UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Concentração em Nutrição Experimental

**Avaliação do *status* de magnésio e da sua associação com o
estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia**

Vivianne de Sousa Rocha

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Prof^a Dr^a Célia Colli

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Concentração em Nutrição Experimental

**Avaliação do *status* de magnésio e da sua associação com o
estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Vivianne de Sousa Rocha

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

Prof^a Dr^a Célia Colli

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rocha, Vivianne de Sousa
R672a Avaliação do *status* de magnésio e da sua associação
com o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-
eclâmpsia / Vivianne de Sousa Rocha. -- São Paulo, 2013.
118p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Colli, Célia

1. Magnésio : Avaliação nutricional : Ciência dos alimentos
2. Citocina : Bioquímica humana I. T. II. Colli, Célia, orientador.

641.17 CDD

Vivianne de Sousa Rocha

**Avaliação do *status* de magnésio e da sua associação com
estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Dr^a Célia Colli
Orientador/Presidente

Prof^a. Dr^a. Anita Sachs

Prof. Dr. José Carlos Peraçoli

Prof^a. Dr^a Elvira Maria Guerra Shinohara

Prof^a. Dr^a. Silvia M. Franciscato Cozzolino

São Paulo, 1 de julho de 2013

À minha mãe, Silvana Rocha

AGRADECIMENTOS

Às gestantes, que gentilmente participaram desse estudo: muito obrigada!

À professora Célia Colli, pelos anos de confiança e ensinamentos que levarei pela vida inteira.

Aos amigos do laboratório, pelos conhecimentos compartilhados: Adriana Rodrigues, Alexandre Lobo, Ana Lina Sales, Cassiana Ganem, Cristiane Hermes, Edna Machado, Eduardo de Carli, Eduardo Gaievski, Jéssica Silva, Juliana Campanholo, Maria Lúcia Cocato, Luciana Setaro, Natália Nadur, Pryscilla Teixeira, e Renata Kanashiro.

Em especial, à Fernanda Brunacci e à Ivana Lavanda, que, em diferentes momentos da pós-graduação, foram mais do que colegas na realização desses projetos e se tornaram minhas grandes amigas.

À Fabiana Lima e à Laila Sangaletti, pelo incentivo e pelo apoio.

Aos professores da FM-USP, Dr. Rodrigo Ruano e Dr. Marcelo Zugaib, que possibilitaram a realização desse estudo no Hospital das Clínicas, e ao Dr. Marcos Tadeu, médico do Hospital do Ipiranga, pela colaboração. Agradeço à doutoranda da FM-USP, Eugênia Assunção, que nos ajudou na seleção das gestantes.

Aos funcionários do Hospital das Clínicas e do Hospital Ipiranga, pelo auxílio durante as coletas, em especial à técnica de enfermagem, Evagelina, que gentilmente se dispôs a realizar as coletas de sangue.

À professora Ana Paula e à mestrand Fabiana Almeida, da FCF-USP, que prontamente disponibilizaram seu tempo e seu espaço físico para nos ajudar na realização da análise de malondialdeído.

Aos técnicos: Alexandre Pimentel, Ivanir Pires, Rosângela Paiva e Tatiana Garofalo, pela ajuda e pelos empréstimos de materiais.

Aos amigos de pós-graduação: Aline Martins, Ana Mara Silva, Claudimar de Oliveira, Daiana Vianna, Felipe Gomes, Gabriela Fulin, Graziela Biude, Isabela Saraiva, Liliane Pires, Rafael Bueno, Renata Figueiredo.

Aos funcionários da FCF-USP: Alan Ramos, Vanessa David e Wanderléa Domingues, pela importante ajuda na administração do financiamento concendido pela FAPESP; à Maria de Lourdes Pedrosa (Lurdinha), ao Edilson Feitosa, à Roberta Uehara, à Cleonice Estrela, à Mônica Perussi, ao Jorge Alves de Lima, à Elaine Midori e à Majô, que, direta ou indiretamente, possibilitam a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Inácio Filho e Silvana Rocha; aos meus irmãos, Danilo e Philipe Rocha, e aos queridos avós, distantes fisicamente, mas presentes em meus pensamentos.

Ao Marcelo Victor, pela paciência e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À Kaluce Almondes, minha irmã de coração: obrigada por todo carinho.

Aos amigos: Kátia Callou, Diane Rossetto, Tatiane Moreira, Dayves Augusto, Normando Peres, Jorge Torrejon, Leandro Montalvão, Lucillia Oliveira, Leonardo Torres, Emidio Matos, Marcelo Sibaldo, Aparecida Sibaldo e Adeilson Sedrins: vocês foram uma família.

RESUMO

ROCHA VS. **Avaliação do *status* de magnésio e da sua associação com o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia.** 2013. 118 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o *status* de magnésio (Mg) e a sua relação com o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia (PE). Participaram do estudo, 18 gestantes saudáveis (controle – CT) e 18 gestantes com PE, diagnosticadas com pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg, proteinúria $\geq 0,3$ g/24 h e sem doenças associadas. Sangue e urina de 24 horas foram coletados para análise de *status* de Mg, estresse oxidativo [malondialdeído (MDA), 8-isoprostano urinário e a atividade antioxidante das enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px)], a concentração de óxido nítrico (NO), e das citocinas inflamatórias [proteína C reativa, interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α)]; Foi aplicado um questionário quantitativo de frequência alimentar para gestantes. As comparações entre os grupos foram feitas pelos testes Qui-quadrado, *t-Student* ou *Mann Whitney*. O coeficiente de correlação de *Spearman* foi usado para verificar associação entre as variáveis. A análise do *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foi realizada para identificar as variáveis que melhor discriminassem os grupos ($\alpha=5\%$). As concentrações de Mg plasmático e eritrocitