 2018). Adicionalmente, em uma coorte de gestantes norte-americanas, foram encontradas concentrações séricas médias de 25(OH)D de 68,9nmol/L, 76,2nmol/L e 80,9nmol/L no primeiro, segundo e terceiro trimestre, respectivamente, corroborando com os dados citados anteriormente (FRANCIS; HINKLE; SONG; RAWAL *et al.*, 2018).

A maior produção de DBP entre a 8ª e a 10ª semana gestacional (SG) é uma das modificações do metabolismo da vitamina D na gestação (WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012). Embora não estejam esclarecidos os mecanismos envolvidos no aumento da produção de DBP, há a suposição de que o estrogênio seja um dos agentes que estimulem essa síntese em maiores proporções (BIKLE; GEE; HALLORAN; HADDAD, 1984). Além disso, entre a 10ª e 12ª SG, ocorre também o aumento da atividade da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase nos rins, placenta e decídua e, em contrapartida, menor expressão da enzima 24-hidroxilase, a qual cataboliza a vitamina D (BRANNON; PICCIANO, 2011; EVANS; BULMER; KILBY; HEWISON, 2004; NOVAKOVIC; SIBSON; NG; MANUELPILLAI *et al.*, 2009). Esse processo otimiza a conversão da 25(OH)D em 1,25(OH)D e resulta no aumento nos níveis da forma ativa da vitamina D no organismo materno. Em torno da 12ª SG, os níveis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D são duas vezes maiores que em mulheres adultas não gestantes e continuam a aumentar ao longo da gestação (LUND; SELNES, 1979; WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012).

Embora a placenta produza vitamina D, a produção renal tem um papel fundamental, pois estudos mostram que mulheres com 1- $\alpha$  hidroxilase renal não funcional, mesmo que com

a placenta saudável, não revelaram aumento expressivo nos níveis de 1,25(OH)D circulante (GREER; HOLLIS; NAPOLI, 1984; WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012). Pensava-se que esse aumento no metabólito ativo da vitamina D ocorresse unicamente devido à necessidade de transporte de cálcio para a formação do esqueleto fetal. Porém, níveis tão elevados, isto é, acima dos níveis fisiológicos comumente encontrados em mulheres saudáveis não gestantes, não modificam o mecanismo da homeostase de cálcio (STEVENSON; HILLYARD; MACINTYRE; COOPER *et al.*, 1979; WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012). Este fato é mais um indício de que a vitamina D pode atuar em outras funções extra esqueléticas na gestação.

É crescente o número de estudos que investigam a associação entre vitamina D e desfechos gestacionais. Zhang et al. (2018) realizaram uma revisão sistemática com meta-análise incluindo 87 estudos observacionais e 25 ensaios clínicos randomizados que avaliaram a relação entre vitamina D e DMG ou os fatores de risco para DMG, entre eles glicemia e insulina de jejum, e o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (*homeostatic model assessment of insulin resistance*, HOMA-IR). Dos 27 estudos com dados séricos de vitamina D e glicemia de jejum, 17 encontraram correlação negativa e ao agrupar todos os estudos, manteve-se essa correlação (coeficiente de correlação: -0,100; IC95% -0.166; -0.033). A mesma direção foi encontrada em relação ao HOMA-IR, dos 16 estudos inclusos, 11 apresentaram correlação negativa entre vitamina D e HOMA-IR e, ao considerar todos os estudos, essa relação foi mantida (coeficiente de correlação: -0.351; IC95% -0.594;-0.050) (ZHANG; GONG; XUE; XIONG *et al.*, 2018). Adicionalmente, Enquobahrie et al. (2011) realizaram uma comparação do perfil de expressão de genes entre gestantes com concentrações de 25(OH)D <64 nmol/L e gestantes com concentrações de 25(OH)D >79 nmol/L. Esses autores encontraram importante diferença na expressão de 305 genes entre os grupos. Alguns desses genes são relacionados à angiogênese, inflamação e processos metabólicos, como metabolismo de carboidratos, ou seja, quando não expressos podem levar a distúrbios metabólicos que são associados à diabetes, inflamação, entre outros (ENQUOBAHRIE; WILLIAMS; QIU; SISCOVICK *et al.*, 2011). Esses achados indicam que menores concentrações de vitamina D podem estar relacionadas ao desenvolvimento de condições adversas de saúde, como resistência à insulina, diabetes, pior estado inflamatório.

#### *Vitamina D e metabolismo glicídico na gestação*

A gestação é um período no qual a mulher desenvolve um estado fisiológico de resistência à insulina, gradual e crescente ao longo dos trimestres (SONAGRA; BIRADAR;

K; MURTHY D S, 2014). Estima-se que no terceiro trimestre da gestação, a sensibilidade à insulina decline em torno de 50% em comparação aos níveis normais devido à necessidade fetal de glicose, seu principal substrato energético, caracterizando o período de maior crescimento fetal, (CATALANO; TYZBIR; ROMAN; AMINI *et al.*, 1991). Diante disso, maior resistência à insulina confere maior disponibilidade de glicose no sangue materno para ser transferida para o feto por meio da placenta. Porém, este quadro pode ser agravado e desencadear DMG, que por sua vez aumenta o risco de complicações no parto e manutenção do quadro de diabetes mellitus após o parto (ASSOCIATION, 2004).

Os hormônios da gestação, como o estrogênio, a progesterona e o lactogênio placentário humano são alguns fatores que reconhecidamente influenciam neste processo de redução da sensibilidade à insulina (RYAN; ENNS, 1988). Mas, além desses, a vitamina D vem sendo apontada como outro fator que influencia no metabolismo glicídico. A deficiência desta vitamina estimula a secreção de paratormônio na tentativa de compensar a menor absorção de cálcio. Assim, ocorre um quadro de hiperparatireoidismo secundário. Mais tarde, essa condição faz com que haja aumento de cálcio intracelular. Com essa elevação, pode haver alteração nos mecanismos de reconhecimento nas células-alvo de insulina, reduzindo sua ação. Esse efeito causa danos na sinalização pós-receptores de insulina, prejudicando, por exemplo, a translocação do transportador de glicose GLUT-4, o que resulta em maiores concentrações séricas de glicose (STIVELMAN; RETNAKARAN, 2012). Adicionalmente, o desequilíbrio de cálcio intra e extracelular nas células beta pancreáticas, podem reduzir a conversão de pró-insulina à insulina (STIVELMAN; RETNAKARAN, 2012; TRIUNFO; LANZONE; LINDQVIST, 2017).

Walsh *et al.* (2013) avaliaram a associação entre vitamina D e resistência à insulina, por meio da avaliação do modelo HOMA-IR, em gestantes no primeiro e terceiro trimestres gestacionais. Os autores observaram correlação negativa entre resistência à insulina no primeiro trimestre e 25(OH)D na 28<sup>a</sup> SG ( $r=-0,32$ ;  $p\text{-valor}=0,02$ ) e também que gestantes com 25(OH)D acima da mediana no primeiro trimestre ( $>41,0$  nmol/L) apresentaram menores valores de HOMA-IR (1,1 vs. 2,2;  $p\text{-valor}=0,02$ ) e no terceiro trimestre (mediana 45,7 nmol/L) apresentaram uma tendência a menor HOMA-IR (1,7 vs. 3,1;  $p\text{-valor}=0,07$ ) (WALSH; MCGOWAN; KILBANE; MCKENNA *et al.*, 2013).

Casey *et al.* (2018) conduziram um estudo observacional com 1.585 gestantes Irlandesas entre a 24<sup>a</sup> e a 32<sup>a</sup> SG com o objetivo de investigar a associação entre os níveis de 25(OH)D e marcadores de DMG e lipídios. Apesar da alta prevalência de deficiência de vitamina D nessa amostra (65,8%), não houve diferença nos marcadores de DGM entre os

grupos com 25(OH)D <50 nmol/L ou ≥50 nmol/L. Nas análises de regressão, observou-se uma tendência de associação inversa entre concentração de vitamina D e glicemia de jejum (coeficiente de regressão -0,017; IC95% -0,034; 0,001, p-valor: 0,06); e associação direta apenas entre concentrações de 25(OH)D e HOMA-β (coeficiente de regressão 1,013; IC95% 1,001; 1,024; p-valor: 0,031). Estes resultados indicaram que maiores concentrações de vitamina D aumentaram a secreção de insulina nas células β pancreáticas (CASEY; MCGINTY; HOLMES; HILL *et al.*, 2018).

Em um ensaio clínico randomizado realizado com 120 gestantes recrutadas até 12 SG, foi testado o efeito de diferentes doses de suplementação de vitamina D nos valores de resistência à insulina (SOHEILYKHAH; MOJIBIAN; MOGHADAM; SHOJAODDINY-ARDEKANI, 2013). A suplementação para todos os grupos ocorreu entre a 12<sup>a</sup> SG e o parto. O grupo A recebeu 200 UI/dia, o grupo B 1.666 UI/dia e o grupo C 3.333/dia. Ao final do estudo, observou-se redução nos valores de HOMA-IR para todos os grupos de intervenção, porém houve diferença significativa apenas entre os grupos A e C [diferença média (DP) A: 1,46 (1,69), C: 0,7 (1,04); p-valor: 0,02]. Em contrapartida, em um ensaio clínico randomizado, duplo cego, com 158 gestantes, realizado em 2014, foi avaliado o possível efeito de diferentes doses de vitamina D (400 UI x 5,000 UI) em gestantes com deficiência desta vitamina e não encontraram diferenças significativas no HOMA-IR e nem na ocorrência de DGM (YAP; CHEUNG; GUNTON; ATHAYDE *et al.*, 2014). Contudo, a amostra não foi calculada com poder para detectar diferenças na ocorrência de DGM entre os grupos. É possível ainda que o início da suplementação possa ter sido tardio (segundo trimestre de gestação) ou ter ocorrido por tempo insuficiente. Além disso, não foi considerada a severidade da deficiência da vitamina D, o que poderia interferir no efeito do tratamento.

Mousa et al. (2017) investigaram a associação entre 25(OH)D no primeiro trimestre gestacional e desfechos glicêmicos (glicemia em jejum, 1 e 2 horas após ingestão de glicose) no terceiro trimestre em mulheres com sobrepeso e obesidade no primeiro trimestre. Os autores observaram correlação negativa entre vitamina D na linha de base e glicemia de jejum e glicemia uma hora após o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) ( $r=-0,35$ , p-valor<0,001;  $r=-0,22$ , p-valor: 0,04, respectivamente). Além disso, mulheres com maiores concentrações de vitamina D no início da gestação, apresentaram menor risco de desenvolver DMG entre a 26<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> SG (OR: 0,97, IC 95% 0,94 – 0,99) (MOUSA; ABELL; SHORAKAE; HARRISON *et al.*, 2017). Este resultado mostrou que o estado de vitamina D no início da gestação teve impacto nos desfechos ao longo da gestação, no qual a maior a concentração de

25(OH)D no 1º trimestre gestacional, levou a menor concentração de glicose no 2º trimestre, assim como menor o risco de desenvolver DGM.

Além da atuação direta da vitamina D sobre as células  $\beta$  pancreáticas, a vitamina D desempenha uma ação imunomoduladora e antiinflamatória, o que poderia reduzir a resistência à insulina causada por citocinas pró-inflamatórias que estão exacerbadas no período gestacional e assim podem melhorar o perfil metabólico (TRIUNFO; LANZONE; LINDQVIST, 2017). Adicionalmente, também pode influenciar no metabolismo glicídico por meio das adipocinas, mais especificamente adiponectina e leptina (HAJIMOHAMMADI; SHAB-BIDAR; NEYESTANI, 2017; MOUSA; ABELL; SHORAKAE; HARRISON *et al.*, 2017). As adipocinas são proteínas secretadas majoritariamente pelo tecido adiposo e desempenham papéis importantes sobre controle do apetite, fatores inflamatórios, resistência à insulina, entre outros (KERSHAW; FLIER, 2004; KHAN; JOSEPH, 2014).

A adiponectina é uma adipocina que tem propriedades de sensibilização à insulina das células-alvo (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo), como aumento da captação de glicose no músculo. Essa adipocina também protege as células  $\beta$  de ataques imunológicos e reduz a resistência à insulina por meio de efeitos imuno-regulatórios e antiinflamatórios (RAKATZI; MUELLER; RITZELER; TENNAGELS *et al.*, 2004). Em gestantes, as concentrações de adiponectina têm sido associadas à melhoria no quadro resistência à insulina (BOZKURT; GÖBL; BAUMGARTNER-PARZER; LUGER *et al.*, 2018; RETNAKARAN; RETNAKARAN, 2012). Porém, durante a gravidez, são esperadas reduções nas concentrações de adiponectina no plasma materno devido ao aumento do tecido adiposo. Em contraste a outras proteínas secretadas pelos adipócitos, a adiponectina tem sua expressão reduzida em situações de aumento de tecido adiposo (FUGLSANG; SKJAERBAEK; FRYSTYK; FLYVBJERG *et al.*, 2006).

A vitamina D parece estar positivamente associada ao aumento da secreção de adiponectina por duas vias. A primeira se dá por meio do estímulo à expressão gênica da adiponectina (Liu *et al.*, 2009. Rajj *et al.*, 2014), o que poderia diretamente estimular a maior produção desta adipocina. Já a segunda, pela atuação da vitamina D na regulação negativa da renina no tecido adiposo, que então reduz a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (VAIDYA; WILLIAMS; FORMAN, 2012). Com a redução da produção dos componentes do SRAA, especialmente aldosterona, ocorre o aumento da secreção de adiponectina, porém esse mecanismo permanece desconhecido (FALLO; DELLA MEA; SONINO; BERTELLO *et al.*, 2007). Portanto, se a vitamina D atua reduzindo a expressão do SRAA, a baixa concentração de vitamina D possivelmente leva à redução da secreção de

adiponectina por esta via e pode ser considerado um fator de risco para distúrbios no metabolismo glicídico.

Um estudo observacional com 445 gestantes mostrou que mulheres que desenvolveram DMG apresentaram menores concentrações de adiponectina no 1º (11,73 vs 9,67 $\mu$ g/mL) e 2º trimestre (11,67 vs 9,70 $\mu$ g/mL) da gestação em comparação com àquelas que não desenvolveram DMG. Os autores também encontraram uma correlação negativa entre as concentrações de adiponectina e HOMA-IR em ambos os trimestres (1º trimestre:  $r$ :-0,22;  $p$ <0,04; 2º trimestre:  $r$ :-0,22;  $p$ <0,01) (LACROIX; BATTISTA; DOYON; MÉNARD *et al.*, 2013). Um estudo caso-controle com 71 mulheres conduzido no Canadá em 2014 comparou os níveis séricos de vitamina D e adiponectina em gestantes com DMG e gestantes saudáveis entre 24 e 28 SG (MCMANUS; SUMMERS; DE VRIJER; COHEN *et al.*, 2014). Os autores concluíram que as mulheres com DMG ( $n$ =36) tiveram menores concentrações de 25(OH)D e adiponectina quando comparados com gestantes saudáveis ( $n$ =35). Embora este estudo não tenha desenho longitudinal, o que não permite sugerir uma relação de causalidade, o mesmo indica que pode haver uma relação entre vitamina D, adiponectina e DGM. Assim, considerando a ação da vitamina D sobre esta adipocina, destacada anteriormente, é relevante investigar essa possível associação.

A leptina tem sua expressão aumentada na gestação devido ao incremento de tecido adiposo no organismo materno (HENSON; CASTRACANE, 2006). A vitamina D possivelmente reduz a secreção desta por meio da regulação da transcrição (KONG; CHEN; ZHU; ZHAO *et al.*, 2013; MENENDEZ; LAGE; PEINO; BALDELLI *et al.*, 2001). Uma meta-analise com seis ensaios clínicos e 14 estudos observacionais indicou que existe uma relação inversa entre leptina e vitamina D, porém houve heterogeneidade significativa entre os estudos, o que enfraquece a evidencia, não sendo possível concluir como de fato é essa associação e os mecanismos desta ação da vitamina D sobre a leptina (HAJIMOHAMMADI; SHAB-BIDAR; NEYESTANI, 2017). Embora não comprovada esta relação, a potencial ação da vitamina D na redução da secreção de leptina seria benéfica, pois esta adipocina exerce um efeito pró-inflamatório, estimulando a produção de citocinas, que por sua vez poderiam agravar o quadro de resistência à insulina e aumento de risco de prematuridade (PÉREZ-PÉREZ; TORO; VILARIÑO-GARCÍA; MAYMÓ *et al.*, 2018).

Embora haja evidências sobre a relação entre vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico (**Quadro 2**), os estudos ainda são inconclusivos e os mecanismos não estão completamente esclarecidos.

**Quadro 2.** Resumo dos estudos de vitamina D e marcadores do metabolismo glicídico na gestação.

Autor (ano); origem (país)	Desenho do estudo; amostra	Desfecho	Principais resultados
WALSH et al. (2013); Irlanda	Coorte prospectiva; 60 gestantes	HOMA-IR	Correlação negativa entre HOMA-IR no 1º trimestre gestacional e vitamina D no 3º trimestre ( $r=-0,32$ ; $p\text{-valor}=0,02$ ); Mulheres com 25(OH)D acima da mediana no 1º trimestre ( $>41,0 \text{ nmol/L}$ ) apresentaram menores valores de HOMA-IR (1,1 vs. 2,2; $p\text{-valor}=0,02$ )
MOUSA et al. (2017); Australia	Ensaio clínico randomizado (dados apenas do grupo controle); 102 gestantes	Glicemia de jejum e após TOTG	Correlação negativa entre vitamina D no 1º trimestre e glicemia de jejum e pós TOTG ( $r=-0,35$ , $p\text{-valor}<0,001$ ; $r=-0,22$ , $p\text{-valor}: 0,04$ , respectivamente). Maiores concentrações de vitamina D 1º trimestre, menor risco de DMG entre a 26 <sup>a</sup> e 28 <sup>a</sup> SG (OR: 0,97, IC 95% 0,94 – 0,99)
CASEY et al. (2018); Irlanda	Observacional transversal; 1.585 gestantes	Glicemia, HOMA-IR, HOMA-β, TOTG	Tendência de associação inversa entre concentração de vitamina D e glicemia de jejum (coeficiente de regressão -0,017; IC95% -0,034; 0,001, $p\text{-valor}: 0,06$ ); e associação direta apenas entre concentrações de 25(OH)D e HOMA-β (coeficiente de regressão 1,013; IC95% 1,001; 1,024; $p\text{-valor}:0,031$ )
SOHEILYKHAH et al. (2013); Irã	Ensaio clínico; 120 gestantes Grupo A 200 UI/dia, grupo B 1.666 UI/dia e grupo C 3.333/dia.	HOMA-IR	Todos os grupos apresentaram redução de HOMA-IR, porém diferença significativa apenas entre A e C [diferença média (DP) A: 1,46 (1,69), C: 0,7 (1,04); $p\text{-valor}: 0,02$ ]
YAP et al., (2014); Austrália	Ensaio clínico; 158 gestantes 80 grupo controle: 400 UI/dia; 78 grupo intervenção: 5.000 UI/dia	Glicemia de jejum e após TOTG; HOMA-IR	Não houve diferença entre os grupos

### Vitamina D e desfechos neonatais

O peso ao nascer (PN) e o comprimento ao nascer são as primeiras medidas corporais realizadas na primeira hora de vida do recém-nascido, sendo o PN um dos parâmetros mundialmente mais utilizados para avaliar a condição de vida do neonato (CHRISTIAN, 2010). O PN pode ser classificado segundo termos absolutos (**Quadro 3**) ou em relação ao percentil para SG ao nascimento e sexo segundo um padrão/referência de comparação (**Quadro 4**). Na presente tese foram adotados os valores recomendados pelo *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* (INTERGROWTH 21<sup>st</sup>), um estudo multicêntrico que teve por objetivo estabelecer novas curvas internacionais prescritivas de crescimento, incluindo a fase fetal, neonatal e pós-neonatal, e o qual considera também RN prematuros (VILLAR; CHEIKH ISMAIL; VICTORA; OHUMA *et al.*, 2014).

**Quadro 3.** Classificação do peso ao nascer em valores absolutos.

Peso ao nascer (g)	Classificação
<1500	Muito baixo peso
≥1500; <2500	Baixo peso
>2500; <4000	Normal
≥ 4000	Macrossomia

(BRASIL, 2004).

**Quadro 4.** Classificação do percentil de peso ao nascer em relação à IG.

Peso ao nascer (percentil)	Classificação
<P10	PIG
≥P10; <P90	AIG
≥P90	GIG

(PEDREIRA; PINTO; PEREIRA; COSTA, 2011; VILLAR; CHEIKH ISMAIL; VICTORA; OHUMA *et al.*, 2014)

O estado nutricional materno é um importante determinante do PN e comprimento ao nascer, uma vez que o feto é totalmente dependente da transferência de nutrientes por meio da placenta (GACCIOLI; LAGER, 2016). De maneira geral, o metabolismo da mulher passe por adaptações para poupar nutrientes para transferência fetal. Quando o estado nutricional materno está em um nível mais grave de depleção, essa adaptação não é suficiente para atender à demanda e o crescimento fetal pode ser prejudicado, aumentando o risco para nascimentos PIG ou com BPN (POPPITT; PRENTICE; GOLDBERG; WHITEHEAD, 1994).

O excesso de peso materno ou ganho de peso excessivo na gestação também oferece riscos ao feto em desenvolvimento uma vez que a oferta excessiva de nutrientes pode favorecer a ocorrência de RN GIG e ruptura prematura das membranas, resultando em parto pré-termo, isto é, antes de 37 SG (GOLDSTEIN; ABELL; RANASINHA; MISSO *et al.*, 2017; LIU; XU; SUN; DU *et al.*, 2019).

A glicose é o principal substrato energético utilizado pelo feto, logo esse tipo de macronutriente é o mais transportado pela placenta (SONAGRA; BIRADAR; K; MURTHY D S, 2014). Especialmente no terceiro trimestre da gestação, o aumento da resistência à insulina promove a maior utilização de lipídios para a demanda energética materna, priorizando os carboidratos para transferência fetal (SONAGRA; BIRADAR; K; MURTHY D S, 2014). Neste período, ocorre a maior taxa de incremento de peso fetal, refletindo em maior depósito de gordura e também aumento muscular, garantindo reserva de nutrientes (CHRISTIAN, 2010).

Existe uma relação intrínseca entre o metabolismo de macro e micronutrientes, portanto, além de uma dieta equilibrada em energia, lipídios, carboidratos e proteínas, as necessidades de micronutrientes também devem ser supridas (CHRISTIAN, 2010). Mas, além disso, outras vitaminas exercem diferentes ações, que não diretamente relacionadas ao metabolismo de macronutrientes, como a vitamina D.

Classicamente, a vitamina D atua sobre o metabolismo ósseo. O aumento da conversão da vitamina D para a forma ativa é gradual ao longo das SG e já no segundo trimestre, as concentrações dobram em relação aos valores pré-gestacionais (WAGNER; TAYLOR; JOHNSON; HOLLIS, 2012). Este aumento favorece a absorção de cálcio no intestino materno e diminui sua excreção renal, o que viabiliza maiores quantidades deste mineral para transferência fetal e formação esquelética, impactando no comprimento e no PN (ABRAMS, 2007). Um dos mecanismos envolvidos neste processo é a secreção de peptídeo relacionado ao PTH (PHTrP), o qual é produzido na glândula paratireóide do feto e também na placenta (MULLIGAN; FELTON; RIEK; BERNAL-MIZRACHI, 2010). Quando o PHTrP alcança a circulação materna, este liga-se ao receptor de PTH/PHTrP tanto nos rins quanto nos ossos da mulher e então ocorre a sinalização celular para que haja a regulação do cálcio (MULLIGAN; FELTON; RIEK; BERNAL-MIZRACHI, 2010).

Outras ações da vitamina D podem influenciar nos desfechos neonatais. A placenta apresenta todo o aparato metabólico necessário para conversão da vitamina D para sua forma ativa, e, ao longo da gestação, a nível placentário, a expressão da enzima conversora (1- $\alpha$  hidroxilase) aumenta enquanto a enzima catalizadora (24-hidroxilase) reduz (KIELY;

HEMMINGWAY; O'CALLAGHAN, 2017). Além disso, a placenta apresenta receptores de vitamina D, indicando que existe sua atuação neste local. A vitamina D desempenha na placenta o papel de regulação da expressão de hormônios como progesterona, que atua na glicose materna, aumentando a resistência à insulina para disponibilizar glicose ao feto, fornecendo energia para o crescimento fetal (LAPILLONNE, 2010; SHIN; CHOI; LONGTINE; NELSON, 2010). Dessa forma, ocorre o incremento de peso fetal.

Em uma meta-análise recém-publicada, incluindo 54 estudos, totalizando 67.484 participantes, Tous *et al.* (2019) avaliaram a associação entre concentrações de vitamina D na gestação e o PN, comprimento ao nascer, ocorrência de PIG e prematuridade. Foram considerados três pontos de corte para classificação do grau de suficiência da vitamina D, 30 nmol/L, 50 nmol/L e 75 nmol/L. Gestantes com vitamina D abaixo de 30 nmol/L tiveram RN com menor PN e 59% mais chance de PIG, mas não houve diferença quanto ao comprimento ao nascer nem em relação à prematuridade. As gestantes com vitamina D < 50nmol/L tiveram 43% e 28% mais chance de RN PIG e parto prematuro, respectivamente. Ao realizar as análises com o ponto de corte de 75nmol/L, não foram encontradas diferenças entre as categorias (TOUS; VILLALOBOS; IGLESIAS; FERNÁNDEZ-BARRÉS *et al.*, 2019). Estes resultados indicam que existe uma associação direta entre menores concentrações de vitamina D e risco de alguns desfechos neonatais adversos, como BPN, PIG e prematuridade.

Chen *et al.* (2017) realizaram uma meta-análise apenas com estudos de coorte e para investigar a associação entre deficiência de vitamina D e PIG. Foram incluídos 13 estudos, contabilizando 28.285 gestantes, sendo que cinco estudos mediram vitamina D no 1º trimestre gestacional, cinco no 2º e apenas três avaliaram em mais de um trimestre da gestação. Ao compilar todos os resultados, observou-se que as gestantes com deficiência de vitamina D tiveram 1,59 mais chances de ter nascimentos PIG (OR: 1,588; CI95% 1,138; 2.216) (CHEN; ZHU; WU; LI *et al.*, 2017). Ressalta-se que a diferença nos pontos de corte adotados para indicar a classificação da deficiência de vitamina D (<25 nmol/L; <37,5 nmol/L; e <50 nmol/L) e os diferentes momentos de avaliação sérica da vitamina D podem ter atenuado as associações. O mecanismo sugerido pelos autores para explicar a relação de causalidade envolveu o perfil inflamatório das mulheres.

Neste sentido, há evidências do envolvimento da vitamina D na mediação de marcadores inflamatórios. Gestantes com menores concentrações de vitamina D poderiam apresentar maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa, o qual inibe a síntese de hormônios placentários e também induz o catabolismo do calcitriol (CHEN; ZHU; WU; LI *et al.*, 2017; DÍAZ; NOYOLA-MARTÍNEZ; BARRERA;

HERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Além disso, a vitamina D atua na resposta imune adaptativa inibindo o fator de transcrição kappa beta (NF $\kappa$ B) na decídua, o qual é o principal fator de transcrição de mediadores inflamatórios (CHEN; ZHU; WU; LI *et al.*, 2017; COHEN-LAHAV; SHANY; TOBVIN; CHAIMOVITZ *et al.*, 2006). Este cenário pró-inflamatório gera estresse oxidativo, que por sua vez reduz a perfusão placentária e, consequentemente, prejudica o transporte de nutrientes para o feto, levando a restrição de crescimento intrauterino e aumentando o risco de nascimentos PIG ou com BPN (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; RAMIRO-CORTIJO; REYES-HERNÁNDEZ; LÓPEZ DE PABLO *et al.*, 2018).

O perfil inflamatório na gestação também se relaciona à presença de patógenos, o que pode aumentar o risco para parto prematuro. Algumas bactérias têm a capacidade de romper a membrana amniótica e, então, podem desencadear uma sequência de respostas imunológicas. Entre elas, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas que estimulam a contração uterina de forma precoce (BASTEK; GÓMEZ; ELOVITZ, 2011). A vitamina D pode exercer um efeito protetor, estimulando a expressão de proteínas que protegem contra a ação de patógenos, como a catelicidina, reduzindo a produção dessas citocinas e, portanto, o risco de contração uterina que induziria um parto pré-termo (BASTEK; GÓMEZ; ELOVITZ, 2011; HEWISON, 2011; ROMERO; ESPINOZA; GONÇALVES; KUSANOVIC *et al.*, 2007). Um estudo transversal brasileiro com 158 mulheres comparou a concentração sérica de vitamina D no parto entre aquelas que deram à luz a RN prematuros (<32 semanas de gestação) e a termo ( $\geq 37$  semanas) (KASSAI; CAFEO; AFFONSO-KAUFMAN; SUANO-SOUZA *et al.*, 2018). As mulheres que tiveram filhos prematuros apresentaram menores concentrações de vitamina D em relação às que tiveram parto a termo ( $54,2 \pm 28,0$  nmol/L vs.  $65,4 \pm 24,5$  nmol/L, p-valor: 0,011). Uma meta-análise realizada em 2017 com 24 estudos (6 ensaios clínicos e 18 estudos observacionais, totalizando 28.391 participantes) encontrou resultados inconsistentes quando diferentes pontos de corte foram empregados (ZHOU; TAO; HUANG; ZHU *et al.*, 2017). Ao avaliar o ponto de corte do IOM, gestantes com concentrações séricas <50 nmol/L apresentaram 1,25 (IC95%: 1,13–1,38) vezes mais chances de parto prematuro que aquelas com >50 nmol/L. Contudo, considerando o ponto de corte da ES (75 nmol/L), não houve associação estatisticamente significativa (OR: 1,09; IC95%: 0,89–1,35). Este resultado reforça a discussão sobre a definição do ponto de corte que deve ser recomendado na gestação e também que os estudos consideram diferentes momentos de coleta de sangue, dificultando a comparação entre estes.

é plausível hipotetizar que a vitamina D também pode estar associada indiretamente ao índice de Apgar. Este índice refere-se ao escore de pontuação do neonato no primeiro minuto pós-parto e aos cinco minutos pós-parto, no qual são avaliados cinco itens: frequência cardíaca, cor da pele (cianose), irritabilidade reflexa, esforço respiratório e tônus muscular (APGAR, 1953). Quanto maior a pontuação, melhor o estado de saúde e menor necessidade de suporte médico ao RN. De acordo com meta-análise conduzida por Amegah *et al.* (2017) sobre insuficiência de vitamina D e risco de desfechos neonatais indesejáveis, os autores encontraram que estudos de intervenção, a suplementação de vitamina D foi associada a maiores pontuações de Apgar (HOSSAIN; KANANI; RAMZAN; KAUSAR *et al.*, 2014; SABLOK; BATRA; THARIANI; BHARTI *et al.*, 2015). Nos estudos observacionais, apenas em um estudo espanhol com 466 gestantes no 1º trimestre gestacional, mulheres com vitamina D <75 nmol/L apresentaram 40% mais chance de RN com Apgar <7 (FERNÁNDEZ-ALONSO; DIONIS-SÁNCHEZ; CHEDRAUI; GONZÁLEZ-SALMERÓN *et al.*, 2012).

Embora haja evidências (**Quadro 5**), ainda existe uma lacuna na literatura quanto à relação da vitamina D e os desfechos perinatais. Portanto novos estudos podem colaborar para elucidação dessa temática que é relevante diante de um cenário no qual ainda são encontradas taxas em torno de 19,3% de PIG e até 28% de prematuridade, importantes causas de morbi-mortalidade neonatal (KATZ; LEE; KOZUKI; LAWN *et al.*, 2013; LEE; KOZUKI; COUSENS; STEVENS *et al.*, 2017).

**Quadro 5.** Resumo dos estudos de vitamina D gestacional e desfechos neonatais.

Autor (ano); origem (país)	Desenho do estudo; amostra	Desfecho	Principais resultados
TOUS et al. (2019);	Meta-análise; 54 estudos (67.484 gestantes)	PN, comprimento ao nascer, PIG, prematuridade	Gestantes com vitamina D <30 nmol/L tiveram RN com menor PN (diferença média: -87,82; IC95% -119,73; -55,91) e mais chance de PIG (OR: 1,59; IC95% 1,24; 2,03). Gestantes com vitamina D < 50nmol/L tiveram mais chance de RN PIG (OR: 1,43; IC95% 1,08; 1,91) e prematuro (OR: 1,28; IC95% 1,08; 1,52), respectivamente.
CHEN et al. (2017);	Meta-análise; 13 estudos (28.285 gestantes)	PIG	Gestantes com deficiência de vitamina D tiveram 1,59 mais chances de ter nascimentos PIG (OR: 1,588; CI95% 1,138; 2.216).
Kassai et al. (2018); Brasil	Observacional, transversal; 158 gestantes	prematuridade	As mulheres que tiveram filhos prematuros apresentaram menores concentrações de vitamina D em relação às que tiveram parto a termo ( $54,2 \pm 28,0$ nmol/L vs. $65,4 \pm 24,5$ nmol/L, p-valor: 0,011).
ZHOU et al. (2017);	Meta-análise; 24 estudos (28.391 gestantes)	prematuridade	Gestantes com concentrações séricas <50 nmol/L apresentaram mais chances de parto prematuro que aquelas com >50 nmol/L (OR: 1,25; IC95%: 1,13–1,38).
Amegah et al. (2017);	Meta-análise; 18 estudos	Índice de Apgar	Apenas em um estudo espanhol com 466 gestantes no 1º trimestre gestacional, mulheres com vitamina D <75 nmol/L apresentaram 40% mais chance de RN com Apgar <7.

### 3. Justificativa

As condições de saúde da mulher podem influenciar de forma marcante o período gestacional. O estado nutricional adequado, que atenda à demanda energética do organismo e que mantenha as concentrações séricas adequadas de micronutrientes, pode reduzir o risco de intercorrências maternas e fetais.

O período gestacional, por si só, já é um momento onde é esperado aumento do estresse oxidativo, produção de citocinas pró-inflamatórias e resistência à insulina (FIALOVÁ; MALBOHAN; KALOUSOVÁ; SOUKUPOVÁ *et al.*, 2006). Neste sentido, estudos já evidenciaram que menores concentrações de vitamina D também estão associadas a desfechos gestacionais adversos como aumento da resistência à ação da insulina, que pode evoluir para DMG, assim como a desfechos neonatais indesejáveis como BPN e prematuridade (BOGESS; ESPINOLA; MOSS; BECK *et al.*, 2011; TOUS; VILLALOBOS; IGLESIAS; FERNÁNDEZ-BARRÉS *et al.*, 2019; TRIUNFO; LANZONE; LINDQVIST, 2017). Portanto a adequação das concentrações de vitamina D podem contribuir para a redução de riscos de desfechos maternos e neonatais indesejáveis por meio da modulação do estresse oxidativo, regulação do sistema imunológico e atuação no metabolismo glicídico.

Segundo a teoria da origem fetal das doenças, as condições gestacionais são importantes determinantes de desfechos neonatais indesejáveis, que por sua vez aumentam o risco de doenças também na vida adulta (BARKER, 2007). Assim, desfechos de nascimento como PIG e GIG e prematuridade são uma preocupação devido ao aumento do risco de morte neonatal e comprometimento do desenvolvimento, que pode impactar negativamente na qualidade de vida (PLATT, 2014; SAVCHEV; SANZ-CORTES; CRUZ-MARTINEZ; ARRANZ *et al.*, 2013). Há evidências de que estes RN têm maior probabilidade de desenvolver doenças não transmissíveis na adolescência e na idade adulta (DE JONG; MONUTEAUX; VAN ELBURG; GILLMAN *et al.*, 2012; KLEISER; SCHAFFRATH ROSARIO; MENSINK; PRINZ-LANGENOHL *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos sobre o estado nutricional de micronutrientes, como da vitamina D, são relevantes para a elucidação de possíveis associações com desfechos maternos-infantis. A identificação de deficiência/insuficiência de vitamina D é uma condição passível de modificação, logo podem ser realizadas orientações nutricionais no planejamento da gestação e no seu decorrer com a finalidade de reduzir o risco de intercorrências maternas e neonatais.

Além disso, esta temática ainda é pouco estudada no Brasil e os estudos desenvolvidos nessa tese podem contribuir com a literatura científica. Diante da ausência de pontos de corte definidos para o período gestacional, o primeiro artigo descrito na tese abordará a associação da adequação da vitamina D no primeiro trimestre gestacional com a mudança nas concentrações de marcadores do metabolismo glicídico e adipocinas ao longo da gestação, considerando dois pontos de corte para classificação do estado de adequação da vitamina D. Portanto, tem o potencial de colaborar com evidências sobre a influência do ponto de corte nos desfechos gestacionais. O segundo artigo poderá trazer evidências de como a vitamina D se associa a desfechos neonatais, onde ainda também existe uma lacuna nos estudos brasileiros e não há consenso na literatura.

#### **4. Hipóteses**

##### **Artigo 1**

As mulheres que iniciam a gestação com concentrações inadequadas de vitamina D têm maiores valores de glicemia, insulina, resistência à insulina, e leptina e menores de adiponectina.

##### **Artigo 2**

Mulheres com maiores concentrações de vitamina D na gestação tem recém-nascidos com maior peso ao nascer, maiores escores de Apgar e menor risco de recém-nascidos pequenos para idade e prematuridade.

## **5. Objetivos**

### **Artigo 1**

- i. Avaliar a associação entre o estado de suficiência da vitamina D e as concentrações de glicemia, insulina, resistência à insulina, adiponectina e leptina ao longo da gestação.

### **Artigo 2**

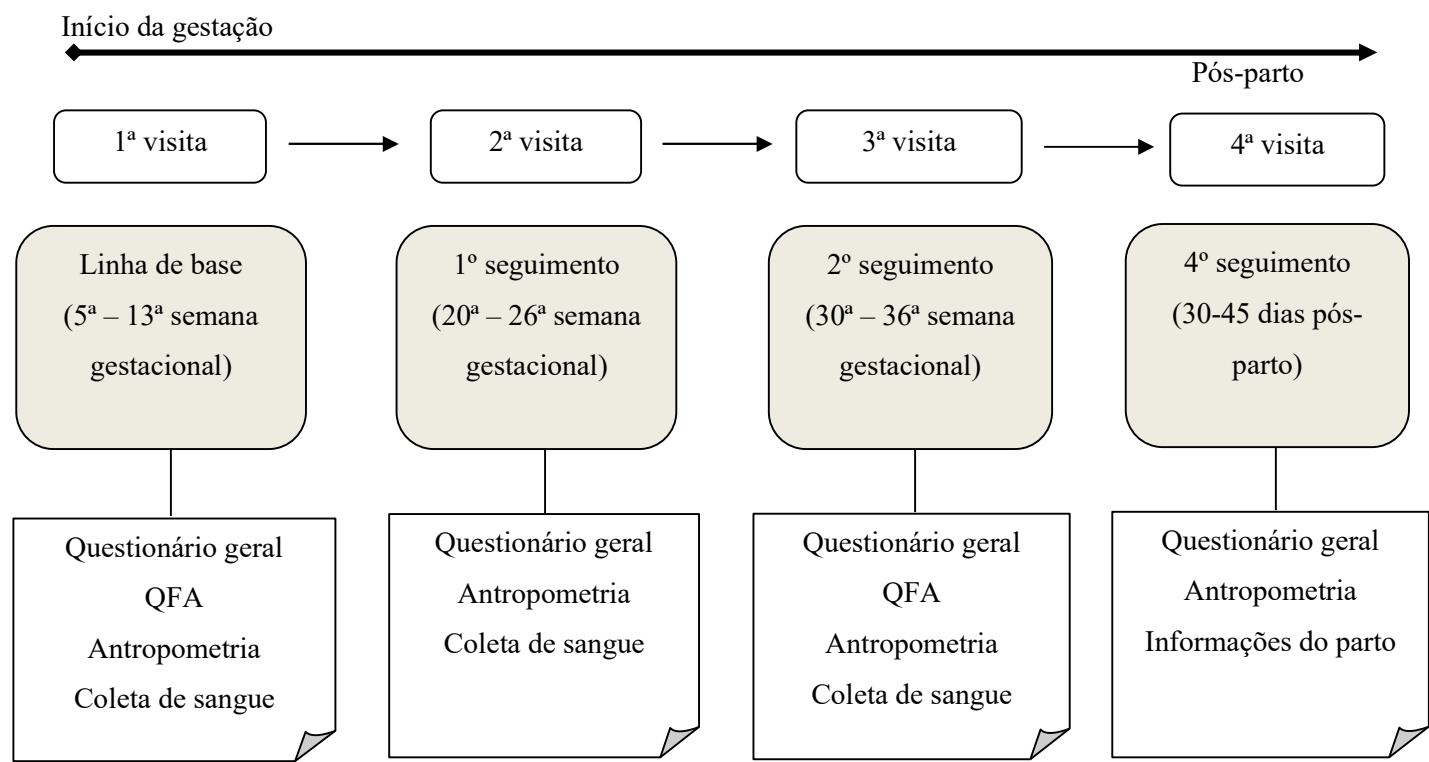
- ii. Avaliar a associação entre as concentrações séricas de vitamina D em cada trimestre e sua variação ao longo da gestação e o peso ao nascer, índice de Apgar, risco de PIG, GIG e prematuridade.

## 6. Métodos

### 6.2 Desenho do estudo

O presente estudo baseia-se em uma coorte prospectiva com gestantes adultas saudáveis atendidas no Centro Municipal de Saúde Heitor Beltrão (CMSHB), na Tijuca, Rio de Janeiro, Brasil, no período de novembro de 2009 a outubro de 2011.

As gestantes foram acompanhadas ao longo do pré-natal e realizaram entrevistas e coleta de sangue em três momentos da gestação, uma em cada trimestre: entre 5<sup>a</sup>-13<sup>a</sup> SG, 20<sup>a</sup>-26<sup>a</sup> SG e 30<sup>a</sup>-36<sup>a</sup> SG. Adicionalmente, em um momento entre 30 e 45 dias pós-parto, as mulheres compareceram apenas para realização de entrevista.



Siglas: QFA: questionário de frequência alimentar

**Figura 2.** Fluxograma de acompanhamento e avaliações realizadas nos estudos.

## **6.2 Captação das gestantes**

As gestantes receberam o convite para participar do projeto após ser confirmado resultado positivo do teste imunológico de gravidez ou quando compareceram ao CMSHB para primeira consulta de pré-natal.

Todas as mulheres contatadas responderam a um questionário geral, independentemente de aceitarem ou recusarem participar do estudo, com as seguintes informações: data da última menstruação, idade, escolaridade, peso pré-gestacional, número de filhos, informações sobre doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e infecciosas, local da residência, e local de realização do pré-natal.

## **6.3 Critérios de elegibilidade**

Após o primeiro contato na captação, 322 foram consideradas elegíveis para o estudo gestantes com até 13 SG, com idade entre 20 e 40 anos, livres de doenças infecciosas ou DCNT (exceto obesidade)] e com acompanhamento pré-natal no CMSHB. Dessas, 299 gestantes concordaram em participar do projeto.

## **6.4 Critérios de exclusão**

Para as análises do artigo 1, foram excluídas mulheres que sofreram aborto espontâneo (n=25), hipertensão arterial crônica (n=3), gestação múltipla (n=4), diagnóstico de doença infecciosa ou não transmissível após o início do estudo (n=11), gravidez avançada ( $\geq 14$  SG, n=15) confirmada após inclusão no estudo, que mudaram de local de atendimento no pré-natal (n=7), natimorto (n=5), sem análise de vitamina D medida na linha de base (n=30), que informaram alteração de glicemia (n=12) e que não realizaram as demais análises bioquímicas (n=1).

No artigo 2, foram excluídas mulheres que sofreram aborto espontâneo (n=25), hipertensão arterial crônica (n=3), gestação múltipla (n=4), diagnóstico de doença infecciosa ou não transmissível após o início do estudo (n=11), gravidez avançada ( $\geq 14$  SG, n=15) confirmada após inclusão no estudo, que mudaram de local de atendimento no pré-natal (n=7), natimorto (n=5), não compareceram à consulta de linha de base (n=5), sem análise de vitamina D medida na linha de base (n=26), sem informação de peso ao nascer (n=13), sem informação de comprimento ao nascer (n=3), com IG no parto  $> 42$  semanas (n=1), informação equivocada no registro de IG no parto (n=1).

## 6.5 Coleta de dados

Na primeira consulta da gestante com a equipe da pesquisa, era coletada amostra de sangue, realizada antropometria e agendado o retorno ainda no primeiro trimestre para aplicação do questionário geral (**Anexo Online 1**) com dados sociodemográficos, de condições de saúde, entre outros. Nos seguimentos do segundo e terceiro trimestres, as mulheres retornavam para coleta de sangue, pesagem e aplicação de questionário geral (**Anexos Online 2**).

## 6.6 Variáveis do estudo

### 6.6.1 Variável dependente

#### *Artigo 1*

Os marcadores do metabolismo glicídico (glicemia e insulina), adiponectina e leptina foram avaliados na fração sérica. A coleta de sangue foi realizada na linha de base e nas duas ondas de seguimento do estudo por um profissional qualificado, previamente treinado, seguindo protocolo de jejum de 12 horas. Após o sangue ser devidamente coletado, foi centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rotações por minuto e o soro e o plasma foram separados e armazenados em freezer a -80°C para análises posteriores.

A glicemia de jejum foi estimada por método colorimétrico enzimático, por meio da utilização de kits comerciais (Linco Research, St. Charles, Missouri, EUA e Wiener Lab., Rosario, Argentina, respectivamente). As concentrações de insulina foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) por meio de kits comerciais específicos projetados para amostras humanas (Millipore, St. Charles, MO, EUA), com sensibilidade de 2 $\mu$ U/ml. O HOMA-IR foi calculado com base na multiplicação da insulina de jejum ( $\mu$ U/mL) e glicose (mmol/L) dividido por 22,5. As adipocinas foram avaliadas por ELISA, com sensibilidades de 0,78 ng/mL para adiponectina e 0,5 ng/dL para leptina.

#### *Artigo 2*

O PN (g), comprimento ao nascer (cm) e índice de Apgar no primeiro minuto (escore) foram obtidos na caderneta de vacinação infantil na visita pós-parto. Os escores-z de PN e comprimento ao nascer foram calculados com base nas tabelas e gráficos do INTERGROWTH-21st, de acordo com o sexo e a IG (VILLAR; CHEIKH ISMAIL; VICTORA; OHUMA *et al.*, 2014). Os valores dos percentis do

INTERGROWTH-21st também foram utilizados para a classificação do PN para a IG no nascimento, sendo classificado em adequado para IG (AGA; entre percentil 10 e 90), PIG (percentil <10) ou GIG (percentil > 90). Os gráficos do INTERGROWTH-21st incluem RN nascidos entre 24 e 42 SG, permitindo a inclusão de recém-nascidos prematuros. A IG ao parto foi calculada com base na data de nascimento relatada na consulta pós-parto. O nascimento prematuro foi classificado como IG ao nascimento <37 semanas.

### **6.6.2 Variável independente**

Para a mensuração da 25(OH)D, foi utilizada a fração plasmática do sangue coletado na linha de base. As amostras foram enviadas ao laboratório *Quest Diagnostics Nichols Institute* (San Juan Capistrano, CA, EUA), o qual é reconhecido pelo programa de padronização de hormônios coordenado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças. Foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC/MS), método considerado padrão ouro. Nesta técnica, as proteínas são extraídas por precipitação e posteriormente são separadas por cromatografia líquida para então serem detectadas e quantificadas por meio de espectrometria de massa. A faixa de medição analítica é de 10-640 nmol/L e o coeficiente de variação é <10%.

As concentrações plasmáticas de 25(OH)D foram categorizadas segundo os pontos de corte preconizados pela IOM e pela ES em insuficiente (IOM <50 nmol; ES <75 nmol/L) ou suficiente (IOM ≥50 nmol/L; ES ≥75 nmol/L), respectivamente.

### **6.6.3 Co-variáveis**

Um questionário estruturado (**Anexos 1, 2 e 3**) foi utilizado para obtenção das co-variáveis investigadas no estudo maior. Para as presentes análises, as seguintes co-variáveis foram utilizadas: idade (anos), estado marital (casada ou em relacionamento estável/solteira), renda familiar per-capita (USD\$), educação (anos), hábito de fumar (não fumante/fumante atual ou ex-fumante), consumo de álcool (não/sim), intervalo interpartal (nulípara ou  $\geq 48$  meses/< 48 meses), cor da pele (branca/não branca) e alteração da glicemia auto-referida (não/sim).

A IG (semanas) foi calculada baseada na primeira ultrassonografia (USG) obstétrica realizada antes da 26<sup>a</sup> semana de gestação. Quando esta informação não estava disponível, foi utilizada a data da última menstruação (DUM).

As medidas antropométricas foram realizadas por avaliadores de acordo com os procedimentos padronizados descritos por Gordon *et al.* (1988). As mulheres foram pesadas em balança digital (Filizzola PL 150, Filizzola Ltda, Brasil) com capacidade de 150 kg e variação de 0,1 kg em cada trimestre gestacional. A altura foi mensurada em duplicata por meio de estadiômetro portátil (Seca Ltd., Hamburgo, Alemanha) fixado à parede, com limite de 220 cm e escala de 0,1 cm. O índice de massa corporal (IMC) [peso (kg)/altura (m<sup>2</sup>)] foi calculado a partir do peso aferido e da altura mensurada no primeiro ponto de seguimento.

O consumo energético (Kcal) foi estimado a partir de um questionário de frequência alimentar (QFA) semi-quantitativo, que foi relativamente validado com a população adulta do Rio de Janeiro (GIACOMELLO; SCHMIDT; NUNES; DUNCAN *et al.*, 2008) na linha de base e no terceiro trimestre, ambos referentes ao consumo alimentar nos últimos seis meses anteriores à entrevista (SICHERI; EVERHART, 1998) (**Anexo 4**).

O QFA utilizado era constituído de uma lista que contém 82 alimentos e com oito opções de resposta de frequência de consumo, as quais: 3x/dia; 2 a 3x/dia; 1x/dia; 5 a 6x/semana; 2 a 4x/semana; 1x/semana; 1 a 3x/mês e nunca ou quase nunca. As respostas obtidas foram transformadas para frequências diárias e, a partir destes dados, utilizou-se o software Dietysys do ‘National Cancer Institute’ (NCI - USA) para estimar-se o consumo de nutrientes e calorias. A base de dados empregada foi a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO (NEPA-UNICAMP, 2011). Quando não disponíveis os dados, utilizou-se a tabela de composição de alimentos americana do ‘United States Department of Agriculture’ (USDA, 2011).

#### **6.6.4 Análises estatísticas**

##### *Artigo I*

Inicialmente, avaliou-se a distribuição das variáveis de interesse. Para avaliação da normalidade, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. A idade materna, ingestão de vitamina D, renda familiar per-capita, IMC, glicemia, insulina, HOMA-IR, adiponectina e leptina não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk valor de p <0,05). Por essa razão, as características da amostra foram descritas usando medianas e intervalos interquartilares. Os dados categóricos foram apresentados como valores absolutos (n) e frequências relativas (%). As características na linha de base foram estratificadas de acordo com o status da vitamina D (suficiência versus insuficiência).

Para comparar medianas e frequências, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney e o teste qui-quadrado, respectivamente.

Análises de perda de seguimento foram realizadas para verificar a possível ocorrência de viés de seleção, comparando as medianas ou frequências dos dados de primeiro trimestre das gestantes que completaram o estudo com aquelas que foram perdidos ao longo do acompanhamento por meio dos testes U de Mann-Whitney e qui-quadrado, respectivamente. Foram consideradas as seguintes variáveis nessa análise: status de vitamina D de acordo com os pontos de corte estipulados pela IOM e pela ES, ingestão de vitamina D, idade, IMC, renda familiar per-capita, glicemia, insulina, HOMA-IR, concentrações de adiponectina e leptina, paridade, cor da pele auto-referida e estação do ano.

Modelos de regressão de efeitos mistos para dados longitudinais foram realizados para avaliar as associações longitudinais do estado de vitamina D no primeiro trimestre com os desfechos ao longo da gestação. Este processo de modelagem permite a inclusão de variáveis tempo dependentes e independentes, é robusto para lidar com intervalos de tempo que não seja equidistantes e considera a correlação entre medidas repetidas (SINGER; WILLETT, 2003; TWISK, 2013) Singer & Willett, 2003; Twisk, 2013). Foi incluído termo de interação entre vitamina D no 1º trimestre e a IG (variável tempo do modelo) para explorar o comportamento longitudinal dos desfechos avaliados. Os modelos foram ajustados para fatores de confusão selecionados por significância estatística ( $p < 0,2$ ) na análise bivariada para cada um dos cinco desfechos. Como o teste estatístico para avaliar interação possui baixo poder analítico, foi considerado  $p < 0,1$  como um limiar para definir a significância estatística para o termo de interação e  $p < 0,05$  para as variáveis de efeito principal. Gráficos de dispersão contendo predição longitudinal e intervalos de confiança de 95% foram construídos para ilustrar a variação na glicemia e as concentrações de adipocinas durante a gestação de acordo com o estado da vitamina D na linha de base.

Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico Stata 12.0 (Stata Corporation, College Station, TX). As interações significativas identificadas nos modelos longitudinais foram ilustradas por gráficos plotados com o software RStudio 3.3.1 (45).

Os roteiros das principais análises desenvolvidas estão disponíveis no **anexo 5**.

*Artigo 2*

Na linha de base, as características das gestantes foram descritas usando médias e desvios-padrão (DP) para variáveis contínuas e frequências absolutas (n) e relativas (%) para variáveis categóricas. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por histogramas e avaliação de medidas de curtose, assimetria e teste de Shapiro Wilk. Três variáveis apresentaram distribuição assimétrica (PN, comprimento ao nascer e índice de Apgar), mas a assimetria não foi alta e as possíveis transformações não melhoraram a distribuição e tornariam mais complexas a interpretação dos resultados. Assim, foram assumidas como normais.

A vitamina D foi analisada usando duas abordagens diferentes. A primeira considerou a vitamina D em cada momento (trimestre) e a segunda usou um método de dois estágios para avaliar a associação entre a taxa de variação da vitamina D durante a gestação e os desfechos neonatais. Para esta etapa, foi aplicado um modelo linear de efeitos mistos para dados longitudinais, incluindo a IG (semanas) como efeitos aleatórios e, a partir dessa regressão, foi estimada a melhor predição linear imparcial (*best linear unbiased prediction*, BLUP) de coeficientes aleatórios (CHEN; FERGUSON; MEEKER; MCELRATH *et al.*, 2015). A partir desse modelo, obteve-se o valor de intercepto predito, ou seja, a concentração média de vitamina D quando a IG seria zero e coeficiente angular da reta predita (*slope*), que representa a taxa estimada de mudança da vitamina D no tempo, nesse caso SG. O segundo estágio compreendeu a inclusão do coeficiente angular da reta da vitamina D e do intercepto obtidos na análise de BLUP como exposições nos modelos de regressão.

Modelos de regressão linear foram utilizados para avaliar a associação entre cada medida trimestral de vitamina ou sua variação semanal e PN (g), escore-z de PN, comprimento ao nascer (cm), escore-z de comprimento ao nascer e índice de Apgar. Também foram plotados gráficos de dispersão para ilustrar a relação entre a variação semanal de vitamina D e o escore-z de PN e comprimento ao nascer. A vitamina D foi avaliada como uma variável contínua, uma vez que os desfechos categóricos já apresentam baixas prevalências e isto poderia reduzir a força das associações. A associação entre vitamina D e desfechos categóricos (PIG/GIG; parto prematuro) foi avaliada por meio de regressão de Poisson com variância robusta, sendo *incidence-rate ratios* (IRR) o estimador de risco utilizado.

Todos os modelos multivariados foram ajustados para fatores de confusão selecionados definidos anteriormente com base na literatura e em gráficos acíclicos

direcionados (DAG). Os DAGs são diagramas pelos quais é possível traçar caminhos teóricos causais entre variáveis, indicar fatores de confusão e determinar o conjunto mínimo de fatores de confusão para ajustar os modelos analíticos (MM GREENLAND S, 2008). Os DAGs foram construídos com daggity (TEXTOR; HARDT; KNÜPPEL, 2011). Um conjunto único de fatores de confusão foi selecionado para todos os resultados e incluiu escolaridade materna, IMC no início da gestação, cor da pele, hábito de fumar, consumo de álcool e consumo calórico (**Figura 2 do artigo 2**). Além disso, os RN prematuros foram excluídos dos modelos de PN, comprimento ao nascer e Índice de Apgar, uma vez que o ajuste para IG não foi indicado pelo DAG e a adição desses casos poderia alterar a distribuição dos modelos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Stata Data Analysis and Statistical Software (Stata, versão 15) (STATAcorp, 2017).

Os roteiros das principais análises desenvolvidas estão disponíveis no **anexo 6**.

## **6.7 Aspectos éticos**

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Escola (número do protocolo: 0023.0.361.000-08), pelo Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro [IPUB (número do protocolo: 0012.0.249.000) ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) da cidade do Rio de Janeiro (número do protocolo: 0139.0.314.000-09; (**Anexo 7**). Todas as participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 8**).

## **7. Resultados**

A seção de resultados está dividida em dois artigos, sendo um publicado e um submetido.

### **Artigo 1 (publicado)**

*“Longitudinal Association of 25-Hydroxyvitamin D with Adipokines and Markers of Glucose Metabolism among Brazilian Pregnant Women”.*

### **Artigo 2**

*“Vitamin D during pregnancy and its association with birth outcomes: a Brazilian cohort”.*

### 7.1 Artigo 1. (Anexo 9)

*Longitudinal Association of 25-Hydroxyvitamin D with Adipokines and Markers of Glucose Metabolism among Brazilian Pregnant Women – British Journal of Nutrition*

#### Abstract

This study aimed to evaluate the longitudinal association of vitamin D status with glycaemia, insulin, Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), adiponectin and leptin. A prospective cohort with 181 healthy, pregnant Brazilian women was followed at the 5<sup>th</sup>–13<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>–26<sup>th</sup>, and 30<sup>th</sup>–36<sup>th</sup> gestational weeks. In this cohort, 25(OH)D plasma concentrations were analysed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Vitamin D status was categorized as sufficient or insufficient using the Endocrine Society Practice Guidelines (ESPG) ( $\geq 75$ / $<75$  nmol/L) and the Institute of Medicine (IOM) ( $\geq 50$ / $<50$  nmol/L) thresholds. Linear mixed-effect regression models were employed to evaluate the association between vitamin D status and each outcome, considering the interaction terms between vitamin D status and gestational age ( $P < 0.1$ ). At baseline, 70.7% of pregnant women had 25(OH)D levels  $<75$  nmol/L and 16% had levels  $<50$  nmol/L. Women with sufficient vitamin D status at baseline, using both the ES and IOM thresholds, presented lower glycaemia than those with insufficient 25(OH)D. Pregnant women with 25(OH)D concentrations  $<75$  nmol/L showed lower insulin ( $\beta = -0.12$ ; 95% CI -0.251, 0.009;  $P = 0.069$ ) and adiponectin ( $\beta = -0.070$ ; 95% CI -0.150, 0.010;  $P = 0.085$ ) concentrations throughout pregnancy than those with 25(OH)D levels  $\geq 75$  nmol/L. Pregnant women with 25(OH)D  $<50$  nmol/L at baseline presented significantly higher leptin concentrations than those with 25(OH)D levels  $\geq 50$  nmol/L ( $\beta = -2.532$ ; 95% CI -0.436, 5.551;  $P = 0.094$ ). The baseline status of vitamin D influences the biomarkers involved in glucose metabolism. Vitamin D sufficient women at baseline had higher increases of insulin and adiponectin changes throughout gestation than those who were insufficient.

## Introduction

Prevention of gestational diabetes mellitus (GDM) is a key intervention to circumvent the maternal and foetal consequences of this disease. The primary method of preventing GDM is by lifestyle changes, such as physical activity and diet<sup>(1)</sup>. One important modifiable risk factor is vitamin D deficiency among pregnant women. Vitamin D deficiency is considered highly prevalent worldwide and often persists during pregnancy<sup>(2,3)</sup>. Studies have suggested that low concentrations of vitamin D may be associated with alterations in glucose metabolism<sup>(4)</sup>, can be a risk factor for GDM<sup>(5-7)</sup> and are characterized by glucose intolerance or glycaemia values higher than the normal range when detected during pregnancy<sup>(8)</sup>.

One possible mechanism by which vitamin D may act on glucose metabolism is by increasing adiponectin secretion<sup>(9,10)</sup>. This adipokine has insulin sensitization properties of the target cells (liver, skeletal muscle and adipose tissue) and can enhance glucose uptake in muscle tissue<sup>(11-13)</sup>. Adiponectin also protects  $\beta$ -cells from immune attack and reduces insulin resistance through immunoregulatory and anti-inflammatory effects<sup>(11-14)</sup>. In pregnant women, adiponectin concentrations have been inversely associated with adverse maternal outcomes, such as GDM<sup>(15,16)</sup>, overweight, and obesity<sup>(17)</sup>. During pregnancy, a reduction in maternal plasma adiponectin concentrations is expected<sup>(18,19)</sup>. Many factors can influence the expression of this adipokine. Vitamin D concentration is one example<sup>(13,20)</sup>, as it down-regulates pro-inflammatory cytokines and up-regulates anti-inflammatory cytokines. Vitamin D appears to be positively associated with adiponectin gene expression, and suppresses the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) components secreted by adipocytes, thus contributing to increased adiponectin secretion<sup>(20-22)</sup>. Low 25(OH)D concentrations may then reduce the secretion of adiponectin and could be considered a risk factor for GDM and insulin resistance<sup>(13,23,24)</sup>.

Leptin is a hormone that regulates lipid metabolism and inflammation by influencing glucose metabolism in an inverse manner to adiponectin, i.e., it reduces insulin sensitivity<sup>(25)</sup>. Leptin is directly associated with preeclampsia, GDM and macrosomia<sup>(26,27)</sup>. Studies have shown an inverse association between vitamin D and leptin concentrations<sup>(28-30)</sup>. The mechanism by which vitamin D metabolites impact leptin levels remains unclear. One possible mechanism is that the fat solubility of vitamin D can cause it to be sequestered in fat tissues, leading to a high level of intracellular calcium, which increases lipogenesis and decreases lipolysis<sup>(31)</sup>. A lower

serum vitamin D may lead to a higher serum leptin since its concentration is related to greater body fat mass<sup>(32,33)</sup>. However, randomized clinical trials have found no association between vitamin D supplementation and changes in leptin concentrations<sup>(31,34)</sup>.

There are few studies evaluating the association between vitamin D status, glycaemia and adipokines during pregnancy, particularly among healthy pregnant women without comorbidities such as GDM<sup>(31,35,36)</sup>. The aim of this study was to evaluate the vitamin D status of pregnant women in the first trimester and, if variation in vitamin D status during pregnancy was associated with changes in adiponectin, leptin and glycaemia concentrations throughout pregnancy among a cohort of healthy Brazilian women.

## Methods

### *Study design*

This study consists of a prospective cohort with healthy pregnant adult women from a public health care centre in Rio de Janeiro, Brazil, carried out from November 2009 to October 2011.

Two hundred and ninety-nine women were invited to participate in the study in accordance with the following eligibility criteria: (a) being between 5-13 weeks of gestation, (b) aged between 20 and 40 years, and (c) without any known infectious or chronic non-communicable diseases (except obesity). Criteria for exclusions after baseline clinical evaluation consisted of the following: miscarriages ( $n=25$ ), chronic arterial hypertension ( $n=3$ ), multiple gestation ( $n=4$ ), diagnosis of infectious or non-communicable disease after starting the study ( $n=11$ ), advanced pregnancy ( $\geq 14$  weeks of gestation,  $n=15$ ), prenatal care withdrawn ( $n=7$ ), stillbirth ( $n=5$ ), no vitamin D measured at baseline ( $n=30$ ), self-reported glycaemia alteration ( $n=12$ ), and no biochemical analyses performed ( $n=1$ ).

### *Biochemical analyses*

Venous blood samples were taken after a 12 h overnight fasting at three different visits (first, second, and third gestational trimesters). Samples were immediately centrifuged (5,000 rpm for 5 minutes), aliquoted and stored at -80°C until further analysis. Plasma samples were used to determine 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] (nmol/L), leptin (ng/dL) and adiponectin (ng/mL) concentrations.

## Main independent variable

Plasma 25(OH)D concentrations were analysed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) at the Quest Diagnostics Nichols Institute laboratory (San Juan Capistrano, CA, USA) using the LC Thermo Cohesive System coupled to a Thermo Quantum Ultra Mass Spectrometer (Thermo Fisher; San Jose, CA, USA). This method is the gold standard with analytical measurement range of 10-640 nmol/L and the coefficient of variation <10%.

The 25(OH)D concentrations at baseline (5<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> gestational weeks) were used to determine vitamin D status. Pregnant women were categorized as being vitamin D sufficient or insufficient, using two cut-points based on the Endocrine Society Practice Guidelines (ESPG) and the Institute of Medicine (IOM). According to the ESPG, vitamin D sufficiency and insufficiency are defined as having 25(OH)D concentrations  $\geq 75$  nmol/L and  $<75$  nmol/L, respectively<sup>(2)</sup>. Using the IOM cut-points, sufficiency and insufficiency were defined as 25(OH)D concentrations  $\geq 50$  nmol/L or  $<50$  nmol/L, respectively<sup>(37)</sup>. There are controversies in the literature, as to which cut-point of vitamin D for insufficiency is the most appropriate. There is also no specific guideline set forth for pregnant women. We have decided to report both cut-points, to increase transparency and to allow for comparability between various studies in the literature.

## Dependent variables

Serum fasting glycaemia was estimated by enzymatic colorimetric methods, using commercial kits (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA and Wiener Lab., Rosario, Argentina, respectively) and insulin concentrations were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using specific commercial kits designed for humans (Millipore, St. Charles, MO, USA), with sensitivity of 2 µU/ml. HOMA-IR was calculated based on the product of fasting insulin (µU/mL) and glucose (mmol/L) divided by 22.5<sup>(38)</sup>. The adipokines were evaluated using ELISA, with sensitivities of 0.78 ng/mL for adiponectin and 0.5 ng/dL for leptin.

## Covariate assessment

A structured questionnaire administered at baseline was used to collect information on study population characteristics including: age (y), per-capita monthly household income (USD), parity (nulliparous or primiparous/multiparous) and self-

reported skin colour (white, black or mixed). Date of first blood collection was used to define the season at baseline (summer, autumn, winter and spring).

Anthropometric measurements were collected according to standardized procedures at baseline<sup>(39)</sup>. Weight was measured using a digital scale (Filizzola PL 150, Filizzola Ltda., São Paulo, Brazil) at each gestational trimester and height was measured in duplicate using a portable stadiometer (Seca Ltda., Hamburg, Germany). The early pregnancy Body Mass Index (BMI) was calculated using the formula: weight at baseline (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). The gestational age was obtained from the first ultrasonography (USG) exam (92.3%; n = 167) or using the reported date of the last menstrual period if the USG was not performed before the 24<sup>th</sup> week of gestation (7.7%; n = 14).

The total dietary vitamin D intake (IU/day) was calculated using Nutritional Composition Tables from the Brazilian Institute of Geography and Statistics<sup>(40)</sup> according to a semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ)<sup>(41)</sup>. The FFQ was validated for the adult population of Rio de Janeiro<sup>(41)</sup>, and administered in the first trimester of gestation by trained interviewers and referring to intake of the last six months. Data on vitamin D supplementation was self-reported throughout pregnancy (first, second and third trimesters).

### ***Statistical analysis***

Data distribution was analysed according to the Shapiro-Wilk test. Maternal age, vitamin D intake, per-capita family income, early pregnancy BMI, glycaemia, insulin, HOMA-IR, adiponectin and leptin were not normally distributed (Shapiro-Wilk test p-value <0.05). The sample characteristics are described using medians and interquartile ranges (IQR). Categorical data are presented as absolute values (n) and relative frequencies (%). Baseline characteristics were stratified according to vitamin D status (sufficiency v. insufficiency). To compare medians and frequencies, the Mann-Whitney U test and the chi-squared test were used, respectively.

Dropout analyses were performed to verify the presence of selection bias comparing those who completed the study to those who were lost to follow-up. The following variables were considered: vitamin D status according to thresholds, dietary vitamin D intake, age, early pregnancy BMI, per-capita family income, glycaemia, insulin, HOMA-IR, adiponectin and leptin concentrations, parity, self-reported skin colour and season at recruitment.

Scatter plots containing longitudinal prediction, and 95% confidence intervals (CIs) were constructed to illustrate the variation in glycaemia and adipokine concentrations during pregnancy according to vitamin D baseline status.

Linear mixed effect (LME) models were performed in order to assess the longitudinal associations of vitamin D baseline status with the outcomes throughout pregnancy. The modelling process allows the inclusion of time-dependent and time-independent variables, it is robust to deal with unbalanced time intervals, and considers the correlation between repeated measures<sup>(42,43)</sup>. Interactions between vitamin D baseline status and gestational age were considered to explore the longitudinal behaviour of the evaluated outcomes. The LME models were adjusted for confounders selected by biological plausibility and statistical significance ( $p < 0.2$ ) in the bivariate analysis for each of the five outcomes (glycaemia, insulin, HOMA-IR, adiponectin and leptin). The test to detect interactions was low powered. We considered  $P < 0.1$ <sup>(44)</sup> as a threshold to define statistically significance for the interaction terms and  $P < 0.05$  for the main effect variables.

All analyses were performed in Stata 12.0 (Stata Corporation, College station, TX). The significant interactions identified in the LME models were illustrated by graphs plotted with RStudio 3.3.1 software<sup>(45)</sup>.

### Ethical approval

This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The Rio de Janeiro Federal University Maternity Hospital Ethics Committee (Protocol number: 0023.0.361.000-08), and the Municipal Secretary of Rio de Janeiro Ethics Committee (Protocol number: 0139.0.314.000-09) approved all procedures involving human subjects. All participants signed an informed consent about participation in the study.

### Results

The baseline sample comprised of 181 pregnant women. From baseline to the second trimester follow-up, eleven women moved out from the prenatal program, two withdrew consent, four abandoned prenatal care at the study site, twelve missed the follow-up interview and one had no biochemical analyses performed, leaving a sample of 151 women at the second trimester. From the second to the third visit, six women were classified as lost to follow-up and seven had no biochemical analyses performed.

Eleven women missed the second trimester interview, but returned to the study in the third trimester. Therefore, our final sample at the third trimester comprised 149 women (Supplemental figure 1).

In total, 149 women completed the study and 32 were lost to follow-up. There were no significant differences between women who completed the study compared to those who were lost during follow-up (Supplemental table 1).

At baseline, women had a median age of 26 y (22.0-31.0), early pregnancy BMI of 23.7 kg/m<sup>2</sup> (21.9-27.0), per-capita family income of 292.4 USD (184.8-421.0) and reported a vitamin D intake of 134.2 IU/day (84.2-185.4), and 46.9% self-reported their skin colour to be mixed. The prevalence of vitamin D insufficiency was 70.7% (*n*=128/181) according to cut-offs set by ESPG and 16.0% (*n*=29/181) according the cut-offs proposed by the IOM. Women who began the study in the winter, compared to the summer, were more likely to be vitamin D insufficient (ESPG: 33.6% v. 15.6%, respectively, *P*<0.001; IOM: 51.7% v. 3.5%, respectively, *P*<0.001) (Table 1). None of the women who participated in the study received nutritional vitamin D supplementation (data not shown).

Pregnant women with vitamin D sufficiency at baseline showed lower glycaemia when compared with insufficient women (ESPG: median 79.5 v. 84.0 mg/L, respectively, *P*=0.003; IOM: median 83.0 v. 84.0 mg/L, respectively, *P*=0.034) (Table 2). The glycaemia decreased from the first to the second trimester, followed by a slight increase from the second to the third trimester onwards, in both women with vitamin D sufficiency and insufficiency at baseline (Fig. 1A and 1B). However, the rate of change throughout pregnancy for glycaemia did not show a significant difference between the baseline vitamin D groups (Table 3). Similar results were observed when 25(OH)D throughout pregnancy was analysed (Fig. 2A; 2B and Table 4).

The rate of change of insulin was greater among vitamin D sufficient women at baseline (ESPG:  $\beta$ =0.166; 95% CI 0.047, 0.285; *P*=0.006; IOM:  $\beta$ =0.091; 95% CI 0.019, 0.162; *P*=0.013) (Fig. 1C and 1D). There was a less-pronounced increase of insulin throughout pregnancy among vitamin D insufficient women compared to those who started with sufficient status according to ESPG (interaction  $\beta$ =-0.12; 95% CI -0.251, 0.009; *P*=0.069) (Table 3). We found significant results when 25(OH)D throughout pregnancy was analysed using the IOM thresholds (interaction  $\beta$ =-0.153; 95% CI -0.325, 0.018, *P*=0.080) (Fig. 2C and 2D and Table 4).

There was a tendency of lower HOMA-IR in the group of women classified as sufficient vitamin D status at baseline when compared with those with vitamin D insufficient status (ESPG: median 0.65 v. 0.93, respectively,  $P=0.062$ ; IOM: median 0.82 v. 1.14, respectively,  $P=0.071$ ) (Table 2). HOMA-IR increased throughout gestation among women with sufficient vitamin D status at baseline (ESPG:  $\beta=0.019$ ; 95% CI 0.00001, 0.039;  $P=0.050$ ) but did not change in the insufficient group (Fig. 1E and 1F). However, the results were not significant for this biomarker when baseline vitamin D- sufficient and insufficient women were compared (Table 3). We found significant results when 25(OH)D was analysed throughout pregnancy using the IOM thresholds (interaction  $\beta=-0.030$ ; 95% CI -0.065, 0.005;  $P=0.094$ ) (Fig. 2E; 2F and Table 4).

The trend in changes in adiponectin throughout pregnancy showed an increase from the beginning of pregnancy until the second trimester and was followed by a slight decrease at the end of gestation for both vitamin D status groups, whether measured at baseline or when 25(OH)D varied throughout pregnancy (Fig. 1G; 1H; 2G; 2H). Women with vitamin D insufficient status at baseline started gestation with higher median plasma levels of adiponectin, although this association was not significant (5.26  $\mu\text{g/ml}$  v. 4.49  $\mu\text{g/ml}$ ,  $P=0.170$ ) (Table 2). However, the adiponectin rate of change throughout pregnancy was significantly higher in women with sufficient vitamin D levels at baseline (ESPG:  $\beta=-0.070$ ; 95% CI -0.150, 0.010;  $P=0.085$ ) (Table 3). The women with sufficient vitamin D status at baseline, according to IOM classification, tended to have a lower rate of change of adiponectin throughout pregnancy, although this did not reach significance (Table 3; Fig. 1H). The adiponectin rate of change throughout pregnancy was significantly higher in women with sufficient vitamin D levels when this marker varied throughout pregnancy (ESPG:  $\beta=-0.056$ ; 95% CI -0.116, 0.004;  $P=0.066$ ) (Table 4).

There were no significant differences in leptin concentrations, comparing each trimester individually, according to ESPG, but it was found that women with inadequate vitamin D status according to IOM presented higher leptin concentrations (Table 2). Women with insufficient vitamin D status according to ESPG had a significant decrease in leptin concentrations ( $\beta=-0.259$ ; 95% CI -0.424, -0.094;  $P=0.002$ ). Using the IOM cut-points, the decrease was significant only within the sufficient group ( $\beta=-0.214$ ; 95% CI -0.360, -0.068;  $P=0.004$ ) (Fig. 1I and 1J). Women with insufficient vitamin D levels presented a greater increase in leptin concentrations, in relation to the sufficient group,

according to IOM ( $\beta=-2,532$ ; 95% CI -0.436, 5.551;  $P=0.094$ ) (Table 3). These results did not hold when 25(OH)D varied throughout pregnancy (Fig. 2I; 2J; Table 4).

## Discussion

The main result of this study is the difference in the variation of adiponectin and insulin concentrations throughout pregnancy according to vitamin D baseline status defined by the ESPG Guidelines. We observed that throughout pregnancy the rate of increase for both biomarkers was greater among women with vitamin D sufficiency compared with women who started their pregnancy in a vitamin D deficient state. Another important finding is that women with insufficient vitamin D at baseline had a higher increase in leptin levels during gestation compared to the sufficient group according to the IOM classification. Additionally, women classified with vitamin D sufficiency, independently of the cut-off criteria, had lower baseline glycaemia, although the rate of change of this biomarker did not differ between the two vitamin D status groups.

The definition of vitamin D sufficiency or insufficiency remains controversial. Currently, there are no specific cut-points for pregnant women, and the same cut-points are used for adults. It is well known that the thresholds for several biomarkers are rarely available for this period of life and the case is not different for vitamin D. Thus, more research is needed to establish the adequate cut-off point for this unique period in women's life. In the current study we opted to use two different thresholds presented by the two governing bodies of vitamin D status: the ESPG and the IOM. This strategy allows comparability with other studies in the literature and provides a broader picture of the studied associations in place. Another aspect of studies conducted during pregnancy that can be misleading is related to the timing vitamin D is assessed during pregnancy. The conclusions may vary if studies consider only baseline vitamin D, e.g. first trimester, what should be a representation of how preconception period affects the parameters evaluated throughout pregnancy. On the other end, if data is available, for several time points this can provide a clearer picture of the trajectory and how this may influence a specific outcome. In general, the directions of the rate of change trajectories for the studied outcomes were similar regardless of the 25(OH)D threshold used. Adiponectin was the exception. Pregnant women with sufficient vitamin D levels at baseline showed significantly higher levels of adiponectin when the ESPG criteria was used, while according to the IOM classification, they showed lower levels, but the

results were not significant. The results regarding the timing of vitamin D assessment yield slight conflicting results for insulin, HOMA-IR and leptin. Again, the direction of the associations remained the same, but the statistical significance of the interaction changed depending on the timing and threshold used. An important finding of this study is that differing conclusions can be made depending on the vitamin D deficiency threshold used or the timing when vitamin D status is evaluated. This is of particular importance when considering the conflicting results in the scientific literature.

The longitudinal data with three time points are an important strength of this study. We did not identify other studies assessing these associations with longitudinal data in the scientific literature. Moreover, the robust statistical analysis of the present study, taking into account the correlations between repeated measures and considering all women had information on at least two time points, is an additional strength. The method used to measure plasma 25(OH)D concentrations was LC-MS/MS, which is considered the gold standard for this marker. Furthermore, we also evaluated dietary vitamin D intake and supplementation. However, limitations, such as losses to follow-up, and the absence of information about sun exposure data, should be acknowledged. To assess whether the losses to follow-up biased our results we examined whether those women who were lost to follow-up differed from those who remained in the study. This analysis shows no significant differences in those who were lost to follow-up, which suggests that losses to follow-up occurred randomly in this study. We also adjusted all models for the season of the year at the time of blood collection, which was used as a proxy for sun exposure, since these data were not available. Additionally, we did not measure the expression of enzymes that are involved in the conversion of vitamin D and the vitamin D receptor (VDR) in the placenta to support extra-renal synthesis of 1,25(OH)2D<sub>3</sub> during pregnancy<sup>(46)</sup>. This could influence the outcomes; however, the maternal kidneys are likely to be the major source of increased maternal serum 1,25(OH)2D<sub>3</sub> during pregnancy<sup>(46)</sup>.

A high prevalence of vitamin D insufficiency according to the ESPG was previously reported in this cohort<sup>(47)</sup>, which is similar to results found for pregnant women in other studies using this threshold<sup>(48, 49)</sup>. Schneuer et al. (2014) observed that 80.4% of 5,109 pregnant women from Australia had vitamin D insufficiency in the first trimester. Flood-Nichols et al. (2015) found that 70% of 235 American women had vitamin D insufficiency in early pregnancy, while 59.0% of 190 Brazilian pregnant women presented vitamin D insufficiency<sup>(50)</sup>. We identified a low intake of vitamin D

during pregnancy (134.2 IU/day) in the present study by considering either the recommendation of the ESPG of 1500-2000 IU/day or the Brazilian recommendations (600 IU/day)<sup>(51)</sup>. We also observed that none of the women used vitamin D supplements, since this is not part of public prenatal care. In Brazil, only supplementation with iron (40 mg) and folic acid (400 mcg) are mandatory for pregnant women<sup>(52)</sup>. Despite low vitamin D dietary intake, we have previously reported a longitudinal increase in 25(OH)D levels throughout pregnancy in this cohort of women<sup>(47)</sup>. Additionally, the level of increase in 25(OH)D concentrations depended on seasonal variation. Pregnant women who started their pregnancy during the winter, spring or autumn seasons had a significant longitudinal increase in 25(OH)D concentrations, while women who began pregnancy during the summer season showed no significant changes in 25(OH)D concentrations throughout pregnancy<sup>(47)</sup>.

In the current cohort, pregnant women with vitamin D insufficiency according to the ESPG had higher glycaemia in the first trimester compared to women with vitamin D sufficiency. This result corroborates findings from an earlier cross-sectional study with 155 Iranian pregnant women. That study showed a significant inverse association between first trimester 25(OH)D concentrations and fasting glucose ( $r=0.238$ ;  $P=0.003$ )<sup>(53)</sup>. On another cross-sectional study, Casey et al. (2018) evaluated the association between vitamin D and glycaemia markers at the third gestation trimester and found no significant association with fasting glucose or HOMA-IR<sup>(54)</sup>. These results are in line with the present findings regarding the third trimester. It seems that the relationship between vitamin D and glucose concentrations may be mediated by the role of vitamin D on insulin action.

Due to increased maternal adiposity and placental production, increased insulin resistance is expected to occur during pregnancy from the 18<sup>th</sup> gestational week until the third trimester<sup>(55)</sup>. Peripheral insulin sensitivity decreases in the third trimester, and the hepatic glucose production increases compared to the beginning of pregnancy<sup>(56)</sup>. Vitamin D appears to play a role in insulin sensitivity, stimulating the expression of the insulin receptors and improving glycaemic metabolism<sup>(57-59)</sup>. Thus, glucose would be better absorbed by the cells and the glycaemia would be at lower levels.

The longitudinal analyses from the present study show that pregnant women with vitamin D sufficiency at baseline had sharper increases in insulin concentration compared to those with vitamin D insufficiency according to both thresholds used. The greater increase of insulin in the group with vitamin D adequacy was not followed by

significant longitudinal increases in glycaemia or HOMA-IR during pregnancy. The active metabolite of vitamin D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] has been shown to be involved in insulin secretion by the pancreas and glucose homeostasis<sup>(14)</sup>. Additionally, pancreatic  $\beta$ -cells are known to have vitamin D receptors and an insulin gene promoter that is stimulated by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , thus indicating a direct association between vitamin D and insulin<sup>(60)</sup>. This mechanism could explain the greater insulin increase among women with vitamin D adequacy compared to those with vitamin D inadequacy in our sample. This result reinforces a small study performed with adults that found that subjects with vitamin D deficiency ( $<50 \text{ nmol/mL}$ ) secrete less insulin than subjects with adequacy status<sup>(61)</sup>.

A recent experimental study investigated the metabolic effects of adiponectin on maternal glucose and lipid metabolism by comparing pregnant rats with and without adiponectin deficiency<sup>(62,63)</sup>. The authors observed that adiponectin stimulated the  $\beta$  cell proliferation and impaired the islet mass without differences in insulin sensitivity effects in comparison to the deficient group<sup>(4,62,63)</sup>. This finding allows suggesting another mechanism on insulin besides the well-established insulin-sensitizing property of this adipokine<sup>(62,63)</sup>. In humans, pregnant women present this phenomenon of  $\beta$  cell proliferation without increase in islet mass, but this particular study was limited because it was conducted in women who died during pregnancy<sup>(64)</sup>. However, it is possible that adiponectin also exerts an effect on human cell proliferation<sup>(62)</sup>. Vitamin D could stimulate the adiponectin secretion, which in turn, stimulates beta-cell proliferation, increasing insulin secretion. This explanation would support our results of greater increases in adiponectin and insulin in pregnant women with vitamin D adequacy status during pregnancy.

We found an association between vitamin D status and the rate of change in adiponectin during pregnancy. In the present study, pregnant women with adequate levels of  $25(\text{OH})\text{D}$  in the first trimester showed a sharper increase in adiponectin concentration throughout pregnancy when compared to women with inadequate levels of vitamin D. Additionally,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  is known to regulate the renin-angiotensin system (RAS) in a negative feedback loop by binding with a transcription factor necessary for the expression of renin<sup>(65)</sup>. Inhibition of RAS results in increased levels of adiponectin and improved insulin sensitivity, which exerts influence on glycaemia<sup>(20)</sup>. This mechanism of action can explain our result of higher increase of adiponectin among pregnant women with adequate  $25(\text{OH})\text{D}$  levels compared to those with inadequate levels.

Previous studies found direct associations between vitamin D and adiponectin independently of BMI in both young and adult populations<sup>(66-68)</sup>, but no studies were found with pregnant women.

No differences were observed in mean adiponectin and leptin concentrations between pregnant women with vitamin D adequacy or inadequacy at each gestational trimester, i.e., cross-sectional analysis. Similarly, a case-control study conducted by McManus et al. (2014)<sup>(69)</sup> also found no correlation between 25(OH)D and adipokine concentrations during the third trimester in both healthy pregnant women and pregnant women with GDM.

A meta-analysis conducted in 2016 showed that vitamin D supplementation increased the serum leptin concentrations although a meta-analysis using cross-sectional studies with non-pregnant subjects found inverse associations between 25(OH)D and leptin levels (Fisher's Z=-0.93; 95% CI: -0.95, -0.91)<sup>(31)</sup>. In the present cohort, it was observed that pregnant women with vitamin D sufficiency showed a less pronounced increase in leptin until the second trimester and a higher decrease until the end of gestation, although this did not reach significance. Similarly, Walsh et al. (2013) evaluated the correlation between 25(OH)D and leptin levels at early pregnancy and 28 weeks of gestation and found a negative association that was not significant<sup>(70)</sup>.

## **Conclusion**

Pregnant Brazilian women with vitamin D adequacy [25(OH)D  $\geq$ 75 nmol/L] at the first trimester had a higher rate of increase in adiponectin and insulin concentrations throughout pregnancy compared to women with vitamin D inadequacy [25(OH)D <75 nmol/L]. These results indicate that vitamin D status at the beginning of gestation may influence the changes in adiponectin and insulin during pregnancy. Although these women had higher values of insulin, there were no higher glycaemia values, showing that there was an adequate metabolic response. This result reinforces the importance of monitoring the vitamin D status of pregnant women in the first trimester of pregnancy in order to achieve a favourable metabolic profile for reducing the risk of undesired pregnancy outcomes. Given the scarcity of studies, there is a need for research involving pregnant women to evaluate this relationship and to provide further evidence on this topic.

## Acknowledgment

The authors are grateful to all participants of the cohort study, to the Municipal Health Centre Heitor Beltrão for giving us the space and allow the completion of data collection; to the Quest Diagnostics Nichols Institute laboratory (San Juan Capistrano, CA, USA) for performing the analyses of vitamin D. Additionally, to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq in the Portuguese acronym; grant number: 471196/2010-0) and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ in the Portuguese acronym, grant number E-26/111.400/2010, E\_14/2010) for the financial support. FAPERJ and CNPq had no role in the design, analysis or writing of this article.

## The authors declare no conflict of interest.

Benaim C, Cocate P, Kac G formulated the research question, designed the study and developed the protocol. Benaim C and Cocate P conducted the statistical analysis, and Alves-Santos NH provided support for statistical analysis. Barros E, Franco-Sena AB, Figueiredo A, Lepsch J, Adegbeye AA, Holick M and Mokhtar R assisted with the literature searches and with the writing of the manuscript. All authors substantially have contributed to and have approved the final version of this manuscript.

## References

1. Donazar-Ezcurra M, López-Del Burgo C, Bes-Rastrollo M (2017). Primary prevention of gestational diabetes mellitus through nutritional factors: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth* **17**, 30.
2. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA *et al* (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 1911-30.
3. Wei SQ, Qi HP, Luo ZC *et al* (2013). Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Maternal Fetal Neonatal Medicine* **26**:889-99.
4. Amegah AK, Klevor MK, Wagner CL (2017). Maternal vitamin D insufficiency and risk of adverse pregnancy and birth outcomes: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *PLoS One* **12**:e0173605.

5. Lau SL, Gunton JE, Athayde NP *et al* (2011). Serum 25-hydroxyvitamin D and glycated haemoglobin levels in women with gestational diabetes mellitus. *Med J Aust*, 194334-7.
6. Loy SL, Lek N, Yap F *et al* (2015). Association of Maternal Vitamin D Status with Glucose Tolerance and Caesarean Section in a Multi-Ethnic Asian Cohort: The Growing Up in Singapore Towards Healthy Outcomes Study. *PLoS One* **10**, e0142239.
7. Bener A, Al-Hamaq AO, Saleh NM (2013). Association between vitamin D insufficiency and adverse pregnancy outcome: global comparisons. *Int J Womens Health* **5**, 523-31.
8. Organization WH (2013). Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. Geneva: WHO.
9. Dinca M, Serban MC, Sahebkar A *et al* (2016). Does vitamin D supplementation alter plasma adipokines concentrations? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res* **107**, 360-71.
10. Karras SN, Polyzos SA, Newton DA *et al* (2018). Adiponectin and vitamin D-binding protein are independently associated at birth in both mothers and neonates. *Endocrine* **59**, 164-74.
11. Rosen ED, Spiegelman BM (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847-53.
12. Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH *et al* (2007). Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **18**, 263-70.
13. Rühl R, Landrier JF (2016). Dietary regulation of adiponectin by direct and indirect lipid activators of nuclear hormone receptors. *Mol Nutr Food Res* **60**, 175-84.
14. Sung CC, Liao MT, Lu KC *et al* (2012). Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 634195.
15. Xu J, Zhao YH, Chen YP *et al* (2014). Maternal circulating concentrations of tumor necrosis factor-alpha, leptin, and adiponectin in gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *ScientificWorldJournal*. **201**, 926932.
16. Retnakaran A, Retnakaran R (2012). Adiponectin in pregnancy: implications for health and disease. *Curr Med Chem* **19**, 5444-50.
17. Ianniello F, Quagliaozzi L, Caruso A *et al* (2013). Low adiponectin in overweight/obese women: association with diabetes during pregnancy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **17**, 3197-205.

18. Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP *et al* (2008). Adiponectin multimers in maternal plasma. *J Matern Fetal Neonatal Med* **21**, 796-815.
19. Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R *et al* (2007). Plasma adiponectin concentrations in non-pregnant, normal and overweight pregnant women. *J Perinat Med* **35**, 522-31.
20. Vaidya A, Forman JP, Underwood PC *et al* (2011). The influence of body mass index and renin-angiotensin-aldosterone system activity on the relationship between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin in Caucasian men. *Eur J Endocrinol* **164**, 995-1002.
21. Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E *et al* (2010). Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta* **411**, 1354-60.
22. Forman JP, Williams JS, Fisher ND (2010). Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension* **55**, 1283-8.
23. Pala HG, Ozalp Y, Yener AS *et al*. (2015). Adiponectin levels in gestational diabetes mellitus and in pregnant women without glucose intolerance. *Adv Clin Exp Med* **24**, 85-92.
24. Mohammadi T, Paknahad Z (2017). Adiponectin concentration in gestational diabetic women: a case-control study. *Clin Nutr Res.* **6**, 267-276.
25. Li ZY, Wang P, Miao CY (2011). Adipokines in inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 888-96.
26. Song Y, Gao J, Qu Y *et al* (2016). Serum levels of leptin, adiponectin and resistin in relation to clinical characteristics in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Chim Acta* **458**, 133-7.
27. Fatima SS, Alam F, Chaudhry B *et al* (2016). Elevated levels of chemerin, leptin, and interleukin-18 in gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 1-6.
28. Menendez C, Lage M, Peino R *et al* (2001). Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol* **170**, 425-31.
29. Maetani M, Maskarinec G, Franke AA *et al* (2009). Association of leptin, 25-hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in women. *Nutr Cancer* **61**, 225-31.
30. Karonova T, Belyaeva O, Jude EB *et al* (2016). Serum 25(OH)D and adipokines levels in people with abdominal obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol*.

31. Hajimohammadi M, Shab-Bidar S, Neyestani TR (2017). Vitamin D and serum leptin: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr* **71**, 1144-53.
32. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML *et al* (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**, 292-5.
33. Fatima SS, Farooq S, Tauni MA *et al* (2015). Effect of raised body fat on vitamin D, leptin and bone mass. *J Pak Med Assoc* **65**, 1315-9.
34. Dinca M, Serban MC, Sahebkar A *et al* (2016). Does vitamin D supplementation alter plasma adipokines concentrations? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res* **107**, 360-71.
35. Mousa A, Abell SK, Shorakae S *et al* (2017). Relationship between vitamin D and gestational diabetes in overweight or obese pregnant women may be mediated by adiponectin. *Mol Nutr Food Res* **61**.
36. Pratumvinit B, Wongkrajang P, Wataganara T *et al* (2015). Maternal Vitamin D Status and Its Related Factors in Pregnant Women in Bangkok, Thailand. *PLoS One* **10**, e0131126.
37. (US) IoM (2011). Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. In: Ross AC TC, Yaktine AL, Del Valle HB, editors., editor. Washington (DC): National Academies Press (US).
38. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS *et al* (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-9.
39. Gordon CC, Chumlea WC, Roche AF (1988). Stature, recumbent length, and weight. Anthropometric standardization reference manual Champaign: Human kinetics Books.
40. Statistics. BIoGa (2011). National Household Budget Survey. Nutritional composition table of food consumed in Brazil.
41. Sichieri R, Everhart J (1998). Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutrition Research* **18**, 1649-59.
42. Singer JD, Willett JB (2003). Applied longitudinal data analysis: Modeling change and event occurrence: Oxford university press.
43. Twisk JW (2013). Applied longitudinal data analysis for epidemiology: a practical guide: Cambridge University Press.

44. Greenland S (1983). Tests for interaction in epidemiologic studies: a review and a study of power. *Stat Med* **2**, 243-51.
45. Team RS (2015). RStudio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston, MA.
46. Liu NQ, Hewison M (2012). Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Arch Biochem Biophys* **523**, 37-47.
47. Figueiredo AC, Cocate PG, Adegbeye A *et al* (2017). Changes in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D during pregnancy: a Brazilian cohort. *European Journal of Nutrition*. 2017.
48. Schneuer FJ, Roberts CL, Guilbert C *et al* (2014). Effects of maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in the first trimester on subsequent pregnancy outcomes in an Australian population. *Am J Clin Nutr* **99**, 287-95.
49. Flood-Nichols SK, Tinnemore D, Huang RR *et al* (2015). Vitamin D deficiency in early pregnancy. *PLoS One* **10**, e0123763.
50. Pereira-Santos M, Queiroz Carvalho G, David Couto R *et al* (2018). Vitamin D deficiency and associated factors among pregnant women of a sunny city in Northeast of Brazil. *Clin Nutr ESPEN* **23**, 240-4.
51. Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR *et al* (2014). Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metab* **58**, 411-33.
52. BRASIL (2013). Programa Nacional de Suplementação de Ferro:manual de condutas gerais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, p. 24. Brasília: Ministério da Saúde.
53. Jafarzadeh L, Motamed A, Behradmanesh M *et al* (2015). A comparison of serum levels of 25-hydroxy vitamin d in pregnant women at risk for gestational diabetes mellitus and women without risk factors. *Mater Sociomed* **27**, 318-22.
54. Casey C, McGinty A, Holmes VA, Patterson CC, Young IS, McCance DR (2018). Maternal vitamin D and neonatal anthropometrics and markers of neonatal glycaemia: Belfast Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study. *Br J Nutr* **120**, 74-80.
55. Catalano P (2002). The Diabetogenic State of Maternal Metabolism in Pregnancy. *NewReviews* **3**, e165–e72.

56. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR *et al* (1993). Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol* **264**, E60-7.
57. Alvarez JA, Ashraf A (2010). Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol* **2010**, 351385.
58. Tai K, Need AG, Horowitz M *et al* (2008). Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutrition* **24**, 279-85.
59. Arnold DL, Enquobahrie DA, Qiu C *et al* (2015). Early pregnancy maternal vitamin D concentrations and risk of gestational diabetes mellitus. *Paediatr Perinat Epidemiol* **29**, 200-10.
60. Altieri B, Grant WB, Casa SD *et al* (2016). Vitamin D and pancreas: the role of sunshine vitamin in the pathogenesis of Diabetes Mellitus and Pancreatic Cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 0.
61. Gedik O, Akalin S (1986). Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* **29**, 142-5.
62. Retnakaran R (2017). Adiponectin and  $\beta$ -Cell Adaptation in Pregnancy. *Diabetes*, **66**, 1121-2.
63. Qiao L, Wattez JS, Lee S *et al* (2017). Adiponectin Deficiency Impairs Maternal Metabolic Adaptation to Pregnancy in Mice. *Diabetes* **66**, 1126-35.
64. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R *et al* (2010) . Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* **53**, 2167-76.
65. Yuan W, Pan W, Kong J *et al* (2007). 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* **282**, 29821-30.
66. Gannagé-Yared MH, Chedid R, Khalife S *et al* (2009). Vitamin D in relation to metabolic risk factors, insulin sensitivity and adiponectin in a young Middle-Eastern population. *Eur J Endocrinol* **160**, 965-71.
67. Nimitphong H, Chanprasertyothin S, Jongjaroenprasert W *et al* (2009). The association between vitamin D status and circulating adiponectin independent of adiposity in subjects with abnormal glucose tolerance. *Endocrine* **36** 205-10.
68. Vaidya A, Williams JS, Forman JP (2012). The independent association between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin and its relation with BMI in two large cohorts: the NHS and the HPFS. *Obesity (Silver Spring)* **20**, 186-91.

69. McManus R, Summers K, de Vrijer B *et al* (2014). Maternal, umbilical arterial and umbilical venous 25-hydroxyvitamin D and adipocytokine concentrations in pregnancies with and without gestational diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* **80**, 635-41.
70. Walsh JM, McGowan CA, Kilbane M *et al* (2013). The relationship between maternal and fetal vitamin D, insulin resistance, and fetal growth. *Reprod Sci* **20**, 536-41.

**Table 1.** Baseline characteristics of the study population according to vitamin D sufficiency status in first trimester of pregnancy.

	Endocrine Society Guidelines			Institute of Medicine			P-value <sup>1</sup>
	Total n=181	Sufficiency 25(OH)D ≥ 75 nmol/L n=53	Insufficiency 25(OH)D < 75 nmol/L n=128	P-value <sup>1</sup>	Sufficiency 25(OH)D ≥ 50 nmol/L n=152	Insufficiency 25(OH)D < 50 nmol/L n=29	
<b>Continuous variables</b>							
				<b>Median (IQR)</b>			
25(OH)D (nmol/L)	62.5 (52.5 - 75.0)	82.5 (77.5 - 92.5)	57.5 (50.0 - 65.0)	<0.001	67.5 (57.5 - 77.5)	40.0 (37.5 - 45.0)	<0.001
Vitamin D dietary intake (IU/day)	134.2 (84.22 - 185.4)	130.81 (67.89 - 168.5)	136.4 (89.1 - 201.2)	0.127	133.4 (82.7 - 178.9)	135.7 (98.0 - 248.1)	0.193
Age (y)	26.0 (22.0 - 31.0)	25.5 (21.0 - 31.0)	26.0 (22.0 - 31.0)	0.485	25.0 (21.5 - 31.0)	27.0 (23.0 - 31.0)	0.531
Early pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 (21.9 - 27.0)	23.5 (20.6 - 26.9)	23.7 (22.5 - 27.1)	0.271	23.6 (21.3 - 26.9)	24.8 (22.9 - 28.0)	0.130
Per-capita family income (USD \$)	292.4 (184.8 - 421.0)	301.17 (136.3 - 425.7)	283.6 (193.6 - 417.5)	0.448	277.8 (175.4 - 409.4)	330.4 (208.2 - 438.6)	0.288
<b>Categorical variables</b>							
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>P-value<sup>2</sup></b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>P-value<sup>2</sup></b>
Parity							
Nulliparous	70 (38.7)	34.0 (18)	52 (40.6)	0.402	56 (36.8)	14 (48.3)	0.402
Primiparous or multiparous	111 (61.3)	66.0 (35)	76 (59.4)		96 (63.2)	15 (51.7)	
Self-reported skin color							
White	47 (26.0)	26.4 (14)	33 (25.8)	0.788	43 (28.3)	4 (13.8)	0.264
Black	49 (27.1)	30.2 (16)	33 (25.8)		40 (26.3)	9 (31.0)	
Mixed	85 (46.9)	43.4 (23)	62 (48.4)		69 (45.4)	16 (55.2)	
Season <sup>b</sup>							
Summer	38 (21.0)	18 (34.0) *	20 (15.6)	<0.001	37 (24.3)	1 (3.5)	<0.001
Autumn	47 (26.0)	20 (37.7) *	27 (21.1)		44 (29.0)	3 (10.3)	
Winter	48 (26.5)	5 (9.4)	43 (33.6) **		33 (21.7)	15 (51.7) *	
Spring	48 (26.5)	10 (18.9)	38 (29.7)		38 (25.0)	10 (34.5)	

<sup>1</sup> p-value refers to Mann-Whitney test; <sup>2</sup>p-value refers to chi-square test.\*Among women with vitamin D sufficiency according to Endocrine Society at baseline, we observed significantly higher proportions of women entering pregnancy in the summer and in the autumn, compared with those who became pregnant in the winter. \*\*Among women with vitamin D insufficiency according to Endocrine at baseline, we observed a significantly higher proportion of women entering pregnancy in the winter than in the summer. \*\*\*Among women with vitamin D insufficiency according to Institute of Medicine at baseline, we observed a significantly higher proportion of women entering pregnancy in the winter than in the summer. Abbreviations: 25(OH)D=25-hydroxyvitamin D, IQR: interquartile range; BMI=Body Mass Index.

**Table 2.** Markers of glucose and adipokines concentrations of the study population according to vitamin D sufficiency status in first trimester of pregnancy<sup>†</sup>.

Variables	Endocrine Society Guidelines						Institute of Medicine					
	Total		Sufficiency 25(OH)D ≥75nmol/L		Insufficiency 25(OH)D <75nmol/L		Sufficiency 25(OH)D ≥50 nmol/L		Insufficiency 25(OH)D < 50 nmol/L			
	n	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	P-value <sup>1</sup>	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	P-value	
<b>Glycaemia (mg/dL)</b>												
First trimester	180	83.0 (78.0 - 88.0)	54	79.5 (76.0 - 85.0)	126	84.0 (79.0 - 89.0)	<b>0.003</b>	151	83.0 (78.0 - 87.0)	29	84.0 (79.0 - 95.0)	<b>0.034</b>
Second trimester	146	78.0 (72.0 - 83.0)	42	77.5 (70.0 - 82.0)	104	78.0 (73.0 - 83.0)	0.204	122	77.5 (72.0 - 82.0)	24	78.5 (72.0 - 83.5)	0.885
Third trimester	149	79.0 (72.0 - 84.0)	40	80.5 (71.5 - 84.5)	109	78.0 (72.0 - 84.0)	0.991	123	78.0 (71.0 - 84.0)	26	80.5 (75.0 - 84.0)	0.346
<b>Insulin (μU/ml)</b>												
First trimester	180	4.34 (2.97 - 6.46)	53	3.37 (2.64 - 6.01)	127	4.58 (3.31 - 6.49)	0.125	152	4.04 (2.90 - 6.31)	28	4.89 (3.28 - 7.71)	0.141
Second trimester	149	4.93 (3.21 - 7.70)	44	5.07 (3.26 - 7.53)	106	4.92 (3.19 - 7.70)	0.921	125	4.90 (3.15 - 7.40)	24	6.94 (3.96 - 11.39)	0.082
Third trimester	147	5.75 (3.90 - 8.75)	40	6.89 (4.46 - 11.88)	108	5.49 (3.71 - 8.26)	0.093	123	5.65 (4.08 - 8.28)	24	7.63 (3.69 - 11.70)	0.484
<b>HOMA-IR</b>												
First trimester	180	0.86 (0.57 - 1.36)	54	0.65 (0.50 - 1.23)	126	0.93 (0.65 - 1.41)	0.062	152	0.82 (0.56 - 1.30)	28	1.14 (0.80 - 1.73)	0.071
Second trimester	144	0.95 (0.60 - 1.53)	42	0.94 (0.59 - 1.41)	102	0.96 (0.60 - 1.55)	0.812	120	0.95 (0.59 - 1.39)	24	1.16 (0.70 - 2.18)	0.106
Third trimester	144	1.12 (0.74 - 1.69)	38	1.38 (0.78 - 1.94)	106	1.08 (0.70 - 1.65)	0.176	120	1.10 (0.74 - 1.57)	24	1.60 (0.72 - 2.72)	0.352
<b>Adiponectin (μg/ml)</b>												
First trimester	181	4.96 (3.57 - 7.19)	53	4.49 (3.12 - 6.55)	128	5.26 (3.61 - 7.28)	0.170	152	4.95 (3.52 - 7.08)	29	5.68 (4.07 - 7.91)	0.254
Second trimester	146	5.05 (3.52 - 8.46)	42	5.06 (3.65 - 10.91)	104	5.04 (3.36 - 7.80)	0.469	123	4.75 (3.65 - 10.91)	23	6.21 (3.92 - 12.17)	0.123
Third trimester	148	4.59 (3.42 - 6.97)	41	4.69 (3.43 - 7.32)	107	4.45 (3.32 - 6.91)	0.750	123	4.45 (3.32 - 6.63)	125	5.21 (3.67 - 7.22)	0.494
<b>Leptin (ng/l)</b>												
First trimester	181	166.7 (99.9 - 262.1)	54	134.5 (83.3 - 241.7)	127	174.2 (108.3 - 280.5)	0.093	152	161.0 (97.7 - 268.3)	29	174.2 (116.6 - 246.9)	0.588
Second trimester	151	247.8 (156.7 - 418.0)	44	209.3 (158.9 - 354.2)	107	268.0 (172.6 - 431.8)	0.196	126	234.0 (162.5 - 418.0)	25	327.5 (193.3 - 400.1)	0.228
Third trimester	149	249.5 (159.3 - 387.6)	40	241.2 (144.2 - 383.2)	109	256.6 (159.8 - 388.7)	0.472	124	235.6 (149.4 - 381.2)	25	333.3 (256.6 - 472.9)	<b>0.021</b>

P-value refers to Mann-Whitney test. Abbreviations: 25(OH)D=25-hydroxyvitamin D; IQR: interquartile range.

**Table 3.** Markers of glucose metabolism and adipokines changes during pregnancy according to vitamin D sufficiency status in first trimester, Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.

Fixed-effect	Endocrine society <sup>1</sup>			Institute of Medicine <sup>2</sup>		
	$\beta^3$	95% CI	P-value <sup>4</sup>	$\beta^3$	95% CI	P-value <sup>4</sup>
<b>Glycaemia (mg/dL)</b>						
Gestational age	-0.937	-1.347; -0.526	<0.001	-1.013	-1.405; -0.620	<0.001
Quadratic gestational age	0.019	0.009; 0.028	<0.001	0.019	0.009; 0.028	<0.001
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	3.770	-0.128; 7.667	0.058	3.189	-1.473; 7.851	0.180
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.109	-0.273; 0.055	0.192	-0.052	-0.245; 0.140	0.593
<b>Insulin (<math>\mu</math>U/ml)</b>						
Gestational age	0.167	0.048; 0.287	0.006	0.085	0.017; 0.153	0.014
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	2.357	-0.344; 5.058	0.087	1.309	-1.886; 4.503	0.422
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.121	-0.251; 0.009	<b>0.069</b>	-0.024	-0.180; 0.132	0.762
<b>HOMA-IR</b>						
Gestational age	0.018	-0.005; 0.041	0.116	0.007	-0.007; 0.020	0.320
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	0.458	-0.053; 0.970	0.079	0.241	-0.366; 0.848	0.437
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.016	-0.042; 0.010	0.232	0.0002	-0.031; 0.031	0.992
<b>Adiponectin (<math>\mu</math>g/ml)</b>						
Gestational age	0.303	0.194; 0.478	<0.001	0.281	0.148; 0.415	<0.001
Quadratic gestational age	-0.006	-0.009; -0.002	0.001	-0.005	-0.009; -0.002	0.001
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	0.737	-0.565; 2.038	0.267	0.991	-0.536; 2.520	0.203
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.070	-0.150; 0.010	<b>0.085</b>	0.008	-0.065; 0.081	0.822
<b>Leptin (ng/l)</b>						
Gestational age	1.122	4.303; 15.942	0.001	9.517	4.056; 14.977	0.001
Quadratic gestational age	-0.207	-0.340; -0.074	0.002	-0.200	-0.332; -0.067	0.003
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	12.071	-35.799; 59.942	0.621	-48.741	-104.599; 7.117	0.087
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	0.214	-2.323; 2.752	0.869	2.532	-0.436; 5.501	<b>0.094</b>

<sup>1</sup>Sufficiency [reference category, 25(OH)D  $\geq$  75nmol/L]/Inadequacy status [25(OH)D < 75nmol/L]; <sup>2</sup> Sufficiency [reference category, 25(OH)D  $\geq$  50nmol/L]/Insufficiency status [25(OH)D < 50nmol/L]; <sup>3</sup> $\beta$  = longitudinal linear regression coefficient; <sup>4</sup>p-value refers to maximum likelihood estimator;<sup>5</sup>The reference category was adequate status of 25(OH)D. Abbreviations: 25(OH)D= 25-hidroxi-vitamin D; CI = confidence interval. Note: The adiponectin, leptin and glycaemia models were adjusted for gestational age and quadratic gestational age in weeks and for women's age, Body Mass Index and seasons (Spring/Summer/Autumn/Winter); the insulin and HOMA-IR models were adjusted for gestational age in weeks and for women's age, Body Mass Index and seasons (Spring/Summer/Autumn/Winter). Glycaemia model: Number of observations = 474; Number of groups = 182; Average of 2.6 observations per group. Insulin model: Number of observations = 475; Number of groups = 180; Average of 2.6 observations per group. HOMA-IR model: Number of observations = 467; Number of groups = 182; Average of 2.6 observations per group. Adiponectin model: Number of observations = 474; Number of groups = 182; Average of 2.6 observations per group. Leptin model: Number of observations = 480; Number of groups = 181; Average of 2.7 observations per group.

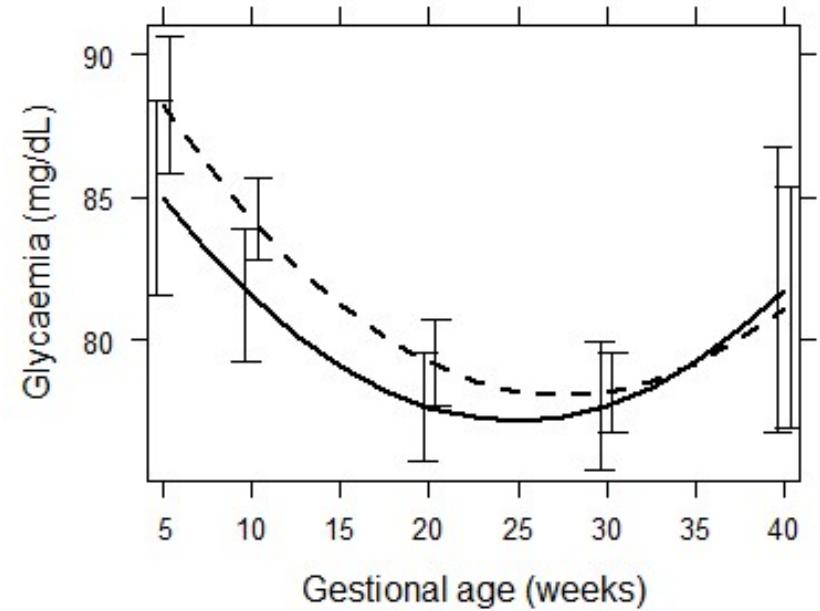
**Table 4.** Markers of glucose metabolism and adipokines according to vitamin D sufficiency status changes during pregnancy, Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.

Fixed-effect	Endocrine Society <sup>1</sup>			Institute of Medicine <sup>2</sup>		
	$\beta^3$	95% CI	P-value <sup>4</sup>	$\beta^3$	95% CI	P-value <sup>4</sup>
<b>Glycaemia (mg/dL)</b>						
Gestational age	-0.915	-1.345; -0.484	<0.001	-0.989	-1.369; -0.609	<0.001
Quadratic gestational age	0.017	0.007; 0.026	0.001	0.018	0.009; 0.027	<0.001
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	2.624	-1.244; 6.492	0.184	3.516	-1.317; 8.350	0.154
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.049	-0.215; 0.116	0.560	-0.029	-0.260; 0.202	0.805
<b>Insulin (<math>\mu</math>U/ml)</b>						
Gestational age	0.107	0.014; 0.201	0.024	0.095	0.029; 0.160	0.004
Vitamin D sufficiency status <sup>4</sup>	0.988	-1.677; 3.654	0.468	2.344	-1.073; 5.760	0.179
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.076	-0.199; 0.047	0.226	-0.153	-0.325; 0.018	<b>0.080</b>
<b>HOMA-IR</b>						
Gestational age	0.013	-0.006; 0.031	0.178	0.009	-0.004; 0.022	0.178
Vitamin D sufficiency status <sup>4</sup>	0.269	-0.260; 0.797	0.319	0.499	-0.181; 1.178	0.150
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.014	-0.038; 0.011	0.270	-0.030	-0.065; 0.005	<b>0.094</b>
<b>Adiponectin (<math>\mu</math>g/ml)</b>						
Gestational age	0.291	0.145; 0.436	<0.001	0.270	0.148; 0.392	<0.001
Quadratic gestational age	-0.005	-0.008; -0.002	0.003	-0.005	-0.008; -0.002	0.001
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	0.847	-0.351; 2.045	0.166	0.186	-1.265; 1.637	0.801
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	-0.056	-0.116; 0.004	<b>0.066</b>	0.006	-0.068; 0.080	0.878
<b>Leptin (ng/l)</b>						
Gestational age	14.590	8.290; 20.889	<0.001	13.794	8.143; 19.445	<0.001
Quadratic gestational age	-0.312	-0.453; -0.171	<0.001	-0.303	-0.440; -0.167	<0.001
Vitamin D sufficiency status <sup>5</sup>	11.311	-41.138; 63.760	0.673	-40.453	-105.123; 24.216	0.220
Interaction terms						
Gestational age # vitamin D status <sup>5</sup>	0.046	-0.205; 0.297	0.719	0.258	-0.089; 0.604	0.145

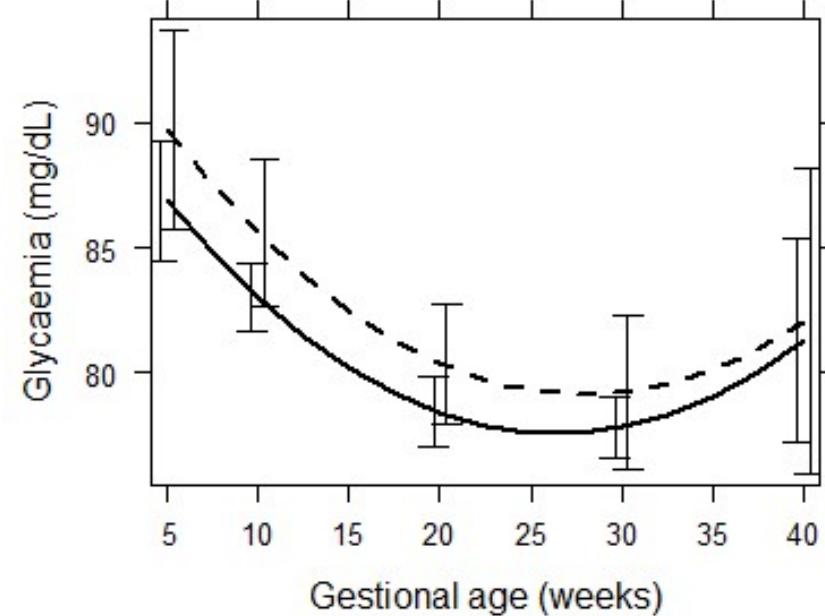
<sup>1</sup>Sufficiency [reference category, 25(OH)D  $\geq$  75nmol/L]/ Insufficiency status [25(OH)D < 75nmol/L]; <sup>2</sup> Sufficiency [reference category, 25(OH)D  $\geq$  50nmol/L]/ Insufficiency status [25(OH)D < 50nmol/L]; <sup>3</sup> $\beta$  = longitudinal linear regression coefficient; <sup>4</sup>p-value refers to maximum likelihood estimator;

<sup>5</sup>The reference category was adequate status of 25(OH)D. Abbreviations: 25(OH)D= 25-hidroxi-vitamin D; CI = confidence interval. Note: The adiponectin, leptin and glycaemia models were adjusted for gestational age and quadratic gestational age in weeks and for women's age, Body Mass Index and seasons (Spring/Summer/Autumn/Winter); the insulin and HOMA-IR models were adjusted for gestational age in weeks and for women's age, Body Mass Index and seasons (Spring/Summer/Autumn/Winter). Glycaemia model: Number of observations = 503; Number of groups = 207; Average of 2.4 observations per group. Insulin model: Number of observations = 509; Number of groups = 205; Average of 2.5 observations per group. HOMA-IR model: Number of observations = 498; Number of groups = 207; Average of 2.4 observations per group. Adiponectin model: Number of observations = 506; Number of groups = 207; Average of 2.4 observations per group. Leptin model: Number of observations = 512; Number of groups = 206; Average of 2.5 observations per group.

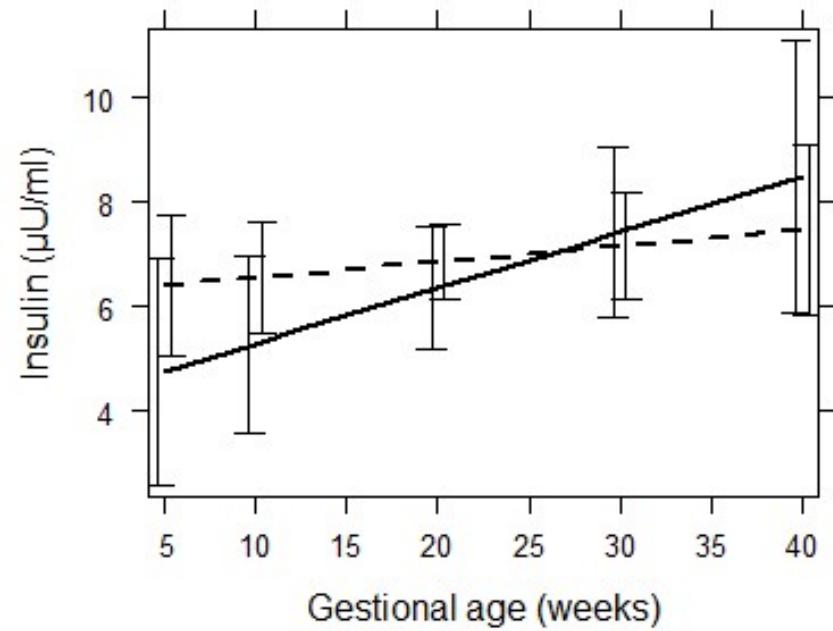
a)



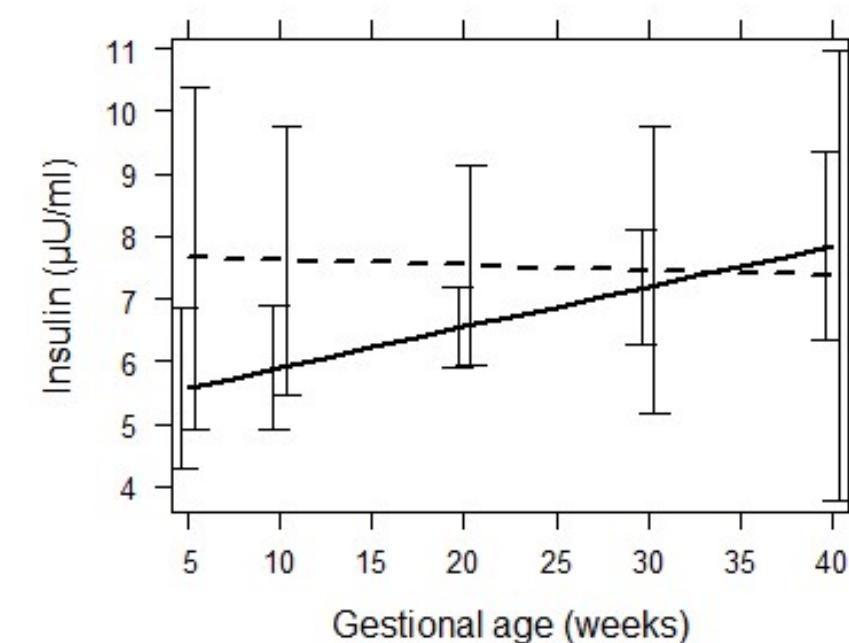
b)



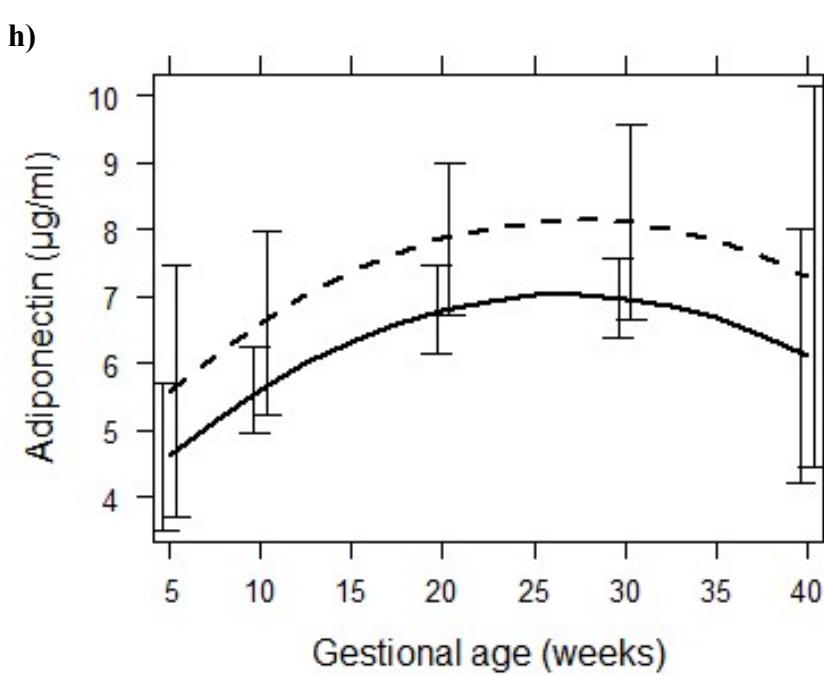
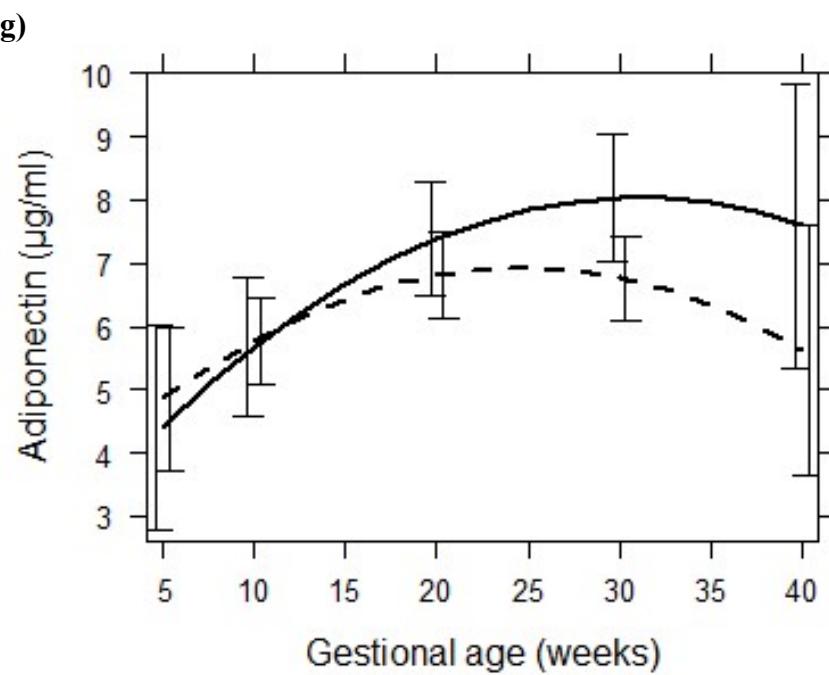
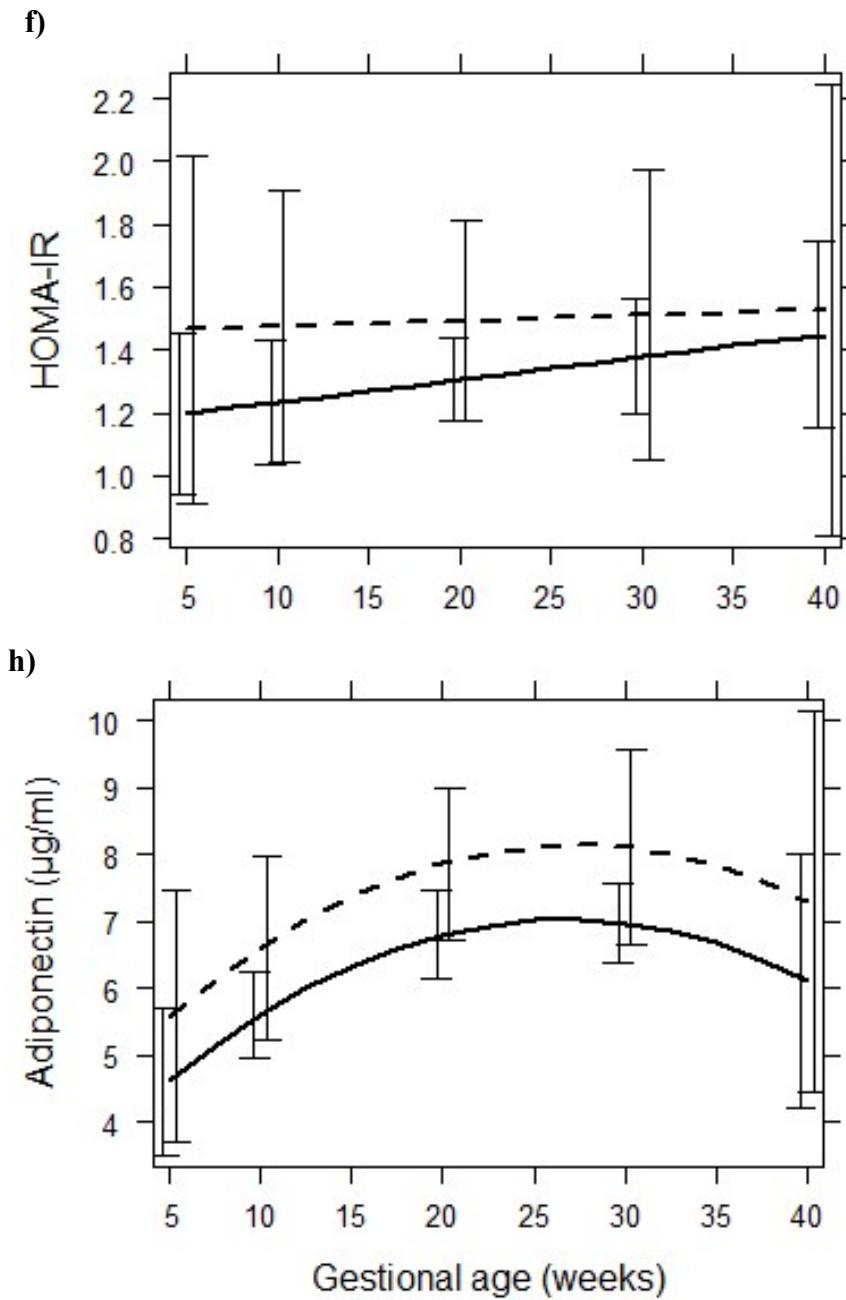
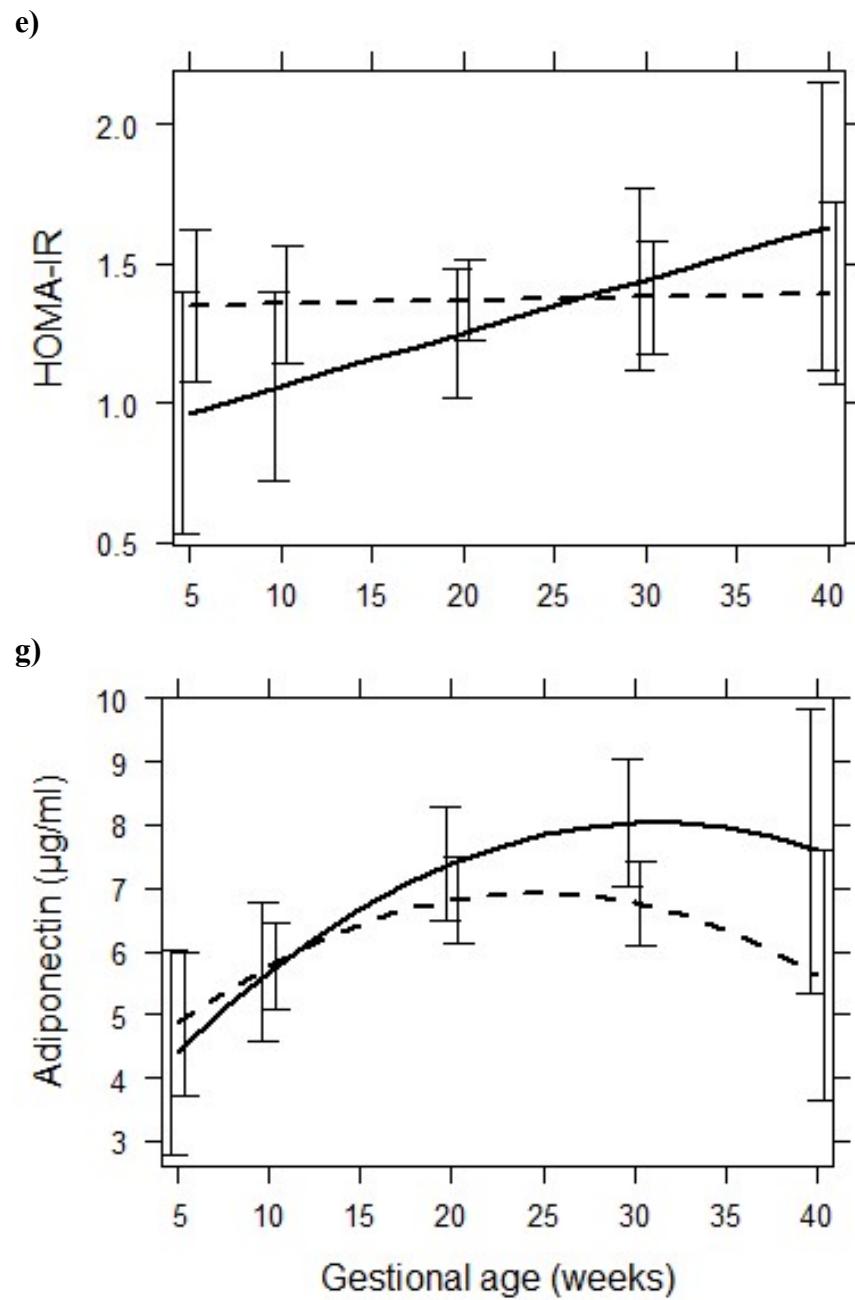
c)

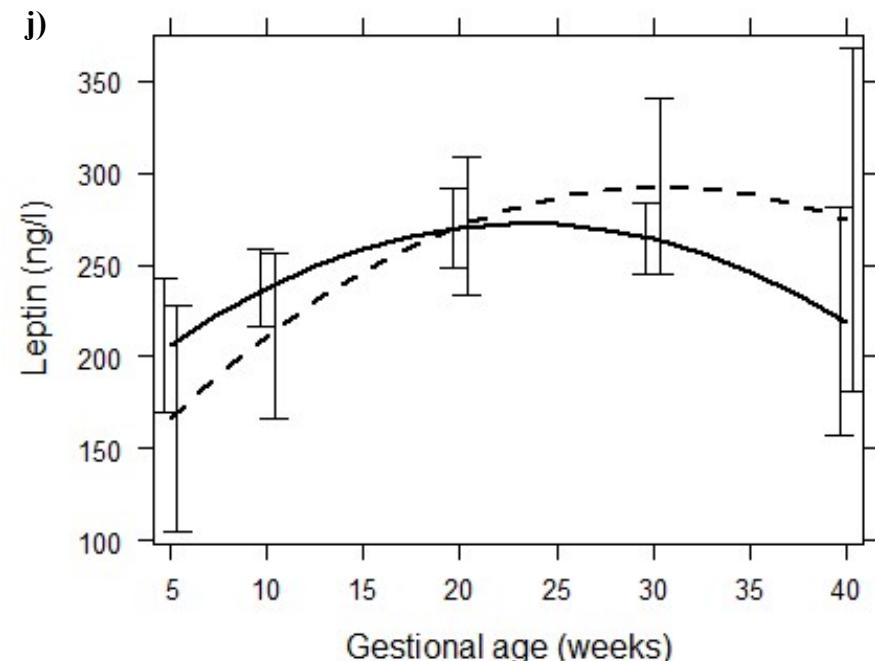
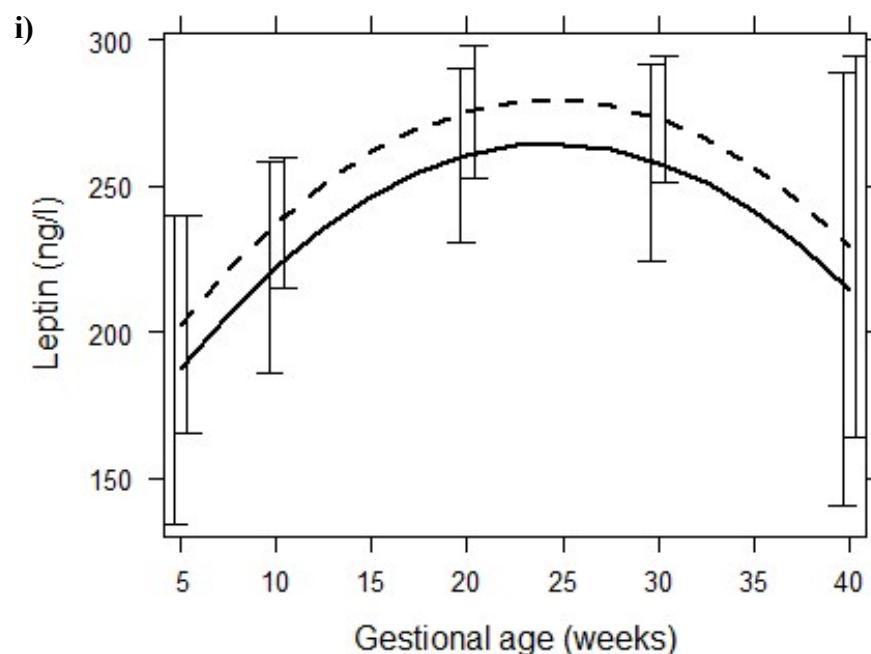


d)



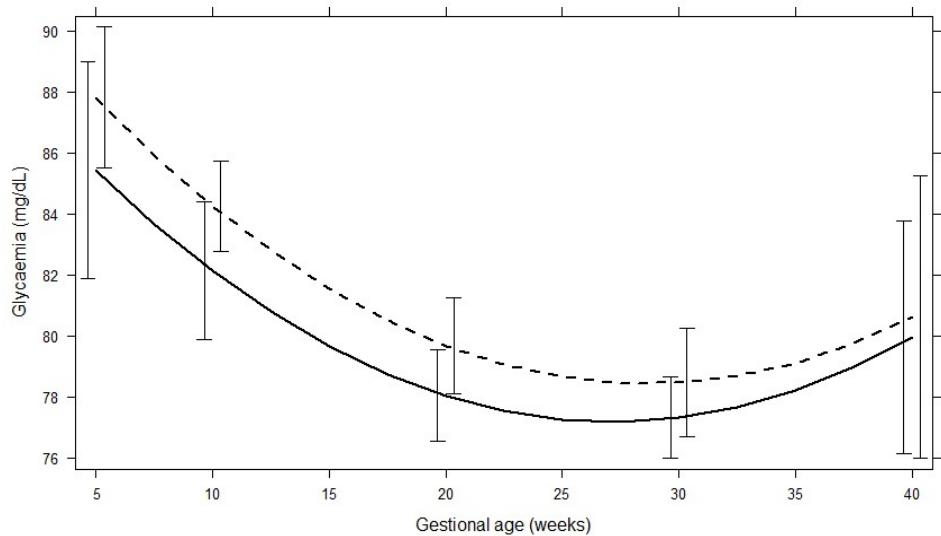
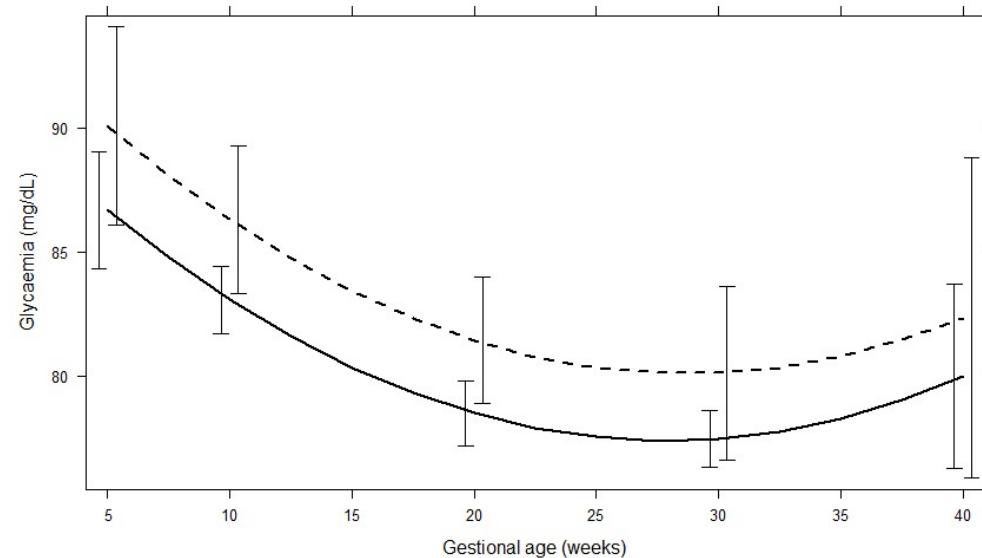
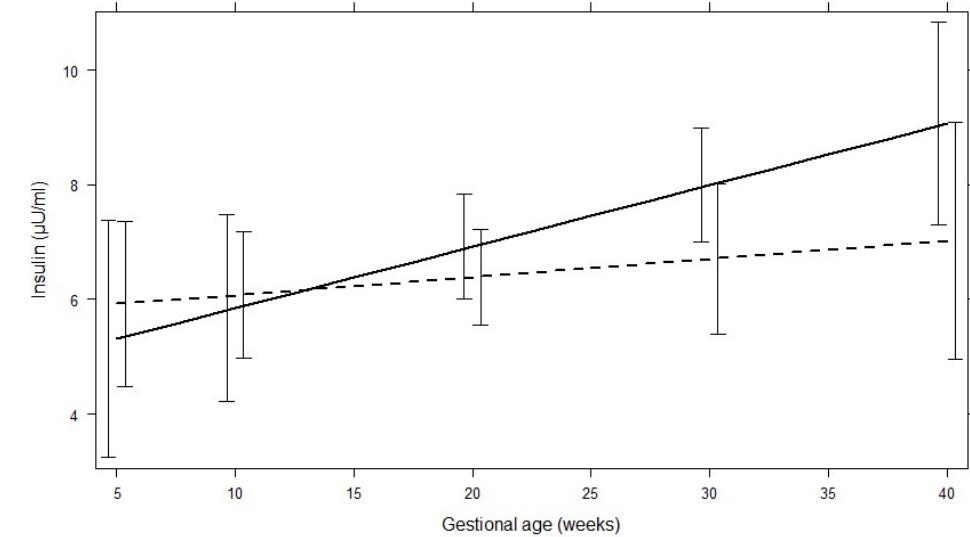
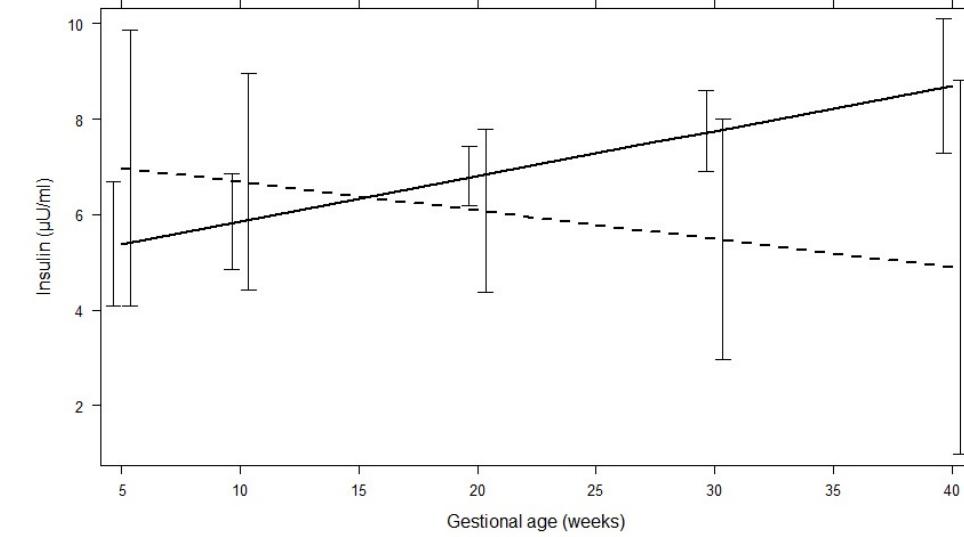
dos

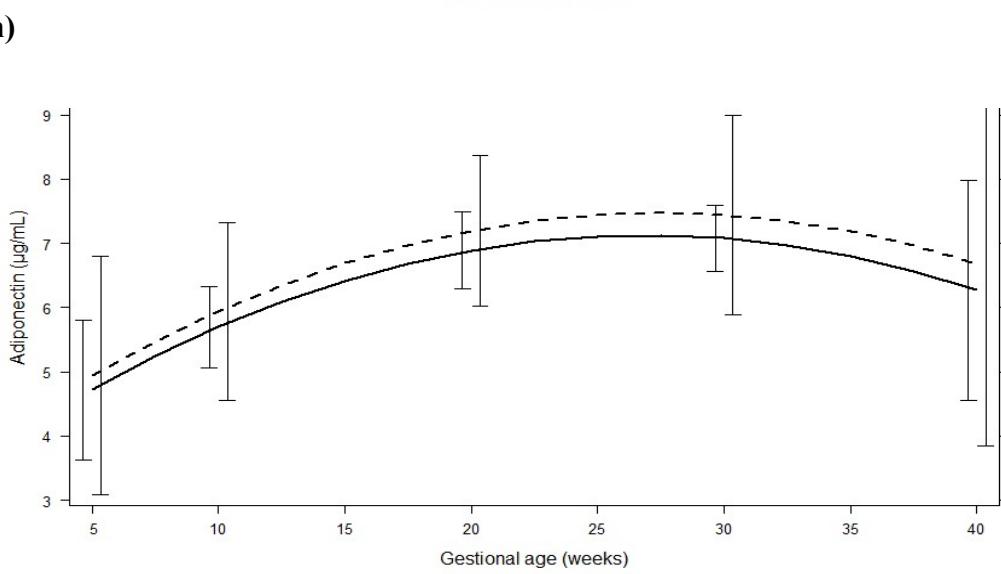
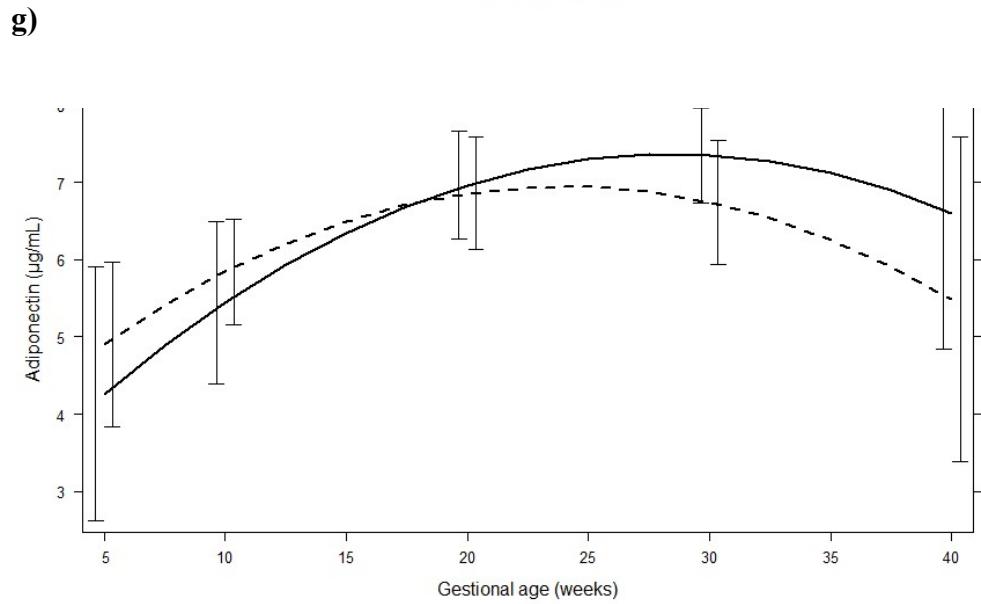
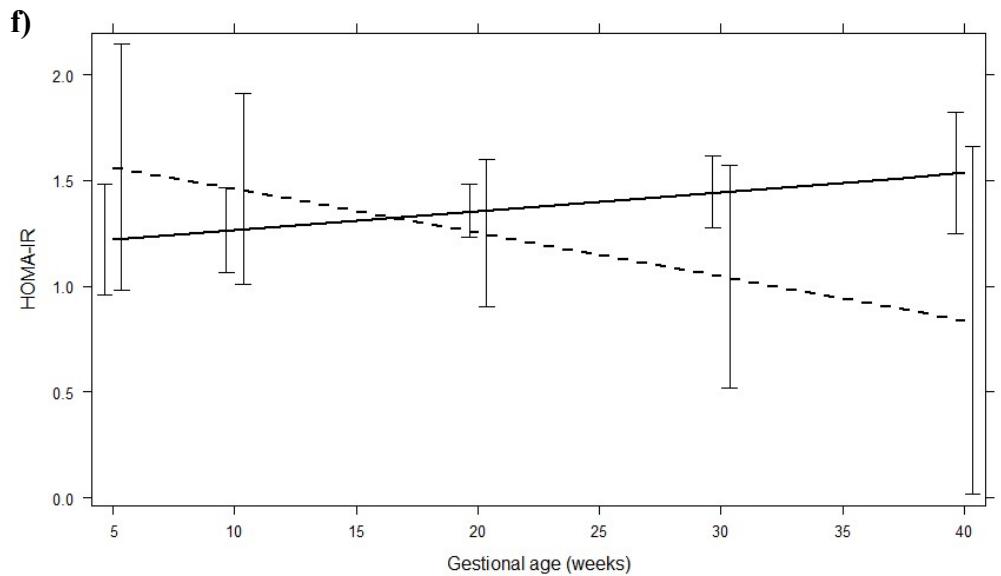
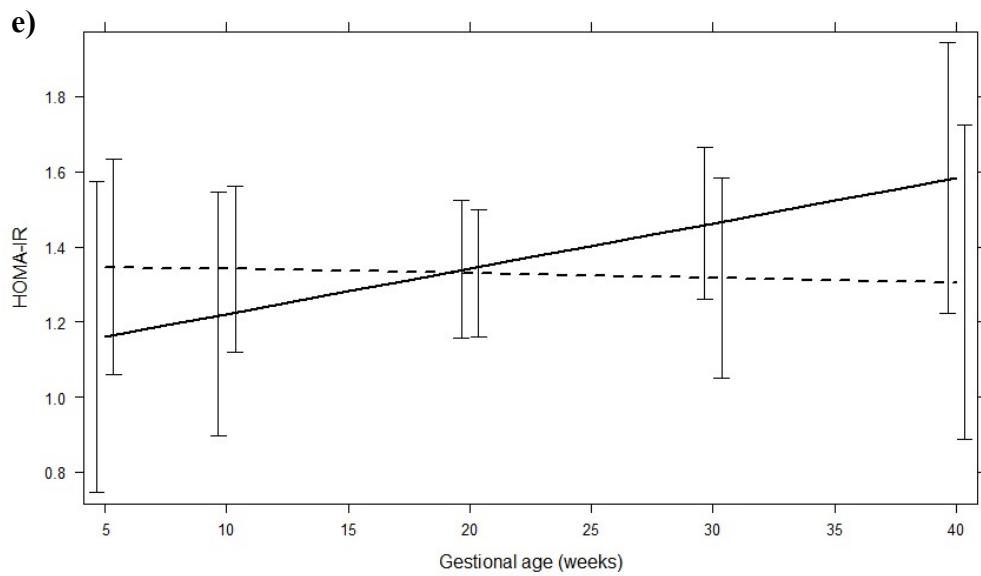


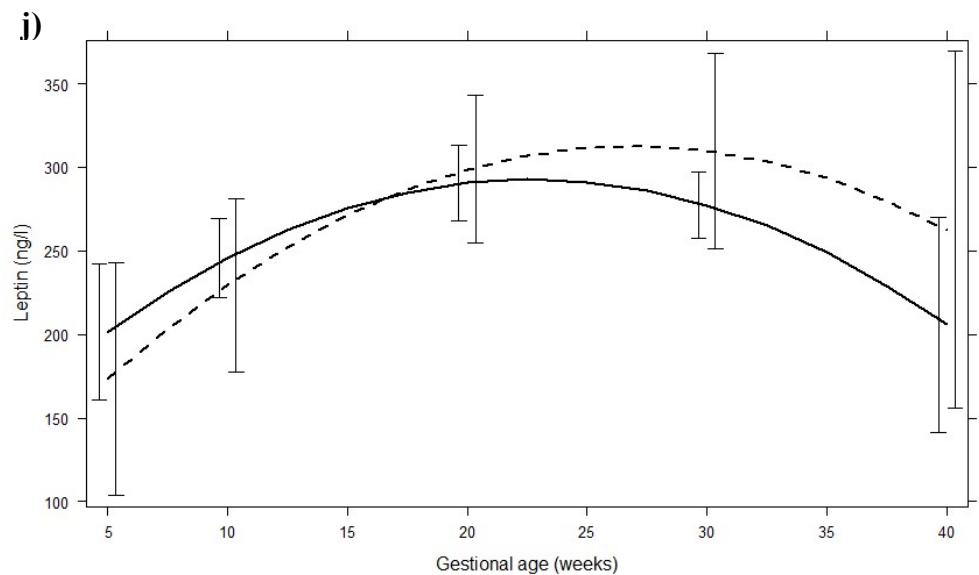
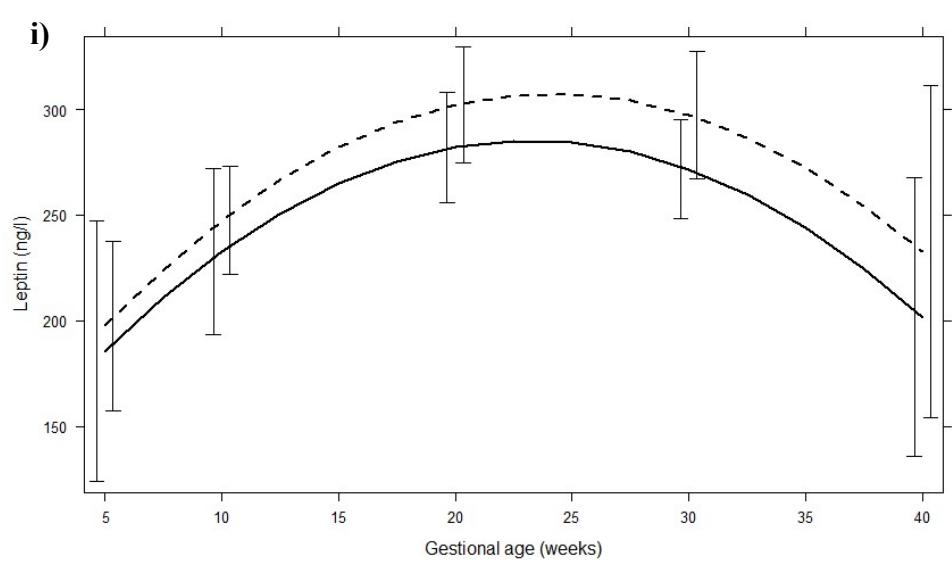


**Figure 1.** Changes in glucose metabolism markers and adipokines throughout pregnancy according to vitamin D baseline status, Rio de Janeiro/Brazil, 2009-2012.

- A) and B) Glycaemia according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;
- C) and D) Insulin according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;
- E) and F) HOMA-IR according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;
- G) and H) Adiponectin according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points,
- I) and J) Adiponectin according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points;

**a)****b)****c)****d)**





**Figure 2.** Changes in glucose metabolism markers and adipokines according to vitamin D status throughout pregnancy, Rio de Janeiro/Brazil, 2009-2012.  
**A) and B)** Glycaemia according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;  
**C) and D)** Insulin according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;  
**E) and F)** HOMA-IR according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;  
**G) and H)** Adiponectin according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;  
**I) and J)** Leptin according to vitamin D status Endocrine Society Practice Guideline and the Institute of Medicine cut-off points, respectively;

**Supplemental table 1.** Baseline characteristics according to follow-up status of pregnant women from a public health centre in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2012.

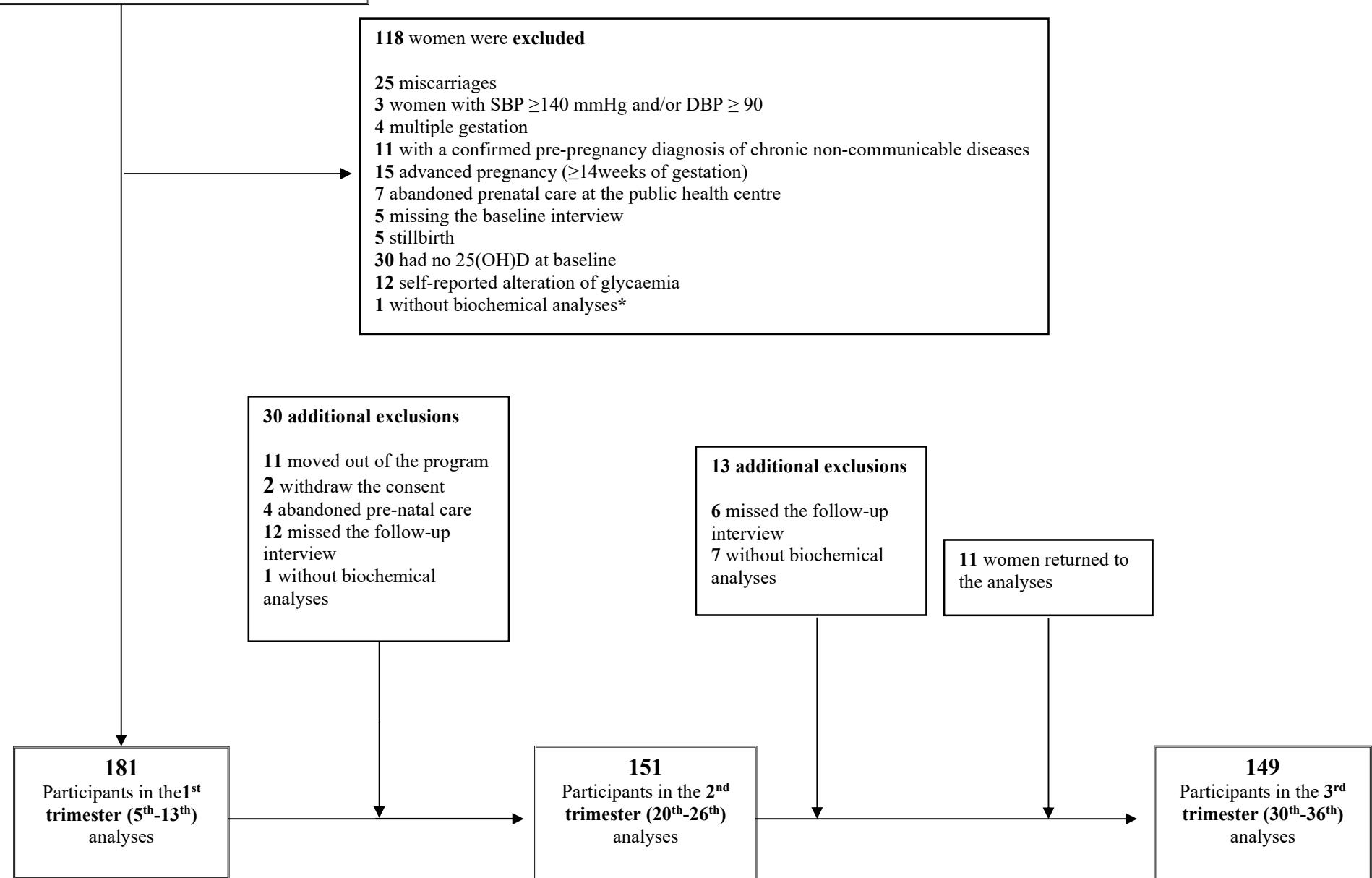
<b>Continuous variables</b>	n	Followed-up	Lost to follow-up	<i>p</i> <sup>1</sup>
		Median (IQR)	n	
25(OH)D (nmol/L)	149	62.50 (52.50; 75.00)	32	67.50 (53.75; 78.75)
Vitamin D dietary intake (IU)	149	137.11 (88.77; 185.44)	32	107.96 (62.43; 189.11)
Age (years)	149	26.0 (22.0; 31.0)	32	24.5 (21.0; 28.5)
Early pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )	149	23.70 (22.30; 26.90)	32	23.15 (21.05; 27.60)
Per-capita family income (USD \$)	147	292.40 (185.38; 417.54)	28	292.40 (152.05; 436.84)
Glycaemia (mg/dL)	147	83.0 (78.0; 84.0)	32	82.5 (76.0; 91.0)
Insulin ( $\mu$ U/ml)	149	4.39 (2.95; 6.47)	32	3.70 (3.10; 6.46)
HOMA-IR	147	0.89 (0.57; 1.35)	32	0.81 (0.55; 1.37)
Adiponectin ( $\mu$ g/ml)	149	4.85 (3.57; 6.98)	31	6.78 (3.57; 9.29)
Leptin (ng/dl)	149	16.98 (10.12; 25.61)	32	14.16 (9.91; 29.10)
<b>Categorical variables</b>		n (%)	n (%)	<i>p</i> <sup>2</sup>
Parity (number of parturitions)	149		32	
Nulliparous		55 (36.9)		15 (46.9)
Primiparous or multiparous		94 (63.1)		17 (53.1)
Vitamin D status (ES)	149		32	0.058
Sufficiency ( $\geq$ 75 nmol/L)		40 (26.9)		14 (43.8)
Insufficiency ( $<$ 75 nmol/L)		109 (73.1)		18 (56.2)
Vitamin D status (IOM)	149			0.549
Sufficiency ( $\geq$ 50 nmol/L)		124 (83.2)	32	28 (87.5)
Insufficiency ( $<$ 50 nmol/L)		25 (16.8)		4 (12.5)
Self-reported skin color	149		32	0.077
White		40 (26.8)		7 (21.9)
Black		36 (24.2)		14 (43.7)
Mixed		73 (49.0)		11 (34.4)
Seasons	149		32	0.114
Summer		32 (21.5)		5 (15.6)
Autumn		41 (27.5)		6 (18.7)
Winter		34 (22.8)		14 (43.8)
Spring		42 (28.2)		7 (21.9)

<sup>1</sup> *p*-value refers to Mann-Whitney Test;

<sup>2</sup> *p*-value refers to Chi-square test;

**Abbreviations:** 25(OH)D = 25-hydroxyvitamin D. BMI = body mass index; IQR = interquartile range; HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance. ES = Endocrine Society. IOM = Institute of Medicine.

**299** pregnant women  
Met the eligibility criteria and agreed to participate



**Supplemental figure 1.** Flowchart. The process of recruitment and follow-up of pregnant women attending at a public prenatal care in Rio de Janeiro.  
Note: \*Leptin was considered the outcome to perform the flowchart

## 7.2 Artigo 2

*Vitamin D during pregnancy and its association with birth outcomes: a Brazilian cohort*

### Abstract

**Introduction:** Maternal vitamin D has been associated with birth outcomes, yet evidence is lacking for how variation in vitamin D concentrations during gestation affects this association.

**Objectives:** Evaluate the association between vitamin D serum concentrations during pregnancy and birth outcomes.

**Methods:** A prospective cohort of 180 healthy Brazilian women was followed at gestational weeks 5-13(baseline), 20-26 and 30-36 and for 30-45 days postpartum. Vitamin D (plasma 25-hydroxyvitamin D, nmol/L) was measured at baseline and the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of gestation. Birth weight (BL - g), birth length (BL - cm), BW z-score, BL z-scores, first minute Apgar (score), small for gestational age (SGA), large for gestational age (LGA) and preterm birth (gestational age at birth<37 weeks) were used as the outcome measures. Multiple linear and Poisson regression models were adjusted to assess the association between vitamin D and outcomes for each trimester. A best linear unbiased prediction of random coefficients model was used to determine the association between the mean rate of change in weekly vitamin D concentrations and neonatal outcomes.

**Results:** The results are presented as the mean (SD): BW 3,254 (556) g, BW z-score 0.340 (1.105), BL 49.3 (3.3) cm, BL z-score 0.440 (1.501), and first minute Apgar score 8.2 (1.5). The prevalence of SGA, LGA and preterm birth were 5.6%, 18.3% and 12.8%, respectively. Vitamin D was directly associated with the risk of preterm birth [1<sup>st</sup> trimester: *incidence-rate ratios* (IRR) 1.018; 95%CI 1.002; 1.033; 2<sup>nd</sup> trimester: IRR 1.051, 95%CI 1.034; 1.068; 3<sup>rd</sup> trimester: IRR 1.037, 95%CI 1.018; 1.056]. Weekly variation in vitamin D was directly associated with BW z-score ( $\beta$ : 0.350, 95%CI 0.062;

0.638), LGA risk (IRR: 1.975, 95%CI 1.075; 3.628) and preterm birth (IRR: 7.050, 95%CI 3.035; 16.378).

**Conclusions:** Weekly variation in vitamin D concentrations during pregnancy was directly associated with BW z-scores, increased LGA and increased preterm birth risk.

**Keywords:** 25-hydroxyvitamin D, pregnancy, birth weight, preterm birth, cohort

## **Introduction**

The developmental origins of health and disease hypothesis postulates that conditions during pregnancy are an important determinant for adult quality of life (1). Thus, birth outcomes such as small for gestational age (SGA), large for gestational age (LGA) and preterm birth are a concern due to their association with an increased risk of neonatal death and impaired development with short and long term health consequences(2, 3). There is evidence that individuals with SGA, LGA or preterm birth are more likely to develop non-communicable diseases in adolescence and adulthood when compared with individuals who were born at an adequate gestational age (4-6).

The etiologies of these outcomes have not been fully elucidated but are thought to be multifactorial (7, 8). Vitamin D concentrations during pregnancy are a relatively new maternal factor that has been recently used as study determinants. In addition to its well-known effects on bone metabolism, vitamin D also plays an important role in stimulating insulin secretion, which exerts anabolic effects, and modulating the immune system, which can attenuate the inflammatory response and, consequently, reduce the risk of poor outcomes such as a premature membrane rupture, i.e., preterm birth (9). Furthermore, vitamin D affects skeletal formation and growth during fetal development, has a role in cell proliferation and differentiation, and may directly stimulate growth factors (10-13).

It is crucial that the maternal levels of 25(OH)D are adequate during pregnancy to meet the fetal micronutrient demands for vitamin D (13). Inadequate vitamin D concentrations in maternal serum may increase the risk of undesirable outcomes such as low birth weight, SGA (14), preterm birth and lower Apgar scores (15). Recent studies evaluated the association between vitamin D during pregnancy and neonatal anthropometric measures (14, 16, 17). These types of studies are relevant as there is a

high worldwide prevalence of maternal vitamin D insufficiency, even in sunny regions (18, 19). The adopted cutoffs used to classify serum vitamin D vary between studies and most only analyzed vitamin D at one time during pregnancy. Additionally, the results of these studies are conflicting and inconclusive (15, 16).

Few studies have measured vitamin D longitudinally throughout pregnancy. Thus, we aimed to evaluate the association between variation in vitamin D concentrations during each gestational trimester and birth weight (BW), birth length (BL), first minute Apgar score, SGA, LGA and preterm birth.

## **Participants and methods**

### ***Study design***

This study utilized data from a prospective cohort of women who were evaluated during an antenatal care of low risk pregnancies at a public health center in Rio de Janeiro, Brazil, from November 2009 to October 2011. The study design included three visits during pregnancy at an interval of one visit per trimester (weeks 5-13, 20-26, and 30-36) and one postpartum visit (30 to 45 days after delivery).

Women were eligible for the study if they presented gestational age between 5-13 weeks, were aged between 20 and 40 years old and if they were free of any infectious or chronic non-communicable diseases, excluding obesity. After the initial screening, women were scheduled for their first visit (baseline) and were excluded if they suffered miscarriages (n=25), presented with chronic arterial hypertension (n=3) or multiple gestations (n=4), were diagnosed with infectious or non-communicable diseases after the enrolment (n=11), were of advanced pregnancy ( $\geq 14$  weeks of gestation) (n=15), had abandoned prenatal care (n=7) or had a stillbirth (n=5). Women without vitamin D measurements at baseline (n=26), BW (n=13) or BL (n=3)

information were also excluded. Moreover, there were two implausible gestational ages at birth data points that were also excluded. After these exclusions, there remained 180 women at baseline visit. At the 2<sup>nd</sup> trimester visit, 170 women were included due to missing vitamin D measurements for 4 participants and missing dietetic data for 6 participants. Finally, at the 3<sup>rd</sup> trimester visit, there were missing vitamin D measurements for 2 women, which led to a final sample size of 168 participants who were followed for 30 to 36 gestational weeks (**Figure 1**).

### ***Independent variables***

Venous blood samples were collected during the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy following an overnight fasting protocol for 12 hours. The samples were collected in EDTA tubes and centrifuged at 5,000 rpm for 5 minutes. Serum and plasma aliquots were then separated and stored in a canister with liquid nitrogen during their transportation to the Federal University of Rio de Janeiro prior to being stored in a freezer at -80°C. The samples were then sent to California in dry ice for analysis. Vitamin D (25-hydroxyvitamin D) was measured (nmol/L) in the plasma fraction using the gold standard method, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (20). All analyses were performed at the Quest Diagnostics Nichols Institute Laboratory (San Juan Capistrano, CA, USA) using the LC Thermo Cohesive System that was coupled to a Thermo Quantum Ultra Mass Spectrometer (Thermo Fisher; San Jose, CA, USA). The range of the analytical measurements was 10–640 nmol/L and the coefficient of variation for all analyses was <10%.

***Dependent variables***

Measurements of BW (g), BL (cm) and first minute Apgar (score) were obtained from the child vaccination booklet during the postpartum visit. BW and BL z-scores were calculated based on the International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21<sup>st</sup> Century (INTERGROWTH-21<sup>st</sup>) charts according to sex and gestational age (21). The INTERGROWTH-21<sup>st</sup> percentiles were also used to classify BW at gestational age at birth as appropriate for the gestational age: AGA (between 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile), SGA (percentile <10<sup>th</sup>) and LGA (percentile>90<sup>th</sup>). The INTERGROWTH-21<sup>st</sup> charts include neonates that are delivered between 24 and 42 gestational weeks, which allows the inclusion of preterm births. The gestational age at delivery was calculated based on the date of birth that was reported at the post-partum visit. Preterm birth was classified as a gestational age at birth <37 weeks.

***Co-variates***

Maternal baseline characteristics such as age (years), education (schooling years), smoking habit (no/yes), alcohol consumption (no/yes), and self-reported skin color (white/black or mixed) were obtained from our structured questionnaires that were administered by trained interviewers. Maternal anthropometric data were taken according to standardized procedures established by Gordon et al. (1988) (22). Weight (kg) was measured at each trimester by using a digital scale (Filizzola PL 150; Filizzola Ltda, São Paulo, Brazil) and duplicate measures of height (m) were taken with a portable stadiometer (Seca Ltda, Hamburg, Germany) at baseline. The first measure of weight was used to calculate the early pregnancy body mass index (BMI) using the formula [weight (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)]. The gestational age was calculated using data from the first ultrasonography that was performed prior to 24 weeks of gestation (n= 170;

94.4%). In cases where this measure was unavailable, the date of the last menstrual period was used (n=10; 5.6%).

Energy intake (Kcal) was estimated from a semi-quantitative food frequency questionnaire, which was validated in an adult population from Rio de Janeiro (23) at baseline (used only to describe the sample characteristics) and the 3<sup>rd</sup> trimester (used as confounder for the statistical models), and both referred to intake during the last 6 months prior to the interview (24). The FFQ included 82 food items with eight possible answers: more than three times a day, two to three times a day, once a day, five to six times a week, two to four times a week, once a week, one to three times a month, and never or hardly ever. After that, data were transformed into daily frequencies calculate daily energy intake (in kilocalories).

### ***Statistical analysis***

The data are described using means and standard deviations (SD) for continuous variables and absolute (n) and relative frequencies (%) for categorical variables. Normality was assessed through histograms and evaluated using kurtosis and asymmetry measures. Three variables presented with non-normal distributions (BW, BL and Apgar scores), but the asymmetry was not high; in addition, they were analyzed normally since any transformations would complicate the interpretation of results.

Vitamin D concentrations were analyzed using two different approaches. The first considered vitamin D at each time point (trimester) while the second used a two-stage method to assess the association between the rate of change of vitamin D throughout pregnancy and birth outcomes. For the latter, a linear mixed-effects model for longitudinal data was applied that included gestational age (weeks) as random effects and, from this regression, the best linear unbiased prediction (BLUP) of random

coefficients was estimated. This model was used to generate the predicted intercept, i.e., the mean vitamin D concentration when gestational age was zero, and the predicted slope, which represents the estimated rate of change in vitamin D concentrations per week of gestation (25). The second stage included the vitamin D concentration slope and intercept that was predicted by BLUP as exposures in the regression models. The linear regression models were used to evaluate the association between variation in vitamin D concentrations or levels per trimester and BW (g), BW z-score, BL (cm), BL z-score and Apgar score. We also constructed scatter plots to illustrate the relationship between weekly variation in Vitamin D concentrations and BW/BL z-scores. Vitamin D was evaluated as a continuous variable since there is no defined cutoff for vitamin D adequacy during pregnancy. Furthermore, adjusted Poisson regression models with robust variance were used to assess the association between vitamin D concentrations and categorical outcomes (SGA/LGA, preterm birth).

All the multivariate models were adjusted for specific confounders that were previously defined in the literature and on directed acyclic graphs (DAG). DAGs are diagrams that make it possible to draw causal and theoretical paths between variables, indicate confounders and to determine the minimum set of confounders to adjust in the analytical models (26). The DAGs were constructed using daggity (27). A unique set of confounders was selected for all outcomes and consisted of maternal education, early pregnancy BMI, skin color, smoking habit, alcohol consumption and energy intake (**Supplemental figure**). Furthermore, preterm infants were excluded from the BW, BL, and first minute Apgar models since, according to the DAG, adjusting for gestational age is not appropriate and adding those cases could skew the distribution down. All the statistical analyses were conducted with Stata Data Analysis and Statistical Software (Stata, version 15) (28).

## Ethical approval

The current study was performed in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. An informed consent for participation was thoroughly explained and signed by all participants. This study was approved by the Rio de Janeiro Federal University Maternity Teaching Hospital Ethics Committee (protocol number: 0023.0.361.000-08) and the Municipal Secretary of Rio de Janeiro Ethics Committee (protocol number: 0139.0.314.000-09).

## Results

The pregnant women who participated in this study were 26.8 (5.6) years old, had 8.7 (2.9) years of education, an early pregnancy BMI of 25.1 (4.7) kg/m<sup>2</sup>, and an energy intake of 2,439.7 (906.0) Kcal at 6 months prior to gestation. Vitamin D concentrations at the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters were 65.6 (17.5), 78.0 (21.8) and 83.8 (24.4) nmol/L, respectively. The mean (SD) gestational age at birth was 38.6 (2.0) weeks, BW 3,254.2 (555.9) g, BW z-score 0.340 (1.105), BL 49.3 (3.3) cm, BL z-score 0.440 (1.501) and the first minute Apgar score was 8.2 (1.5). Additionally, 5.6% of newborns were SGA, 18.3% were LGA and 12.8% were preterm (**Table 1**).

The increase in vitamin D concentrations in all trimesters was associated with an increased risk of preterm birth [1<sup>st</sup> trimester: *incidence-rate ratios* (IRR)=1.018; 95%CI 1.002; 1.033; *P*=0.025; 2<sup>nd</sup> trimester: IRR=1.051, 95%CI 1.034; 1.068, *P*<0.001; 3<sup>rd</sup> trimester: IRR=1.037, 95%CI 1.018; 1.056, *P*<0.001] (**Table 2**).

There was no significant association between mean weekly variation in vitamin D concentrations (slope) and BW ( $\beta$ : 110.981, 95%CI - 19.169; 241.13, *P*=0.094, BL ( $\beta$ =0.671, 95%CI -0.232; 1.574, *P*=0.731), nor with the first minute Apgar score

( $\beta=0.261$ , 95%CI -0.125; 0.648,  $P=0.184$ ) (**Table 3**). We found a direct association between mean weekly variation in vitamin D concentrations and BW z-score ( $\beta=0.350$ , 95%CI 0.062; 0.638,  $P=0.017$ ) and a suggestive association with BL z-score ( $\beta=0.393$ , 95%CI -0.022; 0.807,  $P=0.063$ ) (**Table 3, Figure 2A and 2B**). The vitamin D slope was directly associated with LGA risk (IRR=1.975, 95%CI 1.075; 3.628,  $P=0.028$ ) and preterm birth risk (IRR= 7.050, 95%CI 3.035; 16.378,  $P <0.001$ ) (**Table 3**).

## Discussion

This study presented interesting findings. First, we found a direct association between weekly variation in vitamin D concentrations during pregnancy and BW and BL z-scores (suggestive,  $P=0.063$ ). Moreover, there was an association between vitamin D concentrations and an increased risk of LGA and preterm birth. We also found a direct association between vitamin D concentrations and preterm risk for all trimesters when they were independently analyzed.

The majority of the previous studies that associated vitamin D concentrations with neonatal outcomes were derived from cross-sectional analyses and showed a direct association with BW and an inverse association with SGA. A Brazilian cohort with 327 pregnant women was studied during the third trimester and showed a positive association between maternal vitamin D concentrations and BW ( $\beta=3.06$ ; 95%CI 1.37, 4.75;  $P <0.01$ ) (29). These results agree with the findings of the present study, where a positive association with BW z-scores was found, although the association with BW was not significant.

A recent meta-analysis of observational studies evaluated the association between three different cutoff points of vitamin D adequacy (<30 vs.  $\geq 30$  nmol/L; <50 vs.  $\geq 50$  nmol/L) and birth outcomes (14). The authors found that women with vitamin D

concentrations that were <30 nmol/L gave birth to neonates that, on average, had a BW that was 98 g lighter and a BL that was 0.43 cm shorter when compared with women with vitamin D concentrations  $\geq$  30 nmol/L. Women with vitamin D concentrations <30 nmol/L presented with a 1.72 fold chance of developing SGA. Furthermore, women with vitamin D concentrations <50 nmol presented a higher risk of SGA (OR= 1.31, 95%CI 1.12; 1.54) and preterm birth (OR= 1.21, 95%CI 1.07;1.38) than women with vitamin D concentrations  $\geq$  50 nmol/L. Nobles et al. (2015) evaluated baseline vitamin D concentrations (continuous and categorical) at 15 weeks of gestation for 237 Hispanic and non-Hispanic American pregnant women participating in a clinical trial (17). Although the authors did not find a significant association with vitamin D concentrations as a continuous variable, women with vitamin D concentrations that were <75 nmol/L and <50nmol/L delivered infants that weighed less than 139 g and 175.5 g when compared with women that had vitamin D concentrations  $\geq$  75 nmol/L and  $\geq$  50 nmol/L, respectively. The prevalence of SGA and LGA were 9.6% and 14.2%, respectively, but there were no associations with vitamin D concentrations (17). In the currently study, the prevalence of SGA was lower (5.6%) and LGA higher (18.3%) and the mean weekly variation vitamin D was directly associated to the chance of LGA (IRR=1.975; 95%CI 1.075; 3.628).

A possible mechanism that may explain the increase in BW and risk of LGA for newborns of mothers with higher vitamin D concentrations could relate to the presence of an enzyme that converts 25(OH)D into 1,25(OH)2D and vitamin D receptors in the placenta (13). Thus, vitamin D could regulate the expression of hormones such as progesterone, which affects maternal glucose by increasing insulin resistance to make glucose more available to the fetus and providing energy for fetal growth (30, 31). As a

result, the fetus could present with increased fat mass in addition to bone mass, which would explain the larger increase in BW than BL.

Studies of vitamin D concentrations throughout pregnancy are important as they allow for a clearer understanding of the role of vitamin D concentrations in each trimester as it relates to neonatal outcomes. A Danish cohort evaluated pregnant women during the three gestational trimesters but did not find a statistical association between 25(OH)D serum concentrations and BW, BL or first minute Apgar scores as shown in the current study (except the direct association with BW Z-score) (16). Additionally, a Chinese cohort showed no differences between low ( $<50$  nmol/L), medium ( $\geq 50$  nmol/L and  $<75$  nmol/L) or high concentrations ( $\geq 75$  nmol/L) of vitamin D and Apgar scores between pregnant women (16–20 weeks of gestation) (32). Only one observational study found an inverse association between vitamin D concentrations during the first trimester of pregnancy and Apgar scores, in which women with vitamin D concentrations  $<75$  nmol/L were 40% more likely to have neonates with first minute Apgar scores  $<7$  (33). Thus, the studies are inconclusive, which enhance the further exploration of the role of vitamin D and birth outcomes.

There is evidence of an inverse association between vitamin D and preterm births (14, 34, 35). Al-Shaik et al. (2016) studied 1,000 women from Saudi Arabia and found that the prevalence of preterm birth was higher in the vitamin D sufficiency group (10.8%) when compared with the insufficiency (3.1%) or deficiency (8.5%) groups, although the results were not statistically significant (36). Additionally, a prospective study with Chinese women showed similar results, i.e., the prevalence of preterm births was higher in women with vitamin D concentrations  $\geq 75$  nmol/L (20.8%) than in women with concentrations between 50–75 nmol/L (22.7%) or  $<50$  nmol/L (21.0%) (32). In the present study, we found similar results once there was an increase of 1

nmol/L of vitamin D per week during pregnancy is associated with an approximately 7-fold increase in the risk of preterm birth. In contrast, Kassai et al. (2018) conducted a cross-sectional study with 158 Brazilian women, which showedfound lower concentrations of vitamin D in women who gave birth to preterm neonates ( $n=66$ , 54.2 nmol/L) when compared to full-term ( $n=92$ , 65.4 nmol/L,  $P=0.011$ ) (34). This same study found that women who were classified as deficient (vitamin D  $<75$  nmol/L) were approximately 3-times more likely to experience a preterm birth (34). A meta-analysis of 10 studies that comprised 10,098 participants showed that pregnant women with vitamin D deficiency ( $<50$  nmol/L) are 1.29 times more likely of delivering a preterm birth than women with sufficient concentrations ( $\geq75$  nmol/L) (35). Results from a meta-analysis of 54 studies with a total of 67,484 participants showed an increased chance of preterm birth in vitamin D-deficient women according to two criteria ( $<30$  nmol/L: OR 1.23;  $<50$  nmol/L: OR 1.21) (14).

The inflammatory response to bacterial infections during pregnancy is one of the mechanisms involved in preterm occurrences (37, 38). The release of cytokines such as interleukine-1 (pro-inflammatory) in response to bacterial products is related to preterm labor, possibly due to its ability to stimulate uterine contractions (37). The suggested protective role of vitamin D on preterm births is thought to involve its immunological effects on maternal infections by stimulating the expression of proteins that protect against pathogens and lead to a reduction in cytokine production (37, 39, 40). The participants of this study's cohort were generally healthy and, potentially due to this healthy profile, the association between vitamin D and preterm birth was not inverse.

Most of the studies that have evaluated the association between vitamin D and these outcomes have used vitamin D cutoffs that were not established for pregnancy. Because of the cutoff controversy, evaluating vitamin D as a continuous variable is

advantageous because it does not require adopting inadequate cutoffs. The repeated measures of vitamin D concentrations during pregnancy allow us to establish a relationship between vitamin D variation throughout the duration of the pregnancy. Thus, the use of procedures such as BLUP enables to perform these types of time variation analyses, i.e., when the exposure is a repeated measured and the outcome is evaluated cross-sectionally. There is only one study that has evaluated vitamin D throughout pregnancy, and a point-to-point analysis was performed without considering the correlation between the measurements. A strength of the present study is the gold standard method used to measure plasma 25(OH)D concentrations, i.e., LC–MS/MS. However, some limitations of this study should be acknowledged. Not all women completed every visit and there was a loss of 6.7% of the participants during follow-up. The use of vitamin D supplements could have influenced these results, however, women participating in the current study did not use supplements as previously reported (41).

In conclusion, we found that vitamin D concentrations during pregnancy were associated with birth outcomes in a cohort of pregnant Brazilian women. When vitamin D measurements were separately analyzed by trimester, we showed that higher concentrations of vitamin D during the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters increased the chance of preterm birth. This result remained significant in the longitudinal analysis and higher concentrations of vitamin D were positively correlated with BW and BL z-scores. We did not find any mechanisms that explained the direct association between vitamin D concentrations and the risk of preterm birth. However, we speculate that vitamin D may increase the rate of fetal maturation since it affects cell differentiation. Thus, additional studies are necessary to elucidate the role of vitamin D concentrations on the duration of pregnancy.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to all of the women who volunteered to participate in this cohort study, to the managers and professionals of the Municipal Health Center Heitor Beltrão for providing us with the space and opportunities for the data collection and to the Quest Diagnostics Nichols Institute laboratory (San Juan Capistrano, CA, USA) for performing the vitamin D concentration analyses. Moreover, we thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq in the Portuguese acronym; grant number: 471196/2010-0) and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ for the Portuguese acronym, grant number E-26/111.400/2010, E\_14/2010) for the financial support.

### **Authorship**

Benaim C, Kac G developed the research question and designed the study. Benaim C and Carrilho TRB conducted the statistical analyses. Kac G, Carrilho TRB and Farias D provided support for the statistical analyses. Carrilho TRB assisted with the literature review and with writing the manuscript. All of the authors have made substantial contributions to the manuscript and approved this final revision.

## **References**

1. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007;261(5):412-7.
2. Savchev S, Sanz-Cortes M, Cruz-Martinez R, Arranz A, Botet F, Gratacos E, et al. Neurodevelopmental outcome of full-term small-for-gestational-age infants with normal placental function. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42(2):201-6.
3. Platt MJ. Outcomes in preterm infants. *Public Health.* 2014;128(5):399-403.
4. Kleiser C, Schaffrath Rosario A, Mensink GB, Prinz-Langenohl R, Kurth BM. Potential determinants of obesity among children and adolescents in Germany: results from the cross-sectional KiGGS Study. *BMC Public Health.* 2009;9:46.
5. de Jong F, Monuteaux MC, van Elburg RM, Gillman MW, Belfort MB. Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension.* 2012;59(2):226-34.
6. Nam HK, Lee KH. Small for gestational age and obesity: epidemiology and general risks. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;23(1):9-13.
7. Frey HA, Klebanoff MA. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21(2):68-73.
8. McCowan L, Horgan RP. Risk factors for small for gestational age infants. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2009;23(6):779-93.
9. Triunfo S, Lanzone A, Lindqvist PG. Low maternal circulating levels of vitamin D as potential determinant in the development of gestational diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(10):1049-59.
10. Mannion CA, Gray-Donald K, Koski KG. Association of low intake of milk and vitamin D during pregnancy with decreased birth weight. *CMAJ.* 2006;174(9):1273-7.

11. Francis EC, Hinkle SN, Song Y, Rawal S, Donnelly SR, Zhu Y, et al. Longitudinal Maternal Vitamin D Status during Pregnancy Is Associated with Neonatal Anthropometric Measures. *Nutrients*. 2018;10(11).
12. Bilic M, Qamar H, Onoyovwi A, Korsiak J, Papp E, Al Mahmud A, et al. Prenatal vitamin D and cord blood insulin-like growth factors in Dhaka, Bangladesh. *Endocr Connect*. 2019.
13. Wagner CL, Taylor SN, Johnson DD, Hollis BW. The role of vitamin D in pregnancy and lactation: emerging concepts. *Womens Health (Lond)*. 2012;8(3):323-40.
14. Tous M, Villalobos M, Iglesias L, Fernández-Barrés S, Arija V. Vitamin D status during pregnancy and offspring outcomes: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Clin Nutr*. 2019.
15. Amegah AK, Klevor MK, Wagner CL. Maternal vitamin D insufficiency and risk of adverse pregnancy and birth outcomes: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173605.
16. Møller UK, Streym S, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(7):862-8.
17. Nobles CJ, Markenson G, Chasan-Taber L. Early pregnancy vitamin D status and risk for adverse maternal and infant outcomes in a bi-ethnic cohort: the Behaviors Affecting Baby and You (B.A.B.Y.) Study. *Br J Nutr*. 2015;114(12):2116-28.
18. van der Pligt P, Willcox J, Szymlek-Gay EA, Murray E, Worsley A, Daly RM. Associations of Maternal Vitamin D Deficiency with Pregnancy and Neonatal Complications in Developing Countries: A Systematic Review. *Nutrients*. 2018;10(5).

19. Kelishadi R, Sharifi-Ghazvini F, Poursafa P, Mehrabian F, Farajian S, Yousefy H, et al. Determinants of hypovitaminosis d in pregnant women and their newborns in a sunny region. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:460970.
20. El-Khoury JM, Reineks EZ, Wang S. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. *Clin Biochem.* 2011;44(1):66-76.
21. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet.* 2014;384(9946):857-68.
22. Gordon CC, Chumlea WC, Roche AF. Stature, recumbent length, and weight. Anthropometric standardization reference manual Champaign: Human kinetics Books. 1988:3-8.
23. Giacomello A, Schmidt MI, Nunes MAA, Duncan BB, Soares RM, Manzolli P, et al. Validation of a Food Frequency Questionnaire conducted among pregnant women attended by the Brazilian National Health Service, in two municipalities of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil.* 2008;8(4):445-54.
24. Sichieri R, Everhart J. Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutrition Research.* 1998;18(10):1649-59.
25. Chen YH, Ferguson KK, Meeker JD, McElrath TF, Mukherjee B. Statistical methods for modeling repeated measures of maternal environmental exposure biomarkers during pregnancy in association with preterm birth. *Environ Health.* 2015;14:9.

26. MM Greenland S G. Causal diagrams. In: TL RKGSL, editor. *Modern Epidemiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 183 – 209.
27. Textor J, Hardt J, Knüppel S. DAGitty: a graphical tool for analyzing causal diagrams. *Epidemiology*. 2011;22(5):745.
28. StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC; 2017.
29. Pereira-Santos M, Carvalho GQ, Dos Santos DB, Oliveira AM. Influence of vitamin D serum concentration, prenatal care and social determinants on birth weight: a northeastern Brazilian cohort study. *Br J Nutr*. 2019;122(3):284-92.
30. Lapillonne A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Med Hypotheses*. 2010;74(1):71-5.
31. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. 2010;31(12):1027-34.
32. Zhou J, Su L, Liu M, Liu Y, Cao X, Wang Z, et al. Associations between 25-hydroxyvitamin D levels and pregnancy outcomes: a prospective observational study in southern China. *Eur J Clin Nutr*. 2014;68(8):925-30.
33. Fernández-Alonso AM, Dionis-Sánchez EC, Chedraui P, González-Salmerón MD, Pérez-López FR, Group SVDaWsHR. First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> status and pregnancy outcome. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012;116(1):6-9.
34. Kassai MS, Cafeo FR, Affonso-Kaufman FA, Suano-Souza FI, Sarni ROS. Vitamin D plasma concentrations in pregnant women and their preterm newborns. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018;18(1):412.

35. Qin LL, Lu FG, Yang SH, Xu HL, Luo BA. Does Maternal Vitamin D Deficiency Increase the Risk of Preterm Birth: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients.* 2016;8(5).
36. Al-Shaikh GK, Ibrahim GH, Fayed AA, Al-Mandeel H. Impact of vitamin D deficiency on maternal and birth outcomes in the Saudi population: a cross-sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2016;16:119.
37. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007;25(1):21-39.
38. Bastek JA, Gómez LM, Elovitz MA. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Clin Perinatol.* 2011;38(3):385-406.
39. Hewison M. Antibacterial effects of vitamin D. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(6):337-45.
40. Liu NQ, Hewison M. Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Arch Biochem Biophys.* 2012;523(1):37-47.
41. Figueiredo AC, Cocate PG, Adegbeye AR, Franco-Sena AB, Farias DR, de Castro MB, et al. Changes in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D during pregnancy: a Brazilian cohort. *Eur J Nutr.* 2017.

**Table 1.** Maternal baseline and neonatal characteristics of a cohort from Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.

<b>Continuous variables</b>	Total (n)	Mean (SD)
Maternal age (years)	180	26.8 (5.6)
Maternal education (years)	180	8.7 (2.9)
Pre-pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )	180	25.1 (4.7)
Vitamin D (nmol/L)*		
1 <sup>st</sup> trimester	180	65.6 (17.5)
2 <sup>nd</sup> trimester	170	78.0 (21.8)
3 <sup>rd</sup> trimester	168	83.8 (24.4)
Maternal energy intake (Kcal)	180	2,439.7 (906.0)
Birth weight (g)	180	3,254.1 (555.9)
Birth weight z-score	180	0.340 (1.105)
Birth length (cm)	180	49.3 (3.3)
Birth length z-score	180	0.440 (1.501)
Gestational age at birth (weeks)	180	38.6 (2.0)
First minute Apgar score	135	8.2 (1.4)
<b>Categorical variables</b>	n	%
Smoking habit		
No	170	94.4
Yes	10	5.6
Alcohol consumption		
No	147	81.7
Yes	33	18.3
Skin colour		
White	49	27.2
Black/mixed	131	72.8
Birth weight z-score classification		
AGE	137	76.1
SGA	10	5.6
LGA	33	18.3
Preterm birth**		
No	157	87.2
Yes	23	12.8

Abbreviations: SD=standard deviation; BMI=body mass index; AGE=appropriate for gestational age; SGA=small for gestational age; LGA=large for gestational age.

\*Vitamin D referred to 25-hydroxyvitamin D plasma concentration, which was the only maternal characteristic described by each trimester of pregnancy

\*\*Gestational age at birth<37 weeks

**Table 2.** Association between maternal serum vitamin D and birth outcomes at each gestational trimester. Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.

Outcomes	n	$\beta^1$	95%CI	$P^2$
<b>Birth weight (g)*</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	157	-3.351	-7.630; 0.928	0.124
2 <sup>nd</sup> trimester	158	0.713	-2.679; 4.105	0.678
3 <sup>rd</sup> trimester	155	1.848	-1.007; 4.702	0.203
<b>Birth weight z-score</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	180	-0.005	-0.014; 0.005	0.336
2 <sup>nd</sup> trimester	170	0.005	-0.002; 0.012	0.194
3 <sup>rd</sup> trimester	168	0.004	-0.002; 0.011	0.153
<b>Birth length (cm)*</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	157	-0.012	-0.041; 0.017	0.410
2 <sup>nd</sup> trimester	158	0.002	-0.021; 0.025	0.873
3 <sup>rd</sup> trimester	155	0.013	-0.006; 0.031	0.187
<b>Birth length z-score</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	180	-0.001	-0.015; 0.012	0.824
2 <sup>nd</sup> trimester	170	0.003	-0.008; 0.013	0.600
3 <sup>rd</sup> trimester	168	0.006	-0.003; 0.015	0.188
<b>First minute Apgar score*</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	135	0.002	-0.012; 0.017	0.784
2 <sup>nd</sup> trimester	143	0.005	-0.004; 0.014	0.270
3 <sup>rd</sup> trimester	139	0.007	-0.001; 0.014	0.104
<b>SGA**</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	149	1.015	0.987; 1.043	0.303
2 <sup>nd</sup> trimester	142	1.020	0.985; 1.057	0.265
3 <sup>rd</sup> trimester	143	1.002	0.975; 1.030	0.882
<b>LGA***</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	170	1.003	0.981; 1.025	0.814
2 <sup>nd</sup> trimester	163	1.010	0.992; 1.028	0.270
3 <sup>rd</sup> trimester	160	1.010	0.995; 1.026	0.198
<b>Preterm birth****</b>				
1 <sup>st</sup> trimester	180	1.018	1.002; 1.033	<b>0.025</b>
2 <sup>nd</sup> trimester	170	1.051	1.034; 1.068	<b>&lt;0.001</b>
3 <sup>rd</sup> trimester	168	1.037	1.018; 1.056	<b>&lt;0.001</b>

Abbreviations: 95%CI=95% confidence interval; SGA=small for gestational age; LGA=large for

gestational age; IRR=incidence-rate ratios

<sup>1</sup> $\beta$ : Adjusted linear regression coefficient;

<sup>2</sup>P refers to maximum likelihood estimator.

<sup>3</sup>IRR: Adjusted Poisson regression;

\*Preterm birth neonates were excluded.

\*\*reference category: appropriate for gestational age. LGA were excluded

\*\*\*reference category: appropriate for gestational age. SGA were excluded

\*\*\*\*Gestational age at birth<37 weeks.

**Note:** All models were adjusted for early body mass index; skin colour; smoking habit; alcohol consumption and energy intake.

**Table 3.** Association between vitamin D mean weekly gestational variation and birth outcomes. Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2011.

Outcomes	slope <sup>1</sup>			intercept <sup>2</sup>		
	$\beta^3$	95%CI	P <sup>4</sup>	$\beta^3$	95%CI	P <sup>4</sup>
<b>Birth weight (g)*</b>	110.981	-19.169; 241.131	0.094	-4.943	-12.169; 2.253	0.177
<b>Birth weight Z-score</b>	0.350	0.062; 0.638	<b>0.017</b>	-0.006	-0.023; 0.009	0.408
<b>Birth length (cm)*</b>	0.671	-0.232; 1.574	0.144	-0.018	-0.068; 0.032	0.479
<b>Birth length Z-score</b>	0.393	-0.022; 0.807	<b>0.063</b>	-0.006	-0.029; 0.018	0.631
<b>First minute Apgar score*</b>	0.261	-0.125; 0.648	0.184	0.008	-0.125; 0.648	0.496
	IRR <sup>5</sup>	95%CI	P <sup>4</sup>	IRR	95%CI	P <sup>4</sup>
<b>SGA**</b>	1.258	0.340; 4.658	0.731	1.024	0.967; 1.084	0.410
<b>LGA***</b>	1.975	1.075; 3.628	<b>0.028</b>	0.989	0.947; 1.034	0.629
<b>Preterm birth****</b>	7.050	3.035; 16.378	<b>&lt;0.001</b>	1.039	1.012; 1.066	<b>0.004</b>

Abbreviations: 95%CI=95% confidence interval; SGA=small for gestational age; LGA=large for gestational age; IRR=incidence-rate ratios

<sup>1</sup> Vitamin D [25(OH)D] weekly gestational variation. Obtained by best linear unpredicted model (BLUP) analysis

<sup>2</sup> Vitamin D [25(OH)D] mean concentration when gestational age is zero. Obtained by best linear unpredicted model (BLUP) analysis

<sup>3</sup> $\beta$ : linear regression coefficient;

<sup>4</sup>P refers to maximum likelihood estimator;

<sup>5</sup> $\beta$ : Poisson regression coefficient;

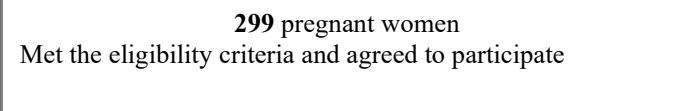
\*Preterm birth neonates were excluded

\*\*reference category: appropriate for gestational age. LGA were excluded

\*\*\*reference category: appropriate for gestational age. SGA were excluded

\*\*\*\*Gestational age at birth<37 weeks.

**Note:** models were adjusted for early body mass index; skin colour; smoking habit; alcohol consumption and energy intake.



**75 women were excluded**

- 25 miscarriages
- 3 women with SBP  $\geq$ 140 mmHg and/or DBP  $\geq$  90
- 4 multiple gestation
- 11 with a confirmed pre-pregnancy diagnosis of chronic non-communicable diseases
- 15 advanced pregnancy ( $\geq$ 14 weeks of gestation)
- 7 abandoned prenatal care at the public health centre
- 5 missing the baseline interview
- 5 stillbirth

**44 additional exclusions**

- 26 had no vitamin D at baseline
- 13 without birth weight information
- 3 without birth length the consent
- 1 gave birth  $>$  42 weeks of gestation
- 1 gestational age at birth register misleading

**10 losses**

- 4 had no vitamin D measure
- 6 without dietetic data

**2 losses**

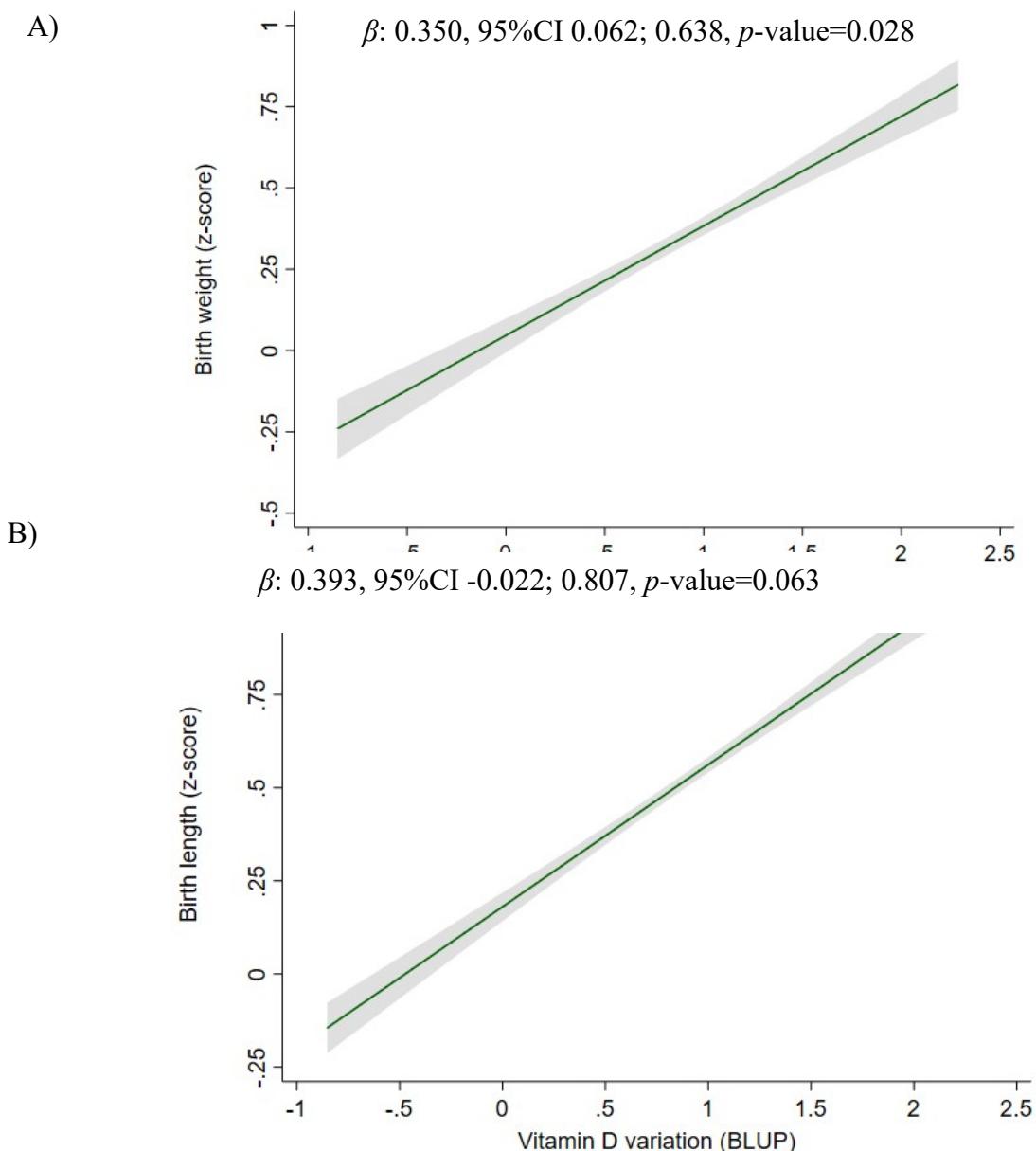
- 2 had no vitamin D measure

**180**  
Participants in the 1<sup>st</sup> trimester (5<sup>th</sup>-13<sup>th</sup>)

**170**  
Participants in the 2<sup>nd</sup> trimester (20<sup>th</sup>-26<sup>th</sup>)

**168**  
Participants in the 3<sup>rd</sup> trimester (30<sup>th</sup>-36<sup>th</sup>)

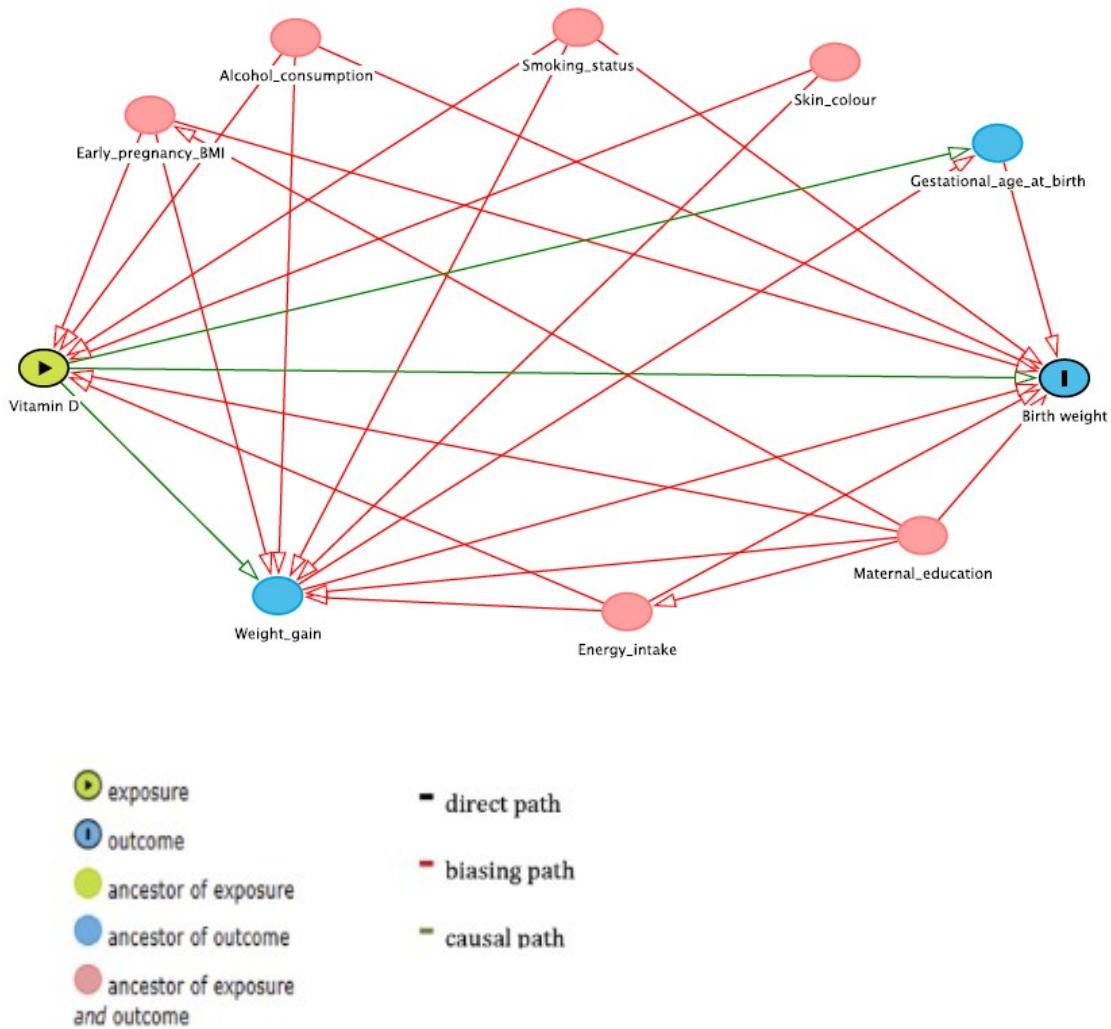
**Figure 1.** Flowchart. The process of recruitment and pregnancy follow-up of women attending at a public prenatal care in Rio de Janeiro.



**Figure 2.** Relationship between vitamin D weekly variation and birth outcomes.

A) Birth weight (z-score)

B) Birth length (z-score)



**Supplemental figure.** Direct Acyclic Graph for a study of vitamin D and birth weight, Rio de Janeiro, Brazil, 2009-2012.

BMI: body mass index.

## 8. Considerações finais

No primeiro artigo, foram avaliadas as associações entre os marcadores do metabolismo glicídico e adipocinas na gestação.

De acordo com o ponto de corte estipulados pela ES, as gestantes com adequação de vitamina D ( $\geq 75$  nmol/L) no primeiro trimestre de gestação apresentaram aumentos mais expressivos de adiponectina e insulina ao longo da gestação. Porém, a resistência à insulina e a glicemia não foram diferentes entre os grupos de adequação de vitamina D, indicando que esse aumento da insulina foi eficiente em desempenhar seu papel de transporte de glicose intracelular. Quando consideramos o ponto de corte do IOM, essas associações não foram observadas. Porém as gestantes com insuficiência de vitamina D ( $\leq 50$  nmol/L) no primeiro trimestre, as quais iniciaram a gestação com menores concentrações séricas de leptina, apresentaram maior aumento dessa adipocina ao longo da gestação e, inclusive, superaram os valores das mulheres adequadas em vitamina D. Este resultado indica que a insuficiência de vitamina D pode implicar em modificações na secreção desta adipocina resultando em maior secreção desta.

Estes resultados mostram que dependendo do ponto de corte escolhido, os desfechos podem ser diferentes. Devido à ausência de pontos de corte definidos para a classificação do estado de vitamina D, não é possível ter uma conclusão definitiva sobre a influência da insuficiência de vitamina D nos marcadores do metabolismo glicídico, leptina e adiponectina.

A associação direta entre a variação das concentrações séricas semanais de vitamina D e o escore-z de PN, indicam que o aumento da vitamina D na gestação possivelmente resulta em incremento de PN, corroborando com os achados na literatura científica. Essa direção também é plausível com o aumento de risco de GIG que foi encontrado no presente estudo.

Os resultados de risco de prematuridade foram contrários ao descrito na literatura, porém as análises foram cuidadosamente conduzidas e ainda são necessários mais estudos que esclareçam os mecanismos de atuação da vitamina D nos desfechos gestacionais e neonatais. Acredita-se que a relação da vitamina D com a diferenciação e proliferação celular possa implicar em maior maturidade no organismo fetal, antecipando o trabalho de parto.

Vale ressaltar que os métodos estatísticos empregados são robustos, isto é, modelo de regressão de efeitos mistos para dados longitudinais e a utilização melhor

predição linear imparcial (*best linear unbiased prediction*, BLUP) para estimar a variação semanal da vitamina D na gestação, garantindo qualidade na condução das análises estatísticas e inferências. Adicionalmente, foram utilizados os diagramas causais que deixam claros quais variáveis são realmente confundidoras dos modelos. Em relação às análises bioquímicas de vitamina D, foi empregado o modelo considerado padrão ouro. Todos estes cuidados e procedimentos foram essenciais para que os dados avaliados fossem de qualidade e minimizasse o risco de vícios. Um último ponto que merece destaque são os 3 pontos de análises bioquímicas. Poucos estudos realizam medidas séricas em todos os trimestres gestacionais, então a presente tese traz resultados inovadores no ponto de vista da influência das medidas ao longo de toda a gestação.

## 9. Referências

- ABRAMS, S. A. In utero physiology: role in nutrient delivery and fetal development for calcium, phosphorus, and vitamin D. **Am J Clin Nutr**, 85, n. 2, p. 604S-607S, Feb 2007.
- AGUDELO-ZAPATA, Y.; Maldonado-Acosta, L. M.; SANDOVAL-ALZATE, H. F.; POVEDA, N. E. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D levels throughout pregnancy: a longitudinal study in healthy and preeclamptic pregnant women. **Endocr Connect**, 7, n. 5, p. 698-707, May 2018.
- AMEGAH, A. K.; KLEVOR, M. K.; WAGNER, C. L. Maternal vitamin D insufficiency and risk of adverse pregnancy and birth outcomes: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **PLoS One**, 12, n. 3, p. e0173605, 2017.
- APGAR, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. **Curr Res Anesth Analg**, 32, n. 4, p. 260-267, 1953 Jul-Aug 1953.
- ARABI, A.; EL RASSI, R.; EL-HAJJ FULEIHAN, G. Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes. **Nat Rev Endocrinol**, 6, n. 10, p. 550-561, Oct 2010.
- ASSOCIATION, A. D. Gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 27 Suppl 1, p. S88-90, Jan 2004.
- BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.
- BASTEK, J. A.; GÓMEZ, L. M.; ELOVITZ, M. A. The role of inflammation and infection in preterm birth. **Clin Perinatol**, 38, n. 3, p. 385-406, Sep 2011.
- BIKLE, D. D.; GEE, E.; HALLORAN, B.; HADDAD, J. G. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. **J Clin Invest**, 74, n. 6, p. 1966-1971, Dec 1984.
- BOGESS, K. A.; ESPINOLA, J. A.; MOSS, K.; BECK, J. *et al.* Vitamin D status and periodontal disease among pregnant women. **J Periodontol**, 82, n. 2, p. 195-200, Feb 2011.
- BOUILLON, R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. **Nat Rev Endocrinol**, 13, n. 8, p. 466-479, 08 2017.
- BOZKURT, L.; GÖBL, C. S.; BAUMGARTNER-PARZER, S.; LUGER, A. *et al.* Adiponectin and Leptin at Early Pregnancy: Association to Actual Glucose Disposal and Risk for GDM-A Prospective Cohort Study. **Int J Endocrinol**, 2018, p. 5463762, 2018.
- BRANNON, P. M.; PICCIANO, M. F. Vitamin D in pregnancy and lactation in humans. **Annu Rev Nutr**, 31, p. 89-115, Aug 2011.

BRASIL. Vigilância alimentar e nutricional - Sisvan: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde / [Andressa Araújo Fagundes et al.]. MINISTÉRIO DA SAÚDE, O., FIOCRUZ, MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL E COMBATE À FOME. Brasília: Ministério da Saúde; 120 p. 2004.

CASEY, C.; MCGINTY, A.; HOLMES, V. A.; HILL, A. J. *et al.* Maternal vitamin D and markers of glycaemia during pregnancy in the Belfast centre of the Hyperglycaemia and Adverse Pregnancy Outcome study. **Diabet Med**, 35, n. 7, p. 972-979, 07 2018.

CASTRO, L. C. G. D. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 55, p. 566-575, 2011.

CATALANO, P. M.; ROMAN-DRAGO, N. M.; AMINI, S. B.; SIMS, E. A. Longitudinal changes in body composition and energy balance in lean women with normal and abnormal glucose tolerance during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, 179, n. 1, p. 156-165, Jul 1998.

CATALANO, P. M.; TYZBIR, E. D.; ROMAN, N. M.; AMINI, S. B. *et al.* Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. **Am J Obstet Gynecol**, 165, n. 6 Pt 1, p. 1667-1672, Dec 1991.

CHEN, Y.; ZHU, B.; WU, X.; LI, S. *et al.* Association between maternal vitamin D deficiency and small for gestational age: evidence from a meta-analysis of prospective cohort studies. **BMJ Open**, 7, n. 8, p. e016404, Aug 2017.

CHEN, Y. H.; FERGUSON, K. K.; MEEKER, J. D.; MCELRATH, T. F. *et al.* Statistical methods for modeling repeated measures of maternal environmental exposure biomarkers during pregnancy in association with preterm birth. **Environ Health**, 14, p. 9, Jan 2015.

CHRISTIAN, P. Micronutrients, birth weight, and survival. **Annu Rev Nutr**, 30, p. 83-104, Aug 2010.

COHEN-LAHAV, M.; SHANY, S.; TOBVIN, D.; CHAIMOVITZ, C. *et al.* Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalphal levels. **Nephrol Dial Transplant**, 21, n. 4, p. 889-897, Apr 2006.

DE JONG, F.; MONUTEAUX, M. C.; VAN ELBURG, R. M.; GILLMAN, M. W. *et al.* Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. **Hypertension**, 59, n. 2, p. 226-234, Feb 2012.

DÍAZ, L.; NOYOLA-MARTÍNEZ, N.; BARRERA, D.; HERNÁNDEZ, G. *et al.* Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. **J Reprod Immunol**, 81, n. 1, p. 17-24, Jul 2009.

ENQUOBHARIE, D. A.; WILLIAMS, M. A.; QIU, C.; SISCOVICK, D. S. *et al.* Global maternal early pregnancy peripheral blood mRNA and miRNA expression

profiles according to plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations. **J Matern Fetal Neonatal Med**, 24, n. 8, p. 1002-1012, Aug 2011.

EVANS, K. N.; BULMER, J. N.; KILBY, M. D.; HEWISON, M. Vitamin D and placental-decidua function. **J Soc Gynecol Investig**, 11, n. 5, p. 263-271, Jul 2004.

FALLO, F.; DELLA MEA, P.; SONINO, N.; BERTELLO, C. *et al.* Adiponectin and insulin sensitivity in primary aldosteronism. **Am J Hypertens**, 20, n. 8, p. 855-861, Aug 2007.

FERNÁNDEZ-ALONSO, A. M.; DIONIS-SÁNCHEZ, E. C.; CHEDRAUI, P.; GONZÁLEZ-SALMERÓN, M. D. *et al.* First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> status and pregnancy outcome. **Int J Gynaecol Obstet**, 116, n. 1, p. 6-9, Jan 2012.

FIALOVÁ, L.; MALBOHAN, I.; KALOUSOVÁ, M.; SOUKUPOVÁ, J. *et al.* Oxidative stress and inflammation in pregnancy. **Scand J Clin Lab Invest**, 66, n. 2, p. 121-127, 2006.

FIGUEIREDO, A. C.; COCATE, P. G.; ADEGBOYE, A. R.; FRANCO-SENA, A. B. *et al.* Changes in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D during pregnancy: a Brazilian cohort. **Eur J Nutr**, Mar 2017.

FRANCIS, E. C.; HINKLE, S. N.; SONG, Y.; RAWAL, S. *et al.* Longitudinal Maternal Vitamin D Status during Pregnancy Is Associated with Neonatal Anthropometric Measures. **Nutrients**, 10, n. 11, Nov 2018.

FUGLSANG, J.; SKJAERBAEK, C.; FRYSTYK, J.; FLYVBJERG, A. *et al.* A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. **BJOG**, 113, n. 1, p. 110-113, Jan 2006.

GACCIOLI, F.; LAGER, S. Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. **Front Physiol**, 7, p. 40, 2016.

**GIACOMELLO, A.; SCHMIDT, M. I.; NUNES, M. A. A.; DUNCAN, B. B. *et al.* Validation of a Food Frequency Questionnaire conducted among pregnant women attended by the Brazilian National Health Service, in two municipalities of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, 8, n. 4, p. 445-454, 2008.

GOLDSTEIN, R. F.; ABELL, S. K.; RANASINHA, S.; MISSO, M. *et al.* Association of Gestational Weight Gain With Maternal and Infant Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, 317, n. 21, p. 2207-2225, Jun 2017.

GREER, F. R.; HOLLIS, B. W.; NAPOLI, J. L. High concentrations of vitamin D2 in human milk associated with pharmacologic doses of vitamin D2. **J Pediatr**, 105, n. 1, p. 61-64, Jul 1984.

- HAJIMOHAMMADI, M.; SHAB-BIDAR, S.; NEYESTANI, T. R. Vitamin D and serum leptin: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. **Eur J Clin Nutr**, 71, n. 10, p. 1144-1153, Oct 2017.
- HENSON, M. C.; CASTRACANE, V. D. Leptin in pregnancy: an update. **Biol Reprod**, 74, n. 2, p. 218-229, Feb 2006.
- HEWISON, M. Antibacterial effects of vitamin D. **Nat Rev Endocrinol**, 7, n. 6, p. 337-345, Jun 2011.
- HOLICK, M. F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutr Rev**, 66, n. 10 Suppl 2, p. S182-194, Oct 2008.
- HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, 96, n. 7, p. 1911-1930, Jul 2011.
- HOSSAIN, N.; KANANI, F. H.; RAMZAN, S.; KAUSAR, R. et al. Obstetric and neonatal outcomes of maternal vitamin D supplementation: results of an open-label, randomized controlled trial of antenatal vitamin D supplementation in Pakistani women. **J Clin Endocrinol Metab**, 99, n. 7, p. 2448-2455, Jul 2014.
- KASSAI, M. S.; CAFEO, F. R.; AFFONSO-KAUFMAN, F. A.; SUANO-SOUZA, F. I. et al. Vitamin D plasma concentrations in pregnant women and their preterm newborns. **BMC Pregnancy Childbirth**, 18, n. 1, p. 412, Oct 2018.
- KATZ, J.; LEE, A. C.; KOZUKI, N.; LAWN, J. E. et al. Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis. **Lancet**, 382, n. 9890, p. 417-425, Aug 2013.
- KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, 89, n. 6, p. 2548-2556, Jun 2004.
- KHAN, M.; JOSEPH, F. Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. **Scientifica (Cairo)**, 2014, p. 328592, 2014.
- KIELY, M.; HEMMINGWAY, A.; O'CALLAGHAN, K. M. Vitamin D in pregnancy: current perspectives and future directions. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, 9, n. 6, p. 145-154, Jun 2017.
- KIELY, M. E.; ZHANG, J. Y.; KINSELLA, M.; KHASHAN, A. S. et al. Vitamin D status is associated with uteroplacental dysfunction indicated by pre-eclampsia and small-for-gestational-age birth in a large prospective pregnancy cohort in Ireland with low vitamin D status. **Am J Clin Nutr**, 104, n. 2, p. 354-361, Aug 2016.
- KING, J. C. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. **Am J Clin Nutr**, 71, n. 5 Suppl, p. 1218S-1225S, 05 2000.
- KLEISER, C.; SCHAFFRATH ROSARIO, A.; MENSINK, G. B.; PRINZ-LANGENOHL, R. et al. Potential determinants of obesity among children and

adolescents in Germany: results from the cross-sectional KiGGS Study. **BMC Public Health**, 9, p. 46, Feb 2009.

KONG, J.; CHEN, Y.; ZHU, G.; ZHAO, Q. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> upregulates leptin expression in mouse adipose tissue. **J Endocrinol**, 216, n. 2, p. 265-271, Feb 2013.

LACROIX, M.; BATTISTA, M. C.; DOYON, M.; MÉNARD, J. *et al.* Lower adiponectin levels at first trimester of pregnancy are associated with increased insulin resistance and higher risk of developing gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 36, n. 6, p. 1577-1583, Jun 2013.

LAPILLONNE, A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. **Med Hypotheses**, 74, n. 1, p. 71-75, Jan 2010.

LAU, S. L.; GUNTON, J. E.; ATHAYDE, N. P.; BYTH, K. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D and glycated haemoglobin levels in women with gestational diabetes mellitus. **Med J Aust**, 194, n. 7, p. 334-337, Apr 2011.

LEE, A. C.; KOZUKI, N.; COUSENS, S.; STEVENS, G. A. *et al.* Estimates of burden and consequences of infants born small for gestational age in low and middle income countries with INTERGROWTH-21. **BMJ**, 358, p. j3677, Aug 2017.

LIU, B.; XU, G.; SUN, Y.; DU, Y. *et al.* Association between maternal pre-pregnancy obesity and preterm birth according to maternal age and race or ethnicity: a population-based study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, 7, n. 9, p. 707-714, Sep 2019.

LUND, B.; SELNES, A. Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels in pregnancy and lactation. **Acta Endocrinol (Copenh)**, 92, n. 2, p. 330-335, Oct 1979.

MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z. C.; CAMARGO, M. B. R.; SILVA, D. M. W. *et al.* Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 58, p. 411-433, 2014.

MCMANUS, R.; SUMMERS, K.; DE VRIJER, B.; COHEN, N. *et al.* Maternal, umbilical arterial and umbilical venous 25-hydroxyvitamin D and adipocytokine concentrations in pregnancies with and without gestational diabetes. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 80, n. 5, p. 635-641, May 2014.

MEDICINE, I. O. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. National Academies Press (US): Washington (DC) 2011.

MENENDEZ, C.; LAGE, M.; PEINO, R.; BALDELLI, R. *et al.* Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. **J Endocrinol**, 170, n. 2, p. 425-431, Aug 2001.

MM GREENLAND S, G. Causal diagrams. In: TL, R. K. G. S. L. (Ed.). **Modern Epidemiology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 183 – 209.

- MOUSA, A.; ABELL, S. K.; SHORAKAE, S.; HARRISON, C. L. *et al.* Relationship between vitamin D and gestational diabetes in overweight or obese pregnant women may be mediated by adiponectin. **Mol Nutr Food Res**, 61, n. 11, Nov 2017.
- MULLIGAN, M. L.; FELTON, S. K.; RIEK, A. E.; BERNAL-MIZRACHI, C. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. **Am J Obstet Gynecol**, 202, n. 5, p. 429.e421-429, May 2010.
- NEPA-UNICAMP. **TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, 2011.
- NOVAKOVIC, B.; SIBSON, M.; NG, H. K.; MANUELPILLAI, U. *et al.* Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. **J Biol Chem**, 284, n. 22, p. 14838-14848, May 2009.
- PEDREIRA, C. E.; PINTO, F. A.; PEREIRA, S. P.; COSTA, E. S. Birth weight patterns by gestational age in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 83, p. 619-625, 2011.
- PEREIRA-SANTOS, M.; SANTOS, J. Y. G. D.; CARVALHO, G. Q.; SANTOS, D. B. D. *et al.* Epidemiology of vitamin D insufficiency and deficiency in a population in a sunny country: Geospatial meta-analysis in Brazil. **Crit Rev Food Sci Nutr**, p. 1-8, Feb 2018.
- PLATT, M. J. Outcomes in preterm infants. **Public Health**, 128, n. 5, p. 399-403, May 2014.
- POPPITT, S. D.; PRENTICE, A. M.; GOLDBERG, G. R.; WHITEHEAD, R. G. Energy-sparing strategies to protect human fetal growth. **Am J Obstet Gynecol**, 171, n. 1, p. 118-125, Jul 1994.
- PÉREZ-LÓPEZ, F. R.; PASUPULETI, V.; MEZONES-HOLGUIN, E.; BENITES-ZAPATA, V. A. *et al.* Effect of vitamin D supplementation during pregnancy on maternal and neonatal outcomes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Fertil Steril**, 103, n. 5, p. 1278-1288.e1274, May 2015.
- PÉREZ-PÉREZ, A.; TORO, A.; VILARIÑO-GARCÍA, T.; MAYMÓ, J. *et al.* Leptin action in normal and pathological pregnancies. **J Cell Mol Med**, 22, n. 2, p. 716-727, 02 2018.
- RAJAKUMAR, K. Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: a historical perspective. **Pediatrics**, 112, n. 2, p. e132-135, Aug 2003.
- RAKATZI, I.; MUELLER, H.; RITZELER, O.; TENNAGELS, N. *et al.* Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. **Diabetologia**, 47, n. 2, p. 249-258, Feb 2004.
- RETNAKARAN, A.; RETNAKARAN, R. Adiponectin in pregnancy: implications for health and disease. **Curr Med Chem**, 19, n. 32, p. 5444-5450, 2012.

- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, P.; RAMIRO-CORTIJO, D.; REYES-HERNÁNDEZ, C. G.; LÓPEZ DE PABLO, A. L. *et al.* Implication of Oxidative Stress in Fetal Programming of Cardiovascular Disease. **Front Physiol**, 9, p. 602, 2018.
- ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONÇALVES, L. F.; KUSANOVIC, J. P. *et al.* The role of inflammation and infection in preterm birth. **Semin Reprod Med**, 25, n. 1, p. 21-39, Jan 2007.
- RYAN, E. A.; ENNS, L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, 67, n. 2, p. 341-347, Aug 1988.
- SABLOK, A.; BATRA, A.; THARIANI, K.; BHARTI, R. *et al.* Supplementation of vitamin D in pregnancy and its correlation with feto-maternal outcome. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 83, n. 4, p. 536-541, Oct 2015.
- SAGGESE, G.; VIERUCCI, F.; PRODAM, F.; CARDINALE, F. *et al.* Vitamin D in pediatric age: consensus of the Italian Pediatric Society and the Italian Society of Preventive and Social Pediatrics, jointly with the Italian Federation of Pediatricians. **Ital J Pediatr**, 44, n. 1, p. 51, May 2018.
- SAVCHEV, S.; SANZ-CORTES, M.; CRUZ-MARTINEZ, R.; ARRANZ, A. *et al.* Neurodevelopmental outcome of full-term small-for-gestational-age infants with normal placental function. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 42, n. 2, p. 201-206, Aug 2013.
- SHIN, J. S.; CHOI, M. Y.; LONGTINE, M. S.; NELSON, D. M. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. **Placenta**, 31, n. 12, p. 1027-1034, Dec 2010.
- SICHIERI, R.; EVERHART, J. Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. **Nutrition Research**, 18, n. 10, p. 1649-1659, OCT 1998 1998. Article.
- SINGER, J. D.; WILLETT, J. B. **Applied longitudinal data analysis: Modeling change and event occurrence**. Oxford university press, 2003. 0195152964.
- SOHEILYKHAH, S.; MOJIBIAN, M.; MOGHADAM, M. J.; SHOJAODDINY-ARDEKANI, A. The effect of different doses of vitamin D supplementation on insulin resistance during pregnancy. **Gynecol Endocrinol**, 29, n. 4, p. 396-399, Apr 2013.
- SONAGRA, A. D.; BIRADAR, S. M.; K, D.; MURTHY D S, J. Normal pregnancy- a state of insulin resistance. **J Clin Diagn Res**, 8, n. 11, p. CC01-03, Nov 2014.
- STATAcorp. ***Stata Statistical Software: Release 15***. College Station, TX: StataCorp LLC, 2017.
- STEVENSON, J. C.; HILLYARD, C. J.; MACINTYRE, I.; COOPER, H. *et al.* A physiological role for calcitonin: protection of the maternal skeleton. **Lancet**, 2, n. 8146, p. 769-770, Oct 1979.

- STIVELMAN, E.; RETNAKARAN, R. Role of vitamin D in the pathophysiology and treatment of type 2 diabetes. **Curr Diabetes Rev**, 8, n. 1, p. 42-47, Jan 2012.
- TAO, S.; YUAN, Q.; MAO, L.; CHEN, F. L. *et al.* Vitamin D deficiency causes insulin resistance by provoking oxidative stress in hepatocytes. **Oncotarget**, 8, n. 40, p. 67605-67613, Sep 2017.
- TEXTOR, J.; HARDT, J.; KNÜPPEL, S. DAGitty: a graphical tool for analyzing causal diagrams. **Epidemiology**, 22, n. 5, p. 745, Sep 2011.
- TOUS, M.; VILLALOBOS, M.; IGLESIAS, L.; FERNÁNDEZ-BARRÉS, S. *et al.* Vitamin D status during pregnancy and offspring outcomes: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Eur J Clin Nutr**, Jan 2019.
- TRIUNFO, S.; LANZONE, A.; LINDQVIST, P. G. Low maternal circulating levels of vitamin D as potential determinant in the development of gestational diabetes mellitus. **J Endocrinol Invest**, 40, n. 10, p. 1049-1059, Oct 2017.
- TWISK, J. W. **Applied longitudinal data analysis for epidemiology: a practical guide**. Cambridge University Press, 2013. 110703003X.
- UNGER, M. D.; CUPPARI, L.; TITAN, S. M.; MAGALHÃES, M. C. *et al.* Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? **Clin Nutr**, 29, n. 6, p. 784-788, Dec 2010.
- USDA. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. 24 ed. United States United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2011.
- VAIDYA, A.; WILLIAMS, J. S.; FORMAN, J. P. The independent association between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin and its relation with BMI in two large cohorts: the NHS and the HPFS. **Obesity (Silver Spring)**, 20, n. 1, p. 186-191, Jan 2012.
- VILLAR, J.; CHEIKH ISMAIL, L.; VICTORA, C. G.; OHUMA, E. O. *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **Lancet**, 384, n. 9946, p. 857-868, Sep 2014.
- WACKER, M.; HOLICK, M. F. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. **Nutrients**, 5, n. 1, p. 111-148, Jan 2013.
- WAGNER, C. L.; TAYLOR, S. N.; JOHNSON, D. D.; HOLLIS, B. W. The role of vitamin D in pregnancy and lactation: emerging concepts. **Womens Health (Lond)**, 8, n. 3, p. 323-340, May 2012.
- WALSH, J. M.; MCGOWAN, C. A.; KILBANE, M.; MCKENNA, M. J. *et al.* The relationship between maternal and fetal vitamin D, insulin resistance, and fetal growth. **Reprod Sci**, 20, n. 5, p. 536-541, May 2013.
- WEBB, A. R.; KLINE, L.; HOLICK, M. F. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and

Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. **J Clin Endocrinol Metab**, 67, n. 2, p. 373-378, Aug 1988.

YAP, C.; CHEUNG, N. W.; GUNTON, J. E.; ATHAYDE, N. *et al.* Vitamin D supplementation and the effects on glucose metabolism during pregnancy: a randomized controlled trial. **Diabetes Care**, 37, n. 7, p. 1837-1844, Jul 2014.

ZEHNDER, D.; EVANS, K. N.; KILBY, M. D.; BULMER, J. N. *et al.* The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha-hydroxylase expression in human placenta and decidua. **Am J Pathol**, 161, n. 1, p. 105-114, Jul 2002.

ZHANG, Y.; GONG, Y.; XUE, H.; XIONG, J. *et al.* Vitamin D and gestational diabetes mellitus: a systematic review based on data free of Hawthorne effect. **BJOG**, 125, n. 7, p. 784-793, Jun 2018.

ZHOU, S. S.; TAO, Y. H.; HUANG, K.; ZHU, B. B. *et al.* Vitamin D and risk of preterm birth: Up-to-date meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies. **J Obstet Gynaecol Res**, 43, n. 2, p. 247-256, Feb 2017.

## **10. Anexos**

Status da gestante: 01[ ]ativa 02[ ]perda 03[ ]exclusão 04[ ]aborto

## ANEXO 1

Ensaio [ ] Coorte [ ] Motivo/tipo de aborto: \_\_\_\_\_

DATA DE COLETA	ENTREV	REV	DIG 1	DATA DE DIGITAÇÃO 1	DIG 2	DATA DE DIGITAÇÃO 2
____ / ____ / ____	____	____	____	____ / ____ / ____	____	____ / ____ / ____

### ☞ Realizar a PRIMEIRA medida de pressão arterial (folha antropometria)

“Vamos começar nossa conversa sobre alguns dados gerais da sra..”

1	Qual sua data de nascimento?	____ / ____ / ____		2	Qual a sua idade?	____ anos	
3	A respeito de sua situação conjugal, a Sra: (LER as opções de resposta)	01 [ ] vive com companheiro 02 [ ] não vive com companheiro há mais de 1 ano 03 [ ] não vive com companheiro há menos de 1 ano 04 [ ] tem namorado há mais de 1 ano		05 [ ] não tem namorado 06 [ ] tem namorado a < 1 ano 07 [ ] outro _____ [ ] codificação			
4	Você pratica alguma religião?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 7 ____ [ ] cod	5	Qual sua religião?	01 [ ] católica romana 03 [ ] umbanda/candomblé 05 [ ] religiões orientais/Budista 07 [ ] espírita/kardecista ____ [ ] codificação		02 [ ] judaica ou israelita 04 [ ] protestante tradicional 06 [ ] evangélica/crente 08 [ ] outra: _____
6	Cor (observação do entrevistador):	1 [ ] branca 2 [ ] parda/mulata/morena/cabocla		3 [ ] negra 4 [ ] amarela/oriental	5 [ ] indígena ____ [ ] codificação		
7	Como você classifica a sua cor?	1 [ ] branca 2 [ ] parda/mulata/morena/cabocla		3 [ ] negra 4 [ ] amarela/oriental	5 [ ] indígena ____ [ ] codificação		
8	Você freqüentou a escola?	1 [ ] sim 0 [ ] não → próxima sessão	— [ ] cod	9	Qual foi a última série (ano) que você concluiu com aprovação?	____ série de estudo ____ grau	
10	CODIFICAR DEPOIS: Qual foi a última série (ano) que você concluiu com aprovação?	0 [ ] Nenhum ou até 3º série do ensino fundamental 1 [ ] 4º série ou ensino fundamental (1º grau) incompleto 2 [ ] Ens.fund. (1º grau) compl. ou ens. médio (2º grau) incompleto 3 [ ] Ensino médio (2º grau) completo ou superior incompleto		4 [ ] Superior completo ____ [ ] codificação			

### HISTÓRIA OBSTÉTRICA

“Vamos agora conversar um pouco sobre alguns aspectos relacionados a outras gestações, partos e filhos.”								
1	Com que idade você menstruou pela primeira vez?	____ anos	2	Com que idade você engravidou pela primeira vez?	____ anos			
3	Quantas vezes você ficou grávida, incluindo esta gravidez e abortos?	____ se 1 vez → siga à próxima seção						
4	Quantos partos você já teve?	____ se 00 → siga à 8	5	Com que idade você teve seu primeiro parto?	____ anos	6	Quantos filhos nasceram vivos?	____
7	Quantos filhos nasceram mortos?	____	8	Já teve gravidez que resultou em aborto?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 11	____ [ ] codificação		
9	Desses abortos que a Sra. teve, quantos foram espontâneos e quantos foram provocados?	____ Espontâneo ____ Provocado	10	Quando foi seu último aborto?	____ / ____ / ____			
11	Você já teve algum bebê prematuro, quer dizer, que tenha nascido antes dos nove meses de gravidez?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 13		— [ ] cod	12	Quantos?	____	
13	Você já teve algum filho com peso ao nascer acima de 4 quilos?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 15		— [ ] cod	14	Quantos?	____	
15	Você já teve algum filho com peso ao nascer menor que 2 quilos e 500 gramas?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 17		— [ ] cod	16	Quantos?	____	
17	Quando foi seu último parto?	____ / ____ / ____	18	Qual foi o tipo de parto do último filho?	1 [ ] vaginal normal 2 [ ] cesárea 3 [ ] fórceps 4 [ ] cócoras	— [ ] cod		
19	Você já perdeu filhos depois de nascidos?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à próxima seção	20	Quantos? Qual (is) era(m) a(s) idade(s)? (codificar abaixo conforme resposta)	____			

21	Antes de completar 1 semana de vida?	— —	22	Entre 1 semana e 1 mês de vida?	— —	23	Entre 1 mês e 1 ano de vida?	— —	24	Com 1 ano ou mais?	— —
----	--------------------------------------	-----	----	---------------------------------	-----	----	------------------------------	-----	----	--------------------	-----

#### IDENTIFICAÇÃO PATERNA

“Agora, eu gostaria de saber algumas coisas sobre o pai da criança.”

1	Qual a data de nascimento do pai da criança?			____ / ____ / ____		
2	Ele freqüentou a escola?	1 [ ] sim 0 [ ] não. <i>Pule para 5</i>	— [ ] cod	3	Qual foi a última série (ano) que ele concluiu com aprovação?	____ anos de estudo ____ grau
4	<b>CODIFICAR DEPOIS</b> Qual foi a última série (ano) que ele concluiu com aprovação?			0 [ ] Nenhum ou até 3º série do ensino fundamental 1 [ ] 4º série ou ensino fundamental (1º grau) incompleto 2 [ ] Ens.fund. (1º grau) compl. ou ens. médio (2ºgrau) incompleto 3 [ ] Ensino médio (2º grau) completo ou superior incompleto		
5	Na sua opinião ele encontra-se	1 [ ] Abaixo do peso ideal	2 [ ] Com peso adequado	3 [ ] Acima do peso ideal	— [ ] cod	
6	Ele está trabalhando no momento?	1 [ ] sim	0 [ ] não	— [ ] cod		

#### DESEJO DE ENGRAVIDAR

“Nós gostaríamos de saber o que você e o pai da criança sentiram quando souberam da sua gravidez.”

1	Você estava utilizando algum método para evitar esta gravidez?	1 [ ] sim 0 [ ] não → <i>sigue à 3</i> — [ ] cod	2	Qual o método você estava usando?	1 [ ] tabela, coito interrompido 2 [ ] camisinha 3 [ ] pílula 4 [ ] hormônio injetável	5 [ ] adesivo — [ ] cod
3	Quando ficou grávida, você:	1 [ ] estava querendo engravidar 2 [ ] queria esperar mais um tempo 3 [ ] não queria engravidar	— [ ] codificação			
4	E o pai do bebê, quando soube que você estava grávida:	1 [ ] queria que você estivesse grávida 2 [ ] queria esperar mais um tempo 3 [ ] não queria que você estivesse grávida	— [ ] codificação			

#### SONO

“Vamos agora conversar um pouco sobre como é o seu sono.”

1	ATUALMENTE, quantas horas de sono, em MÉDIA, você costuma dormir POR NOITE?					____ horas
2	O seu tempo de sono mudou depois que engravidou?	0 [ ] não mudou. <i>Pule para 4</i> 1 [ ] sim, aumentou 2 [ ] sim, diminuiu	— [ ] cod	3	SE SIM, <Mudou> Quanto?	____ horas
4	Em geral, você tem o sono tranquilo?	1 [ ] sim 0 [ ] não — [ ] cod	5	Modificou depois que engravidou?	0 [ ] não modificou 1 [ ] sim, está mais tranquilo 2 [ ] sim, está mais agitado 3 [ ] sim, estou com insônia	— [ ] codificação
6	Você costuma dormir em outros horários, sem ser a noite?	1 [ ] sim 0 [ ] não. <i>Próxima seção</i>	— [ ] cod	7	Quantas horas?	____ h ____ min

#### FUMO

“Agora, eu vou fazer algumas perguntas sobre o hábito de fumar.”

1	Você fuma atualmente?	1 [ ] sim → <i>pule para 3</i> 0 [ ] não	— [ ] cod	2	Você já fumou?	1 [ ] sim 0 [ ] não → <i>pule para a próxima seção</i>	— [ ] cod
3	Com que idade você começou a fumar?	____ anos	4	Quantos cigarros você fuma(va) por dia?	____	5	Sempre fumou a mesma quantidade?
6	SE SIM na 2, Há quanto tempo você parou de fumar? 888 se fuma atualmente, 000 para menos de 1 mês.	____ meses	7	Calcular depois	Durante quanto tempo você foi fumante?	____ meses	

## ÁLCOOL

"E agora, eu vou fazer algumas perguntas sobre consumo de bebidas alcoólicas".

1	Você consome algum tipo de bebida alcoólica?	1 [ ] sim → <i>siga à 5</i> 0 [ ] não _____ [ ] cod	2	Você já consumiu algum tipo de bebida alcoólica?	1 [ ] sim _____ [ ] cod 0 [ ] não → <i>próxima seção</i>
3	Que idade você tinha quando parou de beber? _____ anos	Há quanto tempo parou de beber? _____ meses	4	<i>Calcular depois</i> Durante quanto tempo você foi consumidora de álcool?	_____ meses
5	Com que idade começou a beber?	_____ anos			
6	Qual (era) o tipo de bebida alcoólica?				
Tipo de bebida		Quantidade	Qual a freqüência que você costuma beber?		
Cerveja/ Chopp	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ copos ou _____ garrafa ou _____ long neck _____ latínhas	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
Cachaça/ Vodka	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ copos	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
Vinho	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ taça	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
Uísque	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ doses	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
_____	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod

## RENDAS / CARACTERÍSTICAS DO DOMICÍLIO

"Agora farei algumas perguntas sobre os bens e a renda dos moradores da casa.

**Mais uma vez lembro que os dados deste estudo servirão apenas para uma pesquisa, portanto a Sra. pode ficar tranqüila para informar o que for perguntado."**

1	A casa em que você mora é: 1 [ ] própria    3 [ ] posse    5 [ ] outra: 2 [ ] alugada    4 [ ] emprestada	_____ [ ] cod	2	Quantas pessoas moram em sua casa incluindo você?	_____
3	Quantos cômodos há em sua casa, incluindo o banheiro?	_____	4	Quantos cômodos são usados para dormir?	_____
5	Quantas pessoas que moram na sua casa possuem alguma fonte de renda, incluindo você?	_____ pessoas			
6	Você faz algum trabalho remunerado fora de casa ou em casa?	1 [ ] sim 0 [ ] não. <i>Pule para 8</i>	_____ [ ] cod	7	Qual?
<b>Qual a remuneração em reais de cada uma dessas pessoas (listar parentesco com a gestante)? (GANHOS REFERENTES ao MÊS PASSADO)</b>					
8	8.1 Entrevistada: (88888 se não trabalha)	R\$ _____,00	8.4 Contribuinte 3: (_____)	R\$ _____,00	
	8.2 Contribuinte 1: (_____)	R\$ _____,00	8.5 Contribuinte 4: (_____)	R\$ _____,00	
	8.3 Contribuinte 2: (_____)	R\$ _____,00	8.6 EXTRA ( <i>questão abaixo</i> ):	R\$ _____,00	
		8.7 Total ( <i>Somar depois</i> ):	R\$ _____,00		
A família tem outra fonte de renda, por exemplo, bolsa família, aluguel, pensão ou outra, que não foi citada acima?			0[ ] Não 1[ ] Sim _____ [ ] cod → <b>Quanto?</b> R\$ _____,00/ mês		

<b>Agora vou fazer algumas perguntas a respeito de aparelhos que a Sra. tem em casa.</b>								
A Sra. tem _____ em casa?		<i>Para uso do REVISOR: A escala está completa?</i> 1[ ] Sim 0[ ] Não						
Televisão em cores		0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	1 [ ] uma	2 [ ] duas	3 [ ] três	4 [ ] quatro ou +	_____ [ ] cod
Rádio		0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	1 [ ] uma	2 [ ] duas	3 [ ] três	4 [ ] quatro ou +	_____ [ ] cod
Banheiro		0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	4 [ ] uma	5 [ ] duas	6 [ ] três	7 [ ] quatro ou +	_____ [ ] cod
Automóvel		0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	4 [ ] uma	7 [ ] duas	9 [ ] três	9 [ ] quatro ou +	_____ [ ] cod
<b>Quem faz o serviço doméstico na sua casa?</b>								
Empregada mensalista		0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	3 [ ] uma	4 [ ] duas	4 [ ] três	4 [ ] quatro ou +	_____ [ ] cod
Máquina de lavar, sem ser tanquinho		0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	2 [ ] uma	2 [ ] duas	2 [ ] três	2 [ ] quatro ou +	_____ [ ] cod
Videocassete e/ou DVD		0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	2 [ ] uma	2 [ ] duas	2 [ ] três	2 [ ] quatro ou +	_____ [ ] cod

	<b>Geladeira</b>	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	4 [ ] uma	4 [ ] duas	4 [ ] três	4 [ ] quatro ou +	__ [ ] cod
	<b>Freezer ou geladeira duplex</b>	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	2 [ ] uma	2 [ ] duas	2 [ ] três	2 [ ] quatro ou +	__ [ ] cod
<b>10</b>	<b>Quem é o chefe da família?</b> _____	(PARENTESCO com a gestante)						
	<i>SE O CHEFE DA FAMÍLIA FOR A GESTANTE OU MARIDO, NÃO PERGUNTE E CODIFIQUE DEPOIS.</i>							
	<b>Qual o último ano de estudo do chefe da família?</b>							
<b>11</b>	0 [ ] Nenhum ou até 3º série do ensino fundamental							
	1 [ ] 4º série ou ensino fundamental (1º grau) incompleto							
	2 [ ] Ens.fund. (1º grau) compl. ou ens. médio (2ºgrau) incompleto							
	4 [ ] Ensino médio (2º grau) completo ou superior incompleto							
	8 [ ] Superior completo							__ [ ] cod

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### ANTROPOMETRIA

**“Agora vamos realizar algumas medidas, saber sobre sua gestação atual e conversar um pouco sobre seu peso também.”**

☞ Realizar a PRIMEIRA medida de pressão arterial

1	Qual a data da sua última menstruação? ___ / ___ / ___	2	Semana gestacional DUM: _____ semanas DUM
A Sra. fez Ultrassonografia? 0[ ] Não → Pular para 4. 1[ ] Sim → Consulte ou pergunte a semana gestacional da data em que realizou o exame: ___ semanas e ___ dias no dia ___ / ___ / ___		3	Semana gestacional pela USG (ajustada para data desta entrevista) _____ semanas USG

☞ Medidas antropométricas:

4	Estatura: 4.1 ___ , ___ cm 4.2 ___ , ___ cm	5	Estatura MÉDIA: ___ , ___ cm	
6	Peso pré-gestacional RELATADO: ___ , ___ kg	7	Peso pré-gestacional AFERIDO: ___ , ___ kg	
8	IMC pré- gestacional (peso AFERIDO): ___ , ___ kg/m <sup>2</sup>	9	Categoria IMC pré-gestacional: 1 [ ] baixo peso (< 18,5) 2 [ ] normal (18,5 a 24,9) 3 [ ] sobrepeso (≥25 e <29,9)	4 [ ] obesidade (≥ 30) ___ [ ] codificação

☞ Passar medidas para o CARTÃO DA GESTANTE ☺

10	Data aferição (pressão arterial): ___ / ___ / ___	11	Pressão arterial 1 (PA1): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min
12	Pressão arterial 2 (PA2): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min	13	Pressão arterial MÉDIA (PAM 1): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min

#### 2ª Medida da pressão arterial – Dia do questionário geral

14	Data aferição (pressão arterial): ___ / ___ / ___	15	Pressão arterial 1 (PA1): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min
16	Pressão arterial 2 (PA2): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min	17	MÉDIA Pressão arterial (PAM3): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

(Entrevistador: DESTACAR ESTA FOLHA)

NOME COMPLETO: \_\_\_\_\_  
 DATA COLETA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

1º TRIMESTRE - RESULTADO DOS EXAMES BIOQUÍMICOS			
<b>Data hemograma:</b> ____ / ____ / ____ <b>SEMANA GESTACIONAL do hemograma :</b> ____ semanas			
	Parâmetro	Valor	Valor referência
<b>1</b>	Neutrófilos	____,____ / ____, ____%N	
<b>2</b>	Linfócitos	____,____ / ____, ____%L	21 - 35%
<b>3</b>	Monócitos	____,____ / ____, ____%M	4 - 8%
<b>4</b>	Eosinófilos	____,____ / ____, ____%E	2 - 4 %
<b>5</b>	Basófilos	____,____ / ____, ____%B	0 - 1%
<b>6</b>	RBC	____,____ m/µL	
<b>7</b>	Hemoglobina	____,____ g/dL	12 - 15,5%
<b>8</b>	Hematócrito	____,____ %	37 - 47 g%
<b>9</b>	MCV	____,____ fL	82-92 m³
<b>10</b>	MCH	____,____ pg	
<b>11</b>	MCHC	____,____ g/dL	
<b>12</b>	RDW	____,____ %	
<b>Data bioquímica:</b> ____ / ____ / ____ (não inserir valores com vírgula) <b>SEMANA GESTACIONAL da coleta bioquímica/pesquisa :</b> ____ semanas			
<b>13</b>	Glicemia jejum	____ mg/dL	70 - 110
<b>14</b>	Colesterol total:	____ mg/dL	140 - 200
<b>15</b>	Triglicérides:	____ mg/dL	65 - 150
<b>16</b>	HDL	____ mg/dL	40 - 60
<b>17</b>	LDL (calcular) = CT - (TG/5 + HDL)	____ mg/dL	
<b>Data microbiologia:</b> ____ / ____ / ____ <b>SEMANA GESTACIONAL da urocultura :</b> ____ semanas			
<b>18</b>	Parasitológico de fezes:	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo: _____ _ [ ] cod	
<b>19</b>	Urocultura:	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo 2 [ ] flora bact. Discreta _ [ ] cod	
densidade: _____ ; pH: __, __; proteína (cruzés): _____			
<b>20</b>	HIV	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo _ [ ] cod	
<b>21</b>	VDRL	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo _ [ ] cod	
<b>22</b>	Toxoplasmose	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo _ [ ] cod	

Dosagens posteriores do soro:

	Parâmetro:	Valor	Parâmetro:	Valor
<b>23</b>	Ptn C reativa	mg/mL	<b>24</b>	Interleucina-6: pg/mL
<b>25</b>	Interleucina 1β	pg/mL	<b>26</b>	Insulina μU/mL
<b>27</b>	Adiponectina:	ng/mL	<b>28</b>	
<b>29</b>			<b>30</b>	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

Status da gestante: 01[ ]ativa 02[ ]perda 03[ ]exclusão 04[ ]aborts

## ANEXO 2

Ensaio [ ] Coorte [ ] Motivo/tipo de aborto: \_\_\_\_\_

DATA DE COLETA	ENTREV	REV	DIG 1	DATA DE DIGITAÇÃO 1	DIG 2	DATA DE DIGITAÇÃO 2
____ / ____ / ____	____	____	____	____ / ____ / ____	____	____ / ____ / ____

### ☞ Realizar a PRIMEIRA medida de pressão arterial (folha antropometria)

“Vamos começar nossa conversa sobre alguns dados gerais da sra..”

1	Qual sua data de nascimento?	____ / ____ / ____		2	Qual a sua idade?	____ anos	
3	A respeito de sua situação conjugal, a Sra: (LER as opções de resposta)	01 [ ] vive com companheiro 02 [ ] não vive com companheiro há mais de 1 ano 03 [ ] não vive com companheiro há menos de 1 ano 04 [ ] tem namorado há mais de 1 ano		05 [ ] não tem namorado 06 [ ] tem namorado a < 1 ano 07 [ ] outro _____ [ ] codificação			
4	Você pratica alguma religião?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 7 ____ [ ] cod	5	Qual sua religião?	01 [ ] católica romana 03 [ ] umbanda/candomblé 05 [ ] religiões orientais/Budista 07 [ ] espírita/kardecista ____ [ ] codificação		02 [ ] judaica ou israelita 04 [ ] protestante tradicional 06 [ ] evangélica/crente 08 [ ] outra: _____
6	Cor (observação do entrevistador):	1 [ ] branca 2 [ ] parda/mulata/morena/cabocla		3 [ ] negra 4 [ ] amarela/oriental	5 [ ] indígena ____ [ ] codificação		
7	Como você classifica a sua cor?	1 [ ] branca 2 [ ] parda/mulata/morena/cabocla		3 [ ] negra 4 [ ] amarela/oriental	5 [ ] indígena ____ [ ] codificação		
8	Você freqüentou a escola?	1 [ ] sim 0 [ ] não → próxima sessão	— [ ] cod	9	Qual foi a última série (ano) que você concluiu com aprovação?	____ série de estudo ____ grau	
10	CODIFICAR DEPOIS: Qual foi a última série (ano) que você concluiu com aprovação?	0 [ ] Nenhum ou até 3º série do ensino fundamental 1 [ ] 4º série ou ensino fundamental (1º grau) incompleto 2 [ ] Ens.fund. (1º grau) compl. ou ens. médio (2º grau) incompleto 3 [ ] Ensino médio (2º grau) completo ou superior incompleto		4 [ ] Superior completo ____ [ ] codificação			

### HISTÓRIA OBSTÉTRICA

“Vamos agora conversar um pouco sobre alguns aspectos relacionados a outras gestações, partos e filhos.”								
1	Com que idade você menstruou pela primeira vez?	____ anos	2	Com que idade você engravidou pela primeira vez?	____ anos			
3	Quantas vezes você ficou grávida, incluindo esta gravidez e abortos?	____ se 1 vez → siga à próxima seção						
4	Quantos partos você já teve?	____ se 00 → siga à 8	5	Com que idade você teve seu primeiro parto?	____ anos	6	Quantos filhos nasceram vivos?	____
7	Quantos filhos nasceram mortos?	____	8	Já teve gravidez que resultou em aborto?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 11	____ [ ] codificação		
9	Desses abortos que a Sra. teve, quantos foram espontâneos e quantos foram provocados?	____ Espontâneo ____ Provocado	10	Quando foi seu último aborto?	____ / ____ / ____			
11	Você já teve algum bebê prematuro, quer dizer, que tenha nascido antes dos nove meses de gravidez?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 13		— [ ] cod	12	Quantos?	____	
13	Você já teve algum filho com peso ao nascer acima de 4 quilos?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 15		— [ ] cod	14	Quantos?	____	
15	Você já teve algum filho com peso ao nascer menor que 2 quilos e 500 gramas?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à 17		— [ ] cod	16	Quantos?	____	
17	Quando foi seu último parto?	____ / ____ / ____	18	Qual foi o tipo de parto do último filho?	1 [ ] vaginal normal 2 [ ] cesárea 3 [ ] fórceps 4 [ ] cócoras ____ [ ] cod			
19	Você já perdeu filhos depois de nascidos?	1 [ ] sim 0 [ ] não → siga à próxima seção		20	Quantos? ____ Qual (is) era(m) a(s) idade(s)? (codificar abaixo conforme resposta)			

21	Antes de completar 1 semana de vida?	— —	22	Entre 1 semana e 1 mês de vida?	— —	23	Entre 1 mês e 1 ano de vida?	— —	24	Com 1 ano ou mais?	— —
----	--------------------------------------	-----	----	---------------------------------	-----	----	------------------------------	-----	----	--------------------	-----

#### IDENTIFICAÇÃO PATERNA

“Agora, eu gostaria de saber algumas coisas sobre o pai da criança.”

1	Qual a data de nascimento do pai da criança?			____ / ____ / ____		
2	Ele freqüentou a escola?	1 [ ] sim 0 [ ] não. <i>Pule para 5</i>	— [ ] cod	3	Qual foi a última série (ano) que ele concluiu com aprovação?	____ anos de estudo ____ grau
4	<b>CODIFICAR DEPOIS</b> Qual foi a última série (ano) que ele concluiu com aprovação?			0 [ ] Nenhum ou até 3º série do ensino fundamental 1 [ ] 4º série ou ensino fundamental (1º grau) incompleto 2 [ ] Ens.fund. (1º grau) compl. ou ens. médio (2ºgrau) incompleto 3 [ ] Ensino médio (2º grau) completo ou superior incompleto		
5	Na sua opinião ele encontra-se	1 [ ] Abaixo do peso ideal	2 [ ] Com peso adequado	3 [ ] Acima do peso ideal	____ [ ] cod	
6	Ele está trabalhando no momento?	1 [ ] sim	0 [ ] não	— [ ] cod		

#### DESEJO DE ENGRAVIDAR

“Nós gostaríamos de saber o que você e o pai da criança sentiram quando souberam da sua gravidez.”

1	Você estava utilizando algum método para evitar esta gravidez?	1 [ ] sim 0 [ ] não → <i>sigue à 3</i> — [ ] cod	2	Qual o método você estava usando?	1 [ ] tabela, coito interrompido 2 [ ] camisinha 3 [ ] pílula 4 [ ] hormônio injetável	5 [ ] adesivo — [ ] cod
3	Quando ficou grávida, você:	1 [ ] estava querendo engravidar 2 [ ] queria esperar mais um tempo 3 [ ] não queria engravidar	— [ ] codificação			
4	E o pai do bebê, quando soube que você estava grávida:	1 [ ] queria que você estivesse grávida 2 [ ] queria esperar mais um tempo 3 [ ] não queria que você estivesse grávida	— [ ] codificação			

#### SONO

“Vamos agora conversar um pouco sobre como é o seu sono.”

1	ATUALMENTE, quantas horas de sono, em MÉDIA, você costuma dormir POR NOITE?					____ horas
2	O seu tempo de sono mudou depois que engravidou?	0 [ ] não mudou. <i>Pule para 4</i> 1 [ ] sim, aumentou 2 [ ] sim, diminuiu	— [ ] cod	3	SE SIM, <Mudou> Quanto?	____ horas
4	Em geral, você tem o sono tranquilo?	1 [ ] sim 0 [ ] não — [ ] cod	5	Modificou depois que engravidou?	0 [ ] não modificou 1 [ ] sim, está mais tranquilo 2 [ ] sim, está mais agitado 3 [ ] sim, estou com insônia	— [ ] codificação
6	Você costuma dormir em outros horários, sem ser a noite?	1 [ ] sim 0 [ ] não. <i>Próxima seção</i>	— [ ] cod	7	Quantas horas?	____ h ____ min

#### FUMO

“Agora, eu vou fazer algumas perguntas sobre o hábito de fumar.”

1	Você fuma atualmente?	1 [ ] sim → <i>pule para 3</i> 0 [ ] não	— [ ] cod	2	Você já fumou?	1 [ ] sim 0 [ ] não → <i>pule para a próxima seção</i>	— [ ] cod
3	Com que idade você começou a fumar?	____ anos	4	Quantos cigarros você fuma(va) por dia?	____	5	Sempre fumou a mesma quantidade?
6	SE SIM na 2, Há quanto tempo você parou de fumar? 888 se fuma atualmente, 000 para menos de 1 mês.	____ meses	7	Calcular depois	Durante quanto tempo você foi fumante?	____ meses	

## ÁLCOOL

"E agora, eu vou fazer algumas perguntas sobre consumo de bebidas alcoólicas".

1	Você consome algum tipo de bebida alcoólica?	1 [ ] sim → <i>siga à 5</i> 0 [ ] não _____ [ ] cod	2	Você já consumiu algum tipo de bebida alcoólica?	1 [ ] sim _____ [ ] cod 0 [ ] não → <i>próxima seção</i>
3	Que idade você tinha quando parou de beber? _____ anos	Há quanto tempo parou de beber? _____ meses	4	<i>Calcular depois</i> Durante quanto tempo você foi consumidora de álcool?	_____ meses
5	Com que idade começou a beber?	_____ anos			
6	Qual (era) o tipo de bebida alcoólica?				
Tipo de bebida		Quantidade	Qual a freqüência que você costuma beber?		
Cerveja/ Chopp	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ copos ou _____ garrafa ou _____ long neck _____ latínhas	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
Cachaça/ Vodka	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ copos	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
Vinho	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ taça	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
Uísque	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____ doses	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod
_____	1 [ ] sim 0 [ ] não _____ [ ] cod	_____	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca _____ [ ] cod

## RENDAS / CARACTERÍSTICAS DO DOMICÍLIO

"Agora farei algumas perguntas sobre os bens e a renda dos moradores da casa.

**Mais uma vez lembro que os dados deste estudo servirão apenas para uma pesquisa, portanto a Sra. pode ficar tranqüila para informar o que for perguntado."**

1	A casa em que você mora é:	1 [ ] própria    3 [ ] posse    5 [ ] outra: _____ 2 [ ] alugada    4 [ ] emprestada	2	Quantas pessoas moram em sua casa incluindo você?	_____	
3	Quantos cômodos há em sua casa, incluindo o banheiro?	_____	4	Quantos cômodos são usados para dormir?	_____	
5	Quantas pessoas que moram na sua casa possuem alguma fonte de renda, incluindo você?	_____ pessoas				
6	Você faz algum trabalho remunerado fora de casa ou em casa?	1 [ ] sim 0 [ ] não. <i>Pule para 8</i>	_____ [ ] cod	7	Qual?	_____
<b>Qual a remuneração em reais de cada uma dessas pessoas (listar parentesco com a gestante)?</b> <i>(GANHOS REFERENTES ao MÊS PASSADO)</i>						
8	8.1 Entrevistada: (88888 se não trabalha)	R\$ _____,00	8.4 Contribuinte 3: (_____)	R\$ _____,00		
	8.2 Contribuinte 1: (_____)	R\$ _____,00	8.5 Contribuinte 4: (_____)	R\$ _____,00		
	8.3 Contribuinte 2: (_____)	R\$ _____,00	8.6 EXTRA ( <i>questão abaixo</i> ):	R\$ _____,00		
		8.7 Total ( <i>Somar depois</i> ):	R\$ _____,00			
A família tem outra fonte de renda, por exemplo, bolsa família, aluguel, pensão ou outra, que não foi citada acima?			0[ ] Não 1[ ] Sim _____ [ ] cod → <b>Quanto?</b> R\$ _____,00/ mês			

<b>Agora vou fazer algumas perguntas a respeito de aparelhos que a Sra. tem em casa.</b>						
A Sra. tem _____ em casa?			<i>Para uso do REVISOR: A escala está completa?</i> 1[ ] Sim 0[ ] Não			
9	Televisão em cores	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	1 [ ] uma	2 [ ] duas	3 [ ] três
	Rádio	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	1 [ ] uma	2 [ ] duas	3 [ ] três
	Banheiro	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	4 [ ] uma	5 [ ] duas	6 [ ] três
	Automóvel	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	7 [ ] duas	9 [ ] três	9 [ ] quatro ou +
<b>Quem faz o serviço doméstico na sua casa?</b>						
Empregada mensalista 0 [ ] Não Sim. <b>Quantas?</b> 3 [ ] uma 4 [ ] duas 4 [ ] três 4 [ ] quatro ou + _____ [ ] cod						
Máquina de lavar, sem ser tanquinho 0 [ ] Não Sim. <b>Quantas?</b> 2 [ ] uma 2 [ ] duas 2 [ ] três 2 [ ] quatro ou + _____ [ ] cod						
Videocassete e/ou DVD 0 [ ] Não Sim. <b>Quantas?</b> 2 [ ] uma 2 [ ] duas 2 [ ] três 2 [ ] quatro ou + _____ [ ] cod						

	<b>Geladeira</b>	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	4 [ ] uma	4 [ ] duas	4 [ ] três	4 [ ] quatro ou +	__ [ ] cod
	<b>Freezer ou geladeira duplex</b>	0 [ ] Não	Sim. <b>Quantas?</b>	2 [ ] uma	2 [ ] duas	2 [ ] três	2 [ ] quatro ou +	__ [ ] cod
<b>10</b>	<b>Quem é o chefe da família?</b> _____	(PARENTESCO com a gestante)						
	<i>SE O CHEFE DA FAMÍLIA FOR A GESTANTE OU MARIDO, NÃO PERGUNTE E CODIFIQUE DEPOIS.</i>							
	<b>Qual o último ano de estudo do chefe da família?</b>							
<b>11</b>	0 [ ] Nenhum ou até 3º série do ensino fundamental							
	1 [ ] 4º série ou ensino fundamental (1º grau) incompleto							
	2 [ ] Ens.fund. (1º grau) compl. ou ens. médio (2ºgrau) incompleto							
	4 [ ] Ensino médio (2º grau) completo ou superior incompleto							
	8 [ ] Superior completo							__ [ ] cod

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### ANTROPOMETRIA

**“Agora vamos realizar algumas medidas, saber sobre sua gestação atual e conversar um pouco sobre seu peso também.”**

☞ Realizar a PRIMEIRA medida de pressão arterial

1	Qual a data da sua última menstruação? ___ / ___ / ___	2	Semana gestacional DUM: _____ semanas DUM
A Sra. fez Ultrassonografia? 0[ ] Não → Pular para 4. 1[ ] Sim → Consulte ou pergunte a semana gestacional da data em que realizou o exame: ___ semanas e ___ dias no dia ___ / ___ / ___		3	Semana gestacional pela USG (ajustada para data desta entrevista) _____ semanas USG

☞ Medidas antropométricas:

4	Estatura: 4.1 ___ , ___ cm 4.2 ___ , ___ cm	5	Estatura MÉDIA: _____, ___ cm	
6	Peso pré-gestacional RELATADO: _____, ___ kg	7	Peso pré-gestacional AFERIDO: _____, ___ kg	
8	IMC pré- gestacional (peso AFERIDO): _____, ___ kg/m <sup>2</sup>	9	Categoria IMC pré-gestacional: 1 [ ] baixo peso (< 18,5) 2 [ ] normal (18,5 a 24,9) 3 [ ] sobrepeso (≥25 e <29,9)	4 [ ] obesidade (≥ 30) — [ ] codificação

☞ Passar medidas para o CARTÃO DA GESTANTE ☺

10	Data aferição (pressão arterial): ___ / ___ / ___	11	Pressão arterial 1 (PA1): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min
----	---	----	--

☞ Realizar a SEGUNDA medida de pressão arterial

12	Pressão arterial 2 (PA2): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min	13	Pressão arterial MÉDIA (PAM 1): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min
----	--	----	---

### 2ª Medida da pressão arterial – Dia do questionário geral

14	Data aferição (pressão arterial): ___ / ___ / ___	15	Pressão arterial 1 (PA1): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min
----	---	----	--

☞ Realizar a SEGUNDA medida de pressão arterial

16	Pressão arterial 2 (PA2): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min	17	MÉDIA Pressão arterial (PAM3): Sistólica: ___ mmHg Diástólica: ___ mmHg Batimentos cardíacos: ___ min
----	--	----	--

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

(Entrevistador: DESTACAR ESTA FOLHA)

NOME COMPLETO: \_\_\_\_\_  
 DATA COLETA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

2º TRIMESTRE - RESULTADO DOS EXAMES BIOQUÍMICOS			
<b>Data hemograma:</b> ____ / ____ / ____ <b>SEMANA GESTACIONAL do hemograma :</b> ____ semanas			
	Parâmetro	Valor	Valor referência
1	Neutrófilos	____, ____ / ____, ____%N	
2	Linfócitos	____, ____ / ____, ____%L	21 - 35%
3	Monócitos	____, ____ / ____, ____%M	4 - 8%
4	Eosinófilos	____, ____ / ____, ____%E	2 - 4 %
5	Basófilos	____, ____ / ____, ____%B	0 - 1%
6	RBC	____, ____ m/ $\mu$ L	
7	Hemoglobina	____, ____ g/dL	12 - 15,5%
8	Hematócrito	____, ____ %	37 - 47 g%
9	MCV	____, ____ fL	82-92 $m^3$
10	MCH	____, ____ pg	
11	MCHC	____, ____ g/dL	
12	RDW	____, ____ %	
<b>Data bioquímica:</b> ____ / ____ / ____ (não inserir valores com vírgula) <b>SEMANA GESTACIONAL da coleta bioquímica/pesquisa :</b> ____ semanas			
13	Glicemia jejum	____ mg/dL	70 - 110
14	Colesterol total:	____ mg/dL	140 - 200
15	Triglicérides:	____ mg/dL	65 - 150
16	HDL	____ mg/dL	40 - 60
17	LDL (calcular) = CT - (TG/5 + HDL)	____ mg/dL	
<b>Data microbiologia:</b> ____ / ____ / ____ <b>SEMANA GESTACIONAL da urocultura :</b> ____ semanas			
18	Parasitológico de fezes:	<b>0</b> [ ] negativo <b>1</b> [ ] positivo: _____ _ [ ] cod	
19	Urocultura:	<b>0</b> [ ] negativo <b>1</b> [ ] positivo <b>2</b> [ ] flora bact. Discreta _ [ ] cod	
densidade: _____ ; pH: __, __; proteína (cruzés): _____			
20	HIV	<b>0</b> [ ] negativo <b>1</b> [ ] positivo _ [ ] cod	
21	VDRL	<b>0</b> [ ] negativo <b>1</b> [ ] positivo _ [ ] cod	
22	Toxoplasmose	<b>0</b> [ ] negativo <b>1</b> [ ] positivo _ [ ] cod	

Dosagens posteriores do soro:

	Parâmetro:	Valor		Parâmetro:	Valor
23	Ptn C reativa	mg/mL	<b>24</b>	Interleucina-6:	pg/mL
25	Interleucina 1 $\beta$	pg/mL	<b>26</b>	Insulina	$\mu$ U/mL
27	Adiponectina:	ng/mL	<b>28</b>		
29			<b>30</b>		

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

### ANEXO 3

### ANEXOS

**Status da gestante:** 01[ ]ativa 02[ ]perda 03[ ]exclusão 04[ ]aberto 05[ ]natimorto 06[ ]parto prematuro

Ensaio [ ] Coorte [ ]

**Motivo/tipo de aborto:**

DATA DE COLETA	ENTREV	REV	DIG 1	DATA DE DIGITAÇÃO 1	DIG 2	DATA DE DIGITAÇÃO 2
____ / ____ / ____	____	____	____	____ / ____ / ____	____	____ / ____ / ____

☞ Revisar **FOLHA de ROSTO e PENDÊNCIAS** com a gestante.

☞ Realizar a **PRIMEIRA medida de pressão arterial**

“Vamos começar nossa conversa sobre alguns dados gerais da Sra..”

1	A respeito de sua situação conjugal, a Sra: (LER as opções de resposta)	01 [ ] vive com companheiro 02 [ ] não vive com companheiro há mais de 1 ano 03 [ ] não vive com companheiro há menos de 1 ano 04 [ ] tem namorado há mais de 1 ano 05 [ ] não tem namorado 06 [ ] tem namorado a < 1 ano 07 [ ] outro					_____[ ] codificação
---	--	--	--	--	--	--	----------------------

2	O pai da criança está trabalhando no momento?	1 [ ] sim	0 [ ] não	_____[ ] codificação			
---	---	-----------	-----------	----------------------	--	--	--

3	ATUALMENTE, quantas horas de sono, em MÉDIA, você costuma dormir POR NOITE?				______ horas		
4	Em geral, você tem tido o sono tranquilo?	1 [ ] sim	5	Modificou desde o 7º mês de gestação até agora?	0 [ ] não modificado.	1 [ ] sim, está mais tranqüilo	_____[ ] cod
6	Você tem dormido em outros horários, sem ser a noite?		1 [ ] sim	— [ ] cod	7	Quantas horas?	
			0 [ ] não. Próxima seção			____ hs ____ min	

Fumante no 1º ou 2º trimestre? 0[ ] Não 1[ ] Sim ____ [ ] codificação							
8	Você fuma atualmente?	1 [ ] sim	— [ ] cod	9	Quantos cigarros você fuma por dia?	____ cigarros	
10	Há quanto tempo você parou de fumar? 888 se fuma atualmente, 000 para menos de 1 mês.				______ meses		

11	Você consumiu algum tipo de bebida alcoólica nos últimos 2 meses?		1 [ ] sim	0 [ ] não → próxima seção	_____[ ] codificação		
<b>Tipo de bebida</b>							
Cerveja/ Chopp	1 [ ] sim 0 [ ] não ____ [ ] cod	____ copos ou ____ garrafa ou ____ long neck ____ latinhas	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca	_____[ ] cod	
Cachaça/ Vodka	1 [ ] sim 0 [ ] não ____ [ ] cod	____ copos	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca	_____[ ] cod	
Vinho	1 [ ] sim 0 [ ] não ____ [ ] cod	____ taça	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca	_____[ ] cod	
Uísque	1 [ ] sim 0 [ ] não ____ [ ] cod	____ doses	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca	_____[ ] cod	
_____	1 [ ] sim 0 [ ] não ____ [ ] cod	____ _____	1 [ ] mais de 2 vezes/dia 2 [ ] 1 vez/dia	3 [ ] 4-6 vezes/semana 4 [ ] 1-3 vezes/semana	5 [ ] 1-3 vezes/mês 6 [ ] nunca/quase nunca	_____[ ] cod	

## ANEXOS

RENDAS. "Agora eu gostaria de saber se a renda da sua família mudou desde a última entrevista. Por favor, lembre-se que estas perguntas servirão apenas para a pesquisa e não serão passadas para outras pessoas."

"Da última entrevista para cá: O número de pessoas que possuem renda (trabalham) mudou?"

"Alguém parou de trabalhar?" "O valor do salário aumentou ou diminuiu?"

1	A Sra. faz algum trabalho remunerado fora de casa ou em casa?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> cod	2	Qual?	
3	Quantas pessoas que moram na sua casa incluindo você?			<input type="checkbox"/> pessoas		
<b>Qual a remuneração em reais de cada uma dessas pessoas (listar parentesco com a gestante)? (GÂNHOS REFERENTES ao MÊS PASSADO)</b>						
4	3.1 Gestante: (88888 se não trabalha)	R\$ _____,00	3.4 Contribuinte 3: (_____)			R\$ _____,00
	3.2 Contribuinte 1: (_____)	R\$ _____,00	3.5 Contribuinte 4: (_____)			R\$ _____,00
	3.3 Contribuinte 2: (_____)	R\$ _____,00	3.6 EXTRAS (questão abaixo):			R\$ _____,00
			3.7 Total (Somar depois):			R\$ _____,00
A família tem outra fonte de renda, por exemplo, bolsa família, aluguel, pensão ou outra, que não foi citada acima?			<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> cod → Quanto? R\$ _____,00/ mês			

### HISTÓRIA FAMILIAR DE DOENÇAS CRÔNICAS

"Agora vamos falar um pouco sobre a saúde de seus familiares mais próximos. Na sua família, pais, irmãos, tios ou avós, há pessoas com problema de:"

		Grau de parentesco:	
1	pressão alta?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> cod	<input type="checkbox"/> irmãos <input type="checkbox"/> pais <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/> tios* <input type="checkbox"/> cod
2	diabetes ou açúcar no sangue?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> cod	<input type="checkbox"/> irmãos <input type="checkbox"/> pais <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/> tios* <input type="checkbox"/> cod
3	problemas no coração?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> cod	<input type="checkbox"/> irmãos <input type="checkbox"/> pais <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/> tios* <input type="checkbox"/> cod

\*tios = irmãos dos pais da gestante (não considerar os cônjuges)

### INTERCORRENCIAS DURANTE A GESTAÇÃO

"Agora gostaria de saber como foi a sua gestação até o momento. Vou perguntar para você alguns problemas comuns na gestação..."

1. Infecção urinária?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Se sim, quantas vezes? _____	
2. Gripe ou resfriado?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Se sim, quantas vezes? _____	
3. Inflamação na garganta?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Se sim, quantas vezes? _____	
4. Outra inflamação ou infecção?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Qual? Quantas vezes: _____	
5. Vírose ou intoxicação alimentar?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Se sim, quantas vezes? _____	
6. Você precisou ser hospitalizada ou procurou a emergência durante a gestação?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Se sim, por quê? _____ Usou medicação? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	
7. Para algum desses problemas citados acima, a Sra. usou alguma medicação antiinflamatória durante a gestação?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	quantas vezes: _____ Qual o nome? _____	
8. Durante o pré-natal foi informada que estava com pré-eclâmpsia?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod		
8a. Usou medicação anti-hipertensiva?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Se sim, Qual? _____	
9. Durante o pré-natal foi informada que estava com diabetes ou com açúcar do sangue elevado?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod		
9a. Usou medicação para controlar o açúcar?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Se sim, Qual? _____	
10. Usou alguma outra medicação por outro motivo?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> cod	Qual? _____	
11. Você se recorda se, durante a gestação, aconteceu algum evento estressante, ou seja, alguma coisa que deixou a senhora excessivamente preocupada, estressada ou mesmo muito triste?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Se sim, qual evento?	Trimestre:
		1. _____	<input type="checkbox"/> tri/cod
		2. _____	<input type="checkbox"/> tri/cod
		3. _____	<input type="checkbox"/> tri/cod

## ANEXOS

(seja em casa, na família, ou no trabalho)		4.	_____	— [ ]tri/cod
--	--	----	-------	--------------

(Entrevistador: DESTACAR ESTA FOLHA)

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

<b>ANTROPOMETRIA</b>				
<b>“Agora, vamos realizar algumas medidas.”</b>				
DUM (1º questionário)	____ / ____ / ____	1	Semana gestacional DUM:	____ semanas DUM
2	A Sra. fez ultrassonografia desde a nossa última entrevista? 0 [ ]Não 1[ ] Sim ____ [ ] cod	Caso sim, peça para consultar ou pergunte a semana gestacional da data em que realizou o exame: ____ sem ____ dias no dia ____ / ____ / ____		
3	CALCULAR DEPOIS, Semana gestacional pela USG (ajustada para data desta entrevista)	____ semanas USG (calculo a partir da 1ª USG)		
<b>☞ Medidas antropométricas:</b>				
Estatura :	_____, cm	3	Peso atual:	_____, kg
4	IMC atual: _____, kg/m <sup>2</sup>			
<b>☞ Passar medidas para o CARTÃO DA GESTANTE</b>				
5	Você está com edemas (inchaço) nas pernas?	0 [ ] ausente 1 [ ] membros inferiores e superiores 2 [ ] membros superiores 3 [ ] membros inferiores 4 [ ] tornozelo 5 [ ] generalizado ____ [ ] codificação	6	Cacifu: ____ (número de cruzes em 4)
7	Data aferição (pressão arterial): ____ / ____ / ____	8	Pressão arterial 1 (PA1):	Sistólica: ____ mmHg Diástólica: ____ mmHg Batimentos cardíacos: ____ min
<b>☞ Realizar a SEGUNDA medida de PRESSÃO ARTERIAL</b>				
9	Pressão arterial 2 (PA2): Sistólica: ____ mmHg Diástólica: ____ mmHg Batimentos cardíacos: ____ min	10	MÉDIA Pressão arterial (PAM3):	Sistólica: ____ mmHg Diástólica: ____ mmHg Batimentos cardíacos: ____ min
<b>☞ Agradecer e agendar QFCA NA PRÓXIMA CONSULTA DE PRÉ-NATAL.</b>				
<b>☞ Pedir para gestante passar na sala do projeto todas as próximas vezes que vier para o PN, somente para aferir o peso.</b>				
Acompanhamento do peso da gestante nas últimas semanas gestacionais:				
____ / ____ / ____	____ / ____ / ____	____ / ____ / ____	____ / ____ / ____	____ / ____ / ____
IG:	IG:	IG:	IG:	IG:
Peso:	Peso:	Peso:	Peso:	Peso:
(Dia QFCA)				

## ANEXOS

(Entrevistador: DESTACAR ESTA FOLHA)

**NOME COMPLETO:** \_\_\_\_\_  
**DATA COLETA:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

<b>3º TRIMESTRE - RESULTADO DOS EXAMES BIOQUÍMICOS</b>			
<b>Data exames:</b> ____/____/_____			
<b>SEMANA GESTACIONAL da coleta :</b> ____ semanas			
	Parâmetro	Valor	Valor referência
<b>1</b>	Neutrófilos	____,____ / ____, %N	
<b>2</b>	Linfócitos	____,____ / ____, %L	21 - 35%
<b>3</b>	Monócitos	____,____ / ____, %M	4 - 8%
<b>4</b>	Eosinófilos	____,____ / ____, %E	2 - 4 %
<b>5</b>	Basófilos	____,____ / ____, %B	0 - 1%
<b>6</b>	RBC	____,____ m/ $\mu$ L	
<b>7</b>	Hemoglobina	____,____ g/dL	12 - 15,5%
<b>8</b>	Hematócrito	____,____ %	37 - 47 g%
<b>9</b>	MCV	____,____ fL	82-92 $m^3$
<b>10</b>	MCH	____,____ pg	
<b>11</b>	MCHC	____,____ g/dL	
<b>12</b>	RDW	____,____ %	
<b>13</b>	Glicemia jejum	____ mg/dL	70 - 110
<b>14</b>	Colesterol total:	____ mg/dL	140 - 200
<b>15</b>	Triglicérides:	____ mg/dL	65 - 150
<b>16</b>	HDL	____ mg/dL	40 - 60
<b>17</b>	LDL ( <i>calcular</i> ) = CT - (TG/5 + HDL)	____ mg/dL	
<b>18</b>	Urocultura: densidade: ____ ; pH: ____ ; proteína (cruzés): _____	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo 2 [ ] flora bact. Discreta 7 [ ] IGN	
<b>19</b>	HIV	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo 7 [ ] IGN	
<b>20</b>	VDRL	0 [ ] negativo 1 [ ] positivo 7 [ ] IGN	

*Dosagens posteriores do soro:*

	Parâmetro:	Valor		Parâmetro:	Valor
<b>1</b>	Ptn C reativa	mg/mL	<b>2</b>	Interleucina-6:	pg/mL
<b>3</b>	Interleucina 1 $\beta$	pg/mL	<b>4</b>	Insulina	$\mu$ U/mL
<b>5</b>	Adponectina:	ng/mL	<b>6</b>		

| 2 3 4 5 6 7 8 9 0

**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Nutrição Josué de Castro**

<b>Nome:</b> _____					
<b>Número do questionário</b> _____					
<b>Entrevistador:</b> [____]			<b>Data:</b> ____ / ____ / ____ - ____		
<b>Hora inicio</b> ____ h ____ min		<b>Hora final</b> ____ h ____ min	<b>Local:</b> _____		
<b>REVISOR</b>	<b>DIG 1</b>	<b>DATA DE DIGITAÇÃO 1</b>		<b>DIG 2</b>	<b>DATA DE DIGITAÇÃO 2</b>
_____	____	____	/	____	/

**Questionário alimentar – 1º trimestre**

**“Vou agora realizar algumas perguntas relacionadas à sua alimentação, mas antes gostaria de saber como a Senhora está se sentindo em relação a isso.”**

1. A sua fome mudou depois que engravidou? 0 [ ] não, está igual; 1 [ ] sim, aumentou; 2 [ ] sim, diminuiu

2. A Senhora tem sentido enjôos?

0 [ ] Não; 1 [ ] Sim, freqüente; 2 [ ] Sim, eventual; 3 [ ] Sim, mas já pararam

**“Agora vou fazer algumas perguntas sobre as refeições que você costuma realizar.”**

3. “Em uma semana normal, com que freqüência você faz as seguintes refeições?”	Todos os dias	5-6 X semana	3-4 X semana	1-2 X semana	Nunca/Quase Nunca
Café da manhã?	1	2	3	4	5
Come algo no meio da manhã?	1	2	3	4	5
Lanche no lugar de almoço?	1	2	3	4	5
Almoço?	1	2	3	4	5
Lanche da tarde?	1	2	3	4	5
Lanche no lugar de jantar?	1	2	3	4	5
Jantar?	1	2	3	4	5
Come algo mais tarde ou antes de dormir?	1	2	3	4	5

**4. “Em que local você geralmente realiza as refeições?”**

	Não realiza	Casa	No trabalho, mas leva de casa	Fornecida pelo trabalho	Lanchonete, bar, restaurante	Outros
Café da manhã?	0	1	2	3	4	5
Almoço?	0	1	2	3	4	5
Lanche da tarde	0	1	2	3	4	5
Jantar	0	1	2	3	4	5

- Agora vamos fazer algumas perguntas em relação à sua alimentação, vamos perguntar uma lista de alimentos. Queremos saber se você consumiu cada um destes alimentos nos **ÚLTIMOS SEIS MESES ANTERIORES À GESTAÇÃO**, ou seja, desde \_\_\_\_\_ até agora.

- Para cada alimento que eu perguntar, responda **SE VOCÊ CONSUMIU OU NÃO ESTE ALIMENTO DURANTE ESSE PERÍODO**, de acordo com a seguinte escala de freqüência (**MOSTRAR ESCALA**).

- Caso você não tenha consumido o alimento que eu lhe perguntei, a Sra. responda “**NUNCA ou QUASE NUNCA**”.

- Para os alimentos que VOCÊ CONSUMIU, vou perguntar a QUANTIDADE ou TAMANHO DA PORÇÃO que você NORMALMENTE consome desse alimento. OK? Vamos começar! ☺

### VOCE CONSUMIU ... nos últimos 6 meses?

QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?				Freqüência							
				+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca
Arroz	1-2 C Sopa	1 colher de servir 3-4 CSopa	2 colh servir ou + 5 CSopa ou +	1	2	3	4	5	6	7	8
Miojo <b>ou</b> Macarrão	1 pegador	2 pegadores	3 pegadores ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Farinha de mandioca <b>ou</b> farofa	1 colher sopa	2 colheres sopa	3 colheres sopa ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Polenta <b>ou</b> Angu	1 pedaço	2 pedaços	3 pedaços ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Batata Cozida <b>ou</b> Purê	1 unidade peq. ou 1 colher de sopa	2 unidades peq. 2 C Sopa	3 unidades peq. 3 C Sopa ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Mandioca, Aipim <b>ou</b> Inhamê	1 pedaço	2 pedaços	3 pedaços ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Lasanha, Nhoque <b>ou</b> Ravióli	Marque só a freqüência			1	2	3	4	5	6	7	8
Feijão	½ concha média	1 concha média	2 conchas médias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8

1. Você costuma comer: 1 / grão e caldo, ou somente o 2 / caldo? 8 / não come feijão

Lentilha, Ervilha <b>ou</b> Grão de bico	1-2 colh Sopa	3-4 colh Sopa ou ½ concha	5 colheres ou + 1 concha ou +	1	2	3	4	5	6	7	8
QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?				+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca
Bolo	1 fatia	2 fatias	3 fatias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Biscoito recheado	1-2 unidades	3-5 unidades	6 unidades ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Biscoito doce, maiozena, maria	1-2 unidades	3-5 unidades	6 unidades ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Biscoito salgado, cream cracker	1-2 unidades	3-5 unidades	6 unidades ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Pão, pão francês <b>ou</b> pão de forma	1 unidade ou 2 fatias	1 ½ - 2 unidades ou 3-4 fatias	3 unidades ou 5 fatias ou +	1	2	3	4	5	6	7	8
Margarina	Marque só a freqüência			1	2	3	4	5	6	7	8
Manteiga ( <i>Qual a marca?</i> )	Marque só a freqüência			1	2	3	4	5	6	7	8
Queijo	1 fatia	2 fatias	3 fatias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Requeijão	Marque só a freqüência			1	2	3	4	5	6	7	8

*VOCE CONSUMIU ... nos últimos 6 meses?*

<b>QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?</b>			Freqüência							
			+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca
Leite (em pó ou café com leite, pingado)	1 copo ou 2 CS pó	2 copos ou + ou 3-4 CS pó ou +	1	2	3	4	5	6	7	8

*Se Café com leite ou Pingado: ANOTE AQUI a QUATIDADE de leite por xícara, TAMANHO da xíc. e a FREQ.:*

**2. Que tipo de leite você toma? 1[ ] integral; 2[ ] semi-desnatado; 3[ ] desnatado; 8[ ] não toma leite**

Logurte	1 pote médio ou 2 danoninhos	2 potes ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8	
Alface	1-2 folhas	3-4 folhas	5 folhas ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Couve	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Repolho	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Couve-flor <b>OU</b> Brócolis	1 ramo	2 ramos	3 ramos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Tomate	½ unidade 5 rodelas	1-2 unidades 5-10 rodelas	3 unidades ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Pepino cru ( <b>não enlatado</b> )	1-2 fatias 1 colher	3-4 fatias 2 colheres	5 fatias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Chuchu	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Abobrinha verde	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Abóbora	1 pedaço	2 pedaços	3 pedaços ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Cenoura	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Beterraba	1-2 fatias	3-4 fatias	5 fatias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Quiabo	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Vagem	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>"Agora vou perguntar sobre consumo de frutas, mas não considere aqui suco de frutas, pois irei perguntar depois sobre sucos".</b>				+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca
Laranja ou tangerina	1 média	2 médias	3 méd. ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Banana	1 média	2 médias	3 méd. ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Mamão	1 fatia ou ½ papaia	2 fatias ou 1 papaia ou mais		1	2	3	4	5	6	7	8
Maçã	1 unidade	2 unidades ou mais		1	2	3	4	5	6	7	8
Melancia ou Melão	1 fatia	2 fatias		1	2	3	4	5	6	7	8

*VOCE CONSUMIU ... nos últimos 6 meses?*

QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?				Frequência							
				+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca
Abacaxi	1 fatia	2 fatias	3 fatias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Manga	1 unidade	2 unidades ou mais		1	2	3	4	5	6	7	8
Uva	1/2 cacho	1 cacho	2 cachos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Pimentão	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Alho	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Cebola	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Ovos	1 ovo	2 ovos	3 ovos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Peixe (fresco, não enlatado)	1 filé médio ou 1 posta média	2 filés médios ou 2 postas ou +		1	2	3	4	5	6	7	8

**3. Como você geralmente consome o peixe? 1[ ] frito/empanado; 2[ ] grelhado; 3[ ] ensopado/cozido; 4[ ] assado; 8[ ] não come peixe**

**4. Qual o tipo de peixe (nome) que você costuma consumir (circule o mais o +freqüente)?**

Carne de porco, carré	1 pedaço	2 pedaços ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8	
Frango	1 pedaço	2 pedaços ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8	
Carne vermelha, bife, carne ensopada ou moída	1 bife ou 1 pedaço médio, 5 colheres de sopa de carne ensopada ou de carne moída	2 bifes ou 2 filés médio, 6 colheres de sopa de carne ensopada ou de carne moída	1	2	3	4	5	6	7	8	
Carne de hambúrguer	1 hambúrguer	2 hambúrgueres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8	
Sardinha ou Atum em lata	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Bucho, figado, moela, coração	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8

**Observe ATENTAMENTE a freqüência de consumo semanal das carnes listadas acima; observe se há consumo super ou subrelato.**

Salsicha ou Salsichão	1 unidade média	2 unidades médias	3 unidades médias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Linguiça	1 unidade média	2 unidades médias	3 unidades médias ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?				+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca
Mortadela, Presunto, Apresuntado, Salame	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Bacon, toucinho ou torresmo	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Churrasco de carne vermelha (NÃO FGO)	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Carne seca ou bacalhau	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8

*VOCE CONSUMIU ... nos últimos 6 meses?*

<b>QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?</b>			Freqüência								
			+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca	
Banha de porco para cozinhar, temperar ou fritar?	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Pizza	1 pedaço	2 ou mais pedaços	1	2	3	4	5	6	7	8	
Batata frita, Chips <b>ou</b> Palha	1 pacote pequeno de chips ou 1 porção pequena do McDonald's	2 pacotes pequenos de chips ou 1 porção média do McDonald's	1 pacote grande de chips ou equivalente a 1 porção grande do McDonald's	1	2	3	4	5	6	7	8
Salgadinhos tipo Cheetos, Fofura, Torcida	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Pipoca ( <i>doce/salg, arroz, milho</i> )	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Salgados tipo risoli, coxinha, pastel, kibe	1 unidade média	2 unidades médias ou mais		1	2	3	4	5	6	7	8
Amendoim ( <i>saco</i> )	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Alimentos enlatados como ervilha, azeitona, palmito, picles, pepino	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Maionese	1 colher de chá ou sopa	2 colheres sopa ou mais		1	2	3	4	5	6	7	8
Sorvete	1 bola	2 bolas ou mais		1	2	3	4	5	6	7	8
Balas	<b>Marque só a freqüência</b>			1	2	3	4	5	6	7	8
Chocolate em pó ou Nescau	1 colher	2 colheres	3 colheres ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Chocolate barra ou Bombom	1 unidade (30g)	2 unidades (30g)	3 unidades (30g) ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Doce à base de leite, como pudim, doce leite, ou outros	1 pedaço	2 pedaços	3 pedaços ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Doce à base de fruta, como goiabada, bananada, ou outros	1 pedaço	2 pedaços	3 pedaços ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Açúcar para adoçar	1 colher de sobremesa	2 colheres de sobremesa ou mais		1	2	3	4	5	6	7	8
Café ( <i>solúvel ou pó; puro ou leite</i> )	1 xíc peq/ 1 C chá pó	1 xíc média 2-3 C chá pó	1 xíc grande 2 xícaras ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?</b>			+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca	
Chá <b>OU</b> Mate	1 copo	2 copos	3 copos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Refrigerantes à base de cola, como coca-cola ou pepsi-cola	1 copo	2 copos	3 copos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Outros refrigerantes como guaraná, fanta <b>ou</b> Guaravita	1 copo	2 copos	3 copos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8

Se freqüência for *diária ou semanal para ambos tipos de refrigerante*, revisar com gestante para não supraestimar este consumo.

