



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISA EM MICRONUTRIENTES



**A ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLACENTÁRIAS DE
RETINOL E CAROTENÓIDES COM O ESTADO NUTRICIONAL DE
VITAMINA A EM PUÉRPERAS E RECÉM-NASCIDOS**

MIRIAN MARTINS GOMES

ORIENTADORAS:

PROF^A. DR^A. ANDRÉA RAMALHO
PROF^A. DR^A. CLÁUDIA SAUNDERS

Rio de Janeiro

Mai/2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISA EM MICRONUTRIENTES**

Mirian Martins Gomes

**A ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLACENTÁRIAS DE
RETINOL E CAROTENÓIDES COM O ESTADO NUTRICIONAL DE
VITAMINA A EM PUÉRPERAS E RECÉM-NASCIDOS**

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

ORIENTADORAS:

**PROF^ª. DR^ª. ANDRÉA RAMALHO
PROF^ª. DR^ª. CLÁUDIA SAUNDERS**

Rio de Janeiro

Mai/2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISA EM MICRONUTRIENTES**

Mirian Martins Gomes

**A ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLACENTÁRIAS DE RETINOL E
CAROTENÓIDES COM O ESTADO NUTRICIONAL DE VITAMINA A EM
PUÉRPERAS E RECÉM-NASCIDOS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte integrante dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais.

Rio de Janeiro, 07 de maio de 2009

Prof^a. Dr^a. Rejane Andréa Ramalho Nunes da Silva
Doutora em Saúde Pública – FIOCRUZ

Prof^a Dr^a Eliane Abreu
Doutora em Ciências dos Alimentos – USP

Prof^a Dr^a Elizabeth Accioly
Doutora em Ciências – UNIFESP

Prof^a Dr^a Glória Valéria da Veiga
Doutora em Nutrição – UNIFESP

Prof^a Dr^a Maria das Graças T. do Carmo
Doutora em Farmacologia – UNIFESP

Prof^a Dr^a Célia Regina M. M. Chaves
Doutora em Clínica Médica - UFRJ

Gomes, Mirian Martins

A associação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides com o estado nutricional de vitamina A em puérperas e recém-nascidos / Mirian Martins Gomes. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição, 2009.

xii, 129 f. :il. ; 31 cm

Orientadores: Andréa Ramalho e Cláudia Saunders de Paiva
Coelho

Tese (doutorado) –UFRJ / Instituto de Nutrição, 2009.

Referências bibliográficas: f. 42-41, 62-63, 73-75; 86-90; 131-134; 144-146.

1. Vitamina A. 2. Carotenóides – deficiência. 3. Deficiência de vitamina A. 4. Placenta. 5. Recém-nascidos. 6. Puerpério. 7. Rio de Janeiro. 8. Nutrição - Tese. I. Ramalho, Andréa. II. Coelho, Cláudia Saunders de Paiva. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição. IV. Título.

A Deus, à minha família e ao meu namorado dedico esta tese

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que me ajudaram nesta caminhada. É difícil expressar com palavras o que cada uma representou. Talvez até mesmo lembrar de todos que de alguma forma participaram deste longo processo. Dessa forma desejo representá-las aqui e desde já agradecer todo o apoio e amizade dispensados. Mesmo aquelas que por qualquer motivo não tiveram seus nomes citados, sintam-se parte integrante deste trabalho! Muito obrigada!

Agradeço a Deus pela oportunidade de tornar possível a conclusão de mais uma conquista.

Aos meus pais Beatriz e Reinaldo, por todo apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida e em especial pelas palavras de consolo e conforto nos momentos mais difícil, sempre me levando a acreditar que tudo daria certo. Da mesma forma agradeço ao meu irmão Sérgio Luiz também sempre presente. Agradeço ainda a compreensão pelas horas de convívio subtraídas e pela paciência durante minhas “variações de humor” nos momentos de maior estresse.

Ao meu namorado Anselmo, incansável companheiro em todas as horas. Jamais deixando que o cansaço ou o desânimo ofuscassem o brilho de cada etapa superada. Sempre compreensivo às nossas horas de convívio subtraídas sem nunca medir esforços para qualquer tipo de ajuda principalmente nos momentos de maior volume de trabalho. Ombro mais que amigo nas horas mais difíceis. Alegria sempre vibrante a cada passo dado, a cada conquista.

A Rosane, Fernanda e Gabriela Barroso ex- colegas de trabalho da UFF e atuais amigas pessoais que acompanharam todo estresse inicial do processo de seleção. Aturaram todo o mau humor desse período e estiveram sempre solícitas às minhas constantes necessidades de alteração do horário de trabalho.

À amiga, colega de trabalho e colega de turma Roseli com quem dividi toda essa caminhada. Sempre alto astral. Desânimo era proibido! Além de todos os

percalços compartilhamos muitas alegrias e com certeza carregaremos muitas boas lembranças.

À amiga e colega de trabalho Ana Lúcia que foi mais uma vítima de todo esse estresse sempre com uma palavra de apoio e incentivo.

À amiga e chefe Célia com quem tenho aprendido muito nesses 2,5 anos de convívio. Sempre sensível às minhas necessidades de flexibilização de horário, acompanhou toda a trajetória compondo minha torcida em cada etapa. Tão gentilmente aceitou meu convite tanto no momento da qualificação como também agora na defesa sempre trazendo contribuições pertinentes.

Ao estatístico Paulo Borges que me ajudou a realizar as análises estatísticas com sua inesgotável paciência.

À Renata, secretária da pós-graduação, sempre atenciosa ao atender minhas dúvidas e solidária nos momentos de angústia. Sempre solícita na busca de soluções dos nossos problemas. Obrigada pela paciência!

À professora Andréa Ramalho que teve participação fundamental em minha trajetória científica, desde a iniciação científica. Seu conhecimento, determinação e entusiasmo, eram contagiantes, impedindo qualquer desânimo mesmo quando tudo parecia impossível.

À professora Cláudia Saunders que me contagiou com sua paixão pelo grupo materno-infantil. Com ela deu meus primeiros passos no projeto placenta anda como estagiária voluntária de iniciação científica. Sempre presente e disponível às minhas dúvidas e inseguranças tornou-se minha “mãe científica”. O aprendizado adquirido durante todas as etapas do projeto marcará de forma positiva para sempre minha vida profissional.

À professora Eliane Abreu presente desde minha qualificação e agora se disponibilizando como revisora e membro titular da banca. Sempre com contribuições pertinentes.

À professora Elizabeth Accioly que também vem agregando suas contribuições desde minha qualificação e agora aceitando mais uma vez o convite para participar da banca. Foi mais uma das que acompanhou minha trajetória na pesquisa e com a qual tenho muita alegria em dividir os resultados.

Às professoras Maria das Graças, Glória Valéria, Rosângela Pereira e Silvana Granado por tão gentilmente terem aceitado o convite para participar desta banca.

Um agradecimento especial a todas as puérperas que, mesmo durante a dor do parto, aceitaram participar da pesquisa que deu origem a este trabalho, tornando possível a sua realização. Muito obrigada!

RESUMO

GOMES, Mirian Martins. A associação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides com o estado nutricional de vitamina A em puérperas e recém-nascidos. Rio de Janeiro, 2009. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Nutricionais) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

O objetivo do presente estudo foi avaliar associação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides com o estado nutricional de vitamina A em puérperas e recém-nascidos, bem como avaliar a estabilidade da vitamina A à temperatura ambiente e à luminosidade e, a distribuição intraplacentária de carotenóides. A avaliação do estado nutricional foi realizada com base nos indicadores bioquímico (retinol sérico) e funcional (cegueira noturna gestacional) em uma amostra de 262 puérperas e seus RN. As concentrações de retinol e carotenóides placentários foram avaliadas por espectrofotometria, e uma subamostra também por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), e a cegueira noturna diagnosticada segundo entrevista padronizada. Adotaram-se 1,05µmol/l e 0,7µmol/l como ponto de corte para definição da deficiência de vitamina A (DVA). As variáveis socioeconômicas e obstétricas foram obtidas pela consulta aos prontuários e/ou entrevista à puérpera. Observou-se que os carotenóides apresentam distribuição homogênea no tecido placentário e que a vitamina A é estável no mesmo à temperatura ambiente e à exposição luminosa por até 24 horas ($p=0.763$ e $p=0.609$, respectivamente para retinol e carotenóides). Não houve diferenças com relação aos dois métodos bioquímicos utilizados ($p=0,318$). Não foram observadas diferenças entre as médias de retinol e carotenóides placentários em puérperas independente do ponto de corte utilizado para definição de DVA. Com relação aos RN, observa-se redução ($p=0,012$) das médias de retinol placentário em indivíduos com DVA quando adota-se o ponto de corte 1,05µmol/l. No que diz respeito às médias de carotenóides placentários, observa-se redução para os dois pontos de corte ($p=0,013$ e $p=0,019$ para os pontos 1,05µmol/l e 0,7µmol/l, respectivamente). Os resultados da curva ROC apontam o valor de retinol placentário de 0,80µmol/l como representativo da carência sendo encontrados maiores valores de sensibilidade (66,7%), especificidade (41,7%) e acurácia (65%) quando adota-se o ponto de corte 0,70µmol/l. Encontrou-se redução significativa das médias placentárias de carotenóides na presença de história de aborto ($p=0,006$) e tendência dessa redução na presença de cegueira noturna ($p=0,095$). Não foi observada associação entre as concentrações placentárias de vitamina A e variáveis socioeconômicas. Os resultados apontam para uma maior estabilidade da vitamina A no tecido placentário e da associação das concentrações da placenta em estados carenciais mais severos. Reforça-se a história de aborto como fator de risco para a carência e da cegueira noturna para o seu diagnóstico. A placenta mostra-se um possível indicador do estado nutricional de vitamina A no puerpério imediato podendo contribuir para a detecção e tratamento da carência, permitindo a identificação das puérperas que devem receber a suplementação com a vitamina, trazendo benefícios para o binômio mãe-filho. Sendo o risco de DVA universal para gestantes há necessidade de aconselhamento nutricional a todas independente do nível socioeconômico.

ABSTRACT

GOMES, Mirian Martins. A associação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides com o estado nutricional de vitamina A em puérperas e recém-nascidos. Rio de Janeiro, 2009. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Nutricionais) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

The present study aimed to evaluate the association among placental retinol, carotenoid levels and vitamin A nutritional status as well as the stability of placental retinol and carotenoids at room temperature and the intraplacental distribution of carotenoids. Vitamin A nutritional status was evaluated through biochemical (serum retinol) and functional (night blindness) indicator on 262 puerperal women and their newborns (NB). Serum levels of placental retinol and carotenoids were determined by spectrophotometric analysis. Additionally, a subsample was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Night blindness was evaluated through standard interview. To identify vitamin A deficiency (VAD) cut-off points of 0.70 and 1.05 $\mu\text{mol/l}$ were adopted. Socioeconomic and obstetrics variables were obtained through medical record or interview. Carotenoids showed homogeneous distribution on placental tissue. Vitamin A was found to be stable in the placental tissue under environmental temperature and under exposure to luminosity for over 24 hours ($p=0.763$ and $p=0.609$, respectively for retinol and carotenoids). There was no significant differences between the biochemical methods employed ($p=0,318$). No difference between means of placental retinol and carotenoids was observed in the puerperal women regardless the cut-off point used to define VAD. As for the NB's, placental retinol means in individuals with VAD were significantly lower ($p=0.012$) when the 1.05 $\mu\text{mol/l}$ cut-off point was adopted, in comparison to the results obtained by using the 0.70 $\mu\text{mol/l}$ cut-off point. As for placental carotenoid, the means values dropped using both cut-off points ($p=0,013$ and $p=0,019$ for 1,05 $\mu\text{mol/l}$ and 0,7 $\mu\text{mol/l}$, respectively). The ROC curve results point to the concentration of 0.80 $\mu\text{mol/l}$ of placental retinol as a minimal boundary, under which a retinol deficiency is characterized. Higher values for sensitivity (66.7 %), specificity (41.7 %) and accuracy (65%) were obtained when the 0.70 $\mu\text{mol/l}$ cut-point was adopted. In cases of abortions history, a significant reduction in placental carotenoid means could be observed ($p=0,006$). Whenever night blindness was present, a tendency of reduction in placental carotenoid means was observed ($p=0,095$). No association between placental vitamin A levels and socioeconomic and obstetrics variables was detected. These results point out on the direction of vitamin A stability on the placenta and its association with more severe carencial status. The history of abortion is reinforced as a risk factor for vitamin A deficiency development, while night blindness is reinforced as an indicator for deficiency diagnoses. Placenta appears as a possible indicator of vitamin A deficiency for immediate puerperal period and may contribute for deficiency detection and treatment as well as to identify puerperal women in need for vitamin A supplementation, in order to benefit both mother and child. As VAD risk is universal for all pregnant women, the nutritional intervention becomes a necessity for all of them, regardless the socioeconomic status.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAP	Centro Latinoamericano de Perinatologia e Desenvolvimento Humano
CRABP	Proteína celular carreadora de ácido retinóico
CRBP	Proteína celular carreadora de retinol
DUM	Data da última menstruação
DVA	Deficiência de vitamina A
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
HPLC	High performance liquid chromatography
ICC	Intervalo de confiança
INJC	Instituto de Nutrição Josué de Castro
IOM	Institute of Medicine
IVACG	International Vitamin A Consultative Group
ME	Maternidade Escola
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NPqM	Núcleo de pesquisa em micronutrientes
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organización Panamericana de la Salud
RAR	Receptores de ácido retinóico
RBP	Proteína carreadora de retinol
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido ribonucléico
RXR	Receptor X retinóico
T3	Triiodo-tironina
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WHO	World Health Organization

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Páginas
Revisão da literatura	
Quadro 1: Relação metabólica entre os retinóides.	16
Métodos	
Quadro 2: Avaliação Funcional	38
Artigo 1	
Tabela 1: Comparação das concentrações de retinol de placentas não congeladas segundo tempo transcorrido do parto (n=12)	64
Tabela 2: Distribuição intraplacentária de carotenóides	64
Artigo 2	
Tabela 1: Comparação de médias de retinol e carotenóides placentários segundo estado nutricional de vitamina A materno e do recém-nascido	76
Tabela 2: Resultados de sensibilidade e especificidade segundo pontos de corte séricos para DVA adotando-se o ponto de corte placentário de 0,80 μ mol/L de acordo com a análise da curva ROC	76
Artigo 3	
Tabela 1: Concentração placentária de retinol e carotenóides segundo variáveis sócio-econômicas	91
Tabela 2: Concentração placentária de retinol e carotenóides segundo variáveis obstétricas	92
Tabela 3: Concentração placentária de retinol e carotenóides segundo indicador funcional	93
Nota metodológica	
Tabela 1.1: Caracterização da amostra (n=262)	101

Tabela 2.1: Concentração média de retinol e carotenóides placentários por porção estudada.	102
Tabela 2.2: Correlação entre as concentrações séricas e placentárias de carotenóides.	102
Tabela 2.3: Correlação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides e variáveis antropométricas maternas e do recém-nascido.	103
Tabela 2.4: Correlações entre o peso placentário e variáveis antropométricas maternas e do recém-nascido.	103
Tabela 3.1: Resultado das curvas ROC construídas para as concentrações placentárias de retinol segundo pontos de corte de retinol sérico para DVA materna.	106
Tabela 3.2: Resultado das curvas ROC construídas para as concentrações placentárias de retinol segundo pontos de corte de retinol sérico para DVA do recém-nascido.	107

Anexo 7

Tabela 1: Comparison of the retinol concentrations of non-frozen placentas according to the time elapsed since delivery (n=12)	136
Tabela 2: Intraplacental distribution of carotenoids	136

Anexo 8

Tabela 1: Comparison of placental retinol and carotenoid averages according to maternal and new-born vitamin A nutritional state.	148
Tabela 2: Sensitivity and specificity results according to serum cut-points for VAD adopting the placental cut-point 0.80µmol/L according to analysis of the ROC curve.	149

LISTA DE GRÁFICOS

Nota metodológica

	Páginas
Gráfico 3.1: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico materno de 1,05 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,55).	104
Gráfico 3.2: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico materno de 0,7 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,65).	104
Gráfico 3.3: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico do recém-nascido de 1,05 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,571).	105
Gráfico 3.4: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico do recém-nascido de 0,7 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,574).	105
Gráfico 3.5: Concentrações placentárias de carotenóides segundo ponto de corte de carotenóides séricos maternos de 80 $\mu\text{g/dl}$ (área sob a curva = 0,48).	108
Gráfico 3.6: Concentrações placentárias de carotenóides segundo ponto de corte de carotenóides séricos do recém-nascido de 40 $\mu\text{g/dl}$ (área sob a curva = 0,40).	108

LISTA DE ANEXOS

	Páginas
Anexo 1: Nota Metodológica	100
Anexo 2: Termo de convênio entre a Maternidade Escola e o Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ	110
Anexo 3: Parecer da Comissão de Ética Médica da Maternidade Escola/UFRJ (2a. via)	112
Anexo 4: Parecer do Comitê de Ética da Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ	114
Anexo 5: Termo de consentimento livre e esclarecido	117
Anexo 6: Instrumento de coleta de dados	119
Anexo 7: artigo 1: Stability and intraplacental vitamin A distribution (versão encaminhada à revista International Journal of Nutrition and Food Science)	122
Anexo 8: artigo 2: Placenta: possible predictor of vitamin A deficiency? (versão encaminhada à revista British Journal of Nutrition)	137

LISTA DE UNIDADE DE MEDIDAS

%	Percentual
µg	Micrograma
µmol	Micromol
dl	Decilitro
g	Gramma
Kg	Quilograma
l	Litro
ml	Mililitro
°C	Graus centígrados
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

	Páginas
Apresentação	10
1. Introdução	12
2. Revisão da literatura	14
3. Justificativa	31
4. Objetivos	32
5. Métodos	34
6. Referências bibliográficas	42
7. Artigos	52
Artigo 1: Estabilidade e Distribuição Intraplacentária de Vitamina A	53
Artigo 2: Placenta: possível preditor da deficiência de vitamina A?	65
Artigo 3: Concentração de vitamina A placentária e variáveis sócio-econômicas e obstétricas e indicador funcional	77
8. Considerações finais	94
9. Anexos	99

APRESENTAÇÃO

A deficiência de vitamina A (DVA) é uma das carências de maior destaque no cenário mundial. O avanço nos estudos expandiu seus conhecimentos para além dos grupos clássicos de risco e hoje as pesquisas são realizadas nos diversos grupos populacionais associados as mais diversas condições clínicas.

O reconhecimento cada vez maior dessa carência torna necessário o aprimoramento dos indicadores a fim de possibilitar seu mapeamento assim como a proposição e o monitoramento das medidas de intervenção, sejam estas de caráter preventivo ou de tratamento.

Nesse âmbito o binômio mãe-filho apresenta uma importante particularidade. O órgão de transferência e comunicação entre os dois seres durante a gestação, a placenta, é o único a exibir características de dois indivíduos distintos. Este fato facilitaria estudos nesse grupo na medida em que uma única amostra seria capaz de refletir características tanto da mãe quanto do recém-nato.

Dada a escassez de estudos envolvendo a DVA e a placenta, o Grupo de Pesquisa em Micronutrientes do Instituto de Nutrição da UFRJ iniciou em 1999 o estudo “*Deficiência de Vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição intraplacentária de retinol*” com o objetivo de propor a placenta como possível indicador do estado nutricional do binômio mãe-filho. Participo do projeto desde as etapas iniciais tendo acompanhado toda a evolução como aluna de iniciação científica, aperfeiçoanda, mestranda e agora doutoranda.

Esse projeto realizou estudos desde a padronização metodológica para coleta e análise das amostras placentárias até a proposição dos pontos de corte placentários (tese de doutorado em questão).

No presente trabalho serão apresentados resultados que visam avançar os conhecimentos acerca das concentrações placentárias de vitamina A e sua possível utilização como indicador da carência. A presente tese será apresentada na modalidade “por artigo”. A mesma possui dois artigos já encaminhados a revistas internacionais (British

Journal of Nutrition e International Journal of Nutrition and Food Science) e um terceiro a ser encaminhado após apreciação pela banca examinadora.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento intra-uterino dos mamíferos é dependente da placenta. Este órgão é responsável não só pelo transporte de nutrientes e excreção de metabólitos, como também pela produção, metabolização e até mesmo armazenamento de compostos (hormônios, nutrientes) necessários a todo processo gestacional (Sapin et al, 2000; Iyengar & Rapp, 2001; Marceau et al, 2006).

Dentre os agentes responsáveis pela regulação de todo esse processo pode-se destacar a vitamina A. Os receptores placentários dão a ela a capacidade de mediar tanto a formação e desenvolvimento do tecido placentário quanto de regular seu metabolismo e o desenvolvimento embrionário (Tarrade et al, 2000; Burri, 2001; Sarni et al., 2002; Radhika et al, 2002). Essas funções são atribuídas tanto ao retinol quanto aos carotenóides (Sapin et al, 2000b; Marceau et al, 2006).

A carência nutricional, destacando-se a vitamina A, é responsável pelo aumento das taxas de morbi-mortalidade materno-infantil e por isso também alvo de inúmeras políticas visando sua prevenção (Christian et al, 2000; 2001; 2002; Goldenberg, 2003; Rahmathullah et al., 2003; Roberts et al., 2003; Rouse, 2003; Villar et al., 2003; Chagas, 2007).

A necessidade de estudo acerca dos indicadores a serem utilizados para o mapeamento da carência de vitamina A vem sendo levantada. O espectro das consequências da deficiência é tão largo quanto a magnitude do problema que é hoje considerado um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (OPAS, 2001). No Brasil as prevalências são sempre preocupantes independente do estado ou região do país estudada (Ramalho et al, 2008).

No Rio de Janeiro o Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPqM/INJC/UFRJ) se dedica ao estudo da carência de vitamina A em diversos grupos populacionais dentre eles o materno-infantil (Coelho et al, 1995; Ramalho et al, 1999; Accioly & Souza-Queiroz, 2000; Saunders et al, 2004; Gomes, 2004). Em 1999 iniciou-se um estudo cujo objetivo central foi o estudo da

placenta (Coelho, 2003). Dado ser este um órgão de transferência, podendo refletir características maternas e fetais e havendo relação estreita entre a vitamina A e o seu metabolismo, por que não estudá-la a fim de alavancar mais um possível indicador do estado nutricional de vitamina A? Apesar de toda essa interface, os estudos acerca da placenta nesse cenário são escassos.

Inicialmente, a inexistência de métodos padronizados para coleta, transporte, armazenamento e dosagem bioquímica da vitamina A levaram Saunders et al (2005b) a propor metodologia detalhada assim como a distribuição intraplacentária de retinol. A distribuição homogênea do retinol neste tecido impulsionou a continuidade dos estudos. Ainda nessa fase constatou-se a estabilidade da vitamina no tecido sob temperatura de congelamento.

Contudo para a construção de um indicador são necessários mais conhecimentos acerca desse órgão tais como: distribuição intraplacentária de carotenóides, estabilidade de retinol e carotenóides no tecido mantido à temperatura ambiente e sem proteção à luminosidade, associação com concentrações séricas e indicador funcional (cegueira noturna), assim como com variáveis obstétricas e sócio-econômicas.

Neste contexto o presente trabalho pretende auxiliar na elucidação de tais questionamentos, visando contribuir para o aprofundamento dos conhecimentos acerca do comportamento da vitamina A no tecido placentário.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Placenta

A placenta é um anexo embrionário encontrado apenas em mamíferos, formada pela fusão de tecidos de origem materna e embrionária, sendo assim o único órgão composto por células de dois indivíduos distintos. É um tecido altamente vascularizado possibilitando a difusão de substâncias entre o sangue materno e fetal. Para o feto a placenta exerce funções de trato digestivo, fígado e pulmões, regulando o transporte e metabolismo de nutrientes (Sapin et al, 2000; Marceau et al, 2006). Nos primeiros meses de gestação ainda acumula a função de armazenamento de proteína, cálcio e ferro necessários ao final do desenvolvimento fetal (Iyengar & Rapp, 2001). Dessa forma, qualquer anormalidade nas estruturas ou membranas fetais pode comprometer o desenvolvimento do feto (Marceau et al, 2006).

No final da gestação, a placenta e as membranas fetal e amniótica desempenham atividades regulatórias autócrinas promovendo ruptura programada na fase inicial do trabalho de parto. Possuem também atividade secretora, liberando substâncias no líquido amniótico que afetam sua homeostase e, através do útero, onde podem influenciar a fisiologia celular materna (Marceau et al, 2006).

Essas atividades, entre outras, conferem à placenta função endócrina e imunológica (Iyengar & Rapp, 2001). Alguns nutrientes, dentre eles a vitamina A, participam de toda essa regulação. O papel da vitamina A e seus derivados no desenvolvimento embrionário já está bem fundamentado. Contudo a importância da vitamina A vai além do desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual, metabolismo lipídico e diferenciação e proliferação celular. As placentas humanas expressam fatores de transcrição nuclear de receptores de ácido retinóico (RARs) e receptor X retinóico (RXRs) (Tarrade et al, 2000; Burri, 2001; Sarni et al., 2002; Radhika et al, 2002) pelos quais os retinóides exercem suas funções. Os RARs podem ser ativados tanto pelo *all-trans* ácido retinóico quanto pelo *9-cis* ácido retinóico

enquanto os RXRs são ativados exclusivamente pelo 9-*cis* ácido retinóico (Tarrade et al, 2000; Sharone et al, 2003).

Esses receptores ativam vários fatores de transcrição modulando a expressão de diversos gens responsáveis pela produção de hormônios e nutrientes como: hormônio gonadotrófico coriônico humano, hormônio lactogênio placentário, leptina, receptor de fator de crescimento epidermal (Marceau et al, 2006), triiodo-tironina (T3), estrogênio, progesterona, cortisol, aldosterona, testosterona, vitamina D, colesterol e ácidos graxos (Burri, 2001; Sarni et al., 2002; Radhika et al, 2002).

Outro precursor do retinol, o β -caroteno, possui papel primordial na prevenção da ruptura prematura de membranas fetais (Morriss-Kay & Sokolova, 1996; Marceau et al, 2006). Estudos avaliando função dos carotenóides na prevenção de diversos tipos de câncer apontam que estes também podem ativar receptores nucleares modulando a atividade de fatores de transcrição. Essa hipótese foi levantada após a percepção de que os carotenóides eram capazes de modular mecanismos de proliferação celular, sinalização de fatores de crescimento, comunicação intercelular do tipo *gap junction*, além de alterações na expressão de diversas proteínas participantes desses processos. Um dos mecanismos sugeridos é a alteração do potencial redox da célula que afeta os sistemas de transcrição redox-sensíveis (Sharone et al, 2003).

A oxidação do retinol a retinaldeído e posteriormente a ácido retinóico é necessária para que o retinol seja biologicamente ativo e ocorre na própria placenta (Sapin et al, 2000b; Marceau et al, 2006) sendo as enzimas responsáveis pelo processo expressas na membrana amniótica (Marceau et al, 2006). A enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase, responsável pela clivagem do β -caroteno em duas moléculas de retinal também está presente na parte fetal da membrana amniótica da placenta humana (Morriss-Kay & Sokolova, 1996; Marceau et al, 2006).

Todos os processos metabólicos aqui descritos estão interligados gerando estreita relação entre todos os retinóides responsáveis pela homeostase e todas as funções biológicas da vitamina A (quadro 1).

Quadro 1: Relação metabólica entre os retinóides.



Adaptado de Morriss-Kay & Sokolova, 1996

Outro dado importante é que a conversão de retinol a ácido retinóico pode ser prejudicada por substâncias como o etanol. Assim a exposição pré-natal ao etanol pode levar a restrição de desenvolvimento e mal formações durante a gestação devido a alterações na fisiologia da membrana fetal (Marceau et al, 2006). A deficiência de vitamina A (DVA) em si também é responsável por mal formações na placenta e consequentemente prejuízos no desenvolvimento embrionário (Torrade et al, 2000).

Os achados acima descritos deixam claro o papel da placenta não só como órgão de transferência como também de tecido metabolicamente ativo estando diretamente associada à saúde materna e interferindo diretamente no resultado obstétrico.

2.2. Importância da vitamina A para o grupo materno-infantil

A deficiência de micronutrientes é um importante problema de saúde pública mundial que afeta profundamente a saúde dos indivíduos, sua qualidade de vida, aumenta os custos com o setor saúde e interfere significativamente no desenvolvimento das nações (Maison et al, 2001). Vários estudos evidenciam a associação entre a deficiência nutricional, principalmente de micronutrientes (vitaminas e minerais), com o aumento das taxas de

morbi-mortalidade do binômio mãe-filho. Por outro lado, a eficácia de intervenções nutricionais, especialmente com vitamina A, vem sendo comprovada em populações de risco nutricional com conseqüentes efeitos benéficos para a saúde do grupo materno infantil (Christian et al, 2000; 2001; 2002; Goldenberg, 2003; Rahmathullah et al., 2003; Roberts et al., 2003; Rouse, 2003; Villar et al., 2003; Chagas, 2007).

A vitamina A possui função importante no ciclo visual, crescimento, manutenção da diferenciação epitelial, reprodução e desenvolvimento fetal. A deficiência materna de vitamina A pode resultar em morte fetal e em um espectro de mal formações congênitas (Sapin et al, 2000a,b) especialmente olhos, trato geniturinário, sistema cardiovascular, diafragma e pulmões (Morris-Kay & Sokolova, 1996). A ingestão excessiva de vitamina A pode, da mesma forma, resultar em mal formações (Sapin et al, 2000a,b). Como o feto não é capaz de sintetizar retinol o desenvolvimento embrionário é totalmente dependente da circulação materna para o seu suprimento (Sapin et al, 2000b).

Durante o desenvolvimento fetal, pode-se destacar sua atuação no desenvolvimento pulmonar. As proteínas surfactantes são reguladas por metabólitos de ácido retinóico (Biesalsk & Nohr, 2003). Principalmente no final da gestação, quando ocorre a maturação pulmonar, os estoques de retinol são rapidamente depletados, demonstrando elevadas necessidades de retinol para diferenciação celular e produção de surfactante (Bohles, 1997; Biesalsk & Nohr, 2003). A queratinização do epitélio respiratório observada na bronquiolite pulmonar reforça a associação entre a DVA e o desenvolvimento pulmonar (Biesalski & Nohr, 2003).

Sua importância na função imunológica também merece destaque, sendo necessária para diferenciação e proliferação nuclear em resposta ao estímulo. Já é reconhecido o papel do ácido retinóico no incremento da atividade fagocítica de macrófagos e aumento da produção de interleucinas 1 e outras citocinas, que atuam como importantes mediadores inflamatórios e estimulantes para produção de linfócitos T e B (IOM, 2001; Villamor & Fawzi, 2005).

A continuidade dos estudos expandiu os conhecimentos acerca da Vitamina A. Atualmente sabe-se que a mesma atua no metabolismo intermediário, na síntese de ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, enzimas, globulinas, glicoproteínas, queratina, na permeabilidade celular e nos metabolismos da hemoglobina e do zinco (IOM, 2001). Como descrito no tópico anterior, é responsável pela síntese de diversos hormônios tendo ligação direta com o processo reprodutivo, crescimento e desenvolvimento infantil.

Ultimamente, porém, ganhou destaque sua ação como antioxidante (Baydas et al, 2002; Ramalho et al, 2003), impulsionando os estudos envolvendo, principalmente, os carotenóides. Antes reconhecidos apenas como compostos com atividade pró-vitáminica (Nagel et al, 1997), hoje são vistos como importantes antioxidantes plasmáticos (Baydas et al, 2002; Stahl & Sies, 2003; Ramalho et al, 2003).

Os carotenóides são importantes seqüestradores de radicais oxigênio singleto, (Baydas et al, 2002; Stahl & Sies, 2003; Ramalho et al, 2003), interrompendo a geração de espécies reativas de oxigênio ainda nas etapas iniciais de sua formação (Nagel et al, 1997). Tal efeito também é atribuído, mais recentemente, ao próprio retinol, do qual alguns carotenóides são precursores (Baydas et al, 2002; Ramalho et al, 2003). Uma única molécula de retinol ou β -caroteno é capaz de inativar vários radicais oxigênio singleto antes de ser destruída (Bast et al, 1998; Ramalho et al, 2003). O β -caroteno é ainda reconhecido como varredor de radicais peroxil. Contudo outros carotenóides também apresentam efeitos antioxidantes possuindo efeito sinérgico entre si e com outros micronutrientes antioxidantes como vitamina C e E (Stahl & Sies, 2003; Winkhofer-Roob et al, 2003).

Os estudos recentes dão ênfase especial à importância de quantidades adequadas de antioxidantes no momento do parto, considerado como uma situação de estresse oxidativo. Esse fato é ainda mais preocupante em prematuros que possuem imaturidade dos sistemas antioxidantes e reservas inadequadas de nutrientes que agem como tal. Os radicais livres exercem função primordial na gênese do parto prematuro estando associados

às enfermidades causadas pelo estresse oxidativo e, nesse particular, ganham destaque os danos causados ao sistema respiratório (Biesalski & Nohr, 2003; Gomes et al, 2005).

Um número crescente de evidências indica que o aumento da produção de radicais livres também possui papel importante na patogênese do aborto. O decréscimo do potencial antioxidante é observado 5-6 semanas antes do início dos sintomas da perda reprodutiva. Em mulheres com história de aborto recorrente é observado aumento da peroxidação de lipídios plasmáticos acompanhado da redução das concentrações séricas de vitaminas A e E e β -caroteno (Paszkowski & Lagód, 2001). Encontra-se ainda associação entre a cegueira noturna e a história de aborto (Saunders et al, 2004).

A alteração do *status* antioxidante do organismo também está associado ao desenvolvimento das síndromes hipertensivas da gestação. Baixas concentrações de retinol e carotenóides vêm sendo encontradas em mulheres que desenvolvem tal intercorrência durante a gestação, enquanto as concentrações de tocoferol costumam estar aumentadas (Zhang et al 2001; Williams et al, 2003).

A fisiopatologia da pré-eclâmpsia está associada à disfunção vascular na qual os radicais livres, particularmente os ânions superóxido, podem estar envolvidos. Observa-se um desequilíbrio entre a peroxidação e as defesas antioxidantes, havendo evidências de que haja deficiência nos sistemas de proteção ou aumento da utilização de antioxidantes em mulheres com pré-eclâmpsia (Zhang et al, 2001).

Apesar dos benefícios atribuídos aos carotenóides a indicação de suplementação é controversa. Em algumas situações a suplementação pode ser prejudicial em vez de benéfica. Em circunstância onde se observa altas concentrações de oxigênio, alta concentração de carotenóides ou alteração do estado redox intracelular, o β -caroteno apresenta propriedades prooxidantes (Palozza et al, 2003; Lowe et al, 2003). Os produtos de oxidação do β -caroteno podem alterar a sinalização dos retinóides e o status de fatores de transcrição nuclear (Lowe et al, 2003). Esse comportamento, porém pode variar de acordo com o tipo de célula ou tecido estudado. A interação entre nutrientes antioxidantes

também deve ser levada em consideração. A adição concomitante α -tocoferol parece reverter os efeitos prooxidantes do β -caroteno. Dessa forma acredita-se que o α -tocoferol deva ser consumido para retardar a formação de radicais derivados do β -caroteno. Este fato justifica a falta de associação de efeito prooxidantes com a ingestão de β -caroteno por fontes alimentares já que os alimentos em geral possuem uma combinação de nutrientes antioxidantes (Palozza et al, 2003).

Nesse contexto, uma revisão sistemática realizada recentemente aponta para o cuidado da suplementação de carotenóides, pois não há evidências de prevenção das síndromes hipertensivas com a suplementação ou de quais e como as vitaminas devam ser suplementadas. Como os efeitos adversos ainda não foram avaliados, aponta-se a necessidade de estudos criteriosos com esses micronutrientes no grupo materno infantil (Rumbold et al, 2008).

Por outro lado, a suplementação de vitamina A na forma pré-formada (retinol) tem demonstrado efeitos positivos na saúde materno-infantil. Oliveira & Rondó (2007) avaliou revisões sistemáticas e metanálises, no período de 1993 a 2006, sobre a suplementação de vitamina A. Nesse trabalho foi observado que a suplementação de vitamina A em crianças esteve associada a redução em torno de 23 a 30% da mortalidade geral. A suplementação mostrou-se associada à redução da gravidade e conseqüentemente da mortalidade por quadros de diarreia e sarampo, embora não haja efeito preventivo. Efeito protetor também foi observado em relação ao baixo peso ao nascer e à redução da mortalidade de crianças que vivem com AIDS. Esses resultados sugerem que as infecções mais fortemente associadas com DVA são aquelas nas quais a função do epitélio está acometida (sarampo, diarreia e doenças respiratórias).

Em estudo avaliando a suplementação de vitamina A em crianças com diarreia infecciosa, observou-se que o resultado é dependente do patógeno envolvido, do processo infeccioso induzido por este, do momento de início desse processo e da dose de suplementação. Embora a resposta seja diferenciada de acordo com os fatores listados, a

suplementação mostra-se válida no tratamento da diarreia, porém não como terapêutica de prevenção (Long et al, 2006).

No que diz respeito à suplementação de gestantes e lactantes, há indicação da redução da mortalidade materna, porém não há evidências da associação com a redução da morbi-mortalidade infantil quando a suplementação é realizada na mulher (Oliveira & Rondó, 2007).

Recentemente vêm sendo muito discutidas as doses de suplementação. Foi demonstrado que doses acima do que foi preconizado pela WHO em 1997 não possuem efeito adicional em áreas de carência moderada. Sugere-se que os estudos prossigam a fim de testar também doses abaixo do atualmente recomendado (Darboe et al, 2007)

2.3. Epidemiologia da deficiência de vitamina A

A DVA é considerada um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (OPAS, 2001) sendo mais de sessenta países classificados na categoria de carência grave (Milagres et al, 2007). Em 2002, West atualizando os dados mundiais sobre a prevalência de DVA descreve que cerca de 150 milhões de mulheres e crianças no mundo apresentem a DVA; que 4,4 milhões de pré-escolares apresentem xeroftalmia e que 6,2 milhões de mulheres desenvolvam cegueira noturna durante a gestação. Atualmente, sabe-se que mesmo a DVA subclínica (quando estão ausentes os sinais de xeroftalmia) intensifica a gravidade de enfermidades como diarreia e outros processos infecciosos, podendo provocar quadros de imunodeficiência de origem exclusivamente nutricional (Ferraz et al, 2005). Calcula-se que a cada minuto morre uma criança de causa direta ou indiretamente atribuível à DVA (Sommer, 1995, WHO, 1999) e que, diariamente, muitas mulheres também falecem em decorrência de problemas evitáveis, relacionados à gravidez ou ao parto, que podem ser agravados pela DVA (WHO, 1999).

Estima-se que a cada ano 500.000 crianças tornem-se cegas e em países em desenvolvimento 60% morrem após perderem a visão. As crianças abaixo de cinco anos

são as mais afetadas. Cerca de metade da cegueira em crianças, sobretudo em comunidades mais pobres, deve-se a causas evitáveis. As maiores prevalências são encontradas em países em desenvolvimento onde a principal causa é a DVA. Em torno de 140.000 crianças possuem DVA e estão em risco de cegueira e aumento da mortalidade. A taxa de cegueira em crianças é capaz de refletir o desenvolvimento socioeconômico na medida em que afeta o desenvolvimento psicomotor, social e emocional e futuramente limita as oportunidades de educação e emprego (Gilbert & Awan, 2003).

A taxa de mortalidade de crianças abaixo de cinco anos pode indicar o grau de DVA de um país e alertar países que ainda não investigaram a DVA para que o façam. A análise de dados existentes sugere que qualquer país com taxa de mortalidade em menores de cinco anos >50 possui a DVA como problema até que seja provado o contrário (Sommer & Davidson, 2002).

Embora não se dispondo no país de estudos nacionais para diagnóstico da DVA, as informações provenientes de inquéritos nutricionais em diversas regiões e grupos populacionais empregando diferentes indicadores apontam que a DVA é um problema com magnitude de saúde pública em âmbito nacional (Ramalho et al, 2002; 2005), sendo o Brasil classificado pela OPAS (2001) como uma área de carência subclínica grave (West, 2002).

Recentemente, o Ministério da Saúde (MS, 2004) instituiu, pela Portaria 729 de 13 de maio de 2005, o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A, intitulado Vitamina A Mais. Sua finalidade é reduzir e controlar a DVA em crianças de seis a 59 meses de idade e mulheres no pós-parto imediato, residentes nas áreas consideradas de risco para a deficiência (Nordeste, região norte de Minas Gerais, Vale do Jequitinhonha, Vale do Murici, e Vale do Ribeira em São Paulo). Contudo, reconhece que subsistem dúvidas a cerca da extensão e magnitude desta deficiência nas demais regiões do país, a exemplo da região sudeste, (cidades do Rio de Janeiro e São Paulo) e no Distrito Federal, aonde estudos recentes vêm documentando elevadas prevalências (Accioly &, Souza Queiroz, 2000; Da Silva et al, 2005; Graebner et al, 2007).

A “III Pesquisa de Saúde Materno Infantil do Sergipe” encontrou prevalência de 32,1% das crianças menores de 5 anos com retinol sérico $< 0,7\mu\text{mol/l}$, sendo que 9,6% apresentavam carência grave ($< 0,35\mu\text{mol/l}$) (Martins et al, 2004). No Piauí, um estudo investigando a prevalência de hipovitaminose A em escolares de creches pública encontrou prevalência de 15,4% de carência e 29% concentrações inadequadas (Paiva et al, 2006). Em um centro de atenção à saúde da mulher de Pernambuco, 25% das puérperas avaliadas apresentaram estado carencial segundo indicador retinol sérico (Lopes et al, 2006). Já no Distrito Federal Graebner et al (2007) encontraram prevalência de 33,55% ao estudar crianças e adolescentes (5 a 18 anos) também segundo o mesmo indicador.

No Rio de Janeiro, o Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPqM/INJC/UFRJ), se dedica ao estudo e identificação dessa deficiência vitamínica em diversos segmentos populacionais do estado. Em gestantes consideradas de baixo risco foi encontrada inadequação dietética em 12,4% das entrevistadas, segundo o método de inquérito dietético frequência de consumo semi-quantitativo (Coelho et al, 1995). Ramalho et al., (1999) encontraram inadequação das concentrações séricas de retinol de 23,6% e 55,7% em puérperas e recém-nascidos (RN), respectivamente. Em outro estudo observou-se inadequação das concentrações séricas de retinol e inadequação na ingestão dietética de vitamina A em 12,5% e 14,8% das gestantes, respectivamente, durante o terceiro trimestre de gestação (Accioly & Souza-Queiroz, 2000). A cegueira noturna gestacional foi descrita em 17,9% de puérperas atendidas em maternidade pública do Rio de Janeiro e tal sintoma ocular foi associado com concentrações séricas inadequadas de retinol. As mulheres de maior risco para a DVA segundo o indicador funcional (cegueira noturna) foram as com menor número de consultas do pré-natal e história de aborto (Saunders et al, 2004).

Em estudo realizado no Rio de Janeiro por Gomes (2004) em puérperas de baixo risco, foi descrita prevalência de DVA de 25,4% e 46,2%, em puérperas e RN respectivamente, assim como de inadequação de carotenóides (52,3% e 92,6% para

puérperas e RN, respectivamente). Contudo não são encontradas associações dessa carência nutricional com a antropometria materna (peso pré-gestacional e adequação do ganho de peso total) (Ramalho et al, 2001) ou com suas características sociodemográficas (idade, escolaridade e renda familiar) (Ramalho et al, 2006). Tais resultados sugerem que as medidas de intervenção e prevenção devem ser implementadas na atenção pré natal para todas as gestantes independente de seu estado nutricional ou condição sócio-econômica.

A magnitude da hipovitaminose A é uma preocupação mundial. Observam-se estudos de prevalência em diversos países como forma de sinalizar a gravidade e facilitar a instituição de políticas e medidas de combate. Na Nigéria as prevalências variam de 21 a 28% de acordo com a área do país estudada (Maziya-Dixon, 2006). Em uma província da China em estudo realizado com crianças de zero a quatro anos, a deficiência foi detectada em 3,08% dos indivíduos e a deficiência marginal em 7,28% (Yang et al, 2007). Em estimativa realizada no sul da África no ano 2000 pelo Grupo Consultivo em Vitamina A Sul Africano, foi observado que um terço das crianças de zero a quatro anos e em torno de 3,5% das gestantes possuíam estado carencial. Nesse mesmo ano 3000 mortes por causas infecciosas (diarréia, sarampo e malária) foram atribuídas a hipovitaminose A (Nojilana, 2007). Em um município da Colombia (Funza) a prevalência de hipovitaminose A em escolares foi de 4,6% (Poveda, 2007). Localidades como Estados Unidos e Europa, por não serem consideradas áreas de risco, apresentam escassos estudos sobre a DVA no grupo materno-infantil (Milagres et al, 2007).

Apesar dos constantes alertas divulgados por diversos estudos as prevalências mantêm-se preocupantes e há unanimidade em defender a suplementação com vitamina A como forma de tratamento e prevenção à carência em questão (Maziya-Dixon, 2006; Yang et al, 2007; Nojilana, 2007; Poveda, 2007).

2.4. Indicadores do estado nutricional de vitamina A

Diante do impacto da DVA na saúde, especialmente no grupo materno-infantil, é fundamental a detecção da deficiência nos indivíduos ou comunidades em risco, sobretudo, por meio de indicadores confiáveis e que sejam capazes de retratar, com fidedignidade, a situação de saúde e nutrição do grupo estudado. Alguns dos atributos desejáveis para os indicadores são: validade e confiabilidade, capacidade para diagnóstico precoce (deficiência subclínica), simplicidade metodológica, boa cobertura, representatividade, aceitabilidade, baixo custo, e que seja facilmente incorporável às rotinas de saúde, principalmente quando os recursos são escassos (OPS, 1989; WHO, 1996; McLaren & Frigg, 1999; Gaze & Perez, 2002; Vermelho et al, 2002; Coelho, 2003).

Em 1996 a WHO salientou a necessidade de proposição de guias para seleção, uso e interpretação adequados dos indicadores, não só para mapeamento como também para proposição e avaliação de programas de controle da carência de vitamina A.

Os indicadores atualmente utilizados são: clínico (xerofthalmia); funcional (cegueira noturna); bioquímicos (retinol sérico, retinol do leite materno, proteína ligadora de retinol – RBP- , resposta relativa a dose, resposta relativa a dose modificada, resposta sérica de 30 dias); histológico (impressão citológica da conjuntiva); ecológicos (aleitamento materno, indicadores antropométricos, hábitos alimentares, história alimentar, história vacinal, prevalência de doenças, variáveis sócio-econômicas) (WHO, 1996; McLaren & Frigg, 1999).

O indicador clínico é um indicador tardio indicando evolução da carência para estágio avançado, com alterações anatômicas e lesões frequentemente irreversíveis, portanto, inadequado para implementação de medidas de prevenção (WHO, 1996).

Os indicadores bioquímicos são indicadores precoces capazes de identificar carência subclínica. Contudo a maioria é considerada invasiva por depender de punção venosa. Além disso, a dosagem bioquímica pode representar custo elevado (WHO, 1996). O retinol sérico é internacionalmente recomendado como indicador para avaliação da prevalência de DVA embora não seja um método de mensuração direta das reservas hepáticas (Gorstein et al,

2007). Entretanto, possui a desvantagem de estar em homeostase constante com as reservas orgânicas e reflete os estoques do organismo apenas quando estão muito baixos ou muito altos (WHO, 1996). Apesar disso é considerado um método confiável e prático para uso de rotina desde que sejam seguidos procedimentos rigorosos para sua quantificação (Sommer & Davidson, 2002). A concentração de retinol no leite materno é um método bioquímico considerado pouco invasivo e de boa aceitação capaz de refletir o estado nutricional de vitamina A materno e do recém-nascido. A concentração de vitamina A, porém, varia de acordo com o período de lactação e durante uma mesma mamada dificultando a interpretação dos resultados (WHO, 1996).

A dosagem de RBP oferece as mesmas limitações da dosagem de retinol sérico por refletir as concentrações séricas de retinol e não determinar a reserva hepática de vitamina A (Gorstein et al, 2007). Em prematuros a imprecisão é ainda maior porque a transferência placentária de RBP ocorre no final da gestação e por haver evidências de que o fígado do feto só começa a sintetizar RBP no último quartil gestacional. Nesse caso baixas concentrações de RBP podem refletir baixa síntese e/ou imaturidade hepática e reduzida transferência através da placenta (Weinman et al, 2007). A resposta relativa à dose embora seja validada como o método indireto capaz de refletir as reservas hepáticas, possui limitações logísticas por necessitar de duas amostras de sangue com intervalo de 5 horas. Torna-se difícil manter crianças com suas mães à disposição do pesquisador por 5 horas. A resposta relativa à dose modificada reduz a dificuldade metodológica por dispensar coleta de amostras de sangue no tempo “zero”. Por outro lado gera aumento de custos pela necessidade de administração de um derivado da vitamina A (didehidroretinol) dificultando a realização de estudos populacionais (Underwood, 2004).

O indicador funcional (cegueira noturna) é considerado simples e pouco invasivo e foi validado segundo a concentração de retinol sérico em pré escolares por Sommer et al (1980) e em puérperas por Saunders et al (2005a) e Katz et al (1995). Embora validado para a faixa pré-escolar, é considerado mais preciso questionar a mãe sobre a ocorrência de

cegueira noturna durante sua gestação do que questionar os pais sobre sua ocorrência em crianças nessa idade. O questionamento à mulher pode refletir o estado nutricional de vitamina A da criança se for avaliado até 3 anos após a gestação que deu origem a criança em questão (Sommer & Davidson, 2002).

Os indicadores ecológicos são considerados métodos indiretos e não devem ser utilizados isoladamente, sendo recomendada a associação a outros métodos de diagnóstico (WHO, 1996). São exemplos de indicadores ecológicos: indicadores populacionais do estado nutricional e dietético (história de aleitamento materno, estado nutricional de menores de cinco anos, peso ao nascer, disponibilidade de alimentos, hábitos alimentares de grupos vulneráveis, frequência de consumo de alimentos semiquantitativa e qualitativa); indicadores relacionados com enfermidades em pré-escolares (taxa de prevalência de enfermidades, taxa de cobertura de imunização, taxa de casos fatais de sarampo); indicadores socioeconômicos (grau de escolaridade materna, renda, abastecimento de água, saneamento da moradia, entre outros) (McLaren & Frigg, 1999; WHO, 1996). A taxa de mortalidade em menores de cinco anos (U5MR) é uma proposta de indicador alternativo, recentemente sugerido para avaliação da DVA na população, quando as informações obtidas a partir dos outros indicadores não estão disponíveis (Schulnik, 2002).

O padrão ouro para avaliação da DVA continua sendo a avaliação da reserva hepática de retinol por biópsia. Porém é um método de difícil utilização em indivíduos vivos por razões éticas sendo indicado para estudos em indivíduos necropsiados para identificar áreas e grupos populacionais de risco (Underwood, 2004).

Dada a magnitude da carência e as limitações inerentes a cada método, os estudos sobre indicadores continuam. Nesse cenário a placenta surge como um potencial marcador do estado nutricional de vitamina A no binômio mãe-filho, sem apresentar as variações como observadas no retinol sérico e no leite humano, além de ter facilidades metodológicas, pois, quanto a coleta de amostras placentárias, pode-se considerar que é um método não invasivo.

2.5. Papel da placenta na transferência materno-fetal de vitamina A

Até 1950, a maioria dos estudos que objetivaram descrever o estado nutricional de vitamina A maternos e fetais era pautada na determinação das concentrações plasmáticas de retinol e carotenóides. A placenta começou a ganhar destaque no fim da década de 1940, quando se iniciaram os estudos sobre o transporte materno-fetal de vitamina A em animais e humanos (Barnes, 1951; Coelho, 2003).

A partir de uma observação feita com 20 puérperas, constatou-se não haver correlação entre os teores de vitamina A e de lipídeos da placenta, sugerindo-se que esse órgão não atuava como depósito para a vitamina A. Além disso, foi sugerido que os carotenóides representavam a principal forma de transferência de vitamina A para o feto regulada pela concentração de vitamina A plasmática fetal e independente da placenta (Barnes, 1951; Coelho, 2003).

Embora o principal grupo atingido pela DVA seja o materno-infantil, existem ainda escassas informações acerca da transferência da vitamina A para o feto, da associação entre as concentrações séricas de retinol com as concentrações placentárias bem como sobre a distribuição intraplacentária de vitamina A. Alguns autores discutem a suposta regulação exercida pela placenta através da análise das concentrações séricas de vitamina A materna e fetal, e já é descrita há algum tempo a presença de receptores para a vitamina na membrana da borda em escova da placenta (Barnes, 1951; Dimenstein et al, 1996; Sundaram et al, 1998). Dimenstein et al (1996) avaliando a transferência de vitamina A através da placenta observaram correlação positiva entre as concentrações de beta-caroteno e retinol na placenta no grupo com estado nutricional de vitamina A subadequado ($\leq 20\mu\text{g/dl}$). Este fato, juntamente com a detecção da atividade da enzima de clivagem do beta-caroteno reforçou a hipótese de conversão do mesmo em retinol na placenta. Posteriormente outros estudos confirmaram a existência de enzimas responsáveis pela esterificação dos retinóides e de proteínas carreadoras dos mesmos reforçando o papel metabólico da placenta (Sapin et al, 2000b; Marceau et al, 2006; Kawaguchi et al, 2007).

Contudo sendo o retinol, o retinaldeído e o ácido retinóico lipossolúveis, necessitam de proteínas carreadoras para que possam ser transportados no meio sérico (Marceau et al, 2006). Várias dessas proteínas já foram identificadas dentre elas a proteína celular carreadora de retinol 1 e 2 (CRBP 1 e 2) e a proteína celular carreadora de ácido retinóico 1 e 2 (CRABP 1 e 2) (Marceau et al, 2006). Desde a década de 1970 já se conhece o receptor de RBP nas células epiteliais do intestino (Kawaguchi et al, 2007). Nas últimas três décadas vêm sendo acumuladas evidências da existência de receptores de RBP em outros tecidos incluindo a placenta (Sapin et al, 2000b; Kawaguchi et al, 2007). Cerca de 99% do retinol sérico encontra-se ligado a RBP (Johansson et al, 1999). Em humanos a perda de função de RBP está associada ao aparecimento de sinais de carência de vitamina A como cegueira noturna e atrofia progressiva do epitélio pigmentado da retina confirmando a dependência da proteína carreadora para o transporte da vitamina (Kawaguchi et al, 2007).

Acredita-se que a CRBP I possui atuação importante no metabolismo intracelular de retinol tanto na formação dos metabólitos ativos de ácido retinóico quanto no estoque e liberação do retinol (Johansson et al, 1999). Este receptor assim como o mRNA que codifica a RBP são encontrados na placenta tanto no início quanto no final da gestação (Johansson et al, 1999).

Durante os primeiros estágios de desenvolvimento a placenta atua como um fígado primitivo estocando retinol e aguardando a maturação hepática marcada pela capacidade de produzir e secretar RBP. É ainda demonstrado que a capacidade de esterificação dos retinóides pela placenta no momento do parto é residual quando comparada à atividade existente no início do desenvolvimento embrionário e fetal. Levando-se em consideração sua capacidade de rápido armazenamento de ésteres de retinil, a placenta pode ser considerada um eficiente controlador da transferência materno-fetal de retinol. Isso se dá pelo fornecimento de retinol quando o consumo materno é deficiente e pela proteção do feto de potenciais excessos de retinol materno. Por esse mecanismo a placenta exerce proteção contra efeitos teratogênicos. Porém esse mecanismo é limitado a variações fisiológicas das

concentrações de retinol, sendo anulado por ingestão medicamentosa ou dietética que resultem em quadros de hipervitaminose A materna (Sapin et al, 2000b).

A função de barreira é também reforçada pela alta concentração de receptores de RBP no tecido placentário. Esta é uma característica de células que possuem *tight junctions* ou formam uma barreira entre o plasma e o líquido intersticial. A expressão de RBP na placenta só é comparável a da retina. Tecidos como rim e fígado possuem atividades correspondente a cerca de 20% da atividade da retina, enquanto que pulmões e tecido muscular apenas 10% (Smeland, et al, 1995).

Contudo, as concentrações de retinol nas placentas humanas têm sido pouco utilizados para a avaliação do estado nutricional de vitamina A no grupo materno-infantil, ainda que a placenta seja uma importante via de obtenção deste nutriente para o feto (Saunders et al, 2005b).

A inexistência de metodologia definida para padronização de coleta e análise das concentrações placentárias de vitamina A, levaram Saunders et al. (2005b) a propor uma metodologia de coleta e análise. No referido estudo não foi observada diferença significativa nos teores de retinol nas diferentes porções de placenta analisadas. Dessa forma, qualquer porção desse anexo embrionário pode ser usada na determinação das concentrações de retinol. Outro achado de relevância é a constatação da estabilidade da vitamina A da placenta ao congelamento, o que representa uma certa facilidade na implantação da padronização dos procedimentos de coleta e análise de amostras. Tais achados representam a possibilidade de diminuição dos custos requeridos nos estudos de campo, pois, dispensa a necessidade de profissional altamente qualificado para a coleta, viabilizando os estudos de avaliação do estado nutricional de vitamina A, com esse possível indicador. Outra vantagem seria a determinação do estado nutricional do binômio mãe-filho com uma única amostra o que representaria redução significativa dos custos.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando a magnitude mundial da DVA e as conseqüências da deficiência para a saúde dos indivíduos, a adoção no campo da saúde pública de indicadores que apresentem facilidade metodológica para o diagnóstico, que tenham caráter subclínico, sejam pouco invasivos, de baixo custo e culturalmente aceitos, deve ser uma prioridade do setor saúde.

Nesse sentido questões relacionadas à distribuição intraplacentária de carotenóides, análise da associação entre as concentrações séricas de retinol maternas e dos recém-nascidos com os teores de retinol da placenta; investigação da associação entre outros indicadores do estado nutricional de vitamina A (ex: indicador funcional) e os teores de retinol nas placentas, precisam ser melhor investigadas. A elucidação de tais questões pode impulsionar a construção do indicador “inadequação de vitamina A na placenta” como “preditivo” do estado nutricional de vitamina A em puérperas e recém-nascidos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

↪ Avaliar o estado nutricional de vitamina A em puérperas e recém-nascidos (RN), segundo os indicadores bioquímico (retinol e carotenóides séricos) e funcional (cegueira noturna gestacional) e a sua associação com as concentrações placentárias de retinol e carotenóides.

4.2. Objetivos específicos

- ↪ Descrever a distribuição intraplacentária de carotenóides;
- ↪ Avaliar a estabilidade do retinol placentário à temperatura ambiente e exposição à luminosidade;
- ↪ Avaliar a correlação entre as concentrações de retinol e carotenóides do sangue de puérperas e do cordão umbilical com os teores de vitamina A placentários;
- ↪ Avaliar a associação entre o indicador funcional (cegueira noturna) e as concentrações placentárias de retinol e carotenóides;
- ↪ Estabelecer valor de concentração de retinol e carotenóides placentários representativo da DVA nas puérperas e RN;
- ↪ Descrever as concentrações de retinol e carotenóides placentárias segundo a presença ou ausência de cegueira noturna gestacional;
- ↪ Descrever os teores de vitamina A placentários, segundo as concentrações séricas de retinol; variáveis obstétricas (história de aborto, intervalo intergestacional, intercorrências

gestacionais); socio-econômicas (idade materna, estado civil, escolaridade, condições de saneamento) e da assistência pré-natal (número de consultas do pré-natal).

↳ Comparar as concentrações de retinol placentário em uma subamostra por dois métodos de quantificação bioquímica: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) e Espectrofotometria.

5. MÉTODOS

O presente trabalho é parte integrante da pesquisa realizada pelo NPqM/INJC/UFRJ, intitulada “*Deficiência de Vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição intraplacentária de retinol* (Coelho, 2003), realizada no período de abril de 1999 a janeiro de 2003, na Maternidade Escola (ME) da UFRJ.

A seguir será descrito o método empregado por ocasião da concepção do estudo e da coleta de dados.

5.1. Desenho do estudo

Conforme o desenho escolhido para a seleção da amostra e procedimentos analíticos e estatísticos trata-se de um estudo transversal (Hennekens & Buring, 1987).

5.2. População e Amostra

A população estudada foi constituída por puérperas de baixo risco acompanhadas pelo Serviço de Assistência Pré-natal da ME/UFRJ, sendo selecionada uma amostra de 262 mulheres, segundo os critérios: gestação de feto único, ausência de doenças clinicamente comprovadas com início prévio à gestação (diabetes mellitus, hepatopatias, cardiopatias, nefropatias), não utilização durante a gestação de suplementos vitamínico-minerais que contivessem vitamina A.

5.3. Coleta de Dados

Foram convidadas a participar do estudo, as parturientes/puérperas internadas no Centro Obstétrico da ME/UFRJ, nos dias de plantão das equipes de entrevistadores e que atendiam aos *critérios de inclusão*. A coleta de dados ocorreu em três a quatro turnos semanais de plantões de seis horas, em dias da semana alternados e sendo incluídos dias do final de semana e plantões no horário noturno.

As voluntárias foram informadas da não existência de recompensa de qualquer natureza pela participação no estudo, a não ser o diagnóstico do estado nutricional de vitamina A, orientação nutricional e a suplementação terapêutica de vitamina A para os casos de DVA, não havendo qualquer prejuízo no caso de recusa em participar ou da interrupção de sua participação em qualquer momento do estudo em questão, sendo coletados os dados após consentimento por escrito das mesmas. Na ocasião do parto foram obtidos dados das puérperas e dos RN concebidos na instituição.

Independente do resultado da avaliação do estado nutricional de vitamina A, todas as participantes receberam correspondência informando o resultado da dosagem bioquímica. Àquelas com diagnóstico de DVA foi oferecido tratamento com suplementação de vitamina A, dentro dos limites seguros para o grupo (OMS, 1998).

Adicionalmente foram colhidas informações pertinentes da mãe como dados pessoais, história obstétrica, dados sócio-econômicos, dados antropométricos maternos e dos RN, por consulta aos prontuários, do cartão da gestante e entrevista com as puérperas.

5.4. Instrumento

O instrumento empregado na coleta de dados foi constituído de formulário com perguntas fechadas, abertas e semi-abertas, preenchido pelo pesquisador por meio de entrevista pessoal e consulta aos prontuários, após a assinatura do termo de consentimento pela integrante do estudo. Este instrumento foi submetido à pré-teste, em estudo piloto realizado em 35 gestantes com as mesmas características da população a ser estudada. Foi elaborado manual de instruções para preenchimento dos questionários contendo também soluções para possíveis dúvidas por parte dos entrevistadores (Coelho, 2003).

5.5. Treinamento de Pesquisadores

As equipes de trabalho foram compostas por pesquisadores, alunos de pós-graduação, bolsistas de iniciação científica e de apoio técnico, estagiários voluntários e pelo

técnico de laboratório do NPqM/INJC/UFRJ, capacitado para dosagem de retinol e carotenóides.

Toda a equipe foi supervisionada e reciclada periodicamente pelo pesquisador responsável, visando à obtenção de dados seguros e fidedignos.

5.6. Coleta e Análise das amostras de placentas

A obtenção e pesagem das placentas foram realizadas imediatamente após o parto e separação do RN (Thomson et al, 1969; Saunders et al, 2005b).

Antes da obtenção das amostras da placenta, fez-se a separação da membrana amniocoriônica e do cordão umbilical. Foram obtidas 6 (seis) amostras de 5g de cada placenta, sendo 2 (duas) da porção materna lateral, 1 (uma) da porção materna central além de, 2 (duas) da porção fetal lateral e 1 (uma) da porção fetal central, por incisão realizada com bisturi cirúrgico, em ambiente com pouca luminosidade (Barreto-Lins et al, 1988; Saunders et al, 2005b). O tratamento, armazenamento e transporte das amostras seguiu os procedimentos descritos por Saunders et al (2005b).

Uma sub-amostra foi mantida em temperatura ambiente e sem proteção à luminosidade tendo os teores de retinol quantificados 1 e 24 horas após o parto a fim de ser avaliada a estabilidade de retinol e carotenóides no tecido placentário. Os tempos utilizados visaram estabelecer o menor período entre o parto e a quantificação dos teores de vitamina A e compará-los ao maior período em que a concentração de vitamina A mantém-se estável, sem a presença de degradação tecidual. Este procedimento visou viabilizar o órgão para fins de estudos epidemiológicos sobre o estado nutricional de vitamina A.

Posteriormente, a fim de complementar o estudo foi coletada uma sub-amostra de 9 porções placentárias sendo as quantificações sérica do retinol e carotenóides também foram realizadas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV). Os valores séricos de retinol e carotenóides obtidos foram comparados com os pontos de corte para normalidade propostos pela WHO (1996) e SAUBERLICH et al, (1974) .

5.7. Avaliação Bioquímica das concentrações de Vitamina A

Para determinação das concentrações de retinol e carotenóides séricos materno e dos RN, foi coletada amostra de 5ml de sangue obtida por punção venosa das puérperas, em jejum, bem como amostra do sangue de cordão umbilical dos RN, imediatamente após o parto (Ramalho et al, 1999 Saunders et al, 2005b).

As amostras de sangue obtidas, foram centrifugadas (3000rpm) para separação e extração do soro e imediatamente congeladas à uma temperatura de -20 °C, no laboratório de patologia clínica da ME/UFRJ. Posteriormente, todas as amostras foram acondicionadas a fim de garantir a manutenção da temperatura durante seu transporte ao INJC/UFRJ onde foram mantidas congeladas até o momento da análise das concentrações de retinol e carotenóides no Laboratório de Bioquímica desta instituição.

A determinação das concentrações de retinol e carotenóides séricos e placentários foi realizada por dosagem espectrofotométrica com base no método Bessey et al (1946) modificado segundo Araújo & Flores (1978) e conforme os procedimentos adotados por Flores et al (1988) para a dosagem de vitamina A hepática. Todas as amostras foram dosadas em duplicata, com as precauções recomendadas pelo International Vitamin A Consultative Group (IVACG), para assegurar a qualidade das amostras antes da análise (Arroyave et al., 1982; Barreto-Lins et al, 1988). Este método consiste na saponificação das amostras com KOH 1N para a remoção de lipídios e proteínas do soro. A extração da vitamina A total foi feita com 2 volumes da mistura de 1:1 de xilol e querosene (Araújo & Flores, 1978; Flores et al., 1988).

A subamostra que obteve análise também por HPLC seguiu a técnica descrita por Hess et al. (1991). O método consiste na extração de retinol com hexano, após saponificação. A seguir, por meio de centrifugação, separa-se a fase orgânica (sobrenadante) e evapora-se o extrato de solvente com gás inerte (nitrogênio), redissolvendo o resíduo em metanol. Após essas etapas, injeta-se a solução redissolvida na coluna do cromatógrafo, registrando-se a área de pico cromatográfico e o tempo de

retenção de cada composto identificado pelo aparelho. Determina-se a concentração de retinol ($\mu\text{g}/\text{dl}$) utilizando os dados obtidos no gráfico da curva padrão, correlacionando a área de pico cromatográfico versus a quantidade de soluto injetado na coluna. Visto que o retinol não é padrão primário, a padronização depende da determinação da concentração de uma solução de acetato de retinol em metanol, construindo-se uma curva padrão, segundo os procedimentos do controle de qualidade recomendados pelo IVACG (Arroyave et al., 1982). A análise foi realizada pelo laboratório Sérgio Franco através de convênio firmado entre o referido laboratório e o grupo de pesquisa.

Adotou-se o ponto de corte $<1,05\mu\text{mol}/\text{L}$ de retinol sérico ($<30\mu\text{g}/\text{dl}$) para indicar DVA (Christian et al., 1998; Biswas et al, 2000; Flores et al., 1991; WHO, 1996). Para indicação de inadequação de carotenóides adotou-se o ponto de corte $<80\mu\text{g}/\text{dl}$ para puérperas (Sauberlich et al, 1974 apud Oliveira & Marchini, 1994) e $<40\mu\text{g}/\text{dl}$ para RN. (Sauberlich et al, 1974 apud Oliveira & Marchini, 1994; Robles-Sardin, 1998).

5.8. Avaliação funcional (cegueira noturna gestacional)

Na avaliação funcional da DVA, foi investigada a presença de cegueira noturna gestacional por meio de entrevista padronizada (quadro 1) modificada (Saunders et al, 2005b), segundo recomendações da OMS (WHO, 1996) e OPS (McLaren & Frigg, 1999).

Quadro 2: Avaliação Funcional

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Dificuldade para enxergar durante o dia?2. Dificuldade para enxergar com pouca luz ou à noite?3. Tem cegueira noturna? |
|---|

Foram considerados casos de cegueira noturna, aqueles em que a entrevistada relatava dificuldade em enxergar com pouca luz ou à noite durante o período gestacional e

não apresentava dificuldade em enxergar durante o dia, ou seja, quando a resposta da pergunta 1 foi *Não* e ao menos uma resposta das perguntas 2 ou 3 foram *Sim* (Christian et al, 1998; 2000; Katz et al, 1995, McLaren & Frigg, 1999; WHO, 1996). Caso a entrevistada apresentasse algum problema ocular corrigido por óculos ou lente de contato, era questionada a capacidade de visão com o uso destes.

Foi explicado para a entrevistada que o termo *cegueira noturna* tratava-se de uma alteração do padrão habitual de visão com pouca luz ou à noite na gestação atual, e da dificuldade de adaptação da visão na mudança de um ambiente claro para um escuro, adotando-se como referência o padrão de visão noturna no período pré-gestacional (Saunders et al.,2004; 2005a).

5.9. Idade gestacional

Tendo em vista que a transferência de vitamina A durante a vida intra-uterina processa-se em sua maior parte durante o 3º trimestre gestacional, os RN foram categorizados segundo a idade gestacional para permitir avaliação das concentrações placentárias de vitamina A segundo a referida variável. Foram classificados como nascidos a termo os RN com idade gestacional ente 37 e 41 semanas e 6 dias, pré-termo os que apresentavam idade gestacional inferior a 37 semanas e pós-termo os que apresentavam idade gestacional igual ou superior a 42 semanas (CLAP, 1988).

5.10. Questões Éticas

O estudo foi realizado através de acordo institucional entre o NPqM/INJC/UFRJ e a Maternidade Escola da UFRJ. A coleta de dados ocorreu após a aprovação da comissão de ética da referida maternidade e do comitê de ética da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

5.11. Qualidade dos dados

Para avaliação da qualidade dos dados realizou-se a avaliação da confiabilidade de aplicação, medindo-se a equivalência dos resultados obtidos com a aplicação de um mesmo instrumento por entrevistadores diferentes, para um mesmo indivíduo integrante do estudo. Foram verificados bons índices de concordância entre os entrevistadores para as variáveis avaliadas ($ICC > 0,92$ e $k > 0,65$) (Coelho, 2003; Saunders et al, 2004).

5.12. Plano de utilização de variáveis

Do universo de variáveis coletadas para o projeto de pesquisa “*Deficiência de Vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição intraplacentária de retinol*” (Coelho, 2003), foram selecionadas para o presente trabalho as seguintes:

↳ *Variáveis dependentes*: concentrações placentárias de retinol e carotenóides (contínuas) nas diferentes porções.

↳ *Variáveis independentes*: concentrações de retinol (pontos de corte: $1,05 \mu\text{mol/l}$ e $0,70 \mu\text{mol/l}$) e carotenóides séricos de puérperas (ponto de corte $80 \mu\text{g/dl}$) e do cordão umbilical (ponto de corte $80 \mu\text{g/dl}$), peso da placenta (contínua), cegueira noturna gestacional (presente e ausente), peso pré-gestacional (contínua), estatura (contínua), ganho de peso total (contínua), peso ao nascer (contínua), comprimento ao nascer (contínua), idade materna (<20 anos, 20-34 anos, ≥ 35 anos), escolaridade (analfabeta, ensino fundamental incompleto/completo, ensino médio incompleto/completo, ensino superior incompleto/completo), estado marital (com ou sem companheiro), condições de saneamento (adequada - esgoto, lixo, água encanada; inadequada - um dos serviços ausentes).

5.13. Tratamento Estatístico

Iniciou-se a análise dos dados com uma avaliação exploratória, identificação e exclusão dos *outliers* (valores extremos) de retinol sérico materno e dos recém-nascidos, e

de retinol das placentas, definidos como média mais ou menos três desvios padrões (Hair et al, 1995). Com isso, foram excluídos os casos de retinol sérico com valores 3,83 μ mol/l e 4,38 μ mol/l, respectivamente, observados em um recém-nascido e em uma puérpera. Na análise dos valores de retinol nas placentas, foram encontrados sete casos de valores extremos, sendo dois valores (17,17 μ g/g e 12,54 μ g/g) na porção fetal central; um valor (13,07 μ g/g) na porção fetal lateral 1; dois valores (18,13 μ g/g e 21,97 μ g/g) na porção materna central; um valor (7,92 μ g/g) na porção materna lateral 1; e um valor (4,54 μ g/g) na porção materna lateral 2. Com isso, tais casos foram excluídos (Coelho, 2003).

Para análise dos dados foram calculadas as medidas de tendência central e de dispersão, sendo empregado o teste do Qui-quadrado para avaliar a associação entre as variáveis categóricas. Os testes paramétricos t-Student e ANOVA foram empregados para verificação da igualdade das médias. A regressão linear foi empregada para verificação da correlação entre as concentrações séricas de vitamina A e as concentrações de retinol e carotenóides nas placentas. O teste T pareado foi utilizado para comparação dos dois métodos de dosagem bioquímica estudados. A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi utilizada para estabelecer as concentrações de retinol e carotenóides placentárias representativas das concentrações séricas dos mesmos através da análise dos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia. O nível de significância estabelecido foi $p \leq 0,05$.

A análise estatística foi efetuada através de programa estatístico SPSS for Windows versão 15.

6. REFERÊNCIAS

ACCIOLY, E. SOUZA QUEIROZ. Deficiencia de vitamina A en embarazadas asistidas en una maternidad pública en Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Chilena de Nutrición*, 2000; 27 (3): 316-319.

ARAÚJO, C.R.C., FLORES, H. Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clinical Chemistry*, 1978; 24: 386.

ARROYAVE, G., CHICHESTER, C.O., FLORES, H., GLOVER, J., MEJÍA, L. A., OLSON, J. A., SIMPSON, K. L., UNDERWOOD, B. A., Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status. International Vitamin A Consultative Group. The Nutrition Foundation, Washington. 1982; p. 92.

BARNES, A.C., The placental metabolism of vitamin A. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1951; 61: 368-372.

BARRETO-LINS, M.H.C., CAMPOS, F.A.C.S., AZEVEDO, M.N.A. A re- examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of standardized meal. *Clinical Chemistry*, 1988; 34(11): 2808-2810.

BAST, A., HAENEN, G.R.M.M., VAN DER BERG, R., VAN DER BERG, H. Antioxidant effects of carotenoids. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* 1998; 68: 399-403.

BAYDAS, G., KARATAS, F., GURSU, F., BOZKURT, HA., ILHAN, N., YASAR, A., CANATAN, H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archive of Medical Research*, 2002; 33: 276-280.

BESSEY, O.A., LOWRY, O.H., BROCK, M.J., LÓPEZ, J.A. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *Journal of Biological Chemistry*, 1946; 1: 177-188.

BIESALSKI, H.K., NOHR, D. Importance of vitamin A for lung function and development. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003; 24: 431-440.

BIESALSKI, H.K.; NOHR, D. Importance of vitamin-A for lung function and development. *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 24: 431-440

BISWAS, A.B., MITRA, N.K., CHAKRABORTY, I., BASU, S., KUMAR, S. Evaluation of vitamina A status during pregnancy. *Journal of Indian Medical Association*, 2000; 98(9): 525-529.

BOHLES, H. Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 1997; 67: 321-328.

BURRI, B.J. The formation of vitamin A from β -carotene: good, bad and variable. *Sight and life. Newsletter* 2001; 2.

CHAGAS, CB. Assistência nutricional pré-natal na prevenção e controle da deficiência de vitamina a e anemia em gestantes. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da UFRJ. Orientadores: Cláudia Saunders e Andréa Ramalho. Rio de Janeiro, dezembro, 2007. 111p.

CHRISTIAN, P. Maternal nutrition, health, and survival. *Nutrition Reviews*, 2002; 60: S59-S63.

CHRISTIAN, P., WEST, J.R.K.P., KHATRY, S.K., KATZ, J., LECLERQ, S.C., KIMBROUGH-PRADHAN, E., DALI, S.M., SHRESTHA, S.R. Vitamin A or β -carotene supplementation reduces symptoms of illness in pregnant and lactating women. *The Journal of Nutrition*, 2000; 130: 2675-2682.

CHRISTIAN, P., WEST, J.R.K.P., KHATRY, S.K., KATZ, J., SHRESTHA, S.R., KIMBROUGH-PRADHAN, E., LECLERQ, S.C., POKHREL, R.P. Night blindness of pregnancy in rural Nepal – nutritional and health risks. *International Journal of Epidemiology*, 1998; 27: 231-237.

CHRISTIAN, P., WEST, JR.K.P., KHATRY, S.K., KATZ, J., LeCLERQ, S.C., KIMBROUGH-PRADHAN, E., KATZ, J., SHRESTHA, S.R. Maternal night blindness increases risk of mortality in the first 6 months of life among infants in Nepal. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 1510-1512.

CLAP/OMS - CENTRO LATINOAMERICANO DE PERINATOLOGIA E DESENVOLVIMENTO HUMANO/ ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Saúde perinatal. Artigos selecionados de Salud Perinatal. Boletim do CLAP. Montevidéo: CLAP, 1998.

COELHO, C.S.P. Deficiência de vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição intraplacentária de retinol. Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP/FIOCRUZ [Tese de Doutorado em Ciências, área de concentração - Saúde Pública]. Orientadores: Maria do Carmo Leal e Rejane Andréa Ramalho Nunes da Silva. Rio de Janeiro, Dezembro, 2003. 198p.

COELHO, C.S.P., RAMALHO, R.A., ACCIOLY, E. Vitamina A: inquérito dietético na avaliação do estado nutricional em gestantes. *Ars Curandi Clínica Médica*, 1995; 28: 44-60.

DA SILVA, R., LOPES, J.R.E., SARNI, R.O.S., TADDEI, J.A.A.C. Níveis plasmáticos de vitamina A em crianças carentes com pneumonia na fase aguda e após a recuperação. *Jornal de Pediatria (RJ)*, 2005; 81(2):162-168.

DARBOE, M.K., THURNHAM, D.I., MORGAN, G., ADEGBOLA, R.A., SECKA, O., SOLON, J.A., JACKSON, S.J., NORTHROP, CLEWES, C., FULFORD, T.J., DOHERTY, C.P., PRENTICE, A.M. Effectiveness of an early supplementation scheme of high-dose vitamin A versus standard WHO protocol in Gambian mothers and infants: a randomized controlled trial. *Lancet*, 2007; 369: 2088-2096.

DIMENSTEIN, R., TRUGO, N.M.F., DONANGELO, C.M., TRUGO, L.C., ANASTÁCIO, A.S. Effect of subadequate maternal vitamin A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus. *Biology of the Neonate*, 1996; 69:230-234.

FERRAZ, I.S., DANELUZZI, J.C., ANNUCCHI, H., JORDÃO JR, A.A. Prevalência da carência de ferro e sua associação com a deficiência de vitamina A em pré-escolares. *Jornal de Pediatria (RJ)*, 2005; 81(2): 169-74.

FLORES, H., AZEVEDO, M.N.A., CAMPOS, F.A.C.S., BARRETO-LINS, M.H.C., CAVALCANTI, A.A., SALZANO, A., VARELA, R.M., UNDERWOOD, B. Serum vitamin A distribution curve for children aged 2-6 known to have adequate vitamin A status: a reference population. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1991; 40: 1281-1289.

FLORES, H., RAMALHO, R.A.G., RIBEIRO, A.R.L.P., Intrahepatic distribution of vitamin A in humans and rats. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 1988; 58: 276-280.

GAZE, R., PEREZ, M.A. Vigilância Epidemiológica. In: MEDRONHO, R. *Epidemiologia*, 2002; pp. 73-89, Rio de Janeiro: Atheneu.

GILBERT, C., AWAN, H. Blindness in children. *British Medical Journal*, 2003; 327: 760-761.

GOLDENBERG, R.L., The plausibility of micronutrient deficiency in relationship to perinatal infection. *Journal of Nutrition*, 2003; 133: 1645S-1648S.

GOMES, M.M. Retinol e carotenóides séricos e seu papel antioxidante em puérperas e recém-nascidos. Instituto de Nutrição – Universidade Federal do Rio de Janeiro [Tese de Mestrado em Nutrição Humana]. Orientadores: Elizabeth Accioly e Cláudia Saunders de Paiva Coelho. Rio de Janeiro, Setembro, 2004. 129p.

GOMES, M.M., SAUNDERS, C., ACCIOLY, E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 2005; 5 (3): 275-282.

GORSTEIN, J., DARY, O., SHELL-DUNCAN, B., QUICK, T., WASANWISUT, E. Feasibility of using retinol-binding protein from capillary blood specimens to estimate serum retinol concentration and the prevalence of vitamin A deficiency in low-resource settings. *Public Health Nutrition*, 2007; 11(5): 513-520.

GRAEBNER, I.T., SAITO, C.H., DE SOUZA, E.M.T. Biochemical assessment of vitamin A in schoolchildren from a rural community *Jornal de Pediatria (RJ)*, 2007;83(3):247-252.

HENNEKENS, C.H., BURING, J.E. Descriptive Studies. In: *Epidemiology in Medicine* (S.L. Mayrent), 1987; pp.100-131, Boston: Little, Brown and Company.

HESS, D., KELLER, H.E., OBERLIN, B., BONFANTI, R., SCHÜEP, W. Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1991; 61(3): 232-8.

IOM 2001. Dietary References Intakes for vitamin A vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington: National Academy Press, 2001; cap 4

IYENGAR, G.V., RAPP, A. Human placenta as a 'dual biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements Part 1: Physiology, function and sampling of placenta for Elemental characterisation. *The Science of the Total Environment*, 2001; 280: 195-206.

JOHANSSON, S., GUSTAFSON, A.L., DONOVAN, M., ERIKSON, U., DENKER, L. Retinoid binding proteins – expression patterns in the human placenta. *Placenta*, 1999; 20: 459-465.

KATZ, J., KHATRY, SK., WEST, JRKP., HUMPHREY, JH., LECLERQ, SC., PRADHAN, EK., POHKREL, RP., SOMMER, A. Night blindness is prevalent during pregnancy and lactation in rural Nepal. *Journal of Nutrition*, 1995; 125: 2122-2127.

KAWAGUCHI,R., YU, J., HONDA, J., HU, J., WHITELEGGE, J., PING, P., WIITA, P., BOK, D., SUN, H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*, 2007; 315: 820-825.

LONG, K.Z., ESTRADA-GARCIA, T., ROSADO, J.L., SANTOS, J.S., HAAS, M., FIRESTONE, M., BHAGWAT, J., YOUNG, C., UPONT, H.L., HERTZMARK, E., NANTHAKUMAR, N.N. The effect of vitamin A supplementation on the intestinal immune response in mexican children is modified by pathogen infections and diarrhea. *Journal of Nutrition*, 2006; 136: 1365-1370.

LOPES, R.E., RAMOS, K.S., BRESSANI, C.C., ARRUDA, I.K., SOUZA, A.I. Prevalência de anemia e hipovitaminose A em puérperas do Centro de Atenção à Mulher do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP: um estudo piloto. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 2006; 6(supl 1): S63-S68.

LOWE, G.M., VLISMAS, K., YOUNG, A. Carotenoids as prooxidants? *Molecular Aspects of Medicine*, 2003; 24: 363-369.

MAISON, J.B., LOTFI, M., DALMIYA, N., SETHURAMAN, K., DEITCHLER, M. The Micronutrient Report. Current progress and trends in the control of vitamin A, iodine, and iron deficiencies. Ottawa, Canada: The micronutrient Initiative/UNICEF, 2001.

MARCEAU, G., GALLOT, D., BOREL, V., LÉMERY, D., DASTUGUE, B., DECHELOTTE, P., SAPIN, V. Molecular and metabolic retinoid pathway in human amniotic membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 346: 1207-1216.

MARTINS, M.C., SANTOS, L.M.P., ASSIS, A.M.O. Prevalência de hipovitaminose A em pré-escolares no estado de Sergipe, 1998. *Revista de Saúde Pública*, 2004; 38(4): 537-542.

MAZIYA-DIXON, B.B., AKINYELE, I.O., SANUSI, R.A., OGUNTONA, T.E., NOKOE, S.K., HARRIS, E.W. Vitamin A deficiency is prevalent in children less than 5 y of age in Nigeria. *Journal of Nutrition*, 2006; 136: 2255–2261.

McLAREN, D.S., FRIGG, M. Manual de Ver y Vivir sobre los trastornos por deficiencia de vitamina A (VADD). Washington: OPS, 1999.

MILAGRES, R.C.R.M., NUNES, L.C., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2007; 12(5): 1253-1266.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), Secretaria de Atenção a Saúde: Vitamina A Mais-Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A: Condutas Gerais/ Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

MORRISS-KAY, G.M., SOKOLOVA, N. Embryonic development and pattern formation. *Faseb journal*, 1996; 10: 961-968.

NAGEL, E., VILSENDOR, A.M., BARTELS, M., PICHLMAYR, R. Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 1997; 67: 298-306.

NOJILANA, B., NORMAN, R., BRADSHAW, D., VAN STUIJVENBERG, M.E., DHANSAY, M.A., LABADARIOS, D. and the South African Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Estimating the burden of disease attributable to vitamin A deficiency in South Africa in 2000. *South African Medical Journal*, 2007; 97: 748-753.

OLIVEIRA, J.M., RONDÓ, P.H.C. Evidências do impacto da suplementação de vitamina A no grupo materno-infantil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2007; 23(11): 2565-2575.

OMS - Organisation Mondiale de la Santé - Supplémentation en vitamine A. Genève: OMS, 1998.

OPAS - Organización Panamericana de la Salud (OPS). Visión Integrada de la suplementación con vitamina A en las Américas. 2-4 de mayo del 2001, Managua, Nicaragua. Informe de la Reunión Regional. Washington: OPS; 2001. (HPP/HPN/MN/49-17).

OPAS (Organización Panamericana de la Salud), Conclusiones y recomendaciones. In: Vigilancia alimentaria y nutricional en las Américas. Una Conferencia Internacional, Mexico, 5-9 de septiembre de 1988, pp.7-14, Publicación Científica, 516. Washington: OPAS/OMS.

PAIVA, A.A., RONDÓ, P.H.C., GONÇALVES-CARVALHO, C.M.R., ILLISON, V.K., PEREIRA, J.A., VAZ-DE-LIMA, L.R.A., OLIVEIRA, C.A., UEDA, M., BERGAMASCHI, D.P. Prevalência de deficiência de vitamina A e fatores associados em pré-escolares de Teresina, Piauí, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 2006; 22(9):1979-1987.

PALOZZA, P., SERINI, S., NICUOLO, F.D., PICCIOI, E., CALVIELLO, G. Prooxidant effects of β -carotene in culture cells. Molecular Aspects of Medicine, 2003; 24: 353-362.

PASZKOWSKI, T., LAGÓD, L. The hole of oxidative stress in the pathogenesis of early pregnancy loss. Polish Journal of Gynaecologic Investigation, 2001; 3(4): 135-138.

POVEDA, E., CUARTAS, A., GUARÍN, S., FORERO, Y., VILLARREAL, E. Grupo de Nutrición, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia. Estado de los micronutrientes hierro y vitamina A, factores de riesgo para las deficiencias y valoración antropométrica en niños preescolares del municipio de Funza, Colombia. Biomédica, 2007; 27: 76-93

RADHIKA, M.S., BHASKARAM, P., BALAKRISHMA, N., RAMALAKSHMI, B.A., SAVITHA, D.E.V.I., SIVA KUMAR, B. Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2002; 109: 689-693.

RAHMATHULLAH, L., TIELSCH, J.M., THULASIRAJ, R.D., KATZ, J., COLES, C., DEVI, S., JOHN, R., PRAKASH, K., SADANAND, A.V., EDWIN, N., KAMARAJ, C. Impact of supplementing newborn infants with vitamin A on early infant mortality: community based randomised trial in southern India. British Medical Journal, 2003; 327: 254.

RAMALHO RA., PADILHA PC., SAUNDERS C. Análise Crítica de estudos brasileiros sobre Deficiência de Vitamina A no Grupo Materno-Infantil. Revista Paulista de Pediatria, 2008; 26(4): 392-399.

RAMALHO RA , SAUNDERS, C., COELHO, F. P., ACCIOLY, E., CARDOSO, L., NATALIZI, D. Estado nutricional de vitamina A de puérperas e recém-nascidos e estado antropométrico materno. Revista de Ciências Médicas, 2001;10(1):33-40.

RAMALHO, R.A., ACCIOLY, E., SILVA, L.M. Doenças cardiovasculares: efeito antioxidante das vitaminas A, C e E. Revista de Metabolismo e Nutrição, 2003; 7(1): 6-9.

RAMALHO, R.A., ANJOS, L.A., FLORES, H. Estado nutricional de vitamina A no binômio mãe/recém-nascido em duas maternidades no Rio de Janeiro, Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 1999; 49: 318-321.

RAMALHO, R.A., FLORES, H., ACCIOLY, E., SAUNDERS, C. Associação entre deficiência de vitamina A e sua situação sociodemográfica de mães e recém-nascidos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2006;52(3): 170-175.

RAMALHO, R.A., FLORES, H., SAUNDERS, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 2002; 12 (2): 117-122.

RAMALHO, RA , FLORES, H., ACCIOLY, E., SAUNDERS, C. Deficiência de Vitamina A no Brasil. *Revista da Sociedad Iberoamericana de Información Científica*, Buenos Aires, 2005; 1-09.

ROBERTS, J.M., BALK, J.L., BADNAR, L.M., BELIZÁN, J.M., BERGEL, E., MARTINEZ, A. Nutrient involvement in Preeclampsia. *Journal of Nutrition*, 2003; 133: 1684S-1692S.

ROBLES-SARDIN, A.E., ASTIAZARÁN-GRACIA, M., DÁVALOS-NAVARRO, R., QUIHUI-COTA, L., CABRERA-PACHECO, M., VALENCIA, M.E. Efecto de la suplementación con una dosis masiva de vitamina A en niños de 6 a 36 meses de edad. *Salud Pública de México*, 1998; 40 (4): 309-315.

ROUSE, D.J., Potential cost-effectiveness of nutrition interventions to prevent adverse pregnancy outcomes in the developing world. *Journal of Nutrition*, 2003; 133: 1640S-1644S.

RUMBOLD, A., DULEY, L., CROWTHER, C.A., HASLAM, R.R. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; 23(1):CD004227. Review.

SAPIN, V., ALEXANDRE, M.C., CHAÏB, S., BOURNAZEAU, J.A., SAUVANT, P., BOREL, P., JACQUETIN, B., GROLIER, P., LÉMERY, D., DASTUGUE, B., AZAIS-BRAESCO, V. Effect of vitamin A status at the end of term pregnancy on the saturation of retinol binding protein with retinol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000a; 71: 537-543.

SAPIN, V., CHAÏB, S., BLANCHON, L., ALEXANDRE-GOUABAU, M.C., LÉMERY, D., CHARBONNE, F., GALLOT, D., JACQUETIN, B., DASTUGUE, B., AZAIS-BRAESCO, V. Esterification of vitamin A by the human placenta involves villous mesenchymal fibroblasts. *Pediatric Research*, 2000b; 48: 565-572.

SARNI, R.S., KOCHI, C., RAMALHO, R.A., SCHOEPS, D.O., SATO, K., MATOSO, L.C.Q., XIMENES, C.F., SOUZA, F.I., DAMIANI, R.M. Vitamina A nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2002; 48(1): 48-53.

SAUBERLICH, H.E. et al, 1974 apud OLIVEIRA, J. E. D., MARCHINI, J. S. Levantamento bibliográfico de estudos bioquímico-nutricionais sobre micronutrientes realizados no Brasil. Cadernos de Nutrição da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, São Paulo 1994, 8: 31-67

SAUNDERS, C , LEAL, M. C. , FLORES, H. , SOARES, A. , LIMA, A. P. , LEITE, P. C., GOMES, M. M., SOUZA JR, P.R.B., RAMALHO, A. Intraplacental distribution of retinol. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2005b; 56(8):607-612.

SAUNDERS, C., LEAL, M.C., GOMES, M.M., CAMPOS, L.F.C., SILVA, B.A.S., LIMA, A.P.T., RAMALHO, R.A. Gestational night blindness in women treated at a public maternity hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Health, Population and Nutrition, 2004; 22(4): 348-356.

SAUNDERS, C., RAMALHO, R.A., LIMA, A.P.T., GOMES, M.M., CAMPOS, L.F., SILVA, B.A.S., SOARES, A.G., LEAL, M.C. Association between gestational night blindness and serum retinol in mother/newborn pairs in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Nutrition, 2005a; 21(4): 456-461.

SCHULTNIK, W. Use of under-five mortality rate as an indicator for vitamin A deficiency in a population. Journal of Nutrition, 2002; 32: 2881S-2883S.

SHARONE, Y., AGBARIA, R., AMIR, H., BEM-DOR, A., BOBILEV, I., DOUBI, N., GIAT, Y., HIRSH, K., IZUMCHENKO, G., KHANIN, M., KIRILOV, E., KRIMES, R., NAHUM, A., STEINER, M., WALFISCH, Y., WALFISCH, S., ZANGO, G., DANILENKO, M., LEVY, J. Modulation of transcriptional activity by antioxidant carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 2003; 24: 371-384.

SMELAND, S., BJERKNES, T., MALABA, L., ESKILD, W., NORUM, K.R., BLOMOFF, R. Tissue distribution of the receptor for plasma retinol-binding protein. Biochemistry Journal, 1995; 305: 419-424.

SOMMER, A. La carencia de vitamina A y sus consecuencias. Guía práctica para la detección y el tratamiento. Tercera edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1995

SOMMER, A., DAVIDSON, F.R. Assessment and Control of Vitamin A Deficiency: The Anney Accords. Journal of Nutrition, 2002;132: 2845S–2850S.

SOMMER, A.; HUSSAINI, G.; MUHILAL; TARWOTJO, I.; SUSANTO, D. & SAROSO, S. History of nightblindness: a simple tool for xerophthalmia screening. American Journal of Clinical Nutrition, 1980; 33: 887-891.

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 2003; 24: 345–351.

SUNDARAM, M., SIVAPRASADARAO, A., De SOUSA, M.M., FINDLAY, J.B.C. The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273: 3336-3342.

TARRADE, A., ROCHETTE-EGLY, C., GUIBOURDENCHE, J., EVAIN-BRION, D. The expression of nuclear retinoid receptors in human implantation. *Placenta*, 2000; 21: 703-710.

THOMSON, A.M., BILLEWICZ, W.Z., HYTTEN, F.E., The weight of the placenta in relation to birthweight. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth*, 1969; 76: 865-872.

UNDERWOOD, B.A. Vitamin A deficiency disorders: international efforts to control a preventable "pox". *Journal of Nutrition*, 2004;134: 231S–236S.

VERMELHO, L.L., COSTA, A.J.L. & KALE, P.L., Capítulo 3. Indicadores de Saúde. In: MEDRONHO, R. *Epidemiologia*, pp. 33-55, Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

VILLAMOR, E., FAWZI, W.W. Effects of Vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005; 18(3): 446–464.

VILLAR, J., MERIALDI, M., GÜLMEZOGLU, A.M., ABALOS, E., CARROLI, G., KULIER, R., ONI, M. Nutritional interventions during pregnancy for the prevention or treatment of maternal morbidity and preterm delivery: an overview of randomized controlled trials. *Journal of Nutrition*, 2003; 133: 1606S-1625S.

WEINMAN, A.R.M., JORGE, S.M., MARTINS, A.R., ASSIS, M.G.E., MARTINEZ, F.E., CAMELO, J.S. Assessment of vitamin A nutritional status in newborn preterm infants. *Nutrition*, 2007; 23: 454-460.

WEST, J.R.K.P. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *The Journal of Nutrition* 2002; 132: 2857S-2866S.

WILLIAMS, M.A., WOELK, G.B., KING, I.B., JENKINS, L., MAHOMED, K. Plasma carotenoids, retinol, tocopherols, and lipoproteins in preeclamptic and normotensive pregnant zimbabwean women. *American Journal of Hypertension*, 2003;16:665–672

WINKLHOFER-ROOB, M.B., ROCK, E., RIBALTA, J., SHMERLING, D.H., ROOB, J.M. Effects of vitamin E and carotenoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003; 24: 391–402.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programs. Geneva: WHO, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Reducción de la mortalidad materna. Declaración conjunta OMS/FNUAP/UNICEF/Banco Mundial. Ginebra: OMS; 1999. (Classificación NLM:HB 1322.5)

YANG, R., LI, R., MAO, S., SUN, L., HUANG, X., JI, C., ZHU, Z., WU, L., QIN, Y., ZHAO, Z. The survey of serum retinol of the children aged 0~4 years in Zhejiang Province, China. BMC Public Health, 2007; 7:264.

ZHANG,C., WILLIAMS, M.A., SANCHEZ, S.E., KING, I.B., WARE-JAUREGUI, S., LARRABURE, G., BAZUL, V., LEISENRING, W.M. Plasma concentrations of carotenoids, retinol, and tocopherols in preeclamptic and normotensive pregnant women. American Journal of Epidemiology, 2001;153:572–80.

7. ARTIGOS

ARTIGO 1:

Estabilidade e Distribuição Intraplacentária de Vitamina A

Autores:

Mirian Martins Gomes*

Andréa Ramalho*

Cláudia Saunders*

***Encaminhado à revista: International Journal of Nutrition and Food
Science em março/2009 (anexo 7)***

RESUMO

A placenta é um anexo embrionário importante na regulação do metabolismo e transferência de vitamina A durante a gestação. Contudo existem poucos estudos acerca da utilização do órgão para determinação do estado nutricional de vitamina A. Com o intuito de expandir tais conhecimentos o presente estudo pretende avaliar a distribuição intraplacentária de carotenóides e a estabilidade de retinol e carotenóides placentários à temperatura ambiente. Foram selecionadas 61 placentas das quais foram avaliadas seis porções (três da parte materna e três da parte fetal) para determinação da distribuição de carotenóides e analisou-se uma subamostra de 14 porções para estudo da estabilidade do retinol. As dosagens bioquímicas foram realizadas através de método espectofotométrico com base no método Bessey et al modificado e por HPLC. Os valores de carotenóides obtidos correlacionaram-se com o valor mais provável de cada placenta ($p < 0,002$). As concentrações de retinol e os carotenóides mostraram-se estáveis no tecido placentário por até 24 horas quando este foi mantido sem proteção à luminosidade ou temperatura ($p = 0,763$ e $p = 0,609$, respectivamente para retinol e carotenóides). Estes resultados podem contribuir para a definição da correlação entre as concentrações séricas de retinol materno e dos recém-nascidos e os teores da placenta e impulsionar os estudos de identificação dos teores de vitamina A da placenta como possível indicador do estado nutricional de vitamina A do binômio mãe-filho.

Palavras chave: placenta, vitamina A, retinol, carotenóides, puérperas, recém-nascidos

INTRODUÇÃO

A vitamina A possui papel importante no ciclo visual, crescimento, manutenção da diferenciação epitelial, reprodução e desenvolvimento fetal (Sapin et al, 2000). Ultimamente, porém, vem ganhando destaque a ação antioxidante tanto de retinol quanto de carotenóides (Baydas et al, 2002; Ramalho et al, 2003). O aumento da produção de radicais livres de oxigênio é documentado como sendo associada com a gênese de parto prematuro (Buhimschi et al, 2003; Gomes et al, 2005), aborto espontâneo habitual (Simsek et al, 1998; Paszkowski & Lagód, 2001), síndromes hipertensivas da gestação (Zhang et al 2001; Williams et al, 2003).

O feto é incapaz de sintetizar vitamina A sendo, portanto, dependente dos níveis circulantes maternos para atender suas necessidades. A presença de reserva hepática de vitamina A ao nascimento é indicativa da funcionalidade e importância do transporte placentário durante a gestação (Sapin et al, 2000).

A placenta é um órgão importante na regulação do metabolismo de vitamina A durante a gestação. Ainda que seja uma importante via de obtenção deste nutriente para o feto, as escassas informações de metodologia para padronização de coleta, armazenamento e análise das concentrações placentárias de vitamina A têm levado a pouca utilização das concentrações de retinol e carotenóides nas placentas humanas na avaliação do estado nutricional de vitamina A no binômio mãe-filho (Barnes, 1951; Dimenstein et al, 1996; Sapin et al, 2000; Sivaprasadarao & Findlay, 1988; Sundaram et al, 1998).

A compreensão das vias regulatórias de transferência da vitamina A transplacentários poderá contribuir para entendimento dos mecanismos envolvidos na avaliação do estado nutricional dessa vitamina impulsionando avanços no diagnóstico da carência no grupo materno-infantil. Para tal são necessários maiores detalhamentos metodológicos que permitam a determinação dessas concentrações. Neste sentido, são relevantes as contribuições metodológicas de Saunders et al (2005), que observaram que

qualquer porção placentária é representativa da quantidade total de retinol do órgão, visto não ter sido encontrada diferença significativa entre as concentrações teciduais de retinol nas diferentes porções estudadas.

No presente estudo, pretende-se avaliar a estabilidade de vitamina A em amostras de placentas mantidas em temperatura ambiente além de avaliar a distribuição intraplacentária de carotenóides na placenta com o intuito de aumentar o volume de informações sobre o tema em questão e fornecer subsídios para pensar a placenta como possível indicador da deficiência de vitamina A (DVA) no grupo materno-infantil

MATERIAIS E MÉTODOS

População e amostra

A população estudada foi constituída por puérperas de baixo risco acompanhadas pelo Serviço de Assistência Pré-natal na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (ME/UFRJ), município do Rio de Janeiro, Brasil. As puérperas foram selecionadas segundo os critérios: idade materna ≥ 20 anos; ausência de DVA (retinol sérico $\geq 1,05\mu\text{mol/l}$ e ausência de cegueira noturna gestacional); gestação de feto único, sem intercorrências ou má-formações congênitas; parto à termo (idade gestacional ≥ 37 semanas); ausência de enfermidades clinicamente comprovadas com início prévio à gestação (diabetes mellitus, hepatopatias, cardiopatias, nefropatias) e intercorrências gestacionais; não-utilização de suplemento vitamínico-mineral contendo vitamina A no período gestacional.

Para avaliação da distribuição intraplacentária de carotenóides foram selecionadas 61 puérperas das quais se obteve 6 amostras de cada placenta (três da porção materna e três da porção fetal).

Para estudo de estabilidade placentária de retinol foi selecionada uma amostra de 12 porções placentárias coletadas em momento posterior. O local de obtenção das porções foi

aleatório considerando-se que não há diferenças nas concentrações de retinol estatisticamente significantes nas diferentes porções placentárias (Saunders et al, 2005).

Tratamento das amostras

As amostras foram obtidas imediatamente após o parto, a separação do recém-nascido e a pesagem das mesmas. Foram considerados na pesagem, o cordão umbilical e a membrana amniocoriônica (Thomson et al., 1969).

Antes da obtenção das amostras das placentas, foi realizada a separação da membrana amniocoriônica e do cordão umbilical. Foram então obtidas, amostras de aproximadamente 5g através de incisão realizada com bisturi cirúrgico (Saunders et al, 2005), em ambiente com pouca luminosidade (Arroyave et al, 1982; Barreto-Lins et al, 1988).

As amostras das placentas foram lavadas com solução de cloreto de sódio 0,15M até a retirada total de sangue (Dimenstein et al, 1996) e foram submetidas aos procedimentos inerentes ao objetivo de cada estudo:

- *Estudo da estabilidade de retinol e carotenóides:* as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e sem proteção à luminosidade tendo os teores de retinol quantificados 1 e 24 horas após o parto. Os tempos utilizados visaram estabelecer o menor período entre o parto e a quantificação dos teores de vitamina A e compará-los ao maior período em que a concentração de vitamina A mantém-se estável, sem a presença de degradação tecidual. Este procedimento visou viabilizar o órgão para fins de estudos epidemiológicos sobre o estado nutricional de vitamina A.
- *Estudo da distribuição intraplacentária de carotenóides:* as amostras foram estocadas em freezer à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou inferior até o momento da dosagem bioquímica. Todas as amostras foram mantidas em potes individuais esterilizados, com proteção contra a luminosidade.

Quantificação das concentrações placentárias de retinol e carotenóides

As concentrações séricas da vitamina A foram determinadas segundo método espectrofotométrico de Bessey et al modificado por Araújo & Flores (1978), com as precauções necessárias para assegurar a qualidade das amostras antes da análise (Barreto, et al., 1988). As dosagens foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC/UFRJ).

Em uma subamostra de nove porções placentárias as concentrações de vitamina A foram determinadas também por cromatografia líquida de alta de alta eficiência (high performance liquid chromatography – HPLC) (Hess et al, 1991).

Análise estatística

Utilizou-se o teste t-Student e ANOVA para comparação de médias. O test t-Student pareado foi utilizado para comparação dos métodos de dosagem bioquímica.

Para estudo da distribuição intraplacentária de carotenóides foi calculada a médias das 6 porções para cada órgão sendo este definido como valor mais provável (VMP) de carotenóides em cada placenta. O valor de cada porção foi comparado ao VMP utilizando-se os testes F e t-Student.

O nível de significância adotado foi de 5%.

As análises foram realizadas através do programa SPSS for Windows versão 15.0.

Questões éticas:

A coleta de dados ocorreu depois de firmado o convênio institucional entre o Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes (NPqM) do INJC/UFRJ e a referida maternidade e de aprovado o projeto de pesquisa pela comissão de ética da ME/UFRJ e comitê de ética da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os

procedimentos da pesquisa foram elaborados segundo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (MS, 1998).

RESULTADOS

As puérperas participantes do estudo possuíam em média $26\pm 6,4$ anos, apresentaram peso pré-gestacional médio de $55,2\pm 9$ Kg e ganho de peso total $13,1\pm 5,4$ Kg. Seus recém-nascidos apresentaram peso ao nascer de $3266,5\pm 451$ g e as placentas pesaram em média $640\pm 143,9$ g.

Segundo resultados apresentados na tabela 1 observa-se não haver diferenças significativas entre as concentrações de retinol e carotenóides em placentas mantidas em temperatura ambiente por até 24 horas.

Ao avaliar a concentração de carotenóides nas diversas porções estudadas, observa-se que todas apresentam alta correlação com o VMP (tabela 2).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois métodos bioquímicos utilizados ($p=0,318$).

DISCUSSÃO:

A placenta caracteriza-se por ser o único órgão composto por células de dois indivíduos distintos (Iyengar & Rapp, 2001). A importância da vitamina A no metabolismo placentário vai além do desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual, metabolismo lipídico e diferenciação e proliferação celular. As placentas humanas expressam fatores de transcrição nuclear de receptores de ácido retinóico (RAR) e receptor X retinóico (RXR). A modulação desses fatores através do ácido retinóico é capaz de modular a expressão de vários genes como: hormônio gonadotrófico coriônico, hormônio lactogênio placentário, leptina, receptor de fator de crescimento epidermal (Marceau et al, 2006), triiodo-tironina (T3), estrogênio, progesterona, cortisol, aldosterona, testosterona, vitamina D, colesterol e ácidos graxos. (Sarni et al., 2002; Radhika et al, 2002; Burri, 2001).

A placenta possui ainda participação importante no metabolismo da vitamina A, pois já foi demonstrado que o órgão possui a capacidade de esterificar os retinóides e produzir retinóides ativos através do retinol (Marceau et al, 2006). A enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase, responsável pela clivagem do β -caroteno em duas moléculas de retinal está presente na parte fetal da membrana amniótica da placenta humana, demonstrando a capacidade placentária de converter o precursor da vitamina em sua forma ativa (retinol) (Morris-Kay & Sokolova, 1996; Marceau et al, 2006). Estes conhecimentos acumulados justificam o interesse do estudo da placenta acerca do diagnóstico do estado nutricional de vitamina A no grupo materno-infantil.

Segundo resultados demonstrados neste estudo, observa-se que as concentrações de retinol e carotenóides placentários são mantidas mesmo após 24 horas sem proteção referente à exposição luminosa ou temperatura. Estes resultados aliados a estabilidade do retinol na placenta sob congelamento durante seis meses (Saunders et al, 2005) sugerem maior estabilidade do retinol no tecido placentário em relação ao retinol sérico, independente do método de armazenamento. No sangue total, o retinol demonstra ser estável por 24 horas no gelo e por 4 horas em temperatura ambiente ou a 37° C no plasma (Peng et al, 1987). Este dado pode facilitar os estudos acerca da DVA em locais onde não haja condições adequadas para o armazenamento da placenta após o parto.

Outro achado importante diz respeito a distribuição intraplacentária de carotenóides. Qualquer porção da placenta, assim como já foi demonstrado para retinol (Saunders et al, 2005), é capaz de representar a concentração de carotenóides do órgão como um todo. Este achado torna desnecessária a técnica de obtenção de várias amostras ou da homogeneização de toda a placenta conforme preconizado para outras análises (Iyengar & Rapp, 2001), técnica esta que torna o processo mais oneroso e inviabiliza a utilização do órgão para outras análises.

Os resultados do presente artigo podem representar mais um avanço para os estudos que pretendam incorporar a dosagem dos teores placentários de vitamina A em

seus protocolos, tendo em vista a sua facilidade de obtenção por dispensar profissional altamente treinado. A estabilidade tanto do retinol quanto dos carotenóides no tecido seja em temperatura ambiente, seja sob congelamento, minimiza as perdas durante os processos de coleta, transporte, armazenamento e dosagem. Por ser órgão de transferência de nutrientes durante a gestação poder ser capaz de avaliar o estado nutricional de vitamina A no binômio mãe-filho. Estes fatores conferem facilidade ao trabalho de campo como também redução dos custos, possibilitando inclusive a realização de estudos populacionais.

Os resultados do presente estudo podem ser interpretados como um achado importante no atendimento aos objetivos que investigam a placenta como preditivo do estado nutricional de vitamina A em puérperas e recém-nascidos, podendo contribuir para a definição da correlação entre as concentrações séricas de retinol materno e dos recém-nascidos e os teores da placenta. Os achados podem ainda impulsionar os estudos de identificação dos teores de vitamina A da placenta como possível indicador do estado nutricional de vitamina A do binômio mãe-filho. Por manter as concentrações de vitamina A estáveis às condições de exposição no ambiente hospitalar, deve ser valorizado como possível indicador a ser incorporado na rotina de vigilância do estado nutricional de vitamina A inclusive nas maternidades do sistema único de saúde de saúde onde haja laboratórios de referência para realização das dosagens.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C.R.C., FLORES, H. Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clinical Chemistry*, 1978; 24: 386.
- ARROYAVE, G., CHICHESTER, C.O., FLORES, H., GLOVER, J., MEJÍA, L. A., OLSON, J. A., SIMPSON, K. L., UNDERWOOD, B. A., Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status. International Vitamin A Consultative Group. The Nutrition Foundation, Washington. 1982; p. 92.
- BARNES, A.C., The placental metabolism of vitamin A. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1951; 61: 368-372.
- BARRETO-LINS, M.H.C., CAMPOS, F.A.C.S., AZEVEDO, M.N.A. A re- examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of standardized meal. *Clinical Chemistry*, 1988; 34(11): 2808-2810.
- BAYDAS, G., KARATAS, F., GURSU, F., BOZKURT, HA., ILHAN, N., YASAR, A., CANATAN, H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archive of Medical Research*, 2002; 33: 276-280.
- BUHIMSCHI IA, BUHIMSCHI CS, PUPKIN M, WEINER CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, 2003; 189:181-8.
- BURRI, B.J. The formation of vitamin A from β -carotene: good, bad and variable. *Sight and life. Newsletter* 2001; 2.
- DIMENSTEIN, R., TRUGO, N.M.F., DONANGELO, C.M., TRUGO, L.C., ANASTÁCIO, A.S. Effect of subadequate maternal vitamin A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus. *Biology of the Neonate*, 1996; 69:230-234.
- GOMES, M.M., SAUNDERS, C., ACCIOLY, E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 2005; 5 (3): 275-282.
- HESS D, KELLER HE, OBERLIN B, BONFANTI R, SCHÜEP W. Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1991; 61(3):232-8.
- IYENGAR, G.V., RAPP, A. Human placenta as a 'dual biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements Part 1: Physiology, function and sampling of placenta for Elemental characterisation. *The Science of the Total Environment*, 2001; 280: 195-206.
- MARCEAU, G., GALLOT, D., BOREL, V., LÉMERY, D., DASTUGUE, B., DECHELOTTE, P., SAPIN, V. Molecular and metabolic retinoid pathway in human amniotic membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 346: 1207-1216.
- MORRIS-KAY, G.M., SOKOLOVA, N. Embryonic development and pattern formation. *Faseb journal*, 1996; 10: 961-968.
- PASZKOWSKI, T., LAGÓD, L. The hole of oxidative stress in the pathogenesis of early pregnancy loss. *Polish Journal of Gynaecol Invest*, 2001; 3(4): 135-138.

- PENG YM, XU MJ. Analysis and stability of retinol in plasma. *Journal of the National Cancer Institute*, 1987; 7: 95-9.
- RADHIKA, M.S., BHASKARAM, P., BALAKRISHMA, N., RAMALAKSHMI, B.A., SAVITHA, D.E.V.I., SIVA KUMAR, B. Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2002; 109: 689-693.
- RAMALHO, R.A., ACCIOLY, E., SILVA, L.M. Doenças cardiovasculares: efeito antioxidante das vitaminas A, C e E. *Revista de Metabolismo e Nutrição*, 2003; 7(1): 6-9.
- SAPIN, V., ALEXANDRE, M.C., CHAÏB, S., BOURNAZEAU, J.A., SAUVANT, P., BOREL, P., JACQUETIN, B., GROLIER, P., LÉMERY, D., DASTUGUE, B., AZAÏS-BRAESCO, V. Effect of vitamin A status at the end of term pregnancy on the saturation of retinol binding protein with retinol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71: 537-543.
- SARNI, R.S., KOCHI, C., RAMALHO, R.A., SCHOEPS, D.O., SATO, K., MATOSO, L.C.Q., XIMENES, C.F., SOUZA, F.I., DAMIANI, R.M. Vitamina A nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2002; 48(1): 48-53.
- SAUNDERS, C, LEAL, M. C., FLORES, H., SOARES, A., LIMA, A. P., LEITE, P. C., GOMES, M. M., SOUZA JR, P.R.B., RAMALHO, A. Intraplacental distribution of retinol. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2005; 56(8):607-612.
- SIMSEK M, NAZIROĞLU M, SIMSEK H, ÇAY M, AKSAKAL M, KUMRU S. Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. *Cell Biochemistry and Function*, 1998; 16(4): 227-231
- SIVAPRASADARAO A & FINDLAY JBC The mechanism of uptake of retinol by plasma-membrane vesicles. *Biochemical Journal*, 1988; 255: 571-579
- SUNDARAM, M., SIVAPRASADARAO, A., De SOUSA, M.M., FINDLAY, J.B.C. The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273: 3336-3342.
- THOMSON, A.M., BILLEWICZ, W.Z., HYTTEN, F.E., The weight of the placenta in relation to birthweight. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth*, 1969; 76: 865-872.
- WILLIAMS, M.A., WOELK, G.B., KING, I.B., JENKINS, L., MAHOMED, K. Plasma Carotenoids, Retinol, Tocopherols, and Lipoproteins in Preeclamptic and Normotensive Pregnant Zimbabwean Women *American Journal of Hypertension*, 2003;16:665–672
- ZHANG,C., WILLIAMS, M.A., SANCHEZ, S.E., KING, I.B., WARE-JAUREGUI, S., LARRABURE, G., BAZUL, V., LEISENRING, W.M. Plasma Concentrations of Carotenoids, Retinol, and Tocopherols in Preeclamptic and Normotensive Pregnant Women *American Journal Of Epidemiology*, 2001;153:572–80.

Tabela 1: Comparação das concentrações de retinol de placentas não congeladas segundo tempo transcorrido do parto (n=12).

Tempo (horas)	N	Média(μmol/L)	Erro padrão	p
1	6	0,1917	0,0303	0,763
24	6	0,1750	0,0444	

Tabela 2: Distribuição intraplacentária de carotenóides.

Porção	n	Média	Erro padrão	Razão: valores das porções e VMP	Erro padrão	r	p
Fetal central	61	0,283	0,048	1,166	0,128	0,522	0,000
Fetal lateral 1	61	0,215	0,032	0,938	0,087	0,577	0,000
Fetal lateral 2	61	0,212	0,026	0,908	0,101	0,393	0,002
Materna central	61	0,268	0,043	1,102	0,137	0,476	0,000
Materna lateral 1	61	0,195	0,024	0,876	0,103	0,502	0,000
Materna lateral 2	61	0,253	0,040	1,009	0,101	0,633	0,000
VMP	366	0,238	0,019				

VMP = valor mais provável

ARTIGO 2:

Placenta: possível preditor da deficiência de vitamina A?

Autores:

Mirian Gomes

Claudia Saunders

Andrea Ramalho

***Encaminhado à revista: British Journal of Nutrition em março/2009
(anexo 8)***

RESUMO:

O presente trabalho objetivou avaliar a associação entre a deficiência de vitamina A (DVA) através do indicador bioquímico retinol sérico (sangue materno e do cordão) e as concentrações placentárias de retinol e carotenóides a fim de propor valores placentários representativos da carência. Foram avaliadas 262 puérperas e seus recém-nascidos (RN). A determinação dos níveis séricos e placentários de retinol e carotenóides foi realizada através da dosagem espectrofotométrica e por HPLC. Realizou-se a análise da curva ROC segundo os dois pontos de corte (0,70 e 1,05 $\mu\text{mol/l}$) a fim de indicar o valor de concentração placentária representativo da carência. Não foram observadas diferenças entre as médias de retinol e carotenóides placentários em puérperas independente do ponto de corte utilizado para definição de DVA. Com relação aos RN, observa-se redução ($p=0,012$) das médias de retinol placentário em indivíduos com DVA quando adota-se o ponto de corte 1,05 $\mu\text{mol/l}$. No que diz respeito às médias de carotenóides placentários, observa-se redução para os dois pontos de corte ($p=0,013$ e $p=0,019$ para os pontos 1,05 $\mu\text{mol/l}$ e 0,7 $\mu\text{mol/l}$, respectivamente). Os resultados da curva ROC apontam o valor de 0,80 $\mu\text{mol/l}$ como representativo da carência sendo encontrados maiores valores de sensibilidade (66,7%), especificidade (41,7%) e acurácia (65%) quando adota-se o ponto de corte 0,70 $\mu\text{mol/l}$. Os resultados deste estudo apontam para uma associação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides e a carência clínica de vitamina A, sugerindo a necessidade de futuros estudos em casos carenciais mais graves.

INTRODUÇÃO:

A deficiência da vitamina A (DVA), é um problema de saúde pública cuja relevância é inquestionável. Sua crescente prevalência vem sendo alertada desde a década de 1990 (Ferraz et al., 2005; West, 2002; Maisson et al, 2001; WHO, 1999; Sommer, 1995).

A vitamina A é de extrema importância durante os estágios iniciais da vida. Seu papel vai além do desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual, metabolismo lipídico e diferenciação e proliferação celular. As placentas humanas expressam fatores de transcrição nuclear de receptores de ácido retinóico (RAR) e receptor X retinóico (RXR). A modulação desses fatores através do ácido retinóico é capaz de modular a expressão de vários gens como: hormônio gonadotrófico coriônico, hormônio lactogênio placentário, leptina, receptor de fator de crescimento epidermal (Marceau et al, 2006), triiodo-tironina (T3), estrogênio, progesterona, cortisol, aldosterona, testosterona, vitamina D, colesterol e ácidos graxos. (Sarni et al., 2002; Radhika et al, 2002; Burri, 2001).

Em 1996 a WHO salientou a necessidade de proposição de guias para seleção, uso e interpretação adequados dos indicadores, não só para mapeamento da carência como também para proposição de programas de avaliação do impacto das medidas de intervenção para o controle da carência de vitamina A.

A placenta é o único órgão composto por células de dois indivíduos distintos (Iyengar & Rapp, 2001). Não existem, até o presente momento, trabalhos que avaliem as concentrações de retinol e carotenóides da placenta e sua relação com o estado nutricional de vitamina A no binômio mãe-filho. Alguns autores descrevem a presença de receptores para a vitamina na membrana em borda escova da placenta sugerindo um possível mecanismo regulatório da placenta (Barnes, 1951; Dimenstein et al, 1996; Sundaram et al, 1998).

Nesse cenário o objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre os níveis sérico e placentários de vitamina A e propor valores de retinol placentário representantes da deficiência de vitamina A.

MATERIAIS E MÉTODOS

População e Amostra

A população estudada foi constituída por puérperas de baixo risco acompanhadas pelo Serviço de Assistência Pré-natal da ME/UFRJ, sendo selecionada em 262 mulheres, segundo os critérios: gestação de feto único, ausência de patologias clinicamente comprovadas com início prévio à gestação (diabetes mellitus, hepatopatias, cardiopatias, doença renal), não utilização durante a gestação de suplementos vitamínico-minerais que contivessem vitamina A.

Coleta e Análise das amostras de placentas

A obtenção das placentas, bem como a pesagem das mesmas, foi realizada imediatamente após o parto e separação do RN (Thomson et al, 1969; Saunders et al, 2005).

Antes da obtenção das amostras da placenta, fez-se a separação da membrana amniocoriônica e do cordão umbilical. As amostras foram obtida através de incisão realizada com bisturi cirúrgico, em ambiente com pouca luminosidade (Barreto-Lins et al, 1988; Saunders et al, 2005). O tratamento, armazenamento e transporte das amostras seguiu os procedimentos descritos por Saunders et al (2005).

Avaliação Bioquímica do Estado Nutricional de Vitamina A

Para determinação das concentrações de retinol e carotenóides séricos materno e dos RN, foi coletada amostra de 5ml de sangue obtida por punção venosa das puérperas, em jejum, bem como amostra do sangue de cordão umbilical dos RN, imediatamente após o parto (Ramalho et al, 1999; Saunders et al, 2005).

As amostras de sangue obtidas, foram centrifugadas (3000 rpm) para separação e extração do soro e imediatamente congeladas à uma temperatura de -20°C , no laboratório da ME/UFRJ. Posteriormente, todas as amostras foram acondicionadas a fim de garantir a

manutenção da temperatura durante seu transporte ao INJC/UFRJ onde foram mantidas congeladas até o momento da análise das concentrações de retinol e carotenóides no Laboratório de Bioquímica desta instituição.

Quantificação bioquímica

A determinação das concentrações de retinol e carotenóides séricos foi realizada através de dosagem espectrofotométrica com base no método Bessey et al (1946) modificado segundo Araújo & Flores (1978) e conforme os procedimentos adotados por Flores et al (1988) para a dosagem de vitamina A hepática. Todas as amostras foram dosadas em duplicata, com as precauções recomendadas pelo International Vitamin A Consultative Group (IVACG), para assegurar a qualidade das amostras antes da análise (Arroyave et al., 1982; Barreto-Lins et al, 1988). Em uma subamostra de nove porções placentárias as concentrações de vitamina A foram determinadas também por cromatografia líquida de alta de alta eficiência (high performance liquid chromatography – HPLC) (Hess et al, 1991).

Adotaram-se os pontos de corte 0,7 e 1,05 μ mol/L para indicar DVA (Christian et al., 1998; Biswas et al, 2000; Flores et al., 1991; WHO, 1996). Para indicação de inadequação de carotenóides adotou-se o ponto de corte <80 μ g/dl para puérperas (Sauberlich et al, 1974 apud Oliveira & Marchini, 1994) e <40 μ g/dl para RN. (Sauberlich et al, 1974 apud Oliveira & Marchini, 1994; Robles-Sardin, 1998).

Tratamento Estatístico

Utilizou o teste t-Student para verificação da igualdade das médias. O test t-Student pareado foi utilizado para comparação dos métodos de dosagem bioquímica. A curva ROC foi utilizada para estabelecer as concentrações de retinol e carotenóides placentárias representativos das concentrações séricas dos mesmos através da avaliação da sensibilidade e especificidade para cada ponto. Foi definido como melhor ponto aquele que

maximizou os valores de sensibilidade e especificidade. O nível de significância estabelecido será $p < 0,05$. A análise estatística será efetuada através de programa estatístico SPSS for Windows versão 15.0.

Questões Éticas

O estudo foi realizado através de acordo institucional entre o NPqM/INJC/UFRJ e a Maternidade Escola da UFRJ. A coleta de dados ocorreu após a aprovação da comissão de ética da referida maternidade e do comitê de ética da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

RESULTADOS

As puérperas participantes do estudo possuíam em média $26 \pm 5,8$ anos, apresentaram peso pré-gestacional médio de $55,2 \pm 9$ Kg e ganho de peso total $12,9 \pm 5,7$ Kg. Seus recém-nascidos apresentaram peso ao nascer de $3266,5 \pm 451$ g e as placentas pesaram em média $640 \pm 143,9$ g. A idade gestacional ao parto foi de $39 \pm 1,59$ semanas.

Segundo resultados expressos na tabela 1, observa-se redução das concentrações de retinol placentário na vigência de DVA tanto materna quanto do recém-nascido, independente do ponto de corte adotado. No entanto, só é encontrada diferença estatisticamente significativa nos dois pontos de corte para a DVA no RN, ou seja, segundo as concentrações de retinol placentário do RN

No caso dos carotenóides a redução também é observada havendo tendência para significância estatística quando adota-se o ponto de corte para retinol sérico de $1,05 \mu\text{mol/L}$ para identificação da carência materna. Para RN há diferença estatisticamente significativa entre as médias de carotenóides placentários independente do ponto de corte.

Realizou-se a análise da curva ROC para as concentrações placentárias de retinol segundo os dois pontos de corte para classificação da DVA tanto materna quanto do RN. Adotou-se valor de concentração placentária de retinol $< 0,80 \mu\text{mol/L}$ como preditor das

concentrações séricas inadequadas sendo apresentados os valores de especificidade, sensibilidade e a área sob a curva (acurácia) (tabela 2). Observa-se que a sensibilidade aumenta conforme reduz-se o ponto de corte para concentração sérica, ou seja, na medidas que a DVA é agravada. Além disso, independentemente do ponto de corte adotado para classificação das concentrações séricas de retinol os resultados de sensibilidade e especificidade mostraram-se aumentados no RN quando comparados às puérperas. O melhor valor de acurácia (65%) foi encontrado para curva realizada segundo ponto de corte $0,70\mu\text{mol/L}$ para identificação da carência em puérperas.

A curva ROC construída a partir das concentrações placentárias de carotenóides não permitiu adoção de nenhum valor que pudesse representar a inadequação sérica dos mesmos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois métodos bioquímicos utilizados ($p=0,318$).

DISCUSSÃO:

A placenta possui a capacidade de esterificar os retinóides e produzir retinóides ativos através do retinol, sendo portanto capaz de produzir os metabólitos ativos de que necessita (Marceau et al, 2006). O presente estudo se propôs a avaliar a associação entre as concentrações séricas e placentárias de vitamina A e propor valores de retinol placentário representantes da DVA.

Foi encontrada associação entre as concentrações médias de retinol e carotenóides placentários segundo o estado nutricional de vitamina A tanto materno quanto fetal. Embora pela análise da curva ROC a placenta não tenha se mostrado um bom preditor da deficiência sub-clínica, nota-se que os valores de sensibilidade e especificidade aumentaram quando se reduz o ponto de corte de $1,05\mu\text{mol/L}$ para $0,70\mu\text{mol/L}$. Este fato pode ser interpretado como estando os teores de vitamina A placentários mais relacionados a um quadro de DVA mais severa.

Neste sentido, se faz necessária a avaliação da curva com pontos de corte em diferentes estágios de gravidade da doença carencial em questão. Tal abordagem não foi realizada no presente estudo, pelo fato do número de casos de DVA grave (segundo pontos de corte da WHO, 1996), não ter sido suficiente para construção da curva. Nota-se também o mesmo fenômeno para os valores de sensibilidade e especificidade quando se compara puérperas e RN, os resultados tendem a ser mais expressivos nos RN

Em estados carenciais o retinol é prioritário frente aos carotenóides sendo estes últimos convertidos a forma de pró-vitamina. Sabe-se que a enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase, responsável pela clivagem do β -caroteno em duas moléculas de retinal está presente na parte fetal da membrana amniótica da placenta humana (Morriss-Kay & Sokolova, 1996; Marceau et al, 2006). Este fato pode explicar a melhor associação das concentrações placentárias com as concentrações séricas dos RN, além de justificar a dificuldade em encontrar-se valores de concentrações placentárias de carotenóides capazes de representar as concentrações séricas tanto materna quanto do RN.

A placenta apresenta-se como um possível indicador do estado nutricional de vitamina A no puerpério imediato quando se inicia a lactação e a maior transferência de vitamina A para o RN. Dessa forma, esse órgão pode contribuir para o diagnóstico e tratamento assim como para a prevenção da perpetuação da carência em questão.

Os resultados deste estudo apontam para uma associação entre o estado nutricional de vitamina A e as concentrações placentárias de retinol e carotenóides. Sendo este o primeiro estudo utilizando placenta como marcador da DVA sugere-se a necessidade de estudos posteriores de modo a avaliar outros pontos de corte para carência grave e a fim de permitir a definição de pontos de cortes para as concentrações placentárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Ferraz IS, Daneluzzi JC, Annucchi H, Jordão Jr AA (2005) Prevalência da carência de ferro e sua associação com a deficiência de vitamina A em pré-escolares. *J Pediatr (Rio J)* **81**(2), 169-74.
2. West JRKP (2002) Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *J Nutr* **132**, 2857S-2866S.
3. Maison JB, Lotfi M, Dalmiya N *et al* (2001) *The Micronutrient Report. Current progress and trends in the control of vitamin A, iodine, and iron deficiencies*. Ottawa, Canada: The micronutrient Initiative/UNICEF.
4. World Health Organization. (1999) *Reducción de la mortalidad materna. Declaración conjunta OMS/FNUAP/UNICEF/Banco Mundial*. Ginebra: WHO. (Classificación NLM:HB 1322.5).
5. Sommer A (1995) *La carencia de vitamina A y sus consecuencias. Guía práctica para la detección y el tratamiento*. Tercera edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
6. Marceau G, Gallot D, Borel V, *et al* (2006) Molecular and metabolic retinoid pathway in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 1207-1216.
7. Sarni RS, Kochi C, Ramalho RA, *et al* (2002) Vitamina A nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. *Rev Assoc Med Bras* **48**(1), 48-53.
8. Radhika MS, Bhaskaram P, Balakrishma N, *et al* (2002) Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. *Int J Gynaecol Obstet* **109**, 689-693.
9. Burri BJ (2002) The formation of vitamin A from β -carotene: good, bad and variable. *Sight and life. Newsletter*, **2**.
10. Iyengar GV, Rapp A (2001) Human placenta as a 'dual biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements

- Part 1: Physiology, function and sampling of placenta for elemental characterisation. *Sci Total Environ* **280**, 195-206.
11. Barnes AC (1951) The placental metabolism of vitamin A. *Am J Obstet Gynecol* **61**, 368-372.
 12. Dimenstein R, Trugo NMF, Donangelo CM, *et al* (1996) Effect of subadequate maternal vitamin A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus. *Biol Neonate* **69**, 230-234.
 13. Sundaram M, Sivaprasadarao A, De Sousa MM, Findlay JBC (1998) The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *J Biol Chem* **273**, 3336-3342.
 14. Thomson AM, Billewicz WZ, Hytten FE (1969) The weight of the placenta in relation to birthweight. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* **76**, 865-872.
 15. Saunders C, Leal MC, Flores H, *et al* (2005) Intraplacental distribution of retinol. *Int J Food Sci Nutr* **56**(8), 607-612.
 16. Barreto-Lins MHC, Campos FACS, Azevedo MNA (1988) A re- examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of standardized meal. *Clin Chem* **34**(11), 2808-2810.
 17. Ramalho RA, Anjos LA, Flores H (1999) Estado nutricional de vitamina A no binômio mãe/recém-nascido em duas maternidades no Rio de Janeiro, Brasil. *Arch Latinoam Nutr* **49**, 318-321.
 18. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ, López JA (1946) The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J Biol Chem* **1**, 177-188.
 19. Araújo CRC, Flores H (1978) Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clin Chem* **24**, 386.
 20. Flores H, Ramalho RAG, Ribeiro ARLP (1988) Intrahepatic distribution of vitamin A in humans and rats. *Int J Vitam Nutr Res.* **58**, 276-280.

21. Arroyave G, Chichester CO, Flores H *et al* (1982) *Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status*. International Vitamin A Consultative Group. The Nutrition Foundation, Washington. p. 92.
22. Hess D, Keller HE, Oberlin B *et al* (1991) Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *Int J Vitam Nutr Res*, **61**(3),232-8.
23. Christian P, West JRKP, Khattry SK *et al* (1998) Night blindness of pregnancy in rural Nepal – nutritional and health risks. *Int J Epidemiol* **27**, 231-237.
24. Biswas AB, Mitra NK, Chakraborty I *et al* (2000) Evaluation of vitamin A status during pregnancy. *J Indian Med Assoc* **98**(9), 525-529.
25. Flores H, Azevedo MNA, Campos FACS *et al* (1991) Serum vitamin A distribution curve for children aged 2-6 known to have adequate vitamin A status: a reference population. *Am J Clin Nutr* **40**, 1281-1289.
26. World Health Organization. (1996) *Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programs*. Geneva: WHO.
27. Sauberlich HE *et al*, 1974 Apud Oliveira JED, Marchini JS (1994) Levantamento bibliográfico de estudos bioquímico-nutricionais sobre micronutrientes realizados no Brasil. *Cad Nutr: Rev Soc Bras Alim Nutr (São Paulo)* **8**, 31-67.
28. Robles-Sardin AE, Astiazarán-Gracia M, Dávalos-Navarro R *et al* (1998) Efecto de la suplementación con una dosis masiva de vitamina A en niños de 6 a 36 meses de edad. *Salud Publica Mex* **40** (4), 309-315.
29. Morriss-Kay GM, Sokolova N (1996) Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* **10**, 961-968.

Tabela 1: Comparação de médias de retinol e carotenóides placentários segundo estado nutricional de vitamina A materno e do recém-nascido.

Ponto de corte	Retinol (média ±dp)					Carotenóides (média ±dp)					
	n	DVA	n	Normal	P	n	DVA	n	Normal	p	
Materno	1,05	26	1,3719± 2,2419	107	1,9495± 3,0214	0,345	27	0,2000± 0,1780	90	0,3356± 0,6036	0,063
	0,7	8	0,9487± 0,8783	125	1,8934± 2,8551	0,354	9	0,1667± 0,1146	108	0,3157± 0,5582	0,272
RN	1,05	50	1,3114± 1,4014	46	3,2954± 4,9834	0,012	44	0,2173± 0,2057	46	0,6802± 1,2006	0,013
	0,7	26	1,4331± 1,7368	70	2,5700± 4,1844	0,063	23	0,2187± 0,2134	67	0,5346± 1,0209	0,019

Tabela 2: Resultados de sensibilidade e especificidade segundo pontos de corte séricos para DVA adotando-se o ponto de corte placentário de 0,80µmol/L de acordo com a análise da curva ROC.

Retinol sérico		Puérpera	RN
<1,05µmol/L	Sensibilidade	59,1%	61,2%
	Especificidade	41,0%	51,2%
	Área sob a curva	0,55	0,57
<0,7µmol/L	Sensibilidade	66,7%	68,0%
	Especificidade	41,7%	49,3%
	Área sob a curva	0,65	0,57

ARTIGO 3:

**Concentração placentária de vitamina A e sua associação com o indicador funcional,
variáveis obstétricas, sócio-econômicas e demográficas**

Autores:

Mirian Martins Gomes

Andréa Ramalho

Cláudia Saunders

A ser encaminhado para a Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil

RESUMO

Apesar da importância da vitamina A na saúde materno-infantil e do papel da placenta no seu metabolismo e transferência, há grande carência de estudos envolvendo as concentrações placentárias de retinol e carotenóides. O presente trabalho objetivou avaliar a associação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides e o indicador funcional, além das variáveis obstétricas e socioeconômicas. A população estudada foi constituída por 262 puérperas atendidas em uma maternidade pública do Rio de Janeiro. As concentrações de retinol e carotenóides placentários foram avaliadas por espectrofotometria e a cegueira noturna diagnosticada segundo entrevista padronizada. As variáveis socioeconômicas e obstétricas foram obtidas por meio de consulta aos prontuários e/ou entrevista à puérpera. As puérperas avaliadas apresentaram em média $26 \pm 5,8$ anos, ganho de peso total $12,9 \pm 5,7$ Kg e idade gestacional ao parto de $39 \pm 1,59$ semanas. Não foi observada associação entre as concentrações placentárias de vitamina A e variáveis socioeconômicas. Encontrou-se redução significativa das médias de carotenóides na presença de história de aborto ($p=0,006$) e tendência dessa redução na presença de cegueira noturna ($p=0,095$). Estes resultados apontam para a necessidade de aconselhamento nutricional a todas as gestantes independente do nível socioeconômico e alertam para a valorização da história de aborto para identificar gestantes em risco e da cegueira noturna para o diagnóstico de deficiência de vitamina A.

INTRODUÇÃO

A deficiência de vitamina A (DVA) é considerada um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (OPS, 2001) sendo mais de sessenta países classificados na categoria de carência grave (Milagres et al, 2007). Em 2002, West atualizando os dados mundiais sobre a prevalência de DVA descreve que cerca de 150 milhões de mulheres e crianças no mundo apresentem a DVA; que 4,4 milhões de pré-escolares apresentem xeroftalmia e que 6,2 milhões de mulheres desenvolvam cegueira noturna durante a gestação. Atualmente, sabe-se que mesmo a DVA subclínica (quando estão ausentes os sinais de xeroftalmia) intensifica a gravidade de enfermidades como diarreia e outros processos infecciosos, podendo provocar quadros de imunodeficiência de origem exclusivamente nutricional (Ferraz et al., 2005).

Calcula-se que a cada minuto morra uma criança de causa direta ou indiretamente atribuível à DVA (Sommer, 1995, WHO, 1999) e que, diariamente, muitas mulheres também faleçam em decorrência de problemas evitáveis, relacionados à gravidez ou ao parto, que podem ser agravados pela DVA (WHO, 1999).

Apesar dos esforços para o controle desta carência, estudos realizados em diversos países apontam prevalências crescentes da carência na América Latina, Ásia e África (Maziya-Dixon, 2006; Yang et al,2007; Nojilana, 2007; Poveda, 2007). Localidades como Estados Unidos e Europa, por não serem consideradas áreas de risco, apresentam escassos estudos sobre a DVA no grupo materno-infantil.

A vitamina A possui papel importante no ciclo visual, crescimento, manutenção da diferenciação epitelial, reprodução e desenvolvimento fetal (Sapin et al, 2000). Estas funções são particularmente críticas em períodos de rápida proliferação e desenvolvimento tecidual como na gravidez e primeira infância (Barón et al, 2003). A deficiência materna de vitamina A pode resultar em morte fetal e em um espectro de mal formações congênitas. (Sapin et al, 2000) e no aumento das taxas de morbi-mortalidade infantil (Milagres et al, 2007).

A transferência materno-fetal da vitamina A ocorre por meio da circulação placentária. Embora o principal grupo atingido pela DVA seja o materno-infantil, existem ainda escassas informações acerca da transferência da vitamina A para o feto (Barnes, 1951; Dimenstein et al, 1996; Sundaram et al, 1998).

De grande relevância é o papel da placenta na regulação do metabolismo da vitamina A. É conhecido que a placenta possui receptores de ácido retinóico cuja modulação é capaz de regular a expressão de diversos gens (Sarni et al., 2002; Radhika et al, 2002; Burri, 2001). Já foi demonstrado que esta possui a capacidade de esterificar os retinóides e produzir retinóides ativos a partir do retinol para ativação dos receptores anteriormente citados (Marceau et al, 2006). A presença da enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase, responsável pela clivagem do β -caroteno em duas moléculas de retinal, corrobora com a importância do tecido no metabolismo da vitamina A (Morriss-Kay & Sokolova, 1996; Marceau et al, 2006). Apesar desses achados, são ainda escassas as informações sobre a transferência de vitamina A durante a gestação, e sua associação com outros indicadores da DVA e com características maternas.

Dada a importância da vitamina A durante a gestação e da placenta no seu metabolismo e transferência para o feto, o presente estudo objetivou avaliar a associação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides e o indicador funcional, além das variáveis obstétricas e socioeconômicas. Estas variáveis podem se tornar ferramentas importantes na triagem do risco nutricional durante a assistência nutricional pré-natal.

MÉTODOS

A população estudada foi constituída por puérperas atendidas pelo Serviço de Assistência Pré-natal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no período de abril de 1999 a janeiro de 2003.

A seleção das 262 participantes do estudo ocorreu no momento da sua admissão para o parto, de acordo com a demanda espontânea à maternidade, em dias alternados de

quatro plantões semanais, sendo incluídos dia do final de semana e plantão noturno. Todas as mulheres internadas para realização do parto nos dias de coleta de dados que assinaram o termo de consentimento e que atenderam aos critérios de inclusão (gestação de feto único, não portadoras de enfermidades crônicas, não utilização de suplementos vitamínico-minerais contendo vitamina A no período gestacional) foram entrevistadas e realizou-se consulta aos seus respectivos prontuários, visando o preenchimento de questionário pré-testado com informações maternas e dos recém-nascido (RN). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da referida maternidade

A obtenção das placentas, bem como a pesagem das mesmas, foi realizada imediatamente após o parto e separação do RN (Thomson et al, 1969; Saunders et al, 2005b). Foram obtidas amostras de 5g de cada placenta, por incisão realizada com bisturi cirúrgico, em ambiente com pouca luminosidade (Barreto-Lins et al, 1988; Saunders et al, 2005b). O tratamento, armazenamento e transporte das amostras seguiu os procedimentos descritos por Saunders et al (2005b). As concentrações de retinol e carotenóides placentários foram avaliados segundo o método Bessey et al (1946) modificado segundo Araújo & Flores (1978) e conforme os procedimentos adotados por Flores et al (1988) para a dosagem de vitamina A hepática. O método espectrofotométrico foi validado segundo HPLC (dados não publicados).

A coleta de dados ocorreu por meio de consulta aos prontuários e entrevistas com as parturientes/puérperas, por equipe de pesquisadores treinados, reciclados periodicamente e orientados a seguir o manual de instruções elaborado para a padronização dos procedimentos, visando garantir a qualidade das informações obtidas. Foram coletadas informações sociodemográficas, história obstétrica, da assistência pré-natal e intercorrências gestacionais.

Na avaliação funcional da DVA, foi investigada a presença de cegueira noturna gestacional por meio de entrevista padronizada modificada (Saunders et al, 2005b), segundo recomendações da OMS (WHO, 1996) e OPS (McLaren & Frigg, 1999).

As condições de saneamento foram consideradas adequadas, quando estavam disponíveis os serviços de água ligada à rede pública com canalização interna, esgoto ligado à rede pública e coleta regular de lixo; e inadequadas quando um dos serviços de saneamento não estava disponível.

Com relação à idade gestacional ao nascimento, os RN foram classificados em pré-termos (< 37 semanas de gestação), a termo (37 a 41 semanas de gestação) e pós-termo (\geq 42 semanas de gestação).

Na análise dos dados, utilizou-se os testes *t-Student* e ANOVA para testar a igualdade entre as médias. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos foi $p < 0,05$. As análises foram realizadas no pacote estatístico SPSS for Windows versão 15.

RESULTADOS

As puérperas participantes do estudo apresentaram em média 26 anos (desvio padrão – DP = 5,8), peso pré-gestacional médio de 55,2 kg (DP = 9Kg) e ganho de peso total 12,9 kg (DP=5,7). Seus RN apresentaram peso ao nascer de 3266,5g (DP= 451g) e as placentas pesaram em média 640g (DP=143,9). A idade gestacional ao parto foi 39 semanas (DP=1,59).

Na tabela 1 são apresentadas as médias de retinol e carotenóides placentários segundo variáveis sócio-econômicas. Observa-se diferença estatisticamente significativa apenas para situação marital, observando-se maiores médias de retinol em mulheres que apresentam união estável.

Ao avaliarem-se as concentrações placentárias de retinol e carotenóides segundo variáveis obstétricas e de assistência pré-natal (tabela 2), observa-se redução significativa das médias de carotenóides quando há relato de história de aborto. Apesar de haver redução das médias de retinol com a redução do número de consultas da assistência nutricional pré-natal, não houve diferença estatisticamente significativa. Na comparação

segundo diagnóstico de DVA utilizando-se o indicador funcional (tabela 3) observa-se tendência de redução das médias de carotenóides na presença de cegueira noturna.

DISCUSSÃO

Embora não se dispondo no Brasil de estudos nacionais para diagnóstico da DVA, as informações provenientes de inquéritos nutricionais em diversas regiões e grupos populacionais empregando diferentes indicadores apontam que a DVA é um problema com magnitude de saúde pública em âmbito nacional (Ramalho et al, 2002; 2005, 2008) sendo o Brasil classificado pela OPAS (2001) como uma área de carência subclínica grave (West, 2002). A prevalência é crescente em todas as regiões do país descartando a hipótese de associação com as regiões de maior concentração de pobreza e reforçando a necessidade de investigação, prevenção e intervenção para a população como um todo. (Accioly &, Souza Queiroz, 2000; Ramalho et al, 2002; 2005; 2008; Da Silva et al, 2005; Paiva et al, 2006; Graebner et al, 2007).