*VOCE CONSUMIU ... nos últimos 6 meses?*

QUANDO COMEU, QUAL FOI A QUANTIDADE POR REFEIÇÃO (OU A CADA VEZ)?				Freqüência							
				+ 3X dia	2 a 3X por dia	1 X por dia	5 a 6 X por semana	2 a 4 X por semana	1 X por semana	1 a 3 X por mês	Nunca ou quase nunca
Suco da fruta ou da polpa ( <i>Não pó</i> )	1 copo	2 copos	3 copos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Vinho	1 copo	2 copos	3 copos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Cerveja	1-2 copos	3-4 copos	5 copos ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8
Outras bebidas alcoólicas	1 dose	2 doses	3 doses ou mais	1	2	3	4	5	6	7	8

*Tem algum alimento que faça parte do seu hábito que eu não tenha perguntado, como sobremesa, outras frutas?*

*(Se observado SUBNOTIFICAÇÃO ou BAIXO CONSUMO, ENFATIZE A PERGUNTA)*

	Porção usual:	1	2	3	4	5	6	7	8
	Porção usual:	1	2	3	4	5	6	7	8
	Porção usual:	1	2	3	4	5	6	7	8
	Porção usual:	1	2	3	4	5	6	7	8

*“Agora, vou fazer algumas perguntas sobre o consumo de ÓLEO na sua casa.”*

4. Qual o tipo de óleo ou gordura que habitualmente vocês utilizam para cozinhar OU temperar os alimentos?

1 [ ] óleo de soja; 2 [ ] óleo de arroz; 3 [ ] óleo de milho; 4 [ ] óleo de girassol 5 [ ] óleo de canola  
6 [ ] azeite de oliva; 7 [ ] banha de porco; 8 [ ] não usa óleo

5. E para fritura? *[se for o mesmo, remarque no quadro abaixo]*

1 [ ] óleo de soja; 2 [ ] óleo de arroz; 3 [ ] óleo de milho; 4 [ ] óleo de girassol ; 5 [ ] óleo de canola  
6 [ ] azeite de oliva; 7 [ ] banha de porco; 8 [ ] margarina; 9 [ ] manteiga; 10 [ ] Não faz frituras

Quanto tempo dura 1 garrafa ou lata de óleo após aberta?

*[óleo cozinhar] \_\_\_\_ dias OU \_\_\_\_ semanas OU \_\_\_\_ meses  
[outro óleo ou azeite de oliva marcado no quadro] \_\_\_\_ dias OU \_\_\_\_ semanas OU \_\_\_\_ meses*

NORMALMENTE, no dias de semana, ou seja, de segunda a sexta-feira, quantas pessoas realizam o ALMOÇO em sua casa? \_\_\_\_ pessoas [total]

Quantas são crianças < 5 anos? \_\_\_\_ ; Demais (adultos/idosos ou adolescentes): \_\_\_\_

Você está incluída? 0 [ ] Não 1 [ ] Sim

E o JANTAR? \_\_\_\_ pessoas no JANTAR [total]

Quantas são crianças < 5 anos? \_\_\_\_ ; Demais (adultos/idosos ou adolescentes): \_\_\_\_

Você está incluída? 0 [ ] Não 1 [ ] Sim

E nos sábados? \_\_\_\_ pessoas no ALMOÇO [total]

Quantas são crianças < 5 anos? \_\_\_\_ ; Demais (adultos/idosos ou adolescentes): \_\_\_\_

Você está incluída? 0 [ ] Não 1 [ ] Sim

E no jantar do sábado: \_\_\_\_ pessoas JANTAR [total]

Quantas são crianças < 5 anos? \_\_\_\_ ; Demais (adultos/idosos ou adolescentes): \_\_\_\_

Você está incluída? 0 [ ] Não 1 [ ] Sim

E nos domingos? \_\_\_\_ pessoas no ALMOÇO [total]

Quantas são crianças < 5 anos? \_\_\_\_ ; Demais (adultos/idosos ou adolescentes): \_\_\_\_

Você está incluída? 0 [ ] Não 1 [ ] Sim

**E no jantar do domingo:** \_\_\_ pessoas JANTAR [total]  
**Quantas são crianças < 5 anos?** \_\_\_ ; **Demais (adultos/idosos ou adolescentes):** \_\_\_  
**Você está incluída?** 0 [ ] Não 1 [ ] Sim

**Status da gestante:** 1[ ]ativa 2[ ]perda 3[ ]exclusão 4[ ]aborto

**Motivo/tipo de aborto:** \_\_\_\_\_

**Anotações:**

**MUITO OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO !!! ☺**

**Hora final \_\_\_ h \_\_\_ min**

**DIGITAÇÃO ÓLEO**

6. Per capta óleo: \_\_\_, \_\_\_ g/dia; 7. VET: \_\_\_\_, \_\_\_ kcal; 8. Lip total: \_\_\_, \_\_\_ g;  
9. SAT: \_\_\_, \_\_\_ g; 10. 16:0: \_\_\_, \_\_\_ g; 11. 18:0: \_\_\_, \_\_\_ g  
12. MONO: \_\_\_, \_\_\_ g; 13. 16:1: \_\_\_, \_\_\_ g; 14. 18:1: \_\_\_, \_\_\_ g  
15. POLI: \_\_\_, \_\_\_ g; 16. 18:2 n6: \_\_\_, \_\_\_ g; 17. 18:3 n3: \_\_\_, \_\_\_ g; 18. 18:3 n6: \_\_\_, \_\_\_ g  
19. Total trans: \_\_\_, \_\_\_ g

## ANEXO 5

```
**Do-file artigo 1

***Table 1*** Características das gestantes segundo adequação
ranksum insulina if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=., by (VitD_nmol1T)

bysort VitD_nmol1T: sum insulin if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.

ranksum homa if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0 & status==1 & vitdquest~=.
& sg_padrao~=., by (VitD_nmol1T)

bysort VitD_nmol1T: sum homa if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0 &
status==1 & vitdquest~=.. & sg_padrao~=.

ranksum adipo if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0 & status==1 &
vitdquest~=.. & sg_padrao~=., by (VitD_nmol1T)

bysort VitD_nmol1T: sum adipo if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0 &
status==1 & vitdquest~=.. & sg_padrao~=.

ranksum leptina if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0 & status==1 &
vitdquest~=.. & sg_padrao~=., by (VitD_nmol1T)

bysort VitD_nmol1T: sum leptina if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0 &
status==1 & vitdquest~=.. & sg_padrao~=.

ranksum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0 & status==1 &
vitdquest~=.. & sg_padrao~=., by (VitD_nmol1T)

bysort VitD_nmol1T: sum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==1 & teve_diabetesgest==0
& status==1 & vitdativa~=.. & sg_padrao~=.

sum VitD_nmol if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d

ranksum VitD_nmol if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., by (VitD_nmol1T)

bysort VitD_nmol1T: sum VitD_nmol if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d

sum Intake_vitD_IU_T1fixo if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d
```

```

ranksum      Intake_vitD_IU_T1fixo if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., by
(VitD_nmol1T)
bysort    VitD_nmol1T: sum      Intake_vitD_IU_T1fixo if trimestre==1 &
teve_diabetesgest~1 & status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. &
adipomil_semout_correto~=..,d

sum renda_percapta_dolar if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d

bysort    VitD_nmol1T: sum      renda_percapta_dolar if trimestre==1 &
teve_diabetesgest~1 & status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. &
adipomil_semout_correto~=..,d

ranksum      renda_percapta_dolar if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., by
(VitD_nmol1T)

sum imc if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 & VitD_nmol1T~=..
& sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d

bysort    VitD_nmol1T: sum      imc if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d

ranksum      imc if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., by (VitD_nmol1T)

sum idade if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 & VitD_nmol1T~=..
& sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d
bysort    VitD_nmol1T: sum      idade if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=..,d
ranksum      idade if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., by (VitD_nmol1T)

tab EstAno_1Trimestre VitD_nmol1T if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., col
chi2

tab paridade_2cat VitD_nmol1T if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., col
chi2

tab Branca_Negro_Outros VitD_nmol1T if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., col
chi2

```

```

tab VitD_nmol1T if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.

***Cálculo do intervalo de confiança da figura de prevalência de
inadaquação/adequação de vitD***
ci total número de observação esperada, level(95)
**IC:Inadequação Verão
ci 117 17, level(95)
**IC:Inadequação Outono
ci 117 26, level(95)
**IC:Inadequação Inverno
ci 117 38, level(95)
**IC:Inadequação Primavera
ci 117 36, level(95)

***DIFERENÇA ENTRE VERÃO COM INVERNO E PRIMAVERA (MAIOR PREVALENCIA NO INVERNO
E PRIMAVERA VS VERÃO)

**IC:Adequação Verão
ci 44 17, level(95)
**IC:Adequação Outono
ci 44 19, level(95)
**IC:Adequação Inverno
ci 44 1, level(95)
**IC:Adequação Primavera
ci 44 7, level(95)

***DIFERENÇA ENTRE INVERNO COM VERÃO E OUTONO (MENOR PREVALENCIA NO INVERNO
VS VERÃO E OUTONO)

```

\*\*\*\*\*Tabela 2\*\*\*\*\*

```

**1º trimestre
sum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & GLICOSE_NOVA_PE~=..,d

bysort VitD_nmol1T: sum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==1 &
teve_diabetesgest~1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmol1T~=.. &
GLICOSE_NOVA_PE~=..,d

ranksum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & GLICOSE_NOVA_PE~=.., by (VitD_nmol1T)

sum insulina if trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmol1T~=.. & sg_padrao~=.. & loginsulina_semout_correto~=..,d

```

```

bysort VitD_nmollT: sum insulina if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & sg_padrao~=.& VitD_nmollT~=.& loginsulina_semout_correto~=.d

ranksum insulina if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& loginsulina_semout_correto~=., by
(VitD_nmollT)

sum homa_semout_correto if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& homa_semout_correto~=.d
bysort VitD_nmollT: sum homa_semout_correto if trimestre==1 &
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.& VitD_nmollT~=.&
homa_semout_correto~=.d

ranksum homa_semout_correto if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1
& VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& homa_semout_correto~=., by (VitD_nmollT)

sum adipomil_semout_correto if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1
& VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& adipomil_semout_correto~=.d

bysort VitD_nmollT: sum adipomil_semout_correto if trimestre==1 &
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.& VitD_nmollT~=.&
adipomil_semout_correto~=.d

ranksum adipomil_semout_correto if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& adipomil_semout_correto~=., by
(VitD_nmollT)

sum leptina_semout_correto if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1
& VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& leptina_semout_correto~=.d

bysort VitD_nmollT: sum leptina_semout_correto if trimestre==1 &
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.& VitD_nmollT~=.&
leptina_semout_correto~=.d

ranksum leptina_semout_correto if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& leptina_semout_correto~=., by
(VitD_nmollT)

sum leptina_ng_1 if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.& sg_padrao~=.& leptina_semout_correto~=.d

bysort VitD_nmollT: sum leptina_ng_1 if trimestre==1 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & sg_padrao~=.& VitD_nmollT~=.& leptina_semout_correto~=., d

```

```

ranksum leptina_ng_lif trimestre==1 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & leptina_semout_correto~=.., by (VitD_nmollT)

**2º trimestre

sum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & GLICOSE_NOVA_PE~=.., d

bysort VitD_nmollT: sum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==2 &
teve_diabetesgest~1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. &
GLICOSE_NOVA_PE~=.., d

ranksum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==2 & teve_diabetesgest~2 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & GLICOSE_NOVA_PE~=.., by (VitD_nmollT)

sum insulina if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & loginsulina_semout_correto~=.., d

bysort VitD_nmollT: sum insulina if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 &
status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. & loginsulina_semout_correto~=.., d

ranksum insulina if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & loginsulina_semout_correto~=.., by
(VitD_nmollT)

sum homa_semout_correto if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & homa_semout_correto~=.., d

bysort VitD_nmollT: sum homa_semout_correto if trimestre==2 &
teve_diabetesgest~1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. &
homa_semout_correto~=.., d

ranksum homa_semout_correto if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & homa_semout_correto~=.., by (VitD_nmollT)

sum adipomil_semout_correto if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., d

bysort VitD_nmollT: sum adipomil_semout_correto if trimestre==2 &
teve_diabetesgest~1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. &
adipomil_semout_correto~=.., d

ranksum adipomil_semout_correto if trimestre==2 & teve_diabetesgest~1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & adipomil_semout_correto~=.., by
(VitD_nmollT)

```

```

sum leptina_semout_correto if trimestre==2 & teve_diabetesgest~=1 & status==1
& VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & leptina_semout_correto~=..,d

bysort VitD_nmollT: sum leptina_semout_correto if trimestre==2 &
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. &
leptina_semout_correto~=..,d

ranksum leptina_semout_correto if trimestre==2 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & leptina_semout_correto~=.., by
(VitD_nmollT)

sum leptina_ng_1 if trimestre==2 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & leptina_semout_correto~=..,d

bysort VitD_nmollT: sum leptina_ng_1 if trimestre==2 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. & leptina_semout_correto~=..,d

ranksum leptina_ng_1 if trimestre==2 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & leptina_semout_correto~=.., by (VitD_nmollT)

**3º trimestre

sum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & GLICOSE_NOVA_PE~=..,d

bysort VitD_nmollT: sum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==3 &
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. &
GLICOSE_NOVA_PE~=..,d

ranksum GLICOSE_NOVA_PE if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=2 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & GLICOSE_NOVA_PE~=.., by (VitD_nmollT)

sum insulina if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & loginsulina_semout_correto~=..,d

bysort VitD_nmollT: sum insulina if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 &
status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. & loginsulina_semout_correto~=..,d

ranksum insulina if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & loginsulina_semout_correto~=.., by
(VitD_nmollT)

sum homa_semout_correto if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
VitD_nmollT~=.. & sg_padrao~=.. & homa_semout_correto~=..,d

```

```

bysort    VitD_nmol1T:   sum      homa_semout_correto   if   trimestre==3   &
teve_diabetesgest~=1   &   status==1   &   sg_padrao~=. &   VitD_nmol1T~=.   &
homa_semout_correto~=.,d

ranksum homa_semout_correto if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 & status==1
& VitD_nmol1T~=. & sg_padrao~=. & homa_semout_correto~=., by (VitD_nmol1T)

sum adipomil_semout_correto if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 & status==1
& VitD_nmol1T~=. & sg_padrao~=. & adipomil_semout_correto~=.,d
bysort    VitD_nmol1T:   sum      adipomil_semout_correto   if   trimestre==3   &
teve_diabetesgest~=1   &   status==1   &   sg_padrao~=. &   VitD_nmol1T~=.   &
adipomil_semout_correto~=.,d

ranksum  adipomil_semout_correto  if  trimestre==3  &  teve_diabetesgest~=1  &
status==1  &  VitD_nmol1T~=.  &  sg_padrao~=.  &  adipomil_semout_correto~=.,  by
(VitD_nmol1T)

sum leptina_semout_correto if trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1 & status==1
& VitD_nmol1T~=. & sg_padrao~=. & leptina_semout_correto~=.,d
bysort    VitD_nmol1T:   sum      leptina_semout_correto   if   trimestre==3   &
teve_diabetesgest~=1   &   status==1   &   sg_padrao~=. &   VitD_nmol1T~=.   &
leptina_semout_correto~=.,d

ranksum  leptina_semout_correto  if  trimestre==3  &  teve_diabetesgest~=1  &
status==1  &  VitD_nmol1T~=.  &  sg_padrao~=.  &  leptina_semout_correto~=.,  by
(VitD_nmol1T)

sum  leptina_ng_1     if  trimestre==3  &  teve_diabetesgest~=1  &  status==1  &
VitD_nmol1T~=. & sg_padrao~=. & leptina_semout_correto~=.,d
bysort VitD_nmol1T: sum  leptina_ng_1  if  trimestre==3 & teve_diabetesgest~=1
& status==1 & sg_padrao~=. & VitD_nmol1T~=. & leptina_semout_correto~=.,d

ranksum  leptina_ng_1  if  trimestre==3  &  teve_diabetesgest~=1  &  status==1  &
VitD_nmol1T~=. & sg_padrao~=. & leptina_semout_correto~=., by (VitD_nmol1T)

sum  leptina_ng_1     if  trimestre==3  &  teve_diabetesgest~=1  &  status==1  &
vitd_50nmol_2cat_1tri~=. & sg_padrao~=. & leptina_semout_correto~=.,d

bysort    vitd_50nmol_2cat_1tri:   sum      leptina_ng_1     if   trimestre==3   &
teve_diabetesgest~=1   &   status==1   &   sg_padrao~=. &   VitD_nmol1T~=.   &
leptina_semout_correto~=.,d

ranksum  leptina_ng_1  if  trimestre==3  &  teve_diabetesgest~=1  &  status==1  &
vitd_50nmol_2cat_1tri~=. & sg_padrao~=. & leptina_semout_correto~=., by
(VitD_nmol1T)

```

```

sum leptina_ng_1 if trimestre==2 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
vitd_50nmol_2cat_1tri~=.. & sg_padrao~=.. & leptina_semout_correto~=.,d

bysort vitd_50nmol_2cat_1tri: sum leptina_ng_1 if trimestre==2 &
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. &
leptina_semout_correto~=.,d

ranksum leptina_ng_1 if trimestre==2 & teve_diabetesgest~=1 & status==1 &
vitd_50nmol_2cat_1tri~=.. & sg_padrao~=.. & leptina_semout_correto~=., by
(VitD_nmollT)

bysort vitd_50nmol_2cat_1tri: sum leptina_ng_1 if trimestre==1 &
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. & VitD_nmollT~=.. &
leptina_semout_correto~=.,d

*****LME correto
xi: xtmixed adipomil_semout_correto c.sg_padrao##VitD_nmollT sg2 idade imc
i.EstAno_1Trimestre if teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. &
trimestre~=4 & VitD_nmollT~=.. & adipomil_semout_correto~=., || id: sg_padrao,
covariance(ex) variance

xtmixed insulina c.sg_padrao##VitD_nmollT idade imc i.EstAno_1Trimestre if
teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. & trimestre~=4 & VitD_nmollT~=..
& id~=17 & id~=289, || id: sg_padrao, covariance(ex) variance

xtmixed GLICOSE_NOVA_PE c.sg_padrao##VitD_nmollT sg2 idade imc
i.EstAno_1Trimestre if teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. &
trimestre~=4 & VitD_nmollT~=.. & glicemia_semout_correto~=., || id: sg_padrao,
covariance(uns) variance

xtmixed homa_semout_correto c.sg_padrao##VitD_nmollT idade imc
i.EstAno_1Trimestre if teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. &
trimestre~=4 & VitD_nmollT~=.. & homa_semout_correto~=., || id: sg_padrao,
covariance(uns) variance

xtmixed leptina_ng_1 c.sg_padrao##VitD_nmollT idade imc i.EstAno_1Trimestre
if teve_diabetesgest~=1 & status==1 & sg_padrao~=.. & trimestre~=4 &
VitD_nmollT~=.. & leptina_semout_correto~=., || id: sg_padrao, covariance(uns)
variance

```

## ANEXO 6

### \*\*Do-file do artigo 2

#### \* Tabela 1

```
sum idade if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum anos_escolaridade if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum imc_pre if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum VitD_nmol if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum new_kcal_1 if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum peso_ao_nascer if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum weightzscore if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum comprimento_ao_nascer if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
lengthcentile~=. & sg_parto_padrao~=. & weightzscore~=. & imc_pre~=. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=. & fumo_atual~=. & new_cor_referida_cat~=.
```

```
sum lengthzscore if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=. &
anos_escolaridade~=. & VitD_nmol~=. & comprimento_ao_nascer~=. &
```

```

lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

sum sg_parto_padrao if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

sum apgar_lmin if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

tab fumo_atual if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

tab consome_alcool if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

tab new_cor_referida_cat if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

tab consome_alcool if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

tab PN_PIG_ADEQ_GIG if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

tab prematuridade if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. &
lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. &
new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=..&

sum apgar_lmin if trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & sg_parto_padrao~=.. & VitD_nmol~=.. &
weightzscore~=.. & weightcentile~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. &

```

```

consome_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1
& apgar_1min~=.. & id~=256

```

**\* por trimestre sem blup - Tabela 2**

```

regress peso_ao_nascer VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==1 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. & consome_alcohol~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

```

```

regress peso_ao_nascer VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcohol if trimestre==2 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcohol~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

```

```

regress peso_ao_nascer VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcohol if trimestre==3 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcohol~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

```

```

regress weightzscore VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcohol if trimestre==1 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. & consome_alcohol~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256

```

```

regress weightzscore VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcohol if trimestre==2 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcohol~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256

```

```

regress weightzscore VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcohol if trimestre==3 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcohol~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256

```

```

regress comprimento_ao_nascer VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==1 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

regress comprimento_ao_nascer VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade
new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==2 &
status==1 & peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

regress comprimento_ao_nascer VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade
new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==3 &
status==1 & peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

regress lengthzscore VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==1 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256

regress lengthzscore VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==2 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256

regress lengthzscore VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==3 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256

regress apgar_1min VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==1 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &

```

```

weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

regress apgar_1min VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==2 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

regress apgar_1min VitD_nmol imc_pre anos_escolaridade new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==3 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & prematuridade~=1 & id~=256

poisson SGA_AGA VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool comprimento_ao_nascer if
trimestre==1 & status==1 & id~=256 , vce(robust) irr

poisson SGA_AGA VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==2 & status==1 &
id~=256 , vce(robust) irr

poisson SGA_AGA VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==3 & status==1 &
id~=256 , vce(robust) irr

poisson AIG_GIG_sem_pig VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==1 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256 , vce(robust) irr

poisson AIG_GIG_sem_pig VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==2 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256 , vce(robust) irr

poisson AIG_GIG_sem_pig VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==3 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &

```

```

weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256 , vce(robust) irr

poisson prematuridade VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_1
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool comprimento_ao_nascer if
trimestre==1 & status==1 & peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. &
VitD_nmol~=.. & comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. &
sg_parto_padrao~=.. & weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_1~=.. &
comsume_alcool~=.. & fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256 ,
vce(robust) irr

poisson prematuridade VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==2 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256 , vce(robust) irr

poisson prematuridade VitD_nmol anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3
new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if trimestre==3 & status==1 &
peso_ao_nascer~=.. & anos_escolaridade~=.. & VitD_nmol~=.. &
comprimento_ao_nascer~=.. & lengthcentile~=.. & sg_parto_padrao~=.. &
weightzscore~=.. & imc_pre~=.. & new_kcal_3~=.. & consome_alcool~=.. &
fumo_atual~=.. & new_cor_referida_cat~=.. & id~=256 , vce(robust) irr

```

#### **\*Regressões do blup - Tabela 3**

```

regress peso_ao_nascer slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol imc_pre
anos_escolaridade new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if
trimestre==1 & status==1 & prematuridade~=1 & id~=256

regress weightzscore slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol anos_escolaridade
imc_pre new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if
trimestre==1 & status==1 & id~=256

regress comprimento_ao_nascer slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol
anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual
comsume_alcool if trimestre==1 & status==1 & prematuridade~=1 & id~=256

regress lengthzscore slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol anos_escolaridade
imc_pre new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if
trimestre==1 & status==1 & id~=256

regress apgar_1min slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol anos_escolaridade
imc_pre new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if
trimestre==1 & status==1 & id~=256 & prematuridade~=1

```

```
poisson prematuridade slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol anos_escolaridade
imc_pre new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if
trimestre==1 & status==1 & id~=256 , vce(robust) irr

poisson SGA_AGA slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol anos_escolaridade
imc_pre new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual consome_alcool if
trimestre==1 & status==1 & id~=256 , vce(robust) irr

poisson AIG_GIG_sem_pig slope_VitD_nmmol intercept_VitD_nmmol
anos_escolaridade imc_pre new_kcal_3 new_cor_referida_cat fumo_atual
consome_alcool if trimestre==1 & status==1 & id~=256 , vce(robust) irr
```

## ANEXO 7



Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº 168A/2009

Rio de Janeiro, 10 de agosto de 2009.

Sr(a) Pesquisador(a),

Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - CEP SMSDC-RJ, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:

<p><b>Coordenadora:</b> Salésia Felipe de Oliveira</p> <p><b>Vice-Coordenadora:</b> Suzana Alves da Silva</p> <p><b>Membros:</b> Andréa Estevam de Amorim Alice de C. A. Vinhaes Bráulio dos Santos Júnior Carlos Alberto Pereira de Oliveira Elisete Casotti José M. Salame Jucema Fabricio Vieira Márcia Constância P. A. Gomes Maria Alice Gunzburger Mônica Amorim de Oliveira Nara Saraiva Pedro Paulo Magalhães Chispim Rafael Aron Abitbol Rondineli Mendes da Silva Sandra Regina Victor</p> <p><b>Secretárias Executivas:</b> Carla Costa Vianna Renata Guedes Ferreira</p>	<p><b>PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 121/09</b> <b>CAAE: 0139.0.314.000-09</b></p> <p><b>TÍTULO:</b> Saúde mental e estado nutricional na gestação e no pós-parto: estudo prospectivo com ensaio clínico randomizado aninhado.</p> <p><b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL:</b> Gilberto Kac.</p> <p><b>UNIDADE (S) ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:</b> CMS Heitor Beltrão.</p> <p><b>DATA DA APRECIAÇÃO:</b> 13/08/2009.</p> <p><b>PARECER: APROVADO.</b></p>
--	--

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII. 13.d., da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

Esclarecemos, ainda, com relação aos Protocolos, que o CEP/SMSDC deverá ser informado de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.

**Salésia Felipe de Oliveira**  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil  
Rua Afonso Cavalcanti, 455 sala 715 – Cidade Nova – Rio de Janeiro  
CEP: 20211-901  
E-mail: [cepsms@rio.rj.gov.br](mailto:cepsms@rio.rj.gov.br) - Site: [www.saude.rio.rj.gov.br/cep](http://www.saude.rio.rj.gov.br/cep)

FWA nº: 00010761  
IRB nº: 00005577

## ANEXO 8



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DA PESQUISA

**“Estado nutricional e saúde mental na gestação e no pós-parto: Estudo prospectivo com ensaio clínico randomizado”**

Você está sendo convidada a fazer parte de uma pesquisa que tem por objetivo entender melhor a relação entre a alimentação e a ocorrência de problemas como a ansiedade e o estresse durante a gestação e após o parto. Neste estudo, também avaliaremos se o ômega-3 (um composto natural presente em vários alimentos, como peixes e alguns vegetais) protege as gestantes de tais problemas.

Você não é obrigada a participar e, mesmo aceitando fazer parte do estudo, poderá desistir e retirar o seu consentimento a qualquer momento. Sua recusa em participar do estudo não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, com o seu médico ou com a maternidade; ou seja, você poderá seguir normalmente com o seu atendimento nesta unidade de saúde.

#### Como irei participar?

Você fará uma avaliação completa e detalhada sobre sua saúde. No total, você terá 4 consultas com nossa equipe: 4 durante o pré-natal (com até 13 semanas, na 24<sup>a</sup> e 34<sup>a</sup> semanas) e uma de 30 a 45 dias após o nascimento de seu filho. Todas estas consultas serão preferencialmente marcadas em dias em que você já tenha que vir ao hospital. O tempo aproximado destas consultas é de 30-45 minutos.

Durante as consultas, você irá **responder a perguntas e preencher questionários** para obtermos informações como: sua identificação (endereço e telefone), dados demográficos (nome, estado civil, idade), situação social e econômica, história obstétrica, uso de álcool, fumo e outras drogas, violência familiar, estresse e ansiedade, atividade física e como você se alimenta. Em todas as 4 consultas iremos também avaliar seu peso e altura e coletar amostras de sangue para avaliarmos o açúcar, gorduras, colesterol e níveis de hormônios.

Além disso, em cada consulta, deixaremos com você dois aparelhos por um período de **24 horas (1 dia)**: um chamado de “frequencímetro polar” que mede a freqüência cardíaca (batimentos do coração) e o outro “pedômetro” que conta o número de passos que você dará durante este dia. No dia seguinte, um pesquisador do projeto irá até a sua casa recolher esses equipamentos, **não sendo necessário, portanto, que você retorne ao hospital apenas para devolvê-los**.

A partir da **18<sup>a</sup> semana** de gestação, um grupo de mulheres que estiverem participando do estudo serão convidadas a integrar uma parte diferente do estudo e serão orientadas a fazer uso de um suplemento na forma de cápsulas, contendo **ômega-3**. Se você fizer parte deste grupo, você deverá fazer uso de **5-6 cápsulas por dia** junto das refeições (almoço), todos os dias **até 30 dias após o parto**. Você não precisará comprar ou pagar por este suplemento, ou seja, **você vai recebê-lo de graça**.

**É importante você saber que esta suplementação é composta unicamente de óleo de peixes marinhos**, porém sem qualquer sabor ou cheiro característico de peixe. Além do óleo, o outro ingrediente presente é uma pequena quantidade de vitamina E. **O uso desta suplementação durante a gestação não traz nenhum risco ou efeito colateral para a sua saúde e a do bebê.** No entanto, já foram relatados a **ocorrência passageira** de diarréia, regurgitação e refluxo. Consumir o óleo na forma de cápsula torna apenas mais prático.

Todas as informações que você fornecer serão mantidas em segredo e utilizadas apenas para a pesquisa. Nenhuma outra pessoa ou profissional terá acesso a suas informações, somente os pesquisadores que trabalham para esta pesquisa. Quando divulgarmos os resultados deste trabalho, **seu nome em momento algum irá aparecer**, bem como qualquer outra informação fornecida, ou resultado de exame de sangue. Portanto, **não há riscos em participar desta pesquisa**, apenas a necessidade de coletar sangue e o tempo que você irá gastar com as avaliações durante as consultas. Por ocasião da coleta de sangue, você poderá observar a formação pequeno hematoma na região do braço onde ocorreu a picada da agulha. **Sempre usaremos materiais descartáveis.**

### **Quais as vantagens?**

Ao participar deste estudo, você terá a **oportunidade de realizar uma avaliação mais completa e detalhada da sua saúde**. O acompanhamento de seus hábitos durante a gestação, como o seu ganho de peso e sua alimentação, são medidas importantes para garantir a saúde do seu bebê ao nascer. Este acompanhamento também é importante para que você tenha uma vida mais saudável, prevenindo problemas futuros como a obesidade, ansiedade e depressão. **Você terá acesso a todos os seus resultados se assim desejar.**

Este termo de consentimento é um documento importante e você irá receber uma cópia na qual consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, **podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.**

### **Meu consentimento:**

Minha participação é de livre e espontânea vontade, ou seja, não fui pressionada por ninguém para participar desta pesquisa. Tenho liberdade para continuar ou recusar, em qualquer momento, a participar da pesquisa. O meu atendimento e de meu(minha) filho(a), nesta unidade não será, em momento algum, afetado pela minha recusa. Desta forma, concordo em participar deste estudo estando totalmente esclarecida dos objetivos, riscos e benefícios desta pesquisa, uma vez que tive em mãos este documento e a oportunidade de lê-lo antes de assinar.

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do pesquisador

data

\_\_\_\_\_  
Nome do sujeito da pesquisa

### **Telefones:**

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa

data

Contato do coordenador da pesquisa:

Professor Dr. Gilberto Kac  
Universidade Federal do Rio de Janeiro -  
**UFRJ**

Telefones: 25626595 / 93152301  
E-mail: [kacetal@gmail.com](mailto:kacetal@gmail.com)

Juliana dos Santos Vaz  
Nutricionista, doutoranda UFRJ  
Telefones: 74221922  
E-mail: [juliana.vaz@gmail.com](mailto:juliana.vaz@gmail.com)

Secretaria Municipal de Saúde e  
Pesquisa

Defesa Civil / Comitê de Ética em

Rua Afonso Cavalcanti, 455 Bloco 1 -  
Sala 715  
E-mail: [cepsms@rio.rj.gov.br](mailto:cepsms@rio.rj.gov.br)



## Longitudinal association of 25-hydroxyvitamin D with adipokines and markers of glucose metabolism among Brazilian pregnant women

Camila Benaim<sup>1,2</sup>, Paula Guedes Cocate<sup>1,2</sup>, Erica Guimarães de Barros<sup>1</sup>, Nadya Helena Alves-Santos<sup>1,2</sup>, Amanda Caroline Cunha Figueiredo<sup>1,2</sup>, Ana Beatriz Franco-Sena<sup>1,3</sup>, Jaqueline Lepsch<sup>1,4</sup>, Amanda Rodrigues Amorim Adegbeye<sup>5</sup>, Rana Mokhtar<sup>6</sup>, Michael F. Holick<sup>6</sup> and Gilberto Kac<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Nutritional Epidemiology Observatory, Department of Social and Applied Nutrition, Institute of Nutrition Josué de Castro, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro 21941-590, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Nutrition, Institute of Nutrition Josué de Castro, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro 21941-590, RJ, Brazil

<sup>3</sup>Department of Social Nutrition, Emilia de Jesus Ferreiro Nutrition School, Fluminense Federal University, Niteroi 24020-140, Brazil

<sup>4</sup>Faculty of Nutrition, Santa Ursula University, Rio de Janeiro 22231-040, RJ, Brazil

<sup>5</sup>Department of Psychology, Social Work and Counselling, Faculty of Education and Health, University of Greenwich, London SE9 2UG, UK

<sup>6</sup>Section of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, Department of Medicine, Boston University School of Medicine (BUSM), Boston, MA 02118, USA

(Submitted 26 December 2017 – Final revision received 24 August 2018 – Accepted 27 September 2018)

### Abstract

This study aimed to evaluate the longitudinal association of vitamin D status with glycaemia, insulin, homoeostatic model assessment of insulin resistance, adiponectin and leptin. A prospective cohort with 181 healthy, pregnant Brazilian women was followed at the 5th–13th, 20th–26th and 30th–36th gestational weeks. In this cohort, 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) plasma concentrations were analysed using liquid chromatography–tandem MS. Vitamin D status was categorised as sufficient or insufficient using the Endocrine Society Practice Guidelines ( $\geq 75/\text{<75 nmol/l}$ ) and the Institute of Medicine ( $\geq 50/\text{<50 nmol/l}$ ) thresholds. Linear mixed-effect regression models were employed to evaluate the association between vitamin D status and each outcome, considering interaction terms between vitamin D status and gestational age ( $P < 0.1$ ). At baseline, 70.7% of pregnant women had 25(OH)D levels  $<75 \text{ nmol/l}$  and 16% had levels  $<50 \text{ nmol/l}$ . Women with sufficient vitamin D status at baseline, using both thresholds, presented lower glycaemia than those with insufficient 25(OH)D. Pregnant women with 25(OH)D concentrations  $<75 \text{ nmol/l}$  showed lower insulin ( $\beta = -0.12$ ; 95% CI  $-0.251$ ,  $0.009$ ;  $P = 0.069$ ) and adiponectin ( $\beta = -0.070$ ; 95% CI  $-0.150$ ,  $0.010$ ;  $P = 0.085$ ) concentrations throughout pregnancy than those with 25(OH)D levels  $\geq 75 \text{ nmol/l}$ . Pregnant women with 25(OH)D  $<50 \text{ nmol/l}$  at baseline presented significantly higher leptin concentrations than those with 25(OH)D levels  $\geq 50 \text{ nmol/l}$  ( $\beta = -0.253$ ; 95% CI  $-0.044$ ,  $0.550$ ;  $P = 0.095$ ). The baseline status of vitamin D influences the biomarkers involved in glucose metabolism. Vitamin D-sufficient women at baseline had higher increases in insulin and adiponectin changes throughout gestation than those who were insufficient.

**Key words:** Adipokines; Biomarkers; Glycaemia; Pregnancy; Vitamin D

Prevention of gestational diabetes mellitus (GDM) is a key intervention to circumvent the maternal and fetal consequences of this disease. The primary method of preventing GDM is by lifestyle changes, such as physical activity and diet<sup>(1)</sup>. One important modifiable risk factor is vitamin D deficiency among pregnant women. Vitamin D deficiency is considered highly prevalent worldwide and often persists during pregnancy<sup>(2,3)</sup>.

Studies have suggested that low concentrations of vitamin D may be associated with alterations in glucose metabolism<sup>(4)</sup>, can be a risk factor for GDM<sup>(5–7)</sup> and are characterised by glucose intolerance or glycaemia values higher than the normal range when detected during pregnancy<sup>(8)</sup>.

One possible mechanism by which vitamin D may act on glucose metabolism is by increasing adiponectin secretion<sup>(9,10)</sup>.

**Abbreviations:** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; ESPG, Endocrine Society Practice Guidelines; GDM, gestational diabetes mellitus; HOMA-IR, homoeostatic model assessment of insulin resistance; IOM, Institute of Medicine.

\* **Corresponding author:** G. Kac, fax +55 21 22808343, email gilberto.kac@gmail.com

This adipokine has insulin-sensitisation properties of the target cells (liver, skeletal muscle and adipose tissue) and can enhance glucose uptake in muscle tissue<sup>(11–13)</sup>. Adiponectin also protects  $\beta$ -cells from immune attack and reduces insulin resistance through immunoregulatory and anti-inflammatory effects<sup>(11–14)</sup>. In pregnant women, concentrations of adiponectin have been inversely associated with adverse maternal outcomes, such as GDM<sup>(15,16)</sup>, overweight and obesity<sup>(17)</sup>. During pregnancy, a reduction in maternal plasma adiponectin concentrations is expected<sup>(18,19)</sup>. Many factors can influence the expression of this adipokine. Vitamin D concentration is one example<sup>(13,20)</sup>, as it down-regulates pro-inflammatory cytokines and up-regulates anti-inflammatory cytokines. Vitamin D appears to be positively associated with adiponectin gene expression and suppresses the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) components secreted by adipocytes, thus contributing to increased adiponectin secretion<sup>(20–22)</sup>. Low 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) concentrations may then reduce the secretion of adiponectin and could be considered a risk factor for GDM and insulin resistance<sup>(13,23,24)</sup>.

Leptin is a hormone that regulates lipid metabolism and inflammation by influencing glucose metabolism in an inverse manner to adiponectin, that is, it reduces insulin sensitivity<sup>(25)</sup>. Leptin is directly associated with pre-eclampsia, GDM and macrosomia<sup>(26,27)</sup>. Studies have shown an inverse association between vitamin D and leptin concentrations<sup>(28–30)</sup>. The mechanism by which vitamin D metabolites impact leptin levels remains unclear. One possible mechanism is that the fat solubility of vitamin D can cause it to be sequestered in fat tissues, leading to a high level of intracellular Ca that increases lipogenesis and decreases lipolysis<sup>(31)</sup>. A lower serum vitamin D may lead to a higher serum leptin, since its concentration is related to greater body fat mass<sup>(32,33)</sup>. However, randomised clinical trials have found no association between vitamin D supplementation and changes in leptin concentrations<sup>(31,34)</sup>.

There are few studies evaluating the association between vitamin D status, glycaemia and adipokines during pregnancy, particularly among healthy pregnant women without comorbidities such as GDM<sup>(31,35,36)</sup>. The aim of this study was to evaluate the vitamin D status of pregnant women in the first trimester and, if variation in vitamin D status during pregnancy was associated with changes in adiponectin, leptin and glycaemia concentrations throughout pregnancy among a cohort of healthy Brazilian women.

## Methods

### Study design

This study consists of a prospective cohort with healthy pregnant adult women from a public health care centre in Rio de Janeiro, Brazil, carried out from November 2009 to October 2011.

A total of 299 women were invited to participate in the study in accordance with the following eligibility criteria: (a) being between 5 and 13 weeks of gestation, (b) aged between 20 and 40 years and (c) without any known infectious or chronic non-communicable diseases (except obesity). Criteria for exclusion

after baseline clinical evaluation consisted of the following: miscarriage (*n* 25), chronic arterial hypertension (*n* 3), multiple gestation (*n* 4), diagnosis of infectious or non-communicable disease after starting of the study (*n* 11), advanced pregnancy ( $\geq$ 14 weeks of gestation, *n* 15), pre-natal care withdrawn (*n* 7), stillbirth (*n* 5), no vitamin D measured at baseline (*n* 30), self-reported glycaemia alteration (*n* 12) and no biochemical analyses performed (*n* 1).

### Biochemical analyses

Venous blood samples were taken after a 12-h overnight fasting at three different visits (first, second and third gestational trimesters). Samples were immediately centrifuged (5000 rpm for 5 min), aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Plasma samples were used to determine 25(OH)D (nmol/l), leptin (ng/l) and adiponectin (ng/ml) concentrations.

### Main independent variable

Plasma 25(OH)D concentrations were analysed using liquid chromatography–tandem MS (LC–MS/MS) at the Quest Diagnostics Nichols Institute Laboratory (San Juan Capistrano) using the LC Thermo Cohesive System coupled to a Thermo Quantum Ultra Mass Spectrometer (Thermo Fisher). This method is the ‘gold standard’ with analytical measurement range of 10–640 nmol/l and the CV <10 %.

The 25(OH)D concentrations at baseline (5th–13th gestational weeks) were used to determine vitamin D status. Pregnant women were categorised as being vitamin D sufficient or insufficient using two cut-points based on the Endocrine Society Practice Guidelines (ESPG) and the Institute of Medicine (IOM). According to the ESPG, vitamin D sufficiency and insufficiency are defined as having 25(OH)D concentrations  $\geq$ 75 and <75 nmol/l, respectively<sup>(2)</sup>. Using the IOM cut-points, sufficiency and insufficiency were defined as 25(OH)D concentrations  $\geq$ 50 or <50 nmol/l, respectively<sup>(37)</sup>. There are controversies in the literature as to which cut-point of vitamin D for insufficiency is the most appropriate. There is also no specific guideline set forth for pregnant women. We have decided to report both cut-points to increase transparency and to allow for comparability between various studies in the literature.

### Dependent variables

Serum fasting glycaemia was estimated by enzymatic colorimetric methods using commercial kits (Linco Research and Wiener Lab., respectively), and insulin concentrations were assessed by ELISA using specific commercial kits designed for humans (Millipore), with sensitivity of 2  $\mu\text{U}/\text{ml}$ . Homoeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated based on the product of fasting insulin ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ ) and glucose (mmol/l) divided by 22.5<sup>(38)</sup>. Adipokines were evaluated using ELISA, with sensitivities of 0.78 ng/ml for adiponectin and 5 ng/l for leptin.

### Covariate assessment

A structured questionnaire administered at baseline was used to collect information on study population characteristics, including age (year), per-capita monthly household income (USD), parity (nulliparous or primiparous/multiparous) and self-reported skin colour (white, black or mixed). Date of first blood collection was used to define the season at baseline (summer, autumn, winter and spring).

Anthropometric measurements were collected according to standardised procedures at baseline<sup>(39)</sup>. Weight was measured using a digital scale (Filizzola PL 150; Filizzola Ltda) at each gestational trimester, and height was measured in duplicate using a portable stadiometer (Seca Ltda). The early pregnancy BMI was calculated using the following formula: weight at baseline (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). The gestational age was obtained from the first ultrasonography (USG) examination (92·3%; *n* 167) or using the reported date of the last menstrual period if the USG was not performed before the 24th week of gestation (7·7%; *n* 14).

The total dietary vitamin D intake (μg/d) was calculated using Nutritional Composition Tables from the Brazilian Institute of Geography and Statistics<sup>(40)</sup> according to a semi-quantitative FFQ<sup>(41)</sup>. The FFQ was validated for the adult population of Rio de Janeiro<sup>(41)</sup> and administered in the first trimester of gestation by trained interviewers and referring to intake of the last 6 months. Data on vitamin D supplementation were self-reported throughout pregnancy (first, second and third trimesters).

### Statistical analysis

Data distribution was analysed according to the Shapiro–Wilk test. Maternal age, vitamin D intake, per-capita family income, early pregnancy BMI, glycaemia, insulin, HOMA-IR, adiponectin and leptin were not normally distributed (Shapiro–Wilk test *P* value <0·05). The sample characteristics are described using medians and interquartile ranges. Categorical data are presented as absolute values (*n*) and relative frequencies (%). Baseline characteristics were stratified according to vitamin D status (sufficiency *v.* insufficiency). To compare medians and frequencies, the Mann–Whitney *U* test and the χ<sup>2</sup> test were used, respectively.

Dropout analyses were performed to verify the presence of selection bias comparing those who completed the study to those who were lost to follow-up. The following variables were considered: vitamin D status according to thresholds, dietary vitamin D intake, age, early pregnancy BMI, per-capita family income, glycaemia, insulin, HOMA-IR, adiponectin and leptin concentrations, parity, self-reported skin colour and season at recruitment.

Scatter plots containing longitudinal prediction and 95% CI were constructed to illustrate the variation in glycaemia and adipokine concentrations during pregnancy according to vitamin D baseline status.

Linear mixed-effect (LME) models were performed to assess the longitudinal associations of vitamin D baseline status with the outcomes throughout pregnancy. The modelling process

allows the inclusion of time-dependent and time-independent variables; it is robust to deal with unbalanced time intervals and considers the correlation between repeated measures<sup>(42,43)</sup>. Interactions between vitamin D baseline status and gestational age were considered to explore the longitudinal behaviour of the evaluated outcomes. The LME models were adjusted for confounders selected by biological plausibility and statistical significance (*P*<0·2) in the bivariate analysis for each of the five outcomes (glycaemia, insulin, HOMA-IR, adiponectin and leptin). The test to detect interactions was low powered. We considered *P*<0·1<sup>(44)</sup> as a threshold to define statistical significance for the interaction terms and *P*<0·05 for the main effect variables.

All analyses were performed in Stata 12.0 (Stata Corporation). The significant interactions identified in the LME models were illustrated by graphs plotted with RStudio 3.3.1 software<sup>(45)</sup>.

### Ethical approval

This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The Rio de Janeiro Federal University Maternity Hospital Ethics Committee (protocol number: 0023.0.361.000-08) and the Municipal Secretary of Rio de Janeiro Ethics Committee (protocol number: 0139.0.314.000-09) approved all procedures involving humans. All participants signed an informed consent for participation in the study.

### Results

The baseline sample comprised 181 pregnant women. From baseline to the second-trimester follow-up, 11 women moved out from the pre-natal program, 2 withdrew consent, 4 abandoned pre-natal care at the study site, 12 missed the follow-up interview and 1 had no biochemical analyses performed, leaving a sample of 151 women at the second trimester. From the second to the third visit, six women were classified as lost to follow-up and seven had no biochemical analyses performed. Eleven women missed the second-trimester interview but returned to the study in the third trimester. Therefore, our final sample at the third trimester comprised 149 women (online Supplementary Fig. S1).

In total, 149 women completed the study, and 32 were lost to follow-up. There were no significant differences between women who completed the study compared to those who were lost during follow-up (online Supplementary Table S1).

At baseline, women had a median age of 26 (IQR 22·0–31·0) years, early pregnancy BMI of 23·7 (IQR 21·9–27·0) kg/m<sup>2</sup>, per-capita family income of 292·4 (IQR 184·8–421·0) USD and reported a vitamin D intake of 3·4 (IQR 2·22–4·64) μg/d, and 46·9% self-reported their skin colour to be mixed. The prevalence of vitamin D insufficiency was 70·7% (*n* 128/181) and 16·0% (*n* 29/181) according the cut-offs proposed by the ESPG and the IOM, respectively. Women who began the study in the winter, compared to those who began in summer, were more likely to be vitamin D insufficient (ESPG: 33·6 *v.* 15·6%, respectively, *P*<0·001; IOM: 51·7 *v.* 3·5%, respectively, *P*<0·001) (Table 1). None of the women who participated in

**Table 1.** Baseline characteristics of the study population according to vitamin D sufficiency status in the first trimester of pregnancy (Medians and interquartile ranges (IQR); numbers and percentages)

	Endocrine Society Practice Guidelines						Institute of Medicine					
	Sufficiency		Insufficiency		Sufficiency		Insufficiency					
	Total (n 181)	25(OH)D ≥75 nmol/l (n 53)	25(OH)D <75 nmol/l (n 128)	25(OH)D ≥50 nmol/l (n 152)	25(OH)D <50 nmol/l (n 29)							
Continuous variables	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	P*	Median	IQR	Median	IQR	P*
25(OH)D (nmol/l)	62.5	52.5–75.0	82.5	77.5–92.5	57.5	50.0–65.0	<0.001	67.5	57.5–77.5	40.0	37.5–45.0	<0.001
Vitamin D dietary intake (μg/d)	3.4	2.22–4.64	3.3	4.20–4.22	3.4	2.2–5.0	0.127	3.3	2.1–4.5	3.4	2.5–6.2	0.193
Age (years)	26.0	22.0–31.0	25.5	21.0–31.0	26.0	22.0–31.0	0.485	25.0	21.5–31.0	27.0	23.0–31.0	0.531
Early pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.7	21.9–27.0	23.5	20.6–26.9	23.7	22.5–27.1	0.271	23.6	21.3–26.9	24.8	22.9–28.0	0.130
Per-capita family income (USD)	292.4	184.8–421.0	301.17	136.3–425.7	283.6	193.6–417.5	0.448	277.8	175.4–409.4	330.4	208.2–438.6	0.288
Categorical variables	n	%	n	%	n	%	P†	n	%	n	%	P†
Parity												
Nulliparous	70	38.7	34.0	18	52	40.6	0.402	56	36.8	14	48.3	0.402
Primiparous or multiparous	111	61.3	66.0	35	76	59.4		96	63.2	15	51.7	
Self-reported skin colour												
White	47	26.0	26.4	14	33	25.8	0.788	43	28.3	4	13.8	0.264
Black	49	27.1	30.2	16	33	25.8		40	26.3	9	31.0	
Mixed	85	46.9	43.4	23	62	48.4		69	45.4	16	55.2	
Season												
Summer	38	21.0	18‡	34.0	20	15.6	<0.001	37	24.3	1	3.5	<0.001
Autumn	47	26.0	20‡	37.7	27	21.1		44	29.0	3	10.3	
Winter	48	26.5	5	9.4	43§	33.6		33	21.7	15	51.7	
Spring	48	26.5	10	18.9	38	29.7		38	25.0	10	34.5	

25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D.

\* P value refers to the Mann–Whitney test. P values <0.05 were considered statistically significant.

† P value refers to the  $\chi^2$  test. P values <0.05 were considered statistically significant.

‡ Among women with vitamin D sufficiency according to Endocrine Society Practice Guidelines at baseline, we observed significantly higher proportions of women entering pregnancy in the summer and in the autumn, compared with those who became pregnant in the winter.

§ Among women with vitamin D insufficiency according to Endocrine Society Practice Guidelines at baseline, we observed a significantly higher proportion of women entering pregnancy in the winter than in the summer.

II Among women with vitamin D insufficiency according to the Institute of Medicine at baseline, we observed a significantly higher proportion of women entering pregnancy in the winter than in the summer.

the study received nutritional vitamin D supplementation (data not shown).

Pregnant women with vitamin D sufficiency at baseline showed lower glycaemia when compared to insufficient women (ESPG: median 79.5 v. 84.0 mg/l, respectively,  $P=0.003$ ; IOM: median 83.0 v. 84.0 mg/l, respectively,  $P=0.034$ ) (Table 2). The glycaemia decreased from the first to the second trimester, followed by a slight increase from the second to the third trimester onwards, in both women with vitamin D sufficiency and insufficiency at baseline (Fig. 1(a) and (b)). However, the rate of change for glycaemia throughout pregnancy did not show a significant difference between the baseline vitamin D groups (Table 3). Similar results were observed when 25(OH)D was analysed throughout pregnancy (Fig. 2(a) and (b); Table 4).

The rate of change in insulin was greater among vitamin D sufficient women at baseline (ESPG:  $\beta=0.166$ ; 95% CI 0.047, 0.285,  $P=0.006$ ; IOM:  $\beta=0.091$ ; 95% CI 0.019, 0.162,  $P=0.013$ ) (Fig. 1(c) and (d)). There was a less pronounced increase in insulin throughout pregnancy among vitamin D insufficient women compared to those who started with sufficient status according to ESPG (interaction  $\beta=-0.12$ ; 95% CI -0.251, 0.009;  $P=0.069$ ) (Table 3). We

found significant results when 25(OH)D was analysed throughout pregnancy using the IOM thresholds (interaction  $\beta=-0.153$ ; 95% CI -0.325, 0.018;  $P=0.080$ ) (Fig. 2(c) and (d); Table 4).

There was a tendency for lower HOMA-IR in the group of women classified as sufficient vitamin D status at baseline when compared to those with vitamin D insufficient status (ESPG: median 0.65 v. 0.93, respectively,  $P=0.062$ ; IOM: median 0.82 v. 1.14, respectively,  $P=0.071$ ) (Table 2). HOMA-IR increased throughout gestation among women with sufficient vitamin D status at baseline (ESPG:  $\beta=0.019$ ; 95% CI 0.00001, 0.039;  $P=0.050$ ) but did not change in the insufficient group (Fig. 1(e) and (f)). However, the results were not significant for this biomarker when baseline vitamin D-sufficient and insufficient women were compared (Table 3). We found significant results when 25(OH)D was analysed throughout pregnancy using the IOM thresholds (interaction  $\beta=-0.030$ ; 95% CI -0.065, 0.005;  $P=0.094$ ) (Fig. 2(e) and (f); Table 4).

The trend in changes in adiponectin throughout pregnancy showed an increase from the beginning of pregnancy until the second trimester and was followed by a slight decrease at the end of gestation for both vitamin D status groups, whether measured at baseline or when 25(OH)D varied throughout



**Table 2.** Markers of glucose and adipokines concentrations of the study population according to vitamin D sufficiency status in the first trimester of pregnancy  
(Medians and interquartile ranges (IQR))

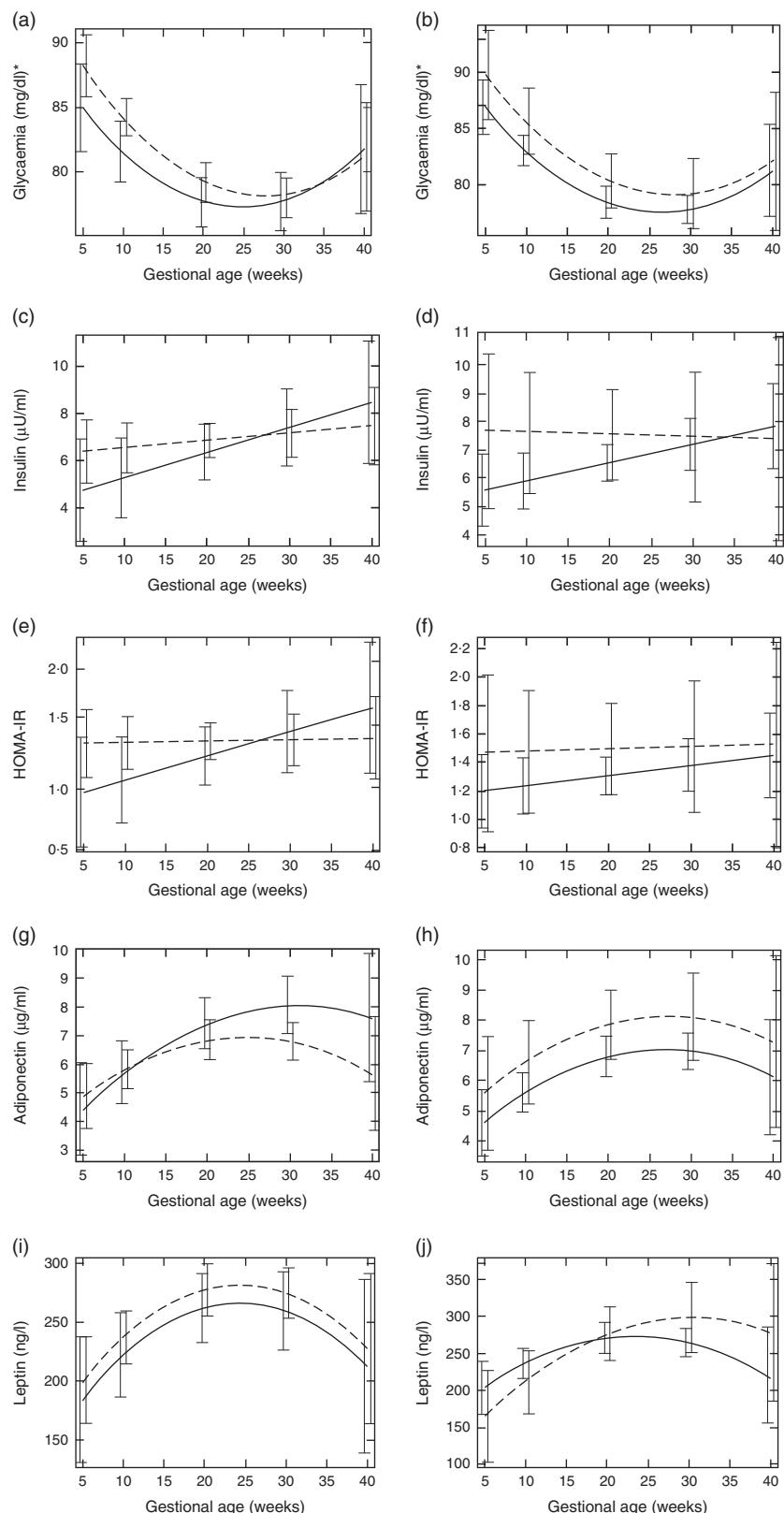
Variables	n	Endocrine Society Practice Guidelines						Institute of Medicine						P*			
		Total		Sufficiency		Insufficiency		Sufficiency		Insufficiency							
		Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR				
Glycaemia (mg/dl)†																	
First trimester	180	83.0	78.0–88.0	54	79.5	76.0–85.0	126	84.0	79.0–89.0	0.003	151	83.0	78.0–87.0	29	84.0	79.0–95.0	0.034
Second trimester	146	78.0	72.0–83.0	42	77.5	70.0–82.0	104	78.0	73.0–83.0	0.204	122	77.5	72.0–82.0	24	78.5	72.0–83.5	0.885
Third trimester	149	79.0	72.0–84.0	40	80.5	71.5–84.5	109	78.0	72.0–84.0	0.991	123	78.0	71.0–84.0	26	80.5	75.0–84.0	0.346
Insulin ( $\mu$ U/ml)																	
First trimester	180	4.34	2.97–6.46	53	3.37	2.64–6.01	127	4.58	3.31–6.49	0.125	152	4.04	2.90–6.31	28	4.89	3.28–7.71	0.141
Second trimester	149	4.93	3.21–7.70	44	5.07	3.26–7.53	106	4.92	3.19–7.70	0.921	125	4.90	3.15–7.40	24	6.94	3.96–11.39	0.082
Third trimester	147	5.75	3.90–8.75	40	6.89	4.46–11.88	108	5.49	3.71–8.26	0.093	123	5.65	4.08–8.28	24	7.63	3.69–11.70	0.484
HOMA-IR																	
First trimester	180	0.86	0.57–1.36	54	0.65	0.50–1.23	126	0.93	0.65–1.41	0.062	152	0.82	0.56–1.30	28	1.14	0.80–1.73	0.071
Second trimester	144	0.95	0.60–1.53	42	0.94	0.59–1.41	102	0.96	0.60–1.55	0.812	120	0.95	0.59–1.39	24	1.16	0.70–2.18	0.106
Third trimester	144	1.12	0.74–1.69	38	1.38	0.78–1.94	106	1.08	0.70–1.65	0.176	120	1.10	0.74–1.57	24	1.60	0.72–2.72	0.352
Adiponectin ( $\mu$ g/ml)																	
First trimester	181	4.96	3.57–7.19	53	4.49	3.12–6.55	128	5.26	3.61–7.28	0.170	152	4.95	3.52–7.08	29	5.68	4.07–7.91	0.254
Second trimester	146	5.05	3.52–8.46	42	5.06	3.65–10.91	104	5.04	3.36–7.80	0.469	123	4.75	3.65–10.91	23	6.21	3.92–12.17	0.123
Third trimester	148	4.59	3.42–6.97	41	4.69	3.43–7.32	107	4.45	3.32–6.91	0.750	123	4.45	3.32–6.63	125	5.21	3.67–7.22	0.494
Leptin (ng/l)																	
First trimester	181	166.7	99.9–262.1	54	134.5	83.3–241.7	127	174.2	108.3–280.5	0.093	152	161.0	97.7–268.3	29	174.2	116.6–246.9	0.588
Second trimester	151	247.8	165.7–418.0	44	209.3	158.9–354.2	107	268.0	172.6–431.8	0.196	126	234.0	162.5–418.0	25	327.5	193.3–400.1	0.228
Third trimester	149	249.5	159.3–387.6	40	241.2	144.2–383.2	109	256.6	159.8–388.7	0.472	124	235.6	149.4–381.2	25	333.3	256.6–472.9	0.021

25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; HOMA-IR, homoeostatic model assessment of insulin resistance.

\* P value refers to the Mann-Whitney test. P values <0.05 were considered statistically significant.

† To convert glucose in mg/dl to mmol/l, multiply by 0.0555.

C. Benaim *et al.*



**Fig. 1.** Changes in glucose metabolism markers and adipokines throughout pregnancy according to vitamin D baseline status, Rio de Janeiro/Brazil, 2009–2012. Glycaemia according to vitamin D status (a) Endocrine Society Practice Guidelines and (b) the Institute of Medicine cut-off points. Insulin according to vitamin D status (c) Endocrine Society Practice Guidelines and (d) the Institute of Medicine cut-off points. Homoeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) according to vitamin D status (e) Endocrine Society Practice Guidelines and (f) the Institute of Medicine cut-off points. Adiponectin according to vitamin D status (g) Endocrine Society Practice Guidelines and (h) the Institute of Medicine cut-off points. Leptin according to vitamin D status (i) Endocrine Society Practice Guidelines and (j) the Institute of Medicine cut-off points. —, Sufficiency vitamin D status at baseline; ---, insufficiency vitamin D status at baseline. \* To convert glucose in mg/dl to mmol/l, multiply by 0.0555.

**Table 3.** Markers of glucose metabolism and adipokines changes during pregnancy according to vitamin D adequacy status at the first trimester, Rio de Janeiro, Brazil, 2009–2011  
 ( $\beta$ -Coefficients and 95 % confidence intervals)

Fixed-effect‡	Endocrine Society Practice Guidelines*			Institute of Medicine†		
	$\beta\$$	95 % CI	P	$\beta\$$	95 % CI	P
<b>Glycaemia (mg/dl)¶</b>						
Gestational age	-0.937	-1.347, -0.526	<0.001	-1.013	-1.405, -0.620	<0.001
Quadratic gestational age	0.019	0.009, 0.028	<0.001	0.019	0.009, 0.028	<0.001
Vitamin D sufficiency status**	3.770	-0.128, 7.667	0.058	3.189	-1.473, 7.851	0.180
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.109	-0.273, 0.055	0.192	-0.052	-0.245, 0.140	0.593
<b>Insulin (<math>\mu</math>U/ml)</b>						
Gestational age	0.167	0.048, 0.287	0.006	0.085	0.017, 0.153	0.014
Vitamin D sufficiency status**	2.357	-0.344, 5.058	0.087	1.309	-1.886, 4.503	0.422
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.121	-0.251, 0.009	0.069††	-0.024	-0.180, 0.132	0.762
<b>HOMA-IR</b>						
Gestational age	0.018	-0.005, 0.041	0.116	0.007	-0.007, 0.020	0.320
Vitamin D sufficiency status**	0.458	-0.053, 0.970	0.079	0.241	-0.366, 0.848	0.437
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.016	-0.042, 0.010	0.232	0.0002	-0.031, 0.031	0.992
<b>Adiponectin (<math>\mu</math>g/ml)</b>						
Gestational age	0.303	0.194, 0.478	<0.001	0.281	0.148, 0.415	<0.001
Quadratic gestational age	-0.006	-0.009, -0.002	0.001	-0.005	-0.009, -0.002	0.001
Vitamin D sufficiency status**	0.737	-0.565, 2.038	0.267	0.991	-0.536, 2.520	0.203
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.070	-0.150, 0.010	0.085††	0.008	-0.065, 0.081	0.822
<b>Leptin (ng/l)</b>						
Gestational age	10.122	4.303, 15.942	0.001	9.517	4.056, 14.977	0.001
Quadratic gestational age	-0.207	-0.340, -0.074	0.002	-0.200	-0.332, -0.067	0.003
Vitamin D sufficiency status**	12.071	-35.799, 59.942	0.621	-48.741	-104.599, 7.117	0.087
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	0.214	-2.323, 2.752	0.869	2.532	-0.436, 5.501	0.094††

HOMA-IR, homoeostatic model assessment of insulin resistance.

\* Sufficiency (reference category, 25(OH)D  $\geq$  75 nmol/l)/inadequacy status (25(OH)D < 75 nmol/l).

† Insufficiency (reference category, 25(OH)D  $\geq$  50 nmol/l)/insufficiency status (25(OH)D < 50 nmol/l).

‡ The adiponectin, leptin and glycaemia models were adjusted for gestational age and quadratic gestational age in weeks and for women's age, BMI and seasons (spring/summer/autumn/winter); the insulin and HOMA-IR models were adjusted for gestational age in weeks and for women's age, BMI and seasons (spring/summer/autumn/winter). Glycaemia model: number of observations = 474; number of groups = 182; average of 2.6 observations per group. Insulin model: number of observations = 475; number of groups = 180; average of 2.6 observations per group. HOMA-IR model: number of observations = 467; number of groups = 182; average of 2.6 observations per group. Adiponectin model: number of observations = 474; number of groups = 182; average of 2.6 observations per group. Leptin model: number of observations = 480; number of groups = 181; average of 2.7 observations per group.

§  $\beta$  = longitudinal linear regression coefficient.

¶ To convert glucose in mg/dl to mmol/l, multiply by 0.0555.

|| P value refers to maximum likelihood estimator.

\*\* The reference category was adequate status of 25(OH)D.

†† P values  $<0.1$  were considered statistically significant.

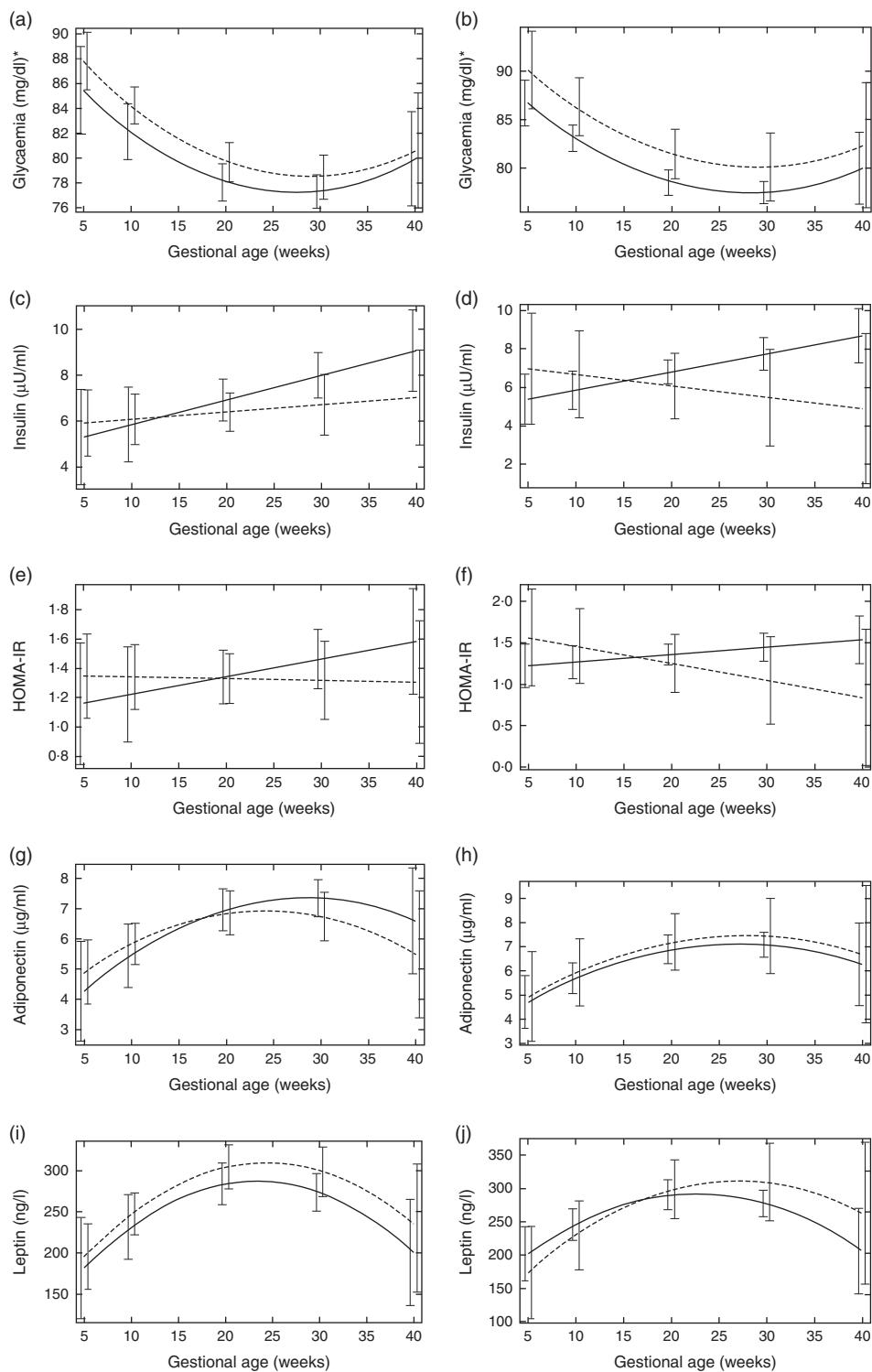
pregnancy (Figs. 1(g) and (h) and 2(g) and (h)). Women with vitamin D insufficient status at baseline started gestation with higher median plasma levels of adiponectin, although this association was not significant (5.26 v. 4.49  $\mu$ g/ml,  $P=0.170$ ) (Table 2). However, the rate of change of adiponectin throughout pregnancy was significantly higher in women with sufficient vitamin D levels at baseline (ESPG:  $\beta=-0.070$ ; 95 % CI -0.150, 0.010;  $P=0.085$ ) (Table 3). Women with sufficient vitamin D status at baseline, according to IOM classification, tended to have a lower rate of change in adiponectin throughout pregnancy, although this did not reach significance (Table 3; Fig. 1(h)). The rate of change in adiponectin throughout pregnancy was significantly higher in women with sufficient vitamin D levels when this marker varied throughout pregnancy (ESPG:  $\beta=-0.056$ ; 95 % CI -0.116, 0.004;  $P=0.066$ ) (Table 4).

There were no significant differences in leptin concentrations, comparing each trimester individually, according to ESPG,

but it was found that women with inadequate vitamin D status according to IOM presented higher leptin concentrations (Table 2). Women with insufficient vitamin D status according to ESPG had a significant decrease in leptin concentrations ( $\beta=-0.259$ ; 95 % CI -0.424, -0.094;  $P=0.002$ ). Using the IOM cut-points, the decrease was significant only within the sufficient group ( $\beta=-0.214$ ; 95 % CI -0.360, -0.068;  $P=0.004$ ) (Fig. 1(i) and (j)). Women with insufficient vitamin D levels presented a greater increase in leptin concentrations, in relation to the sufficient group, according to IOM ( $\beta=2.532$ ; 95 % CI -0.436, 5.501;  $P=0.094$ ) (Table 3). These results did not hold when 25(OH)D varied throughout pregnancy (Fig. 2(i) and (j); Table 4).

## Discussion

The main result of this study is the difference in the variation of adiponectin and insulin concentrations throughout pregnancy



**Fig. 2.** Changes in glucose metabolism markers and adipokines according to vitamin D status throughout pregnancy, Rio de Janeiro/Brazil, 2009–2012. Glycaemia according to vitamin D status (a) Endocrine Society Practice Guidelines and (b) the Institute of Medicine cut-off points. Insulin according to vitamin D status (c) Endocrine Society Practice Guidelines and (d) the Institute of Medicine cut-off points. Homoeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) according to vitamin D status (e) Endocrine Society Practice Guidelines and (f) the Institute of Medicine cut-off points. Adiponectin according to vitamin D status (g) Endocrine Society Practice Guidelines and (h) the Institute of Medicine cut-off points. Leptin according to vitamin D status (i) Endocrine Society Practice Guidelines and (j) the Institute of Medicine cut-off points. —, Sufficiency vitamin D status during pregnancy; ---, insufficiency vitamin D status during pregnancy. \* To convert glucose in mg/dl to mmol/l, multiply by 0.0555.

according to vitamin D baseline status defined by the ESPG. We observed that throughout pregnancy the rate of increase for both biomarkers was greater among women with vitamin D

sufficiency compared to women who started their pregnancy in a vitamin D-deficient state. Another important finding is that women with insufficient vitamin D at baseline had a higher

**Table 4.** Markers of glucose metabolism and adipokines according to vitamin D sufficiency status changes during pregnancy, Rio de Janeiro, Brazil, 2009–2011  
 ( $\beta$ -Coefficients and 95 % confidence intervals)

Fixed-effect‡	Endocrine Society Practice Guidelines*			Institute of Medicine†		
	$\beta\$$	95 % CI	P	$\beta\$$	95 % CI	P
Glycaemia (mg/dl)¶						
Gestational age	-0.915	-1.345, -0.484	<0.001	-0.989	-1.369, -0.609	<0.001
Quadratic gestational age	0.017	0.007, 0.026	0.001	0.018	0.009, 0.027	<0.001
Vitamin D sufficiency status**	2.624	-1.244, 6.492	0.184	3.516	-1.317, 8.350	0.154
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.049	-0.215, 0.116	0.560	-0.029	-0.260, 0.202	0.805
Insulin ( $\mu$ U/ml)						
Gestational age	0.107	0.014, 0.201	0.024	0.095	0.029, 0.160	0.004
Vitamin D sufficiency status**	0.988	-1.677, 3.654	0.468	2.344	-1.073, 5.760	0.179
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.076	-0.199, 0.047	0.226	-0.153	-0.325, 0.018	0.080††
HOMA-IR						
Gestational age	0.013	-0.006, 0.031	0.178	0.009	-0.004, 0.022	0.178
Vitamin D sufficiency status**	0.269	-0.260, 0.797	0.319	0.499	-0.181, 1.178	0.150
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.014	-0.038, 0.011	0.270	-0.030	-0.065, 0.005	0.094††
Adiponectin ( $\mu$ g/ml)						
Gestational age	0.291	0.145, 0.436	<0.001	0.270	0.148, 0.392	<0.001
Quadratic gestational age	-0.005	-0.008, -0.002	0.003	-0.005	-0.008, -0.002	0.001
Vitamin D sufficiency status**	0.847	-0.351, 2.045	0.166	0.186	-1.265, 1.637	0.801
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	-0.056	-0.116, 0.004	0.066††	0.006	-0.068, 0.080	0.878
Leptin (ng/l)						
Gestational age	14.590	8.290, 20.889	<0.001	13.794	8.143, 19.445	<0.001
Quadratic gestational age	-0.312	-0.453, -0.171	<0.001	-0.303	-0.440, -0.167	<0.001
Vitamin D sufficiency status**	11.311	-41.138, 63.760	0.673	-40.453	-105.123, 24.216	0.220
Interaction terms						
Gestational age $\times$ vitamin D status**	0.461	-2.053, 2.975	0.719	2.576	-0.888, 6.041	0.145

HOMA-IR, homoeostatic model assessment of insulin resistance; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D.

\* Sufficiency (reference category, 25(OH)D  $\geq$  75 nmol/l)/insufficiency status (25(OH)D < 75 nmol/l).

† Sufficiency (reference category, 25(OH)D  $\geq$  50 nmol/l)/insufficiency status (25(OH)D < 50 nmol/l).

‡ The adiponectin, leptin and glycaemia models were adjusted for gestational age and quadratic gestational age in weeks and for women's age, BMI and seasons (spring/summer/autumn/winter); the insulin and HOMA-IR models were adjusted for gestational age in weeks and for women's age, BMI and seasons (spring/summer/autumn/winter). Glycaemia model: number of observations = 503; number of groups = 207; average of 2.4 observations per group. Insulin model: number of observations = 509; number of groups = 205; average of 2.5 observations per group. HOMA-IR model: number of observations = 498; number of groups = 207; average of 2.4 observations per group. Adiponectin model: number of observations = 506; number of groups = 207; average of 2.4 observations per group. Leptin model: number of observations = 512; number of groups = 206; average of 2.5 observations per group.

§  $\beta$  = longitudinal linear regression coefficient.

¶ To convert glucose in mg/dl to mmol/l, multiply by 0.0555.

|| P value refers to maximum likelihood estimator.

\*\* The reference category was adequate status of 25(OH)D.

†† P values <0.1 were considered statistically significant.

increase in leptin levels during gestation compared to the sufficient group according to the IOM classification. In addition, women classified with vitamin D sufficiency, independent of the cut-off criteria, had lower baseline glycaemia, although the rate of change of this biomarker did not differ between the two vitamin D status groups.

The definition of vitamin D sufficiency or insufficiency remains controversial. Currently, there are no specific cut-points for pregnant women, and the same cut-points are used for adults. It is well-known that the thresholds for several biomarkers are rarely available for this period of life, and the case is not different for vitamin D. Thus, more research is needed to establish the adequate cut-off point for this unique period in women's life. In the current study, we opted to use two different thresholds presented by the two governing bodies of vitamin D status: the ESPG and the IOM. This strategy allows comparability with other studies in the literature and provides a broader picture of the studied associations in place. Another aspect of

studies conducted during pregnancy that can be misleading is related to the timing vitamin D was assessed during pregnancy. The conclusions may vary if studies consider only baseline vitamin D, for example, first trimester, what should be a representation of how pre-conception period affects the parameters evaluated throughout pregnancy. On the other end, if data are available for several time points, this can provide a clearer picture of the trajectory and how this may influence a specific outcome. In general, the directions of the rate of change trajectories for the studied outcomes were similar, regardless of the 25(OH)D threshold used. Adiponectin was the exception. Pregnant women with sufficient vitamin D levels at baseline showed significantly higher levels of adiponectin when the ESPG criteria was used, while according to the IOM classification, they showed lower levels, but the results were not significant. The results regarding the timing of vitamin D assessment yield slight conflicting results for insulin, HOMA-IR and leptin. Again, the direction of the associations remained the

same, but the statistical significance of the interaction changed depending on the timing and threshold used. An important finding of this study is that differing conclusions can be made depending on the vitamin D deficiency threshold used or the timing when vitamin D status is evaluated. This is of particular importance when considering the conflicting results in the scientific literature.

The longitudinal data with three time points are an important strength of this study. We did not identify other studies assessing these associations with longitudinal data in the scientific literature. Moreover, the robust statistical analysis of the present study, taking into account the correlations between repeated measures and considering all women had information on at least two time points, is an additional strength. The method used to measure plasma 25(OH)D concentrations was LC–MS/MS, which is considered the ‘gold standard’ for this marker. Furthermore, we also evaluated dietary vitamin D intake and supplementation. However, limitations, such as losses to follow-up and the absence of information about sun exposure data, should be acknowledged. To assess whether the losses to follow-up biased our results, we examined whether those women who were lost to follow-up differed from those who remained in the study. This analysis shows no significant differences in those who were lost to follow-up, which suggests that losses to follow-up occurred randomly in this study. We also adjusted all models for the season of the year at the time of blood collection, which was used as a proxy for sun exposure, since these data were not available. In addition, we did not measure the expression of enzymes that are involved in the conversion of vitamin D and the vitamin D receptor in the placenta to support extra-renal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) during pregnancy<sup>(46)</sup>. This could influence the outcomes; however, the maternal kidneys are likely to be the major source of increased maternal serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> during pregnancy<sup>(46)</sup>.

A high prevalence of vitamin D insufficiency according to the ESPG was previously reported in this cohort<sup>(47)</sup>, which is similar to results found for pregnant women in other studies using this threshold<sup>(48,49)</sup>. Schneuer *et al.*<sup>(48)</sup> observed that 80·4% of 5109 pregnant women from Australia had vitamin D insufficiency in the first trimester. Flood-Nichols *et al.*<sup>(49)</sup> found that 70% of 235 American women had vitamin D insufficiency in early pregnancy, while 59·0% of 190 Brazilian pregnant women presented vitamin D insufficiency<sup>(50)</sup>. We identified a low intake of vitamin D during pregnancy (3·4 µg/d) in the present study by considering either the recommendation of the ESPG of 37·5–50 µg/d or the Brazilian recommendations (15 µg/d)<sup>(51)</sup>. We also observed that none of the women used vitamin D supplements, since this is not part of public pre-natal care. In Brazil, only supplementation with Fe (40 mg) and folic acid (400 mcg) are mandatory for pregnant women<sup>(52)</sup>. Despite low vitamin D dietary intake, we have previously reported a longitudinal increase in 25(OH)D levels throughout pregnancy in this cohort of women<sup>(47)</sup>. In addition, the level of increase in 25(OH)D concentrations depended on seasonal variation. Pregnant women who started their pregnancy during the winter, spring or autumn seasons had a significant longitudinal increase in 25(OH)D concentrations, while women who began pregnancy

during the summer season showed no significant changes in 25(OH)D concentrations throughout pregnancy<sup>(47)</sup>.

In the current cohort, pregnant women with vitamin D insufficiency according to the ESPG had higher glycaemia in the first trimester compared to women with vitamin D sufficiency. This result corroborates with findings from an earlier cross-sectional study with 155 Iranian pregnant women. That study showed a significant inverse association between first-trimester 25(OH)D concentrations and fasting glucose ( $r = 0.238$ ;  $P = 0.003$ )<sup>(53)</sup>. On another cross-sectional study, Casey *et al.*<sup>(54)</sup> evaluated the association between vitamin D and glycaemia markers at the third gestation trimester and found no significant association with fasting glucose or HOMA-IR. These results are in line with the present findings regarding the third trimester. It seems that the relationship between vitamin D and glucose concentrations may be mediated by the role of vitamin D on insulin action.

Due to increased maternal adiposity and placental production, increased insulin resistance is expected to occur during pregnancy from the 18th gestational week until the third trimester<sup>(55)</sup>. Peripheral insulin sensitivity decreases in the third trimester, and the hepatic glucose production increases compared to the beginning of pregnancy<sup>(56)</sup>. Vitamin D appears to play a role in insulin sensitivity, stimulating the expression of the insulin receptors and improving glycaemic metabolism<sup>(57–59)</sup>. Thus, glucose would be better absorbed by the cells, and glycaemia would be at lower levels.

The longitudinal analyses from the present study show that pregnant women with vitamin D sufficiency at baseline had sharper increases in insulin concentration compared to those with vitamin D insufficiency according to both thresholds used. The greater increase in insulin in the group with vitamin D adequacy was not followed by significant longitudinal increases in glycaemia or HOMA-IR during pregnancy. The active metabolite of vitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) has been shown to be involved in insulin secretion by the pancreas and glucose homoeostasis<sup>(14)</sup>. In addition, pancreatic β-cells are known to have vitamin D receptors and an insulin gene promoter that is stimulated by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, thus indicating a direct association between vitamin D and insulin<sup>(60)</sup>. This mechanism could explain the greater insulin increase among women with vitamin D adequacy compared to those with vitamin D inadequacy in our sample. This result reinforces a small study performed with adults that found that subjects with vitamin D deficiency (<50 nmol/ml) secrete less insulin than subjects with adequacy status<sup>(61)</sup>.

A recent experimental study investigated the metabolic effects of adiponectin on maternal glucose and lipid metabolism by comparing pregnant rats with and without adiponectin deficiency<sup>(62,63)</sup>. The authors observed that adiponectin stimulated the β-cell proliferation and impaired the islet mass without differences in insulin sensitivity effects in comparison to the deficient group<sup>(4,62,63)</sup>. This finding allows suggesting another mechanism on insulin besides the well-established insulin-sensitising property of this adipokine<sup>(62,63)</sup>. In humans, pregnant women present this phenomenon of β-cell proliferation without increase in islet mass, but this particular study was limited because it was conducted in women who died during



pregnancy<sup>(64)</sup>. However, it is possible that adiponectin also exerts an effect on human cell proliferation<sup>(62)</sup>. Vitamin D could stimulate the adiponectin secretion, which in turn stimulates  $\beta$ -cell proliferation, increasing insulin secretion. This explanation would support our results of greater increases in adiponectin and insulin in pregnant women with vitamin D adequacy status during pregnancy.

We found an association between vitamin D status and the rate of change in adiponectin during pregnancy. In the present study, pregnant women with adequate levels of 25(OH)D in the first trimester showed a sharper increase in adiponectin concentration throughout pregnancy when compared to women with inadequate levels of vitamin D. In addition, 1,25(OH)<sub>2</sub>D is known to regulate the RAAS in a negative feedback loop by binding with a transcription factor necessary for the expression of renin<sup>(65)</sup>. Inhibition of RAAS results in increased levels of adiponectin and improved insulin sensitivity, which exerts influence on glycaemia<sup>(20)</sup>. This mechanism of action can explain our result of higher increase in adiponectin among pregnant women with adequate 25(OH)D levels compared to those with inadequate levels.

Previous studies found direct associations between vitamin D and adiponectin independent of BMI in both young and adult populations<sup>(66–68)</sup>, but no studies were found with pregnant women.

No differences were observed in mean adiponectin and leptin concentrations between pregnant women with vitamin D adequacy and inadequacy at each gestational trimester, that is, cross-sectional analysis. Similarly, a case-control study conducted by McManus *et al.*<sup>(69)</sup> also found no correlation between 25(OH)D and adipokine concentrations during the third trimester in both healthy pregnant women and pregnant women with GDM.

A meta-analysis conducted in 2016 showed that vitamin D supplementation increased the serum leptin concentrations, although a meta-analysis using cross-sectional studies with non-pregnant subjects found inverse associations between 25(OH)D and leptin levels (Fisher's  $Z = -0.93$ ; 95% CI  $-0.95$ ,  $-0.91$ )<sup>(31)</sup>. In the present cohort, it was observed that pregnant women with vitamin D sufficiency showed a less pronounced increase in leptin until the second trimester and a higher decrease until the end of gestation, although this did not reach significance. Similarly, Walsh *et al.*<sup>(70)</sup> evaluated the correlation between 25(OH)D and leptin levels at early pregnancy and 28 weeks of gestation and found a negative association that was not significant.

### Conclusion

Pregnant Brazilian women with vitamin D adequacy (25(OH)D  $\geq 75$  nmol/l) at the first trimester had a higher rate of increase in adiponectin and insulin concentrations throughout pregnancy compared to women with vitamin D inadequacy (25(OH)D  $< 75$  nmol/l). These results indicate that vitamin D status at the beginning of gestation may influence the changes in adiponectin and insulin during pregnancy. Although these women had higher values of insulin, there were no higher glycaemia values, showing that there was an adequate metabolic response. This result reinforces the importance of monitoring the vitamin D status of

pregnant women in the first trimester of pregnancy to achieve a favourable metabolic profile for reducing the risk of undesired pregnancy outcomes. Given the scarcity of studies, there is a need for research involving pregnant women to evaluate this relationship and to provide further evidence on this topic.

### Acknowledgements

The authors are grateful to all participants of the cohort study, to the Municipal Health Centre Heitor Beltrão for giving us the space and allow the completion of data collection; to the Quest Diagnostics Nichols Institute laboratory (San Juan Capistrano, CA, USA) for performing the analyses of vitamin D. In addition, to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq in the Portuguese acronym; grant no. 471196/2010-0) and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ in the Portuguese acronym, grant no. E-26/111.400/2010, E\_14/2010) for the financial support. FAPERJ and CNPq had no role in the design, analysis or writing of this article.

C. B., P. G. C., G. K. formulated the research question, designed the study and developed the protocol. C. B. and P. G. C. conducted the statistical analysis, and N. H. A.-S. provided support for statistical analysis. E. G. d. B., A. B. F.-S., A. C. C. F., J. L., A. R. A. A., M. F. H. and R. M. assisted with the literature searches and with the writing of the manuscript. All authors substantially have contributed to and have approved the final version of this manuscript.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Supplementary material

For supplementary material/s referred to in this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S0007114518003057>

### References

1. Donazar-Ezcurra M, López-Del Burgo C & Bes-Rastrollo M (2017) Primary prevention of gestational diabetes mellitus through nutritional factors: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth* **17**, 30.
2. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, *et al.* (2011) Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 1911–1930.
3. Wei SQ, Qi HP, Luo ZC, *et al.* (2013) Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* **26**, 889–899.
4. Amegah AK, Klevor MK & Wagner CL (2017) Maternal vitamin D insufficiency and risk of adverse pregnancy and birth outcomes: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *PLOS ONE* **12**, e0173605.
5. Lau SL, Gunton JE, Athayde NP, *et al.* (2011) Serum 25-hydroxyvitamin D and glycated haemoglobin levels in women with gestational diabetes mellitus. *Med J Aust* **194**, 334–337.
6. Loy SL, Lek N, Yap F, *et al.* (2015) Association of maternal vitamin D status with glucose tolerance and caesarean section in a multi-ethnic Asian cohort: the growing up in Singapore towards healthy outcomes study. *PLOS ONE* **10**, e0142239.



7. Bener A, Al-Hamaq AO & Saleh NM (2013) Association between vitamin D insufficiency and adverse pregnancy outcome: global comparisons. *Int J Womens Health* **5**, 523–531.
8. World Health Organization (2013) *Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy*. Geneva: WHO.
9. Dinca M, Serban MC, Sahebkar A, et al. (2016) Does vitamin D supplementation alter plasma adipokines concentrations? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res* **107**, 360–371.
10. Karras SN, Polyzos SA, Newton DA, et al. (2018) Adiponectin and vitamin D-binding protein are independently associated at birth in both mothers and neonates. *Endocrine* **59**, 164–174.
11. Rosen ED & Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847–853.
12. Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, et al. (2007) Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **18**, 263–270.
13. Rühl R & Landrier JF (2016) Dietary regulation of adiponectin by direct and indirect lipid activators of nuclear hormone receptors. *Mol Nutr Food Res* **60**, 175–184.
14. Sung CC, Liao MT, Lu KC, et al. (2012) Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 634195.
15. Xu J, Zhao YH, Chen YP, et al. (2014) Maternal circulating concentrations of tumor necrosis factor-alpha, leptin, and adiponectin in gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *ScientificWorldJournal* **201**, 926932.
16. Retnakaran A & Retnakaran R (2012) Adiponectin in pregnancy: implications for health and disease. *Curr Med Chem* **19**, 5444–5450.
17. Ianniello F, Quaglia L, Caruso A, et al. (2013) Low adiponectin in overweight/obese women: association with diabetes during pregnancy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **17**, 3197–3205.
18. Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP, et al. (2008) Adiponectin multimers in maternal plasma. *J Matern Fetal Neonatal Med* **21**, 796–815.
19. Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, et al. (2007) Plasma adiponectin concentrations in non-pregnant, normal and overweight pregnant women. *J Perinat Med* **35**, 522–531.
20. Vaidya A, Forman JP, Underwood PC, et al. (2011) The influence of body mass index and renin-angiotensin-aldosterone system activity on the relationship between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin in Caucasian men. *Eur Endocrinol* **164**, 995–1002.
21. Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, et al. (2010) Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta* **411**, 1354–1360.
22. Forman JP, Williams JS & Fisher ND (2010) Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension* **55**, 1283–1288.
23. Pala HG, Ozalp Y, Yener AS, et al. (2015) Adiponectin levels in gestational diabetes mellitus and in pregnant women without glucose intolerance. *Adv Clin Exp Med* **24**, 85–92.
24. Mohammadi T & Paknahad Z (2017) Adiponectin concentration in gestational diabetic women: a case-control study. *Clin Nutr Res* **6**, 267–276.
25. Li ZY, Wang P & Miao CY (2011) Adipokines in inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 888–896.
26. Song Y, Gao J, Qu Y, et al. (2016) Serum levels of leptin, adiponectin and resistin in relation to clinical characteristics in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Chim Acta* **458**, 133–137.
27. Fatima SS, Alam F, Chaudhry B, et al. (2017) Elevated levels of chemerin, leptin, and interleukin-18 in gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med* **30**, 1023–1028.
28. Menendez C, Lage M, Peino R, et al. (2001) Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit *in vitro* leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol* **170**, 425–431.
29. Maetani M, Maskarinec G, Franke AA, et al. (2009) Association of leptin, 25-hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in women. *Nutr Cancer* **61**, 225–231.
30. Karonova T, Belyaeva O, Jude EB, et al. (2018) Serum 25(OH)D and adipokines levels in people with abdominal obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **175**, 170–176.
31. Hajimohammadi M, Shab-Bidar S & Neyestani TR (2017) Vitamin D and serum leptin: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr* **71**, 1144–1153.
32. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**, 292–295.
33. Fatima SS, Farooq S, Tauni MA, et al. (2015) Effect of raised body fat on vitamin D, leptin and bone mass. *J Pak Med Assoc* **65**, 1315–1319.
34. Dinca M, Serban MC, Sahebkar A, et al. (2016) Does vitamin D supplementation alter plasma adipokines concentrations? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res* **107**, 360–371.
35. Mousa A, Abell SK, Shorakae S, et al. (2017) Relationship between vitamin D and gestational diabetes in overweight or obese pregnant women may be mediated by adiponectin. *Mol Nutr Food Res* **61**, 18905–18909.
36. Pratumnvitit B, Wongkrajang P, Wataganara T, et al. (2015) Maternal vitamin D status and its related factors in pregnant women in Bangkok, Thailand. *PLOS ONE* **10**, e0131126.
37. Institute of Medicine (USA) (2011) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. In *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*, p. 8 [AC Ross, CL Taylor, AL Yaktine and HB Del Valle, editors]. Washington, DC: National Academies Press.
38. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419.
39. Gordon CC, Chumlea WC & Roche AF (1988) *Stature, Recumbent Length, and Weight. Anthropometric Standardization Reference Manual*. Champaign, IL: Human Kinetics Books.
40. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011) *National Household Budget Survey. Nutritional Composition Table of Food Consumed in Brazil*. Rio de Janeiro: Brazilian Institute of Geography and Statistics.
41. Sichieri R & Everhart J (1998) Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutr Res* **18**, 1649–1659.
42. Singer JD & Willett JB (2003) *Applied Longitudinal Data Analysis: Modeling Change and Event Occurrence*. New York: Oxford University Press.
43. Twisk JW (2013) *Applied Longitudinal Data Analysis for Epidemiology: A Practical Guide*. Cambridge: Cambridge University Press.
44. Greenland S (1983) Tests for interaction in epidemiologic studies: a review and a study of power. *Stat Med* **2**, 243–251.
45. Team RS (2015) *RStudio: Integrated Development for R*. Boston, MA: R Studio Inc.



46. Liu NQ & Hewison M (2012) Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Arch Biochem Biophys* **523**, 37–47.
47. Figueiredo AC, Cocate PG, Adegbeye A, et al. (2018) Changes in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D during pregnancy: a Brazilian cohort. *Eur J Nutr* **57**, 1059–1072.
48. Schneuer FJ, Roberts CL, Guilbert C, et al. (2014) Effects of maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in the first trimester on subsequent pregnancy outcomes in an Australian population. *Am J Clin Nutr* **99**, 287–295.
49. Flood-Nichols SK, Tinnemore D, Huang RR, et al. (2015) Vitamin D deficiency in early pregnancy. *PLOS ONE* **10**, e0123763.
50. Pereira-Santos M, Queiroz Carvalho G, David Couto R, et al. (2018) Vitamin D deficiency and associated factors among pregnant women of a sunny city in Northeast of Brazil. *Clin Nutr ESPEN* **23**, 240–244.
51. Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR, et al. (2014) Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metab* **58**, 411–433.
52. BRAZIL (2013) *National Program of Supplementation of Iron: Manual of General Conduct*, p. 24. Ministry of Health, Secretariat of Health Care, Department of Basic Attention. Brasília, GO, Brazil: Ministry of Health.
53. Jafarzadeh L, Motamed A, Behradmanesh M, et al. (2015) A comparison of serum levels of 25-hydroxy vitamin D in pregnant women at risk for gestational diabetes mellitus and women without risk factors. *Mater Sociomed* **27**, 318–322.
54. Casey C, McGinty A, Holmes VA, et al. (2018) Maternal vitamin D and neonatal anthropometrics and markers of neonatal glycaemia: Belfast Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study. *Br J Nutr* **120**, 74–80.
55. Catalano P (2002) The diabetogenic state of maternal metabolism in pregnancy. *NeoReviews* **3**, e165–e172.
56. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, et al. (1993) Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol* **264**, E60–E67.
57. Alvarez JA & Ashraf A (2010) Role of vitamin D in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol* **2010**, 351385.
58. Tai K, Need AG, Horowitz M, et al. (2008) Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutrition* **24**, 279–285.
59. Arnold DL, Enquobahrie DA, Qiu C, et al. (2015) Early pregnancy maternal vitamin D concentrations and risk of gestational diabetes mellitus. *Paediatr Perinat Epidemiol* **29**, 200–210.
60. Altieri B, Grant WB, Casa SD, et al. (2017) Vitamin D and pancreas: the role of sunshine vitamin in the pathogenesis of diabetes mellitus and pancreatic cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**, 3472–3488.
61. Gedik O & Akalin S (1986) Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* **29**, 142–145.
62. Retnakaran R (2017) Adiponectin and β-cell adaptation in pregnancy. *Diabetes* **66**, 1121–1122.
63. Qiao L, Wattee JS, Lee S, et al. (2017) Adiponectin deficiency impairs maternal metabolic adaptation to pregnancy in mice. *Diabetes* **66**, 1126–1135.
64. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, et al. (2010) Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* **53**, 2167–2176.
65. Yuan W, Pan W, Kong J, et al. (2007) 1,25-Dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* **282**, 29821–29830.
66. Gannagé-Yared MH, Chedid R, Khalife S, et al. (2009) Vitamin D in relation to metabolic risk factors, insulin sensitivity and adiponectin in a young Middle-Eastern population. *Eur J Endocrinol* **160**, 965–971.
67. Nimitphong H, Chanprasertyothin S, Jongjaroenprasert W, et al. (2009) The association between vitamin D status and circulating adiponectin independent of adiposity in subjects with abnormal glucose tolerance. *Endocrine* **36**, 205–210.
68. Vaidya A, Williams JS & Forman JP (2012) The independent association between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin and its relation with BMI in two large cohorts: the NHS and the HPFS. *Obesity (Silver Spring)* **20**, 186–191.
69. McManus R, Summers K, de Vrijer B, et al. (2014) Maternal, umbilical arterial and umbilical venous 25-hydroxyvitamin D and adipocytokine concentrations in pregnancies with and without gestational diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* **80**, 635–641.
70. Walsh JM, McGowan CA, Kilbane M, et al. (2013) The relationship between maternal and fetal vitamin D, insulin resistance, and fetal growth. *Reprod Sci* **20**, 536–541.