Estudos que avaliaram concentrações de vitamina A séricas (Ramalho et al, 2006; Rock et al, 1999; Baron et al, 2003) ou no leite humano (Dimenstein et al, 2003), demonstraram não haver associação entre variáveis socioeconômicas e a carência desta vitamina. O mesmo é demonstrado neste trabalho com relação às concentrações placentárias, à exceção do estado conjugal.

A DVA possui associação com diversas intercorrências maternas (Barón et al, 2003). Neste estudo observou-se redução significativa das concentrações de carotenóides na presença de história de aborto. Um número crescente de evidências indica que o aumento da produção de radicais livres possui papel importante na patogênese do aborto. O decréscimo do potencial antioxidante é observado 5-6 semanas antes do início dos sintomas da perda reprodutiva. Em mulheres com história de aborto recorrente é observado aumento da peroxidação de lipídios plasmáticos acompanhado da redução das concentrações séricas de vitaminas A e E e β -caroteno (Paszkowski & Lagód, 2001).

Os carotenóides são vistos como importantes antioxidantes plasmáticos (Stahl & Sies, 2003; Baydas et al, 2002; Ramalho et al, 2003). Uma única molécula de retinol ou β -caroteno é capaz de inativar vários radicais oxigênio singlet antes de ser destruída (Bast et al, 1998; Ramalho et al, 2003). O β -caroteno é ainda reconhecido como varredor de radicais peroxil, contudo outros carotenóides também possuem efeitos antioxidantes possuindo efeito sinérgico entre si e com outros micronutrientes antioxidantes como vitamina C e E (Stahl & Sies, 2003; Winklhofer-Roob et al, 2003). Segundo nossos resultados essa redução ocorre também no tecido placentário. A redução de antioxidantes no tecido responsável pela transferência pode indicar prejuízo da transferência de tais nutrientes para o RN.

É descrito na literatura que o nascimento já é considerado um evento de estresse oxidativo devido à diferença de concentração de oxigênio entre o meio intra e o extra-uterino (Baydas et al, 2002; Bohles, 1997; Buonocore, 2002; Robles et al, 2001). A não formação de reservas adequadas predispõe o RN a lesões causadas por radicais livres. Estes são potencialmente danosos para DNA, carboidratos, lipídios e proteínas levando a lesões em pontes de ligações do DNA, desnaturação e inativação de enzimas e peroxidação lipídica com alteração da função normal da membrana e dos receptores celulares (Saugstad, 2000; Rogers et al, 2000).

A ausência de associação entre as concentrações placentárias de retinol e o número de consultas da assistência nutricional pré-natal, como observado no presente estudo, talvez seja justificada pelo reduzido número de casos em dois dos grupos avaliados, pois, em estudo desenvolvido por Chagas em 2007 na mesma maternidade, foi observada redução do risco de desenvolvimento de cegueira noturna e anemia em mulheres cujo acompanhamento nutricional foi iniciado juntamente com o pré-natal e foi constituído de no mínimo 4 consultas com o nutricionista.

O indicador funcional já apresenta validação segundo concentrações de retinol sérico para diagnóstico de DVA em puérperas, sendo considerado um método simples e de baixo custo para detecção desta carência (Saunders et al 2005a). Ao analisá-lo segundo

concentrações de vitamina A placentária, observa-se tendência na redução das concentrações da vitamina em comparação com o grupo sem DVA. Esta observação corrobora com achados recentes que apontam que as concentrações de vitamina A placentária podem estar associadas apenas a estados carenciais mais graves (dados ainda não publicados). Dessa forma o indicador funcional parece ser um marcador de carência do estado nutricional de vitamina A mais precoce do que as concentrações placentárias de retinol podendo refletir também baixas concentrações placentárias e conseqüentemente prejuízo na transferência materno-fetal.

Dada a inexistência de associações com variáveis socioeconômicas e associação com intercorrências gestacionais com concentrações séricas e no leite humano e, como visto no presente trabalho também com as concentrações placentárias, reforça-se a necessidade de atenção ao estado nutricional de vitamina A para todas as gestantes independentes da classe social. Da mesma forma confirma-se a importância de investigação da situação marital e da história obstétrica como forma de identificação de fatores de risco para menores concentrações de vitamina A na placenta e da cegueira noturna como forma de diagnóstico da carência. Ressalta-se que tal sintoma ocular está associado com uma tendência para menores concentrações de vitamina A placentárias.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, E. SOUZA QUEIROZ. Deficiencia de vitamina A en embarazadas asistidas en una maternidad pública en Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Chilena de Nutrición*, 2000; 27 (3): 316-319.
- ARAÚJO, C.R.C., FLORES, H. Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clinical Chemistry*, 1978; 24: 386.
- BARNES, A.C., The placental metabolism of vitamin A. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1951; 61: 368-372.
- BARON, M.A., SOLANO, L., LLOVERA, D. PEÑA, E. Estado de vitamina A en adolescentes embarazadas de bajo estrato socioeconómico. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2003; 53(4):364-368.
- BARRETO-LINS, M.H.C., CAMPOS, F.A.C.S., AZEVEDO, M.N.A. A re- examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of standardized meal. *Clinical Chemistry*, 1988; 34(11): 2808-2810.
- BAST, A., HAENEN, G.R.M.M., VAN DER BERG, R., VAN DER BERG, H. Antioxidant effects of carotenoids. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* 1998; 68: 399-403.
- BAYDAS, G., KARATAS, F., GURSU, F., BOZKURT, HA., ILHAN, N., YASAR, A., CANATAN, H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archive of Medical Research*, 2002; 33: 276-280.
- BESSEY, O.A., LOWRY, O.H., BROCK, M.J., LÓPEZ, J.A. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *Journal of Biological Chemistry*, 1946; 1: 177-188.
- BURRI, B.J. The formation of vitamin A from β -carotene: good, bad and variable. *Sight and life. Newsletter* 2001; 2.
- CHAGAS, C.B. Assistência nutricional pré-natal na prevenção e controle da deficiência de vitamina a e anemia em gestantes. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da UFRJ. Orientadores: Cláudia Saunders e Andréa Ramalho. Rio de Janeiro, dezembro, 2007. 111p.
- DA SILVA, R., LOPES, J.R.E., SARNI, R.O.S., TADDEI, J.A.A.C. Níveis plasmáticos de vitamina A em crianças carentes com pneumonia na fase aguda e após a recuperação. *Jornal de Pediatria (RJ)*, 2005; 81(2):162-168.

DIMENSTEIN, R., TRUGO, N.M.F., DONANGELO, C.M., TRUGO, L.C., ANASTÁCIO, A.S. Effect of subadequate maternal vitamin A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus. *Biology of the Neonate*, 1996; 69:230-234.

FERRAZ, I.S., DANELUZZI, J.C., ANNUCCHI, H., JORDÃO JR, A.A. Prevalência da carência de ferro e sua associação com a deficiência de vitamina A em pré-escolares. *Jornal de Pediatria (RJ)*, 2005; 81(2): 169-74.

FLORES, H., RAMALHO, R.A.G., RIBEIRO, A.R.L.P., Intrahepatic distribution of vitamin A in humans and rats. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 1988; 58: 276-280.

GRAEBNER, I.T., SAITO, C.H., DE SOUZA, E.M.T. Biochemical assessment of vitamin A in schoolchildren from a rural community *Jornal de Pediatria (RJ)*, 2007;83(3):247-252.

MARCEAU, G., GALLOT, D., BOREL, V., LÉMERY, D., DASTUGUE, B., DECHELOTTE, P., SAPIN, V. Molecular and metabolic retinoid pathway in human amniotic membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 346: 1207-1216.

MAZIYA-DIXON, B.B., AKINYELE, I.O., SANUSI, R.A., OGUNTONA, T.E., NOKOE, S.K., HARRIS, E.W. Vitamin A deficiency is prevalent in children less than 5 y of age in Nigeria. *Journal of Nutrition*, 2006; 136: 2255–2261.

MILAGRES, R.C.R.M., NUNES, L.C., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2007; 12(5):1253-1266.

MORRISS-KAY, G.M., SOKOLOVA, N. Embryonic development and pattern formation. *Faseb Journal*, 1996; 10: 961-968.

NOJILANA, B., NORMAN, R., BRADSHAW, D., VAN STUIJVENBERG, M.E., DHANSAY, M.A., LABADARIOS, D. and the South African Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Estimating the burden of disease attributable to vitamin A deficiency in South Africa in 2000. *South African Medical Journal*, 2007; 97: 748-753.

Organización Panamericana de la Salud (OPAS). Visión Integrada de la suplementación con vitamina A en las Américas. 2-4 de mayo del 2001, Managua, Nicaragua. Informe de la Reunión Regional. Washington: OPS; 2001. (HPP/HPN/MN/49-17).

PAIVA, A.A., RONDÓ, P.H.C., GONÇALVES-CARVALHO, C.M.R., ILLISON, V.K., PEREIRA, J.A., VAZ-DE-LIMA, L.R.A., OLIVEIRA, C.A., UEDA, M., BERGAMASCHI, D.P. Prevalência de deficiência de vitamina A e fatores associados em pré-escolares de Teresina, Piauí, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2006; 22(9):1979-1987.

PASZKOWSKI, T., LAGÓD, L. The hole of oxidative stress in the pathogenesis of early pregnancy loss. *Polish Journal of Gynaecol Invest*, 2001; 3(4): 135-138.

POVEDA, E., CUARTAS, A., GUARÍN, S., FORERO, Y., VILLARREAL, E. Grupo de Nutrición, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia. Estado de los micronutrientes hierro y vitamina A, factores de riesgo para las deficiencias y valoración antropométrica en niños preescolares del municipio de Funza, Colombia. *Biomédica*, 2007; 27: 76-93

RADHIKA, M.S., BHASKARAM, P., BALAKRISHMA, N., RAMALAKSHMI, B.A., SAVITHA, D.E.V.I., SIVA KUMAR, B. Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2002; 109: 689-693.

RAMALHO, R.A., ACCIOLY, E., SILVA, L.M. Doenças cardiovasculares: efeito antioxidante das vitaminas A, C e E. *Revista de Metabolismo e Nutrição*, 2003; 7(1): 6-9.

RAMALHO, R.A., FLORES, H., ACCIOLY, E., SAUNDERS, C. Associação entre deficiência de vitamina A e sua situação sociodemográfica de mães e recém-nascidos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2006;52(3): 170-175.

RAMALHO, R.A., FLORES, H., SAUNDERS, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 2002; 12 (2): 117-122.

RAMALHO, RA , FLORES, H., ACCIOLY, E., SAUNDERS, C. Deficiência de Vitamina A no Brasil. *Revista da Sociedad Iberoamericana de Información Científica*, Buenos Aires, 2005; 1-09.

RAMALHO A; PADILHA P, SAUNDERS C. Análise crítica de estudos brasileiros sobre deficiência de vitamina A no grupo materno-infantil. *Revista Paulista de Pediatria* 2008; 26(4): 392-399.

ROCK, C.L., THORNQUIST, M.D., KRISTAL, A.R., PATTERSON, R.E., COOPER, D.A., NEUHOUSER, M.L., NEUMARK-SZTAINER, D., CHESKINJ, L.J. Demographic, dietary and lifestyle factors differentially explain variability in serum carotenoids and fat-soluble vitamins: baseline results from the Sentinel Site of the Olestra Post-Marketing Surveillance Study. *Nutrition*, 1999; 129: 855–864.

SAPIN, V., ALEXANDRE, M.C., CHAÏB, S., BOURNAZEAU, J.A., SAUVANT, P., BOREL, P., JACQUETIN, B., GROLIER, P., LÉMERY, D., DASTUGUE, B., AZAÏS-BRAESCO, V. Effect of vitamin A status at the end of term pregnancy on the saturation of retinol binding protein with retinol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71: 537-543.

SARNI, R.S., KOCHI. C., RAMALHO, R.A., SCHOEPS, D.O., SATO, K., MATOSO, L.C.Q., XIMENES, C.F., SOUZA, F.I., DAMIANI, R.M. Vitamina A nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. Revista da Associação Médica Brasileira 2002; 48(1): 48-53.

SAUNDERS, C , LEAL, M. C. , FLORES, H. , SOARES, A. , LIMA, A. P. , LEITE, P. C., GOMES, M. M., SOUZA JR, P.R.B., RAMALHO, A. Intraplacental distribution of retinol. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2005b; 56(8):607-612.

SAUNDERS, C., RAMALHO, R.A., LIMA, A.P.T., GOMES, M.M., CAMPOS, L.F., SILVA, B.A.S., SOARES, A.G., LEAL, M.C. Association between gestational night blindness and serum retinol in mother/newborn pairs in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Nutrition, 2005a; 21(4): 456-461.

SOMMER, A. La carencia de vitamina A y sus consecuencias. Guía práctica para la detección y el tratamiento. Tercera edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1995

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 2003; 24: 345–351.

SUNDARAM, M., SIVAPRASADARAO, A., De SOUSA, M.M., FINDLAY, J.B.C. The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. Journal of Biological Chemistry, 1998; 273: 3336-3342.

THOMSON, A.M., BILLEWICZ, W.Z., HYTTEN, F.E., The weight of the placenta in relation to birthweight. Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth, 1969; 76: 865-872.

WEST, J.R.K.P. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. The Journal of Nutrition 2002; 132: 2857S-2866S.

WINKLHOFER-ROOB, M.B., ROCK, E., RIBALTA, J., SHMERLING, D.H., ROOB, J.M. Effects of vitamin E and carotenoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. Molecular Aspects of Medicine, 2003; 24: 391–402.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Reducción de la mortalidad materna. Declaración conjunta OMS/FNUAP/UNICEF/Banco Mundial. Ginebra: OMS; 1999. (Classificación NLM:HB 1322.5)

YANG, R., LI, R., MAO, S., SUN, L., HUANG, X., JI, C., ZHU, Z., WU, L., QIN, Y., ZHAO, Z.
The survey of serum retinol of the children aged 0~4 years in Zhejiang Province, China. BMC
Public Health, 2007; 7:264.

Tabela 1: Concentrações placentárias de retinol e carotenóides segundo variáveis sócio-econômicas e demográficas.

Variáveis	n (%)	retinol		carotenóides	
		média±ep	p	média±ep	p
Situação marital					
Casada/união estável	99(66)	2,66±0,41	0,001	0,28±0,04	0,392
Outros	51(34)	1,15±0,21		0,36±0,11	
Cor					
Branca	59(39)	1,93±0,44	0,548	0,34±0,06	0,591
Preta, Mulata, parda e outras	91(61)	2,28±0,38		0,29±0,07	
Idade					
<20 anos	19(12,7)	1,25±0,25	0,210	0,26±0,10	0,237
20-34 anos	115(76,7)	2,42±0,37		0,28±0,04	
≥35 anos	16(10,6)	1,19±0,30		0,52±0,28	
Instrução					
Ensino fundamental incompleto	65(43,3)	2,40±0,46	0,540	0,34±0,06	0,774
Ensino médio incompleto	50 (30)	2,21±0,51		0,30±0,06	
Ensino médio ou superior	35(26,7)	1,59±0,52		0,26±0,14	
Saneamento					
Adequado	142(94,7)	2,17±0,30	0,698	0,32±0,05	0,368
Inadequado	8(5,3)	1,68±0,53		0,12±0,06	

ep = erro padrão

Tabela 2: Concentrações placentárias de retinol e carotenóides segundo variáveis obstétricas.

Variáveis	n (%)	retinol		Carotenóides	
		média±ep	p	média±ep	p
História de aborto					
Sim	13(12,1)	1,90±0,54	0,750	0,17±0,03	0,006
Não	94(87,9)	2,24±0,38		0,48±0,10	
Intervalo interpartal					
< 18 meses	9(9)	1,70±0,57	0,710	0,23±0,10	0,707
≥ 18 meses	92(91)	2,17±0,39		0,33±0,07	
Intervalo intergestacional					
< 18 meses	13	2,10±0,69	0,974	0,19±0,07	0,478
≥ 18 meses	86	2,13±0,41		0,34±0,08	
Nº consultas APN					
0 a 3	17(11,3)	1,76±0,58	0,415	0,22±0,06	0,382
4 a 6	40(26,7)	1,87±0,44		0,27±0,08	
7 a 9	59(39,3)	2,74±0,58		0,32±0,06	
10 +	34(22,7)	1,62±0,44		0,38±0,16	
Nº consultas ANPN					
Nenhuma	116(77,3)	1,86±0,29	0,130	0,34±0,07	0,309
Até 3	25(16,7)	2,83±0,88		0,15±0,02	
4 ou mais	9(6)	3,94±1,78		0,29±0,12	
Idade gestacional (DUM)					
Pré-termo	18(6,9)	1,62±0,56	0,939	0,16±0,04	0,139
A termo	232(88,5)	1,67±0,21		0,22±0,02	
Pós-termo	10(3,8)	2,11±0,58		0,32±0,16	

APN = assistência pré-natal; ANPN = assistência nutricional pré-natal; ep = erro padrão

Tabela 3: Concentrações placentárias de retinol e carotenóides segundo indicador funcional.

Cegueira noturna	n (%)	retinol		Carotenóides	
		média±ep	p	média±ep	p
Sim	21(16,4)	2,99±0,88	0,092	0,19±0,06	0,095
Não	107(83,6)	1,43±0,13		0,33±0,05	

ep = erro padrão

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribui no aumento de informações acerca do comportamento da vitamina A no tecido placentário. Conforme já demonstrado para o retinol, os carotenóides também apresentam distribuição homogênea na placenta. Isto significa que qualquer porção placentária é capaz de predizer a quantidade desses nutrientes no órgão como um todo. Esse resultado vem facilitar a metodologia adotada em trabalhos envolvendo vitamina A e placenta. Dispensa-se a necessidade de coleta de várias amostras ou da homogeneização de todo o órgão para análises bioquímicas. Além disso, como não há um local do tecido preferencial para coleta da amostra, o pesquisador pode fazê-lo de forma aleatória de acordo com sua conveniência.

Seguindo a linha de resultados inerentes a metodologia para estudos envolvendo a placenta, observou-se que a vitamina A é estável à temperatura ambiente por até 24 horas dispensando também a proteção quanto à luminosidade. Dessa forma, a vitamina A mostra-se mais estável no tecido placentário quando comparada com o soro. Neste, ela é facilmente oxidável se mantida fora de temperatura de congelamento ou exposta a luz. Nos trabalhos de campo dispensa-se então cuidados excessivos para coleta assim como de manutenção do tecido até a retirada das amostras. Mesmo que a placenta seja mantida fora de refrigeração após o parto na unidade de saúde, ela ainda permanecerá apta para dosagem da vitamina A por até 24 horas. Justifica-se a escolha do tempo máximo de 24 horas para o estudo da estabilidade por ser o período de tempo em que não se observa degradação tecidual da placenta. Assim, pode-se evitar redução das perdas durante os processos de coleta, transporte, armazenamento e dosagem.

Os estudos da placenta como possível indicador da DVA demonstraram redução das médias placentárias de retinol e carotenóides quando observado estado carencial segundo retinol sérico adotando-se os pontos de corte $0,70\mu\text{mol/l}$ e $1,05\mu\text{mol/l}$. A construção da curva ROC sugeriu o valor de $0,80\mu\text{mol/l}$ como preditor de carência quando se analisa a placenta.

Embora segundo os valores de sensibilidade e especificidade a placenta não se apresente como bom preditor da deficiência sub-clínica, nota-se que os valores de sensibilidade e especificidade aumentaram quando se reduz o ponto de corte de 1,05 μ mol/L para 0,70 μ mol/L. Este fato pode ser interpretado como estando os teores de vitamina A placentários mais relacionados a estado carencial mais grave (clínico) de vitamina A para o grupo materno-infantil. Outro fato que deve ser levado em consideração é que a concentração sérica de retinol está em homeostase com as reservas orgânicas e reflete os estoques do organismo apenas quando estão muito baixos ou muito altos. Dessa forma sugere-se a continuidade dos estudos adotando-se pontos de corte que reflitam estados carenciais mais graves e associação com outros indicadores que sejam capazes de refletir melhor as reservas hepáticas (ex.: resposta relativa a dose).

Ao avaliarem-se as concentrações de vitamina A placentária segundo o indicador funcional, observa-se tendência na redução das concentrações da vitamina na presença de cegueira noturna. A ausência de associação mais forte pode ser justificada pela manifestação da cegueira noturna em estágios precoces da DVA, e corrobora com resultados anteriormente descritos que apontam que as concentrações de vitamina A placentária podem estar associadas apenas a estados carenciais mais graves. Dessa forma o indicador funcional parece ser mais precoce que as concentrações placentárias de retinol no sentido de indicação da carência podendo refletir também baixas concentrações placentárias e conseqüentemente prejuízo na transferência materno-fetal.

Contudo deve-se ainda levar em consideração que concentrações placentárias podem ser utilizadas como marcador do estado nutricional de vitamina A no puerpério imediato. Este é momento de início do aleitamento materno e também de maior transferência de vitamina A para o recém-nascido em aleitamento materno exclusivo. Sendo esta a alimentação preconizada para o lactente nos seis primeiros meses de vida a detecção e correção da carência nesse momento torna-se crucial para que se impeça a perpetuação da hipovitaminose A. A quantificação das concentrações de retinol na placenta

pode também tornar-se um instrumento para o mapeamento da carência e contribuir para a expansão do programa de suplementação que, no Brasil, restringe-se a reduzido número de municípios.

A análise segundo as variáveis obstétricas mostrou associação com a história de aborto e as médias de carotenóides corroborando com os achados já publicados em estudos com concentração sérica. Assim reforça-se a importância da valorização da história obstétrica na triagem para identificação de gestantes em risco de desenvolvimento da carência. Já está bem fundamentada a associação entre a DVA e complicações obstétricas assim como doenças da prematuridade, sendo, portanto de suma importância a identificação das situações de risco para a efetiva prevenção.

A ausência de associação com variáveis socioeconômicas vem reforçar a importância e necessidade de atenção a todas as gestantes independente de sua classe social, escolaridade, condições de moradia ou idade. Nenhuma das características descritas é capaz de oferecer qualquer fator de proteção, de forma que o risco de DVA é universal para as gestantes.

A fim de complementar o estudo analisou-se em uma subamostra as concentrações placentárias de vitamina A por dois métodos bioquímicos distintos: a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofotometria. Não foi encontrada diferença entre os resultados das duas dosagens. Este resultado sugere que quando se trata de investigação da carência ou quando não se deseja identificar as frações de vitamina A, o método espectrofotométrico pode ser utilizado. Este caracteriza-se por ser um método de quantificação mais frequentemente disponível e apresentar menor custo, facilitando estudos populacionais e em áreas de poucos recursos.

Os resultados aqui descritos certamente auxiliarão na continuidade dos estudos da placenta como indicador do estado nutricional de vitamina A no binômio mãe-filho, proporcionando um instrumento que facilite e viabilize estudos populacionais sobre a DVA no referido grupo.

Como contribuições deste estudo, pode-se destacar:

- ↪ A distribuição intraplacentária uniforme de carotenóides e a estabilidade da vitamina A no tecido placentário em temperatura ambiente e exposição à luminosidade, facilitando a metodologia de coleta, transporte e armazenamento.
- ↪ A associação entre as concentrações séricas e placentárias de vitamina A qualificando a placenta como um possível indicador da DVA para o binômio mãe-filho, particularmente no puerpério imediato.
- ↪ Reforça-se a importância de investigação da história obstétrica, sobretudo a história de aborto, como forma de identificar as gestantes em risco de desenvolvimento da carência de vitamina A.
- ↪ Reforça-se a importância do indicador funcional (cegueira noturna) como forma de diagnosticar os estados carencias mais precoces.
- ↪ Enfatiza-se a investigação da carência assim como orientação nutricional apropriada a todas as gestantes independente de sua situação socioeconômica, visto que todas possuem risco de desenvolvimento da DVA.
- ↪ No que diz respeito à quantificação de retinol e carotenóides totais não foi observada diferença entres os métodos de análise bioquímica estudados (cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofotometria). A espectrofotometria pode ser utilizada quando não se deseja identificar frações sem que haja prejuízo dos resultados.

Como sugestão para estudos futuros pode-se destacar:

- ↪ A necessidade de investigação das concentrações placentárias em estados carenciais mais graves.
- ↪ A associação das concentrações placentárias com indicadores que reflitam a reserva hepática (ex.: resposta relativa à dose).

- ↳ Definição de pontos de corte para as concentrações placentárias de vitamina
A segundo as situações descritas acima.

9. ANEXOS

ANEXO 1:

Nota Metodológica

A presente nota metodológica tem por objetivo apresentar a caracterização geral da amostra estudada, além de análises e resultados complementares não apresentados nos artigos elaborados. Seguem também maiores detalhamentos com relação à elaboração da curva ROC utilizada para a proposição de pontos de corte de retinol placentário a partir do indicador retinol sérico.

1. Caracterização geral da amostra estudada

Tabela 1.1: Caracterização da amostra (n=262)

Variáveis	Média ± DP/ prevalência
Idade (anos)	26 ± 5,8
Casadas	64,5%
Saneamento adequado	93,5%
Baixa escolaridade (< 4 anos)	38,9%
Prevalência de XN	17,9%
Prevalência de aborto	28,6%
Primíparas	46,2%
Prematuros	6,9%
IMC pré-gestacional (Kg/m²)	22,6 ± 3,7
Ganho de peso (Kg)	12,9 ± 5,7
IG (semanas)	39 ± 1,7
Peso ao nascer (Kg)	3,26 ± 0,5
Comprimento (cm)	49,2 ± 3,1
Retinol sérico materno (µmol/L)	1,7015 ± 0,8551
Retinol sérico RN (µmol/L)	1,2934 ± 0,7497
Carotenóides séricos maternos (µg/dl)	82,8493 ± 59,2281
Carotenóides séricos RN (µg/dl)	18,2714 ± 21,1038
Prevalência de DVA materna	24,4%
Prevalência de DVA RN	45,5%
Inadequação de carotenóides (materno)	52,1%
Inadequação de carotenóides (RN)	92,5%

2. Análises complementares envolvendo as concentrações placentárias de retinol e carotenóides e o peso placentário

Segundo resultados apresentados na tabela 2.1, observa-se homogeneidade nas concentrações placentárias de retinol e carotenóides quando estas são analisadas separadamente segundo cada porção estudada. Observa-se ainda na tabela 2.2 correlação entre as concentrações placentárias e séricas. Esses resultados apontam para associação entre as concentrações séricas e placentárias de vitamina A.

Tabela 2.1: Concentração média de retinol e carotenóides placentários por porção estudada.

		Retinol ($\mu\text{g/g}$)	Carotenóides ($\mu\text{g/g}$)
		média \pm dp	média \pm dp
Porção fetal	FC	2,19 \pm 3,55	0,43 \pm 0,87
	FL1	1,60 \pm 1,87	0,30 \pm 0,55
	FL2	1,96 \pm 2,16	0,29 \pm 0,45
Porção materna	MC	2,14 \pm 3,51	0,30 \pm 0,53
	ML1	1,68 \pm 2,10	0,22 \pm 0,25
	ML2	1,42 \pm 1,43	0,31 \pm 0,52

Tabela 2.2: Correlação entre as concentrações séricas e placentárias de carotenóides.

Variáveis	n	r	p
Retinol sérico materno e retinol placentário	133	0,160	0,065
Retinol sérico RN e retinol placentário	92	-0,201	0,055
Retinol sérico RN e carotenóides placentários	121	0,187	0,039

As concentrações placentárias de vitamina A assim como o peso placentário mostraram associação com variáveis antropométricas maternas e do recém-nascido (tabelas 2.3 e 2.4) apontando a placenta como um instrumento no estudo não só do estado nutricional de vitamina A como também do estado antropométrico do binômio mãe-filho. O estado nutricional antropométrico materno pré-gestacional e o ganho gestacional interferem no peso placentário que, por sua vez, está relacionado com as condições ao nascimento. Da mesma forma o estado nutricional antropométrico materno associa-se com as concentrações placentárias de vitamina A e o peso da placenta com a área da mesma. Ambas situações estão diretamente relacionadas a transferência materno-fetal da vitamina em questão.

Tabela 2.3: Correlação entre as concentrações placentárias de retinol e carotenóides e variáveis antropométricas maternas e do recém-nascido.

Variáveis	n	r	p
Retinol placentário e peso pré-gestacional	97	-0,248	0,014
Carotenóides placentários e ganho de peso total	79	0,206	0,068
Carotenóides placentários e peso ao nascer	122	-0,215	0,017

Tabela 2.4: Correlações entre o peso placentário e variáveis antropométricas maternas e do recém-nascido.

Variáveis	n	r	p
Peso pré-gestacional	235	0,134	0,040
Peso pré-parto	198	0,212	0,003
Ganho de peso total	227	0,181	0,060
Peso ao nascer	242	0,605	0,000
Perímetro cefálico	232	0,371	0,000
Capurro	241	0,199	0,066
Comprimento	234	0,296	0,000

3. Resultados complementares referentes ao estudo dos pontos de corte de retinol e carotenóides na placenta.

Curva ROC

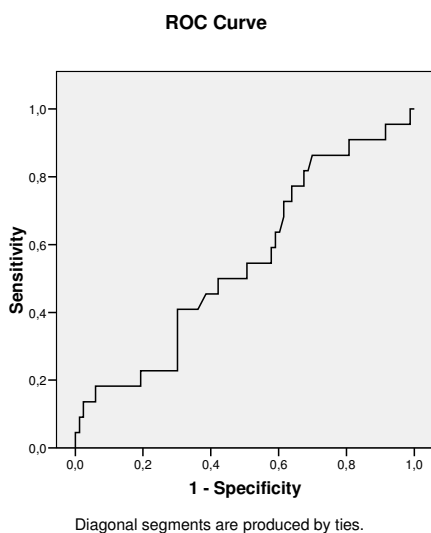


Gráfico 3.1: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico materno de 1,05 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,55).

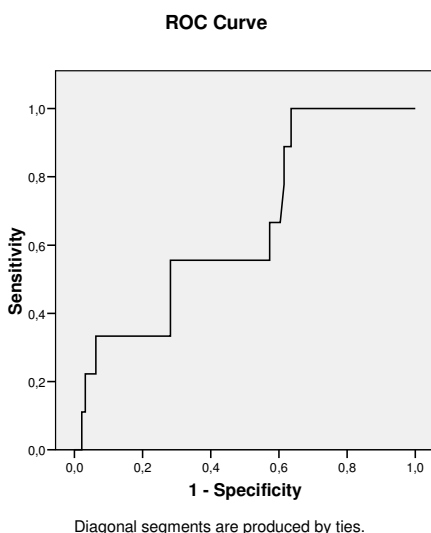


Gráfico 3.2: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico materno de 0,7 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,65).

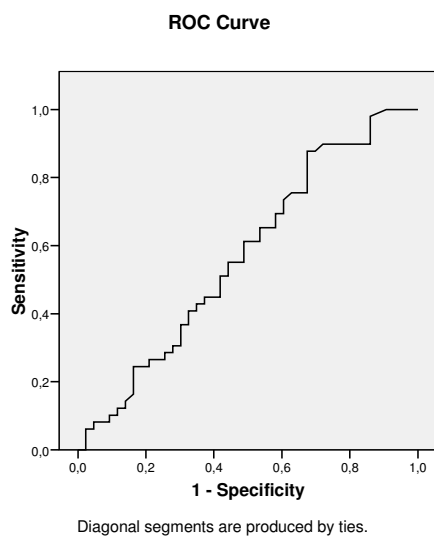


Gráfico 3.3: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico do recém-nascido de 1,05 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,571).

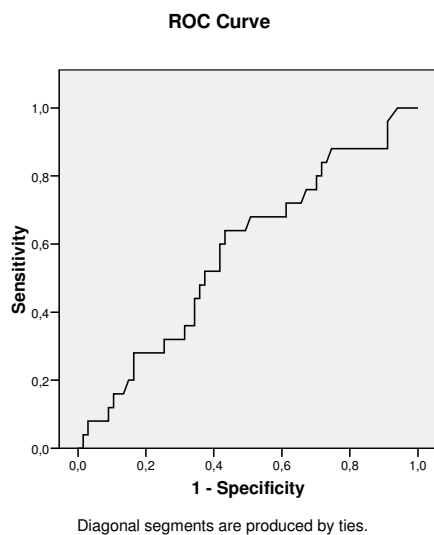


Gráfico 3.4: Concentrações placentárias de retinol segundo ponto de corte para retinol sérico do recém-nascido de 0,7 $\mu\text{mol/l}$ (área sob a curva = 0,574).

Tabela 3.1: Resultado oriundo das curvas ROC construídas para as concentrações placentárias de retinol segundo pontos de corte de retinol sérico para DVA materna.

Retinol placentário	DVA < 1,05 µmol/l		DVA < 0,7 µmol/l	
	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>
0,7300	72,7%	38,6%	88,9%	38,5%
0,7650	68,2%	38,6%	77,8%	38,5%
0,7900	63,6%	39,8%	66,7%	39,6%
0,8050	63,6%	41%	66,7%	40,6%
0,8150	59,1%	41%	66,7%	41,7%
0,8400	59,1%	42,2%	66,7%	42,7%
0,8900	54,5%	42,2%	55,6%	42,7%
0,9700	54,5%	44,6%	55,6%	44,8%
1,0400	54,5%	45,8%	55,6%	45,8%
1,0650	54,5%	47,0%	55,6%	46,9%
1,0750	54,5%	48,2%	55,6%	47,9%
1,0900	54,5%	49,4%	55,6%	49,0%
1,1250	50%	49,4%	55,6%	50,0%
1,1550	50%	51,8%	55,6%	52,1%
1,1850	50%	53,0%	55,6%	53,1%
1,2200	50%	54,2%	55,6%	54,2%
1,2600	50%	55,4%	55,6%	55,2%
1,2950	50%	56,6%	55,6%	56,2%
1,3050	50%	57,8%	55,6%	57,3%
1,3550	45,5%	57,8%	55,6%	58,3%
1,4100	45,5%	59,0%	55,6%	59,4%
1,4350	45,5%	60,2%	55,6%	60,4%
1,4650	45,5%	61,4%	55,6%	61,5%
1,4900	40,9%	63,9%	55,6%	64,6%
1,5100	40,9%	65,1%	55,6%	65,6%
1,5250	40,9%	67,0%	55,6%	66,7%
1,5400	40,9%	67,5%	55,6%	67,7%
1,5600	40,9%	68,7%	55,6%	68,7%
1,6500	40,9%	69,9%	55,6%	69,8%
1,7350	36,4%	69,9%	55,6%	70,8%
1,7850	31,8%	69,9%	55,6%	71,9%

Tabela 3.2: Resultado oriundo das curvas ROC construídas para as concentrações placentárias de retinol segundo pontos de corte de retinol sérico para DVA do recém-nascido.

Retinol placentário	DVA < 1,05 µmol/l		DVA < 0,7 µmol/l	
	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>
0,4850	73,5%	39,5%	72,0%	34,3%
0,5300	71,4%	39,5%	72,0%	35,8%
0,5700	69,4%	39,5%	72,0%	37,3%
0,5850	69,4%	41,2%	72,0%	38,8%
0,5950	67,3%	41,9%	68,0%	38,8%
0,6400	65,3%	41,9%	68,0%	40,3%
0,6850	65,3%	44,2%	68,0%	41,2%
0,7000	65,3%	46,5%	68,0%	43,3%
0,7150	63,3%	46,5%	68,0%	44,8%
0,7250	61,2%	46,5%	68,0%	46,3%
0,8150	61,2%	51,2%	68,0%	49,3%
0,9550	57,1%	51,2%	64,0%	50,7%
1,0550	55,1%	51,2%	64,0%	52,2%
1,1100	55,1%	53,5%	64,0%	53,7%
1,1400	55,1%	55,8%	64,0%	55,2%
1,1650	53,1%	55,8%	64,0%	56,7%
1,1850	51,0%	55,8%	60,0%	56,7%
1,2150	51,0%	58,1%	60,0%	58,2%
1,2350	49,0%	58,1%	56,0%	58,2%
1,2500	46,9%	58,1%	52,0%	58,2%
1,2750	44,9%	58,1%	52,0%	59,7%
1,3150	44,9%	62,8%	52,0%	62,7%

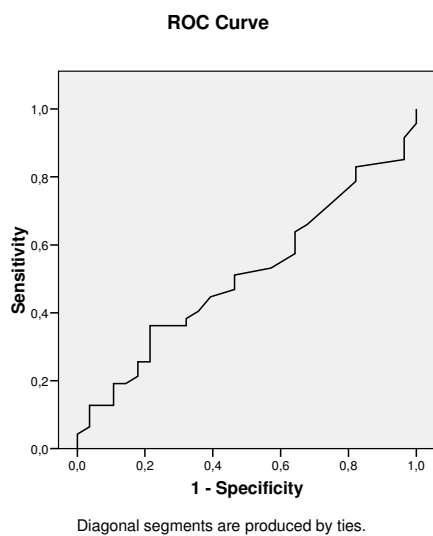


Gráfico 3.5: Concentrações placentárias de carotenóides segundo ponto de corte de carotenóides séricos maternos de 80 μ g/dl (área sob a curva = 0,48).

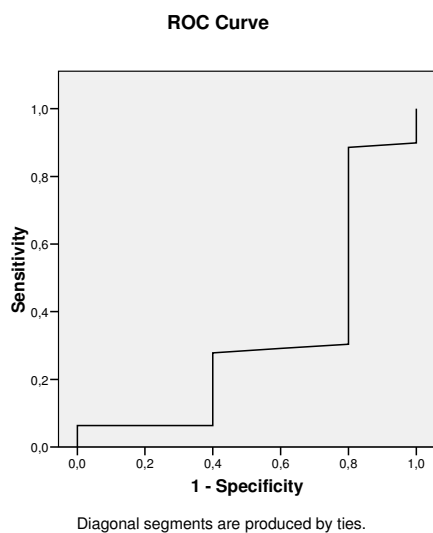


Gráfico 3.6: Concentrações placentárias de carotenóides segundo ponto de corte de carotenóides séricos do recém-nascido de 40 μ g/dl (área sob a curva = 0,40).

Por meio das tabelas (tabelas 3.1 e 3.2) geradas a partir das curvas ROC (gráficos 3.1 a 3.6), observa-se que para mesmos valores de retinol placentário, a sensibilidade aumenta quando se reduz o ponto de corte enquanto a especificidade praticamente não se altera. Esse comportamento é válido para as concentrações placentárias de retinol segundo pontos de corte para retinol sérico seja ele de origem materna ou fetal.

Os valores de retinol placentário 0,8150 e 1,1850 repetem-se nas análises materna e fetal. O primeiro apresenta melhor sensibilidade e o segundo melhor especificidade. Optou-se pela seleção do ponto de corte de maior sensibilidade tendo-se em vista que no caso de detecção de carência nutricional deseja-se que o indicador possua melhor sensibilidade a fim de identificar um maior número de casos.

Com relação aos carotenóides, as baixas áreas sob a curva e a irregularidade das mesmas impedem uma inferência a respeito de pontos de corte placentários para os carotenóides.

ANEXO 2:

Termo de convênio entre a Maternidade Escola e o Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ



CONVÊNIO

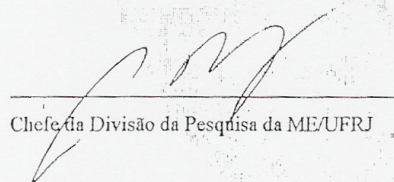
Convênio informal para desenvolvimento conjunto de investigação científica que firmam entre si a **Maternidade-Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, aqui representada pelo **Chefe da Divisão de Pesquisa** e pelo **Diretor da Unidade**, e o **Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, aqui representado pelo **Pesquisador Responsável** e pelo **Professor Coordenador** da pesquisa de que trata o presente convênio.

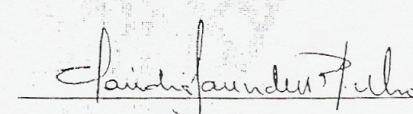
O objeto deste convênio é o desenvolvimento de investigação que tem por proposta estudar Níveis Séricos de Vitamina A Maternos e dos Recém-nascidos e sua Associação com os Níveis Placentários.

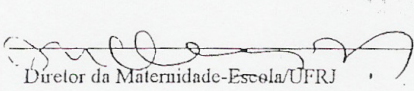
Tem data de início prevista para o mês de janeiro de 1999 e encerramento estimado para o mês de julho de 1999.

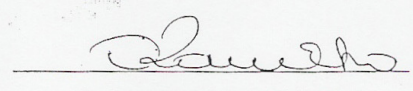
O presente convênio não envolve pecúnia de ambas as partes conveniadas e os pormenores para o seu desenvolvimento deverão ser decididos conjuntamente pelo **Chefe da Divisão de Pesquisa da Maternidade-Escola** e pelo **Professor Coordenador** da pesquisa.

Rio de Janeiro, 28 / dezembro / 1998


Chefe da Divisão da Pesquisa da ME/UFRJ


Responsável pela Pesquisa


Diretor da Maternidade-Escola/UFRJ


Professor Coordenador da Pesquisa

ANEXO 3:

Parecer da Comissão de Ética Médica da Maternidade Escola/UFRJ

(2^a. via)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MATERNIDADE-ESCOLA

Professor Pedro Rogério Furley dos Santos
Chefe de Ensino e Pesquisa da M.E./UFRJ

Parecer da comissão de Ética Médica da Maternidade-Escola da UFRJ sobre o Projeto de Tese de Doutorado de **Cláudia Saunders de Paiva Coelho** sobre **"Níveis Séricos da Vitamina A Materna e dos Recém Nascidos e sua Associação com os Níveis Placentários"**.

Prezado Professor,

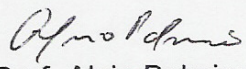
O Projeto de Pesquisa analisado mostra o papel da Vitamina A no organismo e os efeitos da sua carência em diversas situações patológicas.

O estudo da Vitamina A na gestante, no feto e recém nascido é de inegável interesse visto a importância deste fator.

O Projeto de Pesquisa nos parece estar de acordo com os preceitos da Ética Médica, necessitando, entretanto, ser encaminhado á apreciação da Comissão de Ética Médica em Pesquisa de Unidade da UFRJ.

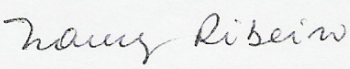
Rio de Janeiro, 25 de abril de 2002

Comissão de Ética Médica da Maternidade-Escola da UFRJ


Prof. Alvio Palmiro

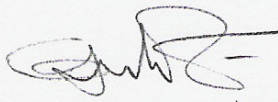
Alvio Palmiro
MÉDICO
CRM/RJ- 5209077-6

Rua das Laranjeiras, 180 – Laranjeiras
7935 Fax (021)285-7994


Prof. Nancy R. da Silva

Prof. Nancy Ribeiro Silva
Chefe do Amb. Pré-Natal
da Maternidade - Escola
- CRM - 52 12805-9 -

CEP: 22240-001 Rio de Janeiro – RJ



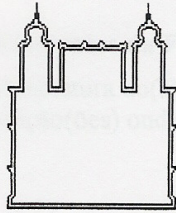
Prof. Osvaldo Coura Filho

Dr. Osvaldo Coura Filho
Ginecologia Obstétrica
CRM 52 20 462 0

Fone (021) 285-

ANEXO 4:

Parecer do Comitê de Ética da Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Oswaldo Cruz



Parecer Nº: 75/02

Rio de Janeiro, 04 de setembro de 2002

Título do Projeto: Carência de vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição interplacentária de retinol.

Pesquisador Responsável: Cláudia Saunders de Paiva Coelho.

Instituição onde se realizará: Instituto de Nutrição da UFRJ, Maternidade Escola da UFRJ e Departamento de Epidemiologia da Escola Nacional de Saúde Pública.

Data de recebimento no CEP-ENSP: 06 de agosto de 2002.

Objetivos do projeto

Avaliar o estado nutricional de vitamina A de puérperas e recém-nascidos por meio de diferentes indicadores e determinar a distribuição intraplacentária de vitamina A, a fim de fornecer subsídios para programas de diagnóstico e combate a esta carência.

Sumário do projeto

Descrição geral: projeto de doutorado já qualificado consistindo de pesquisa com puérperas por entrevista direta e consulta aos prontuários, além de exames de sangue e da placenta, bem como o levantamento de medidas antropométricas (peso, comprimento, perímetro cefálico e idade gestacional) dos recém-nascidos. Os dados serão levantados na Maternidade Escola da UFRJ e os exames serão feitos no Instituto de Nutrição da UFRJ.

Descrição e caracterização da amostra: cerca de 197 puérperas selecionadas com equiprobabilidade (amostra aleatória simples) dentre as atendidas pela referida Maternidade Escola.

Crterios de inclusão e exclusão: terão probabilidade de seleção as puérperas atendidas na referida maternidade, sendo excluídas as que tiverem partos gemelares ou patologias clinicamente comprovadas no período gestacional, além das que usaram complementos vitamínicos durante a gestação e daquelas com menos de 20 anos.

Adequação da metodologia: até onde foi explicitada, e considerando as restrições de tempo de um projeto de doutorado, não se verificou inadequação da metodologia aos objetivos.

Adequação das condições de realização: aparentemente adequadas.

Elementos da Folha de Rosto da CONEP

Assinatura do(s) responsável(is) da(s) Instituição(ões) onde se realizará a pesquisa: constam assinaturas dos responsáveis pela Maternidade Escola da UFRJ e pelo Instituto de Nutrição da UFRJ.

Observações sobre o preenchimento dos demais campos: nada a acrescentar.

Comentários do relator, frente à Resolução nº 196/96 e complementares em particular sobre:

Estrutura do protocolo: protocolo com estrutura adequada.

Justificativa de uso do placebo: não se aplica.

Justificativa da suspensão terapêutica ("Wash-out"): não se aplica.

Análise dos riscos: não há riscos para os participantes, tendo em vista que a coleta de sangue será feita por profissional capacitado usando material descartável, o exame da placenta não oferece riscos e as medições antropométricas são rotineiras.

Retorno de benefícios para o sujeito e/ou para a comunidade: o retorno direto para os sujeitos da pesquisa é o diagnóstico e tratamento da carência de vitamina A e os indiretos decorrem do conhecimento obtido (novos métodos diagnósticos da carência derivados de indicadores mais baratos e de obtenção menos invasiva).

Adequação do termo de consentimento: termo de consentimento adequado.

Forma de obtenção do consentimento: adequada.

Informação adequada quanto ao financiamento: o financiamento do projeto será feito pelas entidades envolvidas.

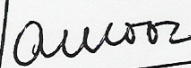
Outros centros, no caso de estudos multicêntricos: não se aplica.

Outros comentários: não há qualquer menção aos mecanismos a serem usados para proteção da identidade dos informantes, apesar de esta proteção ser compromisso assumido no Termo de Consentimento.

Deverá ser encaminhado à CONEP (áreas temáticas especiais) e, portanto, deverá aguardar a apreciação final desta para início da execução? Sim Não

Parecer do CEP: Aprovado.

Atenciosamente,


PROF. FERMIN ROLAND SCHRAMM
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
ENSP/FIOCRUZ

ANEXO 5:

Termo de consentimento livre e esclarecido

GRUPO DE PESQUISA EM VITAMINA A

Pesquisa: “Carência de vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição intraplacentária de retinol”

Entrevistador: _____

Registro no GPVA: _____

Matrícula: _____

Data: ____/____/____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento lhe dará informações e pedirá o seu consentimento para participar de uma pesquisa que está sendo desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa em Vitamina A e pela Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O estudo pretende identificar a carência de vitamina A em mães e recém-nascidos, através da análise da quantidade da vitamina no sangue da mãe e no sangue do cordão umbilical, além de verificar a quantidade dessa vitamina em pequenas porções da placenta. O objetivo final do estudo é contribuir para o diagnóstico da carência de vitamina A, que traz profundas repercussões à saúde dos indivíduos, tais como, problemas oculares, de pele e maior possibilidade de desenvolvimento de infecções.

A pesquisa será conduzida por meio de questionários abordando questões sobre idade, nível de instrução, renda familiar, ocupação, condições de moradia, história reprodutiva e assistência pré-natal. Será também realizada uma avaliação da sua visão noturna, por meio de entrevista e serão consultadas nos prontuários as condições ao nascer do seu filho. Além disso, faremos a retirada de pequena quantidade de seu sangue, do sangue do cordão umbilical e de pequenas amostras da placenta. Esclarecemos que o risco decorrente de sua participação no estudo é o mesmo de procedimentos rotineiros de coleta de sangue e para evitá-lo, seu sangue e o do cordão umbilical serão coletados por técnico especializado com material descartável. E informamos ainda que não há remuneração ou recompensa de qualquer espécie decorrente da participação do estudo.

Os benefícios pela sua participação são o diagnóstico da carência de vitamina A, cujas informações você receberá através de carta na sua residência e caso seja diagnosticada a carência no seu sangue, será oferecido tratamento sem nenhum custo.

As informações que serão coletadas serão mantidas em sigilo, não sendo divulgadas em qualquer hipótese. Os resultados do estudo serão apresentados em conjunto, impossibilitando a identificação dos indivíduos que participaram do mesmo.

Você tem o direito de pedir outros esclarecimentos sobre a pesquisa e de se recusar a participar ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo.

Declaro estar ciente das informações deste Termo de Consentimento e concordo em participar desta pesquisa.

Rio de Janeiro, ____ de ____ de ____.

PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL _____

COORDENADOR DA PESQUISA: _____

ANEXO 6:

Instrumento de coleta de dados

GRUPO DE PESQUISA EM VITAMINA A

Pesquisa: "Carência de vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição intraplacentária de retinol"

Entrevistador: _____

Registro no GPVA: _____

Matrícula: _____

Data: ____/____/____

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO E SOCIOECONÔMICOS:

Nome: _____

Endereço: _____

Bairro: _____

Cidade/Estado: _____

Telefone: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Idade: ____ anos Estado Civil: (1) casada (2) solteira (3) separada/divorciada (4) viúva (5) outros ____

Nível de Instrução: (1) Analfabeta (2) 1º grau incompleto

(3) 1º grau completo (4) 2º grau incompleto

(5) 2º grau completo (6) superior

Cor: (1) Branca (2) Negra (3) Mulata ou parda (4) Outras _____

Renda Familiar total: _____

Nº de pessoas da família: _____ Renda familiar *Per capita*: _____

Ocupação: _____

Condições de saneamento da moradia:

(1) Adequada (2) Inadequada _____

2. História Obstétrica

Gesta: _____ Para: _____ Abortos: _____

Data do último parto: _____

Data do término da última gestação (informar se foi ABORTO): _____

Idade gestacional no parto (segundo DUM): _____

Assistência pré-natal: (1) Sim. Nº de consultas: _____ (2) Não

Assistência Nutricional: (1) Sim. Nº de consultas: _____ (2) Não

Peso placentário: _____ g Tipo de parto: (1) normal (2) cesárea (3) outros _____

Uso de cigarro: (1) Sim. Quantidade/freqüência _____ (2) Não

Uso de bebidas alcoólicas: (1) Sim. Tipo/Quantidade/Freqüência _____ (2) Não

Uso de drogas: (1) Sim. Tipo / Quantidade / Freqüência _____ (2) Não

Intercorrências na gestação, registrar: hipertensão – PA \geq 140 x 90mmHg /IG, anemia (hemoglobina < 11g/dl / IG), alteração na curva glicêmica (valores plasmáticos 105,190,165,145 mg / dl sendo 2 valores superiores: _____

3. Avaliação funcional: ENTREVISTAR A PUÉRPERA CN(1)Sim (0)Não

Dificuldade para enxergar durante o dia? (1) Sim. Quando começou/terminou? _____(2)Não

Dificuldade para enxergar com pouca luz ou à noite?

(1) Sim. Quando começou/terminou? _____ (2) Não

Tem cegueira noturna? (1) Sim. Quando começou/terminou? _____(2) Não

Alteração alimentar na gestação? (1)Sim.Qual?(exclusão/inclusão de alimentos) _____
_____(2) Não

Uso de suplementos vitamínico-minerais (atenção para Materna, Arovit, Rarical, Esclerovitan, Supradyn, Naetene, Natalins, Unicap, Nativit) ou complemento alimentar (Sustagem, Sustain, Sustacal, Mom) durante a gestação? foram excluídas as com complementos???

(1)Sim. Qual/dose/quantidade _____(2) Não

4. Avaliação antropométrica materna

Peso pré-gestacional: _____ kg IMC: _____ Classificação: (1)Bp (2) N (3) Sp (4) Ob

Estatura: _____ m Peso pré-parto: _____ kg Ganho ponderal total: _____ kg

Peso na 1º consulta do Pré-natal (até a 14ª s): _____ kg MS: (0) adequado (1) inadequado

Peso na última consulta do Pré-natal: _____ kg IOM: (1) abaixo (2) adequado (3) acima

5. Condições dos recém-nascidos

Peso: _____ g Comprimento: _____ cm PC: _____ cm Sexo: (1) F (2) M

Capurro: _____ semanas Apgar 1'e 5': ____/____ Correlação P/IG: (1) PIG (2) AIG (3) GIG

Intercorrências clínicas: _____

6. Avaliação bioquímica

Medidas	Retinol($\mu\text{mol/l}$)	Carotenóides($\mu\text{g}/\%$)
Sangue materno		
Sangue do cordão umbilical		
Placenta ML1		
Placenta ML2		
Placenta MC		
Placenta FL1		
Placenta FL2		
Placenta FC		

ANEXO 7:

ARTIGO 1: Stability and intraplacental vitamina A distribution

(versão encaminhada à revista: International Journal of Nutrition and Food Science
em março/2009)

Stability and intraplacental vitamina A distribution

Authors:

MIRIAN M. GOMES¹, ANDRÉA RAMALHO², CLÁUDIA SAUNDERS²

¹Instituto Fernandes Figueira - FIOCRUZ

²Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes – Instituto de Nutrição Josué de Castro -
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Running title: intraplacental vitamin A

ABSTRACT

The present study aims to assess the intraplacental distribution of carotenoids and the stability of placental retinol and carotenoids at room temperature. Sixty-one placentas were selected from which six portions were assessed (three from the maternal portion and three from the fetal portion) for determining the distribution of carotenoids and a subsample of 14 portions was assessed to study retinol stability. Biochemical dosages were performed through the spectrophotometric method and HPLC. The values of carotenoids obtained were correlated to the more probable value of each placenta ($p < 0.002$). The retinol and carotenoids levels were stable in the placental tissue for nearly 24 hours while it was kept without protection against luminosity or temperature ($p = 0.763$ and $p = 0.609$, respectively for retinol and carotenoids). These results can contribute to stimulate the studies of identification of placental vitamin A content as a possible biomarker of the nutritional vitamin A status in the maternal-infant relationship.

Keywords: Placenta, vitamin A, retinol, carotenoids, puerperal women, newborns.

INTRODUCTION

Vitamin A plays an important role in visual cycle, growth, maintenance of epithelial differentiation, reproduction and fetal development (Sapin et al, 2000). Nonetheless, the antioxidant action of retinol has been highlighted as much as that of carotenoids (Baydas et al, 2002; Ramalho et al, 2003). The rise of production of oxygen free radicals is documented as being associated with the genesis of premature delivery (Buhimschi et al, 2003; Gomes et al, 2005), habitual spontaneous abortion Simsek et al, 1998; Paszkowski & Lagód, 2001), hypertensive syndromes in pregnancy (Zang et al, 2001; Williams et al, 2003).

As the fetus is unable to synthesize vitamin A, it depends on the maternal circulating levels to address its needs. The presence of liver store of vitamin A at birth shows the functionality and importance of the placental transfer during pregnancy (Sapin et al, 2000).

Placenta is an important organ in the regulation of vitamin A metabolism during pregnancy. Although being an important path of obtainment of this nutrient for the fetus, the lack of information about a methodology for standardizing placental vitamin A collection and analysis has contributed to the little use of retinol and carotenoids levels in human placentas in the assessment of the nutritional vitamin A status in the maternal-infant relationship (Barnes, 1951; Dimenstein et al, 1996; Sivaprasadarao et al, 1998; Sundaram et al, 1998 Sapin et al, 2000).

The knowledge of the regulatory paths of the transfer of transplacental vitamin A will enable to achieve the understanding of the mechanisms involved in the assessment of the nutritional status of this vitamin impelling advances in the diagnosis of the deficiency in the child-mother group. Thus, more methodological details are necessary which will allow the determination of these levels. In this way, the methodological contributions of Saunders et al. (2005) are relevant as they pointed out that any placental portion is representative of the total amount of retinol in the organ as no significant difference was found between the tissue retinol levels in the different portions studied.

In the present study we aim to assess vitamin A stability in samples of placentas maintained at room temperature besides assessing the intraplacental distribution of carotenoids in the placenta with the objective of enhancing the amount of information on this subject and of providing elements to address placenta as a possible biomarker of vitamin A deficiency (VAD) in the mother-child group.

MATERIALS AND METHODS

Population and sample

The population studied was formed by low-risk puerperal mothers followed up by the antenatal care service at the Maternity Hospital of Universidade Federal do Rio de Janeiro (ME/UFRJ), in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Puerperal mothers were selected according to the following criteria: maternal age ≥ 20 years; absence of VAD (serum retinol $\geq 1.05\mu\text{mol/l}$ and absence of gestational night blindness); pregnancy of a single fetus, without intercurrents or congenital malformations; delivery at term (gestational age ≥ 37 weeks); absence of clinically confirmed diseases beginning previously to pregnancy (diabetes mellitus, cardiovascular disease, liver disease) and gestational intercurrents; non-use of vitamin-mineral supplement containing vitamin A in the gestational period.

For assessment of intraplacental distribution of carotenoids, 61 puerperal mothers were selected from whom six samples of each placenta (three from the maternal portion and three from the fetal portion) were obtained.

For the study of placental stability of retinol a sample of 12 placental portions collected in a posterior time was selected. The sampling location of the portions was chosen at random considering that there are no statistically significant differences in the concentrations of retinol in the assorted placental portions (Saunders et al, 2005).

Treatment of the samples

Samples were obtained immediately after delivery, after the separation from the newborn and the sample weighing. The umbilical cord and the amniochorionic membrane were considered in weighing (Thomson et al, 1969).

A separation of the amniochorionic membrane and of the umbilical cord was performed before the collecting of the placenta samples. Samples of approximately 5g were obtained through an incision carried out with a scalpel incision (Saunders et al, 2005) in dimly-lit surroundings (Arroyave et al, 1982; Barreto-Lins et al, 1988).

The placenta samples were washed with a solution of 0.15M chloride of sodium-chloride solution 0,15M until total blood withdrawal (Dimenstein et al, 1996) and they were submitted to the proceedings inherent to the objective of each study:

- *Study of the stability of retinol and carotenoids:* the samples were kept at room temperature and without protection against luminosity and retinol amounts were quantified twice: after the first hour and 24 hours after delivery. The times applied aimed to establish the shorter period between delivery and the quantification of the vitamin A amounts, and to compare them to the larger period in which the vitamin A levels remains stable without the presence of tissue degradation. This procedure aimed to make the organ viable to epidemiological studies on the nutritional vitamin A status.
- *Study of the intraplacental distribution of carotenoids:* the samples were stored in a freezer at a temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or lower until the time of the biochemical dosage. All samples were kept in sterilized individual vessels with protection against luminosity.

Quantification of the placental levels of retinol and carotenoids

Serum levels of vitamin A were determined according to the spectrophotometric method of Bessey et al. modified by Araújo & Flores (1979) taking into account the

necessary precautions to assure the quality of the samples before analysis (Barreto-Lins et al, 1988). Dosages were conducted at the Laboratory of Biochemistry of the Instituto de Nutrição Josué de Castro of Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC/UFRJ).

For a sample of nine placental portions vitamin A levels were also determined by high performance liquid chromatography (HPLC) (Hess et al, 1991).

Statistical analysis

T-Student and ANOVA were applied to comparison of means. Pared t-Student test was used to compare biochemical methods.

For the study of the intraplacental distribution of carotenoids the mean of the six portions for each organ was calculated and it was defined as the most probable value (MPV) of carotenoids in each placenta. The value of each portion was compared to the MPV through the application of the F and t-Student tests.

The adopted significance level was 5%.

Analyses were conducted through the SPSS for Windows program, version 15.0.

Ethical issues:

Data collection took place after the signing of the institutional agreement between the Center of Research on Micronutrients (Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes /NPqM) of the INJC/UFRJ and the cited maternity hospital. The research project was approved by the Ethics Committee of the ME/UFRJ and the Ethics Committee of the National School of Public Health (Escola Nacional de Saúde Pública / ENSP) of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Research proceedings were established according to the 196/96 Resolution of the National Council of Health (MS, 1998).

RESULTS

The puerperal mothers' mean age was 26 ± 6.4 y, presented a mean pre-gestational weight of 55.2 ± 9 Kg and total weight gain of 13.1 ± 5.4 Kg. Their newborns presented birthweight of 3266.5 ± 451 g and the placentas weighed around 640 ± 143.9 g.

According to the results presented in table 1, there are no significant differences between the retinol and carotenoids levels in placentas maintained at room temperature for a period of time up to 24 hours.

When assessing the carotenoids levels in the several portions studied, it is observed that all of them presented a high correlation with the MPV.

We did not find significant differences between the two biochemical methods used ($p=0,318$), spectrophotometric and HPLC

[Insert tables 1 and 2 about here]

DISCUSSION:

The placenta is characterized by being the single organ composed by cells of two distinct individuals (Iyengar & Rapp, 2001). The importance of vitamin A in the placental metabolism goes beyond the embryonic development, tissue homeostasis, lipid metabolism and cell differentiation and proliferation. Human placentas express factors of nuclear transcription of retinoic acid receptors (RAR) and retinoic X receptor (RXR). The modulation of these factors through retinoic acid is capable of modulating the expression of several genes such as: chorionic gonadotrophic hormone, placental lactogenic hormone, leptin, epidermal growth factor receptor (Marceau et al, 2006), triiodothyronine (T3), estrogen, progesterone, cortisol, aldosterone, testosterone, vitamin D, cholesterol and free fatty acids (Burri, 2001; Sarni et al, 2002; Radhika et al, 2002).

Placenta plays an important role in the metabolism of vitamin A since it has been already demonstrated that this organ has the ability to esterify retinoids and to produce active retinoids through retinol (Marceau et al, 2006). β -carotene-15,15'-dioxygenase enzyme,

responsible for cleavage of β -carotene in two retinol molecules, is present in the fetal part of the amniotic membrane of the human placenta showing the placental ability to convert the vitamin precursor into its active form (retinol) (Marceau et al, 2006; Morris-Kay & Sokolova, 1996). This accumulated information justifies the interest of the study on placenta related to the diagnosis of the nutritional vitamin A status in the mother-child group.

According to the results presented in this study, it is observed that the placental retinol and carotenoids levels are maintained even after 24 hours without protection to light exposure or temperature. These results, added to the stability of retinol in the placenta under freezing for six months (Saunders et al, 2005), suggest a higher stability of retinol in the placental tissue in relation to serum retinol independently from the storage method. In total blood, retinol shows to be stable for 24 hours in ice and for four hours at room temperature or at 37° C in plasma (Peng & Xu, 1987). This fact may become easier studying vitamin A deficiency whereas there is poor or inadequate conditions for placental storage.

Another important finding concerns the intraplacental distribution of carotenoids. Any portion of the placenta, as already demonstrated for retinol (Saunders et al, 2005), is capable of representing the carotenoids levels of the organ as a whole. This finding makes unnecessary the technique of the collecting of several samples or of the homogenization of the overall placenta as recommended for other analyses (Iyengar & Rapp, 2001), a technique which makes the process more onerous and makes difficult the use of the organ for other analyses.

The results of the present paper represents a further advancement for the studies which aim to incorporate the dosage of the placental vitamin A amounts in its protocols, taking into consideration the fact that it is very easy to collect it since it is not necessary to have a highly trained professional to do that. The stability of retinol as much that of carotenoids in the tissue, be at room temperature or by freezing, minimizes the losses during the processes of collecting, transfer, storage and dosage. Because it is an organ of transfer of nutrients during pregnancy it is capable of assessing the nutritional vitamin A status in the

maternal-infant relationship. These factors confer easiness to field work as well reduction of costs, making even possible the conduction of population studies.

The results of the present study can be interpreted as an important finding in the addressing of the objectives which investigate the placenta as a predictor of the nutritional vitamin A status in puerperal mothers and newborns. Besides, they can contribute to the definition of the correlation between the maternal and newborn serum levels of retinol and the contents of the placenta. Those findings can still impel the studies of identification of the placenta contents of vitamin A as a possible biomarker of the nutritional vitamin A status of the mother-child relationship. For maintaining stable the vitamin A levels as regards the conditions of exposure in the hospital environment it must be valued as a possible biomarker to be incorporated into the routine of surveillance of the nutritional vitamin A status, inclusively in the maternity hospitals.

REFERENCES

1. Araújo CRC, Flores H. 1978. Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clinical Chemistry* 24: 386.
2. Arroyave G, Chichester CO, Flores H, Glover J, Mejía LA, Olson JA, Simpson, KL, Underwood, BA. 1982. Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status. International Vitamin A Consultative Group, p. 92, The Nutrition Foundation, Washington.
3. Barnes AC. (1951) The placental metabolism of vitamin A. *American Journal of Obstetric and Gynecology* 61: 368-372.
4. Barreto-Lins MHC, Campos FACS, Azevedo MNA. 1988. A re-examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of standardized meal. *Clinical Chemistry* 34, 11: 2808-2810.
5. Baydas G, Karatas F, Gursu F, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, Canatan H. 2002. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archives of Medical Research* 33: 276-280.
6. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. 2003. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *American Journal of Obstetric and Gynecology* 189: 181-8.
7. Burri BJ. 2001. The formation of vitamin A from β -carotene: good, bad and variable. *Sight and life. Newsletter*, 2.
8. Dimenstein R, Trugo NMF, Donangelo CM, Trugo LC, Anastácio AS. 1996. Effect of subadequate maternal vitamin A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus. *Biology of the Neonate* 69: 230-234.

9. Gomes MM, Saunders C, Accioly E. 2005. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil* 5, 3: 275-282.
10. Hess D, Keller HE, Oberlin B, Bonfanti R, Schüep W. 1991. Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 61(3),232-8.
11. Iyengar GV, Rapp A. 2001 Human placenta as a 'dual biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements Part 1: Physiology, function and sampling of placenta for Elemental characterization. *The Science of the Total Environment* 280: 195-206.
12. Marceau G, Gallot D, Borel V, Lémery D, Dastugue B, Dechelotte P, Sapin V. 2006. Molecular and metabolic retinoid pathway in human amniotic membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346: 1207-1216.
13. Morriss-Kay GM, Sokolova N. 1996. Embryonic development and pattern formation. *FASEB Journal*. 10: 961-968.
14. Paszkowski T, Lagód L. 2001. The role of oxidative stress in the pathogenesis of early pregnancy loss. *Polish Journal of Gynaecologic Investigation* 3, 4: 135-138.
15. Peng YM, Xu MJ. 1987. Analysis and stability of retinol in plasma. *Journal of the National Cancer Institute* 7: 95-9.
16. Radhika MS, Bhaskaram P, Balakrishma N, Ramalakshmi BA, Savitha DEVI, Siva Kumar B. 2002. Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 109: 689-693.
17. Ramalho RA, Accioly E, Silva LM. 2003. Doenças cardiovasculares: efeito antioxidante das vitaminas A, C e E. *Revista de Metabolismo e Nutrição* 7, 1: 6-9.

18. Sapin V, Alexandre MC, Chaïb S, Bournazeau JA, Sauvart P, Borel P, Jacquetin B, Grolier P, Lémery D, Dastugue B, Azaïs-Braesco V. 2000. Effect of vitamin A status at the end of term pregnancy on the saturation of retinol binding protein with retinol. *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 537-543.
19. Sarni RS, Kochi C, Ramalho RA, Schoeps DO, Sato K, Matoso LCQ, Ximenes CF, Souza FI, Damiani RM. 2002. Vitamina A nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. *Revista da Associação Médica Brasileira* 48, 1: 48-53.
20. Saunders C, Leal MC, Flores H, Soares A, Lima AP, Leite PC, Gomes MM, Souza Jr, PRB, Ramalho A. 2005. Intraplacentar distribution of retinol. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56, 8: 607-612.
21. Simsek M, Naziroğlu M, Simsek H, Çay M, Aksakal M, Kumru S. 1998. Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. *Cell Biochemistry and Function* 16, 4: 227-231.
22. Sivaprasadarao A, Findlay JBC. 1988 The mechanism of uptake of retinol by plasma-membrane vesicles. *Biochemistry Journal* 255: 571-579.
23. Sundaram M, Sivaprasadarao A, De Sousa MM, Findlay JBC. 1998. The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 3336-3342.
24. Thomson AM, Billewicz WZ, Hytten FE. 1969. The weight of the placenta in relation to birthweight. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth* 76: 865-872.
25. Williams MA., Woelk GB, King IB, Jenkins L, Mahomed K. 2003. Plasma carotenoids, retinol, tocopherols, and lipoproteins in preeclamptic and normotensive pregnant zimbabwean women. *American Journal of Hypertension* 16: 665–672.

26. Zhang C, Williams MA, Sanchez SE, King IB, Ware-Jauregui S, Larrabure G, Bazul V, Leisenring WM. 2001. Plasma concentrations of carotenoids, retinol, and tocopherols in preeclamptic and normotensive pregnant women. *American Journal of Epidemiology* 153:572–80.

Table 1: Comparison of the retinol levels of non-frozen placentas according to the time elapsed since delivery (n=12).

Time (hours)	n	Mean (µmol/L)	Standard deviation	p
1	6	0.1917	0.0303	0.763
24	6	0.1750	0.0444	

Table 2: Intraplacental distribution of carotenoids.

Portion	n	Mean	Standard deviation	Ratio: values of the portions and of MPV	Standard deviation	r	p
Central fetal	61	0.283	0.048	1.166	0.128	0.522	0.000
Lateral fetal 1	61	0.215	0.032	0.938	0.087	0.577	0.000
Lateral fetal 2	61	0.212	0.026	0.908	0.101	0.393	0.002
Central maternal	61	0.268	0.043	1.102	0.137	0.476	0.000
Lateral maternal 1	61	0.195	0.024	0.876	0.103	0.502	0.000
Lateral maternal 2	61	0.253	0.040	1.009	0.101	0.633	0.000
MPV	366	0.238	0.019				

ANEXO 8:

ARTIGO 2: Placenta: possible predictor of vitamin A deficiency?

(Encaminhado à revista: British Journal of Nutrition em março/2009)

Placenta: possible predictor of vitamin A deficiency?

Authors:

Mirian Gomes*

Claudia Saunders**

Andrea Ramalho**

* Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes – Instituto de Nutrição Josué de Castro – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto Fernandes Figueira – Fundação Oswaldo Cruz.

**Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes – Instituto de Nutrição Josué de Castro – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ.

Keywords: placenta, vitamin A deficiency; newborn; puerperal women

Abstract:

The present study's objective is to evaluate the association between vitamin A deficiency (VAD) through the biochemical indicator serum retinol (blood from mother and chord) and placental retinol and carotenoids levels so as to propose placental values representing deficiency. 262 puerperal women and their newborns (NB) were evaluated. Serum and placental retinol and carotenoids levels were determined by way of spectrophotometric and HPLC dosing. ROC curve analysis was performed according to two cut-points (0.70 and 1.05 $\mu\text{mol/l}$) to placental levels representing deficiency. No difference between means of placental retinol and carotenoids was observed in the puerperal women regardless of the cut-point used to define VAD. In relation to the NB's, a drop ($p=0.012$) in placental retinol means in individuals with VAD was observed when the 1.05 $\mu\text{mol/l}$ cut-point was adopted. What that means in respect to placental carotenoid averages is that a drop is observed for both cut-points ($p=0,013$ and $p=0,019$ for both points 1,05 $\mu\text{mol/l}$ and 0,7 $\mu\text{mol/l}$, respectively). The ROC curve results point to the value 0.80 $\mu\text{mol/l}$ as representing deficiency with greater values found for sensitivity (66.7 %), specificity (41.7 %) and accuracy (65%) when the 0.70 $\mu\text{mol/l}$ cut-point was adopted. The results of this study point to there being an association between placental retinol and carotenoids levels and clinical vitamin A deficiency, suggesting the need for future studies on more serious cases of deficiency.

Introduction:

Vitamin A deficiency (VAD) is a public health problem of unquestionable significance. Its growing prevalence has been noted since the 1990's ^(1, 2, 3, 4, 5).

Vitamin A is extremely important during the initial stages of life. Its role goes beyond embryonic development, tissue homeostasis, lipid metabolism and cellular differentiation and proliferation. Human placentae express factors for the nuclear transition of retinoic acid receptors (RAR) and retinoic X receptor (RXR). Modulation of these factors by retinoic acid is capable of modulating the expression of several differentiations like: chorionic gonadotrophic hormone, placental lactogenic hormone, leptin, epidermal growth factor receptor, tri-iodine tironine, estrogen, progesterone, cortisol, aldosterone, testosterone, vitamin D, cholesterol and fatty acids ^(7, 8, 9).

In 1996 the WHO underscored the need for proposed guidelines on proper selection, use and interpretation of indicators, not just for mapping deficiency but also for proposing programs for assessing the impact of measures of intervention for controlling vitamin A deficiency.

The placenta is the only organ composed of the cells of two distinct individuals ⁽¹⁰⁾. So far, no work has been done to evaluate retinol and levels concentrations in the placenta and their relationship to the nutritional state of mother-child bionomy. Some authors describe the presence of receptors for the vitamin in the placenta's brush border membrane, suggesting the possibility of the placenta having a regulatory mechanism ^(11, 12, 13).

In this scenario the objective of the present study was to evaluate the association between serum and placental levels of vitamin A and propose values of placental retinol representing vitamin A deficiency.

Methodology:

Population and Sample

The population studied was made up of low-risk puerperal women accompanied by the antenatal care service at the Maternity Hospital of Universidade Federal do Rio de Janeiro (ME/UFRJ), with 262 women chosen, according to the following criterion: single-child pregnancy, absence of clinically proven diseases to have surfaced prior to gestation (diabetes mellitus, hepatopathias, cardiopathias, renal illness), no use of vitamin-mineral supplementation containing vitamin A during gestation.

Collection and Analysis of Placenta Samples

Obtention of the placentae, as well as their weighing, was performed immediately post-partum after separation of the new born (NB) ^(14, 15).

Before obtention of placentae samples, the amnionchorionic membrane and umbilical chord were separated. The samples were obtained using a surgical scalpel, in a dimly lit environment ^(15, 16). Treatment, storage and transport of the samples were carried out according to procedures described by Saunders et al ⁽¹⁵⁾.

Biochemical Evaluation of Vitamin A Nutritional Status

To determine of maternal and NB serum retinol and carotenoids levels, 5ml samples of blood were collected intravenously from the puerperal women, in a state of fasting, as well as from the NB's umbilical chord, immediately post-partum ^(15, 17);

The blood samples obtained were centrifuged (3,000 rpm) to separate and extract the serum and were immediately frozen at a temperature of -20 degrees Centigrade, at the laboratory of the ME/UFRJ. Thereafter, all the samples were packaged so as to guarantee the temperature was maintained during transport to the INJC/UFRJ where they were kept frozen until the moment the retinol and carotenoids levels were analyzed at the Institution's Biochemical Laboratory.

Biochemical Quantification

Determination of serum retinol and carotenoid levels was performed through spectrophotometric dosage based on the Bessey et al ⁽¹⁸⁾ method modified by Araujo & Flores ⁽¹⁹⁾ and in accordance with procedures adopted by Flores et al ⁽²⁰⁾ for dosage of hepatic vitamin A. All samples were dosed in duplicate, with precautionary measures recommended by the *International Vitamin A Consultative Group (IVACG)*, to assure sample quality before analysis ^(21, 16). For a sample of 9 placental portions vitamin A levels were also determined by high performance liquid chromatography (HPLC)⁽²²⁾.

Cut-points of 0.7 and 1.05 $\mu\text{mol/L}$ were adopted to indicate VAD (23, 24, 25, 26). To indicate carotenoid insufficiency, cut-points of $<80\mu\text{g/dl}$ for the puerperal women ⁽²⁷⁾ and $<40\mu\text{g/dl}$ for the NB's ^(27,28) were adopted.

Treatment of Statistics

The t-Student test was used to verify that means were equal. Pared t-Student test was used to compare biochemical methods. The ROC curve was used to establish placentary retinol and carotenoid levels representative of their serum levels through

sensitivity and specificity evaluation for each cut-point. The best optimal point was determined to be that which maximized the sensitivity and specificity values. The level of significance established is $p < 0.05$. Statistical analysis is performed using the SPSS for Windows version 15.0 statistical program.

Ethical Issues

The study was carried out through an institutional accord between the NPqM/INJC/UFRJ and the ME/UFRJ. Data collection took place after approval from the ethics commission of the Maternidade Escola of UFRJ and the ethics committee of the Escola Nacional de Saúde Pública of Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Results

The puerperal participants mean age was 26 ± 5.8 y, presented a mean pre-pregnancy weight of 55.2 ± 9 kg and total weight gain of 12.9 ± 5.7 . Their new-borns presented birth weights of $3,266.5 \pm 451$ g and the placentae weighed on 640 ± 143.9 g. Gestational duration on birth was 39 ± 1.59 weeks.

According to the results shown in table 1, a drop in placental retinol levels within the margins of VAD was observed both for the mother and the NB, regardless of the cut-point adopted. However, significant statistical difference was only found in the NB's VAD, or in other words, in the placental retinol levels according to the different cut-points identified in the NB's VAD.

Regarding carotenoids the drop was also observed with a tendency for statistical significance when the serum retinol cut-point of $1.05 \mu\text{mol/L}$ for identifying maternal deficiency was used. In NB there is a statistically significant difference between placental carotenoid means regardless of the cut-point.

Analysis of the ROC curve was carried out for placental retinol levels according to the two cut-points for classifying VAD both for the mother and the NB. Values for placental retinol levels of $< 0.80 \mu\text{mol/L}$ were adopted as predictors of inadequate serum levels with the values of specificity, sensitivity and the area under the curve (accuracy) (table 2) presented. It was observed that sensitivity increases as the cut-point for serum levels is lowered, or in other words, as the VAD is aggravated. Beyond that, regardless of the cut-point adopted for classifying serum retinol levels the sensitivity and specificity results show increases in the NB when compared to the puerperal woman. The best accuracy value (65%) was found for the curve made from the second $0.70 \mu\text{mol/L}$ cut-point for identifying puerperal deficiency.

A ROC curve taken from placental carotenoids levels did not permit the adoption of any value that could represent their serum inadequacy.

We did not find significant differences between the two biochemical methods used ($p=0,318$), spectrophotometric method and HPLC.

Discussion:

The placenta possesses a capacity for retinoid esterification and active retinoid production by way of retinol, thus making it able to produce the active metabolites it needs ⁽⁶⁾. The present study proposes evaluation of the association between serum and placental levels of vitamin A and proposal of placental retinol values representing VAD.

An association between means placental retinol and carotenoids levels according to both maternal and fetal nutritional states of vitamin A was found. Although by analyzing the ROC curve the placenta has not been shown to be a good predictor of sub-clinical deficiency, it was noted that sensitivity and specificity values increased when the cut-point was lowered from $1.05\mu\text{mol/L}$ to $0.70\mu\text{mol/L}$. This fact may be interpreted as being that the placental vitamin A content is more related to a more severe state of VAD.

In this sense, evaluation of the curve with cut-points at different stages of severity of the deprivation illness in question is made necessary. Such an approach was not carried out in the present study, due to the fact there was not a great enough number of grave VAD cases (according to the WHO's cut-points, 1996) ⁽²⁶⁾ to create the curve. The same phenomenon was also noted for sensitivity and specificity values when comparing puerperal women and NB's, the results tend to be more expressive in the NB.

In states of privation, retinol is the priority ahead of carotenoids, with the latter converted into the provitamin form. It is known that the enzyme β -carotene-15,15'-dioxygenase, responsible for splitting the β -carotene molecules into two retinol molecules, is present in the fetal part of the amniotic membrane of the human placenta ^(6, 29). This fact may explain the better association of placental levels with NB's serum levels, besides justifying the difficulty in finding placental carotenoids levels to represent both maternal and NB serum levels.

Placenta appears as a possible indicator of vitamin A for puerperal period when takes place breastfeeding and the major vitamin A transfer to the neonate. So this organ may contribute for detection and treatment so as to prevent the transmission of the deficiency cited.

The results of this study point to an association between vitamin A nutritional state and placental retinol and carotenoids levels. This being the first study using the placenta as a marker for VAD suggests the need for further studies so as to assess more cut-points for grave privation and to define cut-points for placental levels.

Acknowledgments

The authors want to express their gratitude to the researchers and the volunteers who participated in this study; to the Board of Directors of the Maternity Hospital of Universidade Federal do Rio de Janeiro that made the study possible; and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico _ CNPq, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho _ FAPERJ, and the Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro for financial support. Mirian Gomes participated on data collection and analyses; Cláudia Saunders supervised the field work and data collection and participated on study design; Andréa Ramalho participated on study design. All authors had participated on manuscript preparation. None of the authors had a personal or financial interest to declare.

References:

30. Ferraz IS, Daneluzzi JC, Annucchi H, Jordão Jr AA (2005) Prevalência da carência de ferro e sua associação com a deficiência de vitamina A em pré-escolares. *J Pediatr (Rio J)* **81**(2), 169-74.
31. West JRKP (2002) Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *J Nutr* **132**, 2857S-2866S.
32. Maisson JB, Lotfi M, Dalmiya N *et al* (2001) *The Micronutrient Report. Current progress and trends in the control of vitamin A, iodine, and iron deficiencies*. Ottawa, Canada: The micronutrient Initiative/UNICEF.
33. World Health Organization. (1999) *Reducción de la mortalidad materna. Declaración conjunta OMS/FNUAP/UNICEF/Banco Mundial*. Ginebra: WHO. (Classificación NLM:HB 1322.5).
34. Sommer A (1995) *La carencia de vitamina A y sus consecuencias. Guía práctica para la detección y el tratamiento*. Tercera edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
35. Marceau G, Gallot D, Borel V, *et al* (2006) Molecular and metabolic retinoid pathway in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 1207-1216.
36. Sarni RS, Kochi C, Ramalho RA, *et al* (2002) Vitamina A nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. *Rev Assoc Med Bras* **48**(1), 48-53.
37. Radhika MS, Bhaskaram P, Balakrishma N, *et al* (2002) Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. *Int J Gynaecol Obstet* **109**, 689-693.
38. Burri BJ (2002) The formation of vitamin A from β -carotene: good, bad and variable. *Sight and life. Newsletter*, **2**.
39. Iyengar GV, Rapp A (2001) Human placenta as a 'dual biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements Part 1: Physiology, function and sampling of placenta for elemental characterisation. *Sci Total Environ* **280**, 195-206.
40. Barnes AC (1951) The placental metabolism of vitamin A. *Am J Obstet Gynecol* **61**, 368-372.
41. Dimenstein R, Trugo NMF, Donangelo CM, *et al* (1996) Effect of subadequate maternal vitamin A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus. *Biol Neonate* **69**, 230-234.

42. Sundaram M, Sivaprasadarao A, De Sousa MM, Findlay JBC (1998) The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *J Biol Chem* **273**, 3336-3342.
43. Thomson AM, Billewicz WZ, Hytten FE (1969) The weight of the placenta in relation to birthweight. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* **76**, 865-872.
44. Saunders C, Leal MC, Flores H, *et al* (2005) Intraplacental distribution of retinol. *Int J Food Sci Nutr* **56**(8), 607-612.
45. Barreto-Lins MHC, Campos FACS, Azevedo MNA (1988) A re- examination of the stability of retinol in blood and serum, and effects of standardized meal. *Clin Chem* **34**(11), 2808-2810.
46. Ramalho RA, Anjos LA, Flores H (1999) Estado nutricional de vitamina A no binômio mãe/recém-nascido em duas maternidades no Rio de Janeiro, Brasil. *Arch Latinoam Nutr* **49**, 318-321.
47. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ, López JA (1946) The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J Biol Chem* **1**, 177-188.
48. Araújo CRC, Flores H (1978) Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clin Chem* **24**, 386.
49. Flores H, Ramalho RAG, Ribeiro ARLP (1988) Intrahepatic distribution of vitamin A in humans and rats. *Int J Vitam Nutr Res.* **58**, 276-280.
50. Arroyave G, Chichester CO, Flores H *et al* (1982) *Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status*. International Vitamin A Consultative Group. The Nutrition Foundation, Washington. p. 92.
51. Hess D, Keller HE, Oberlin B *et al* (1991) Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *Int J Vitam Nutr Res*, **61**(3),232-8.
52. Christian P, West JRKP, Khattry SK *et al* (1998) Night blindness of pregnancy in rural Nepal – nutritional and health risks. *Int J Epidemiol* **27**, 231-237.
53. Biswas AB, Mitra NK, Chakraborty I *et al* (2000) Evaluation of vitamin A status during pregnancy. *J Indian Med Assoc* **98**(9), 525-529.
54. Flores H, Azevedo MNA, Campos FACS *et al* (1991) Serum vitamin A distribution curve for children aged 2-6 known to have adequate vitamin A status: a reference population. *Am J Clin Nutr* **40**, 1281-1289.
55. World Health Organization. (1996) *Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programs*. Geneva: WHO.

56. Sauberlich HE et al, 1974 Apud Oliveira JED, Marchini JS (1994) Levantamento bibliográfico de estudos bioquímico-nutricionais sobre micronutrientes realizados no Brasil. *Cad Nutr: Rev Soc Bras Alim Nutr (São Paulo)* **8**, 31-67.
57. Robles-Sardin AE, Astiazarán-Gracia M, Dávalos-Navarro R et al (1998) Efecto de la suplementación con una dosis masiva de vitamina A en niños de 6 a 36 meses de edad. *Salud Publica Mex* **40** (4), 309-315.
58. Morriss-Kay GM, Sokolova N (1996) Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* **10**, 961-968.

Table 1: Comparison of placental retinol and carotenoid means according to maternal and new-born vitamin A nutritional state.

		Retinol							Carotenoids						
Cut-point		VAD			Normal				VAD			Normal			
		n	mean	sd	n	mean	sd	p	n	mean	sd	n	mean	sd	p
Maternal	1.05	26	1.3719	2.2419	107	1.9495	3.0214	0.345	27	0.2000	0.1780	90	0.3356	0.6036	0.063
	0.7	8	0.9487	0.8783	125	1.8934	2.8551	0.354	9	0.1667	0.1146	108	0.3157	0.5582	0.272
Newborn	1.05	50	1.3114	1.4014	46	3.2954	4.9834	0.012	44	0.2173	0.2057	46	0.6802	1.2006	0.013
	0.7	26	1.4331	1.7368	70	2.5700	4.1844	0.063	23	0.2187	0.2134	67	0.5346	1.0209	0.019

Sd= standard deviation

Table 2: Sensitivity and specificity results according to serum cut-points for VAD adopting the placental cut-point 0.80 $\mu\text{mol/L}$ according to analysis of the ROC curve.

Serum retinol		Puerperal	Newborn
<1.05 $\mu\text{mol/L}$	Sensitivity	59.1%	61.2%
	Specificity	41.0%	51.2%
	Area under curve	0.55	0.57
<0.7 $\mu\text{mol/L}$	Sensitivity	66.7%	68.0%
	Specificity	41.7%	49.3%
	Area under curve	0.65	0.57

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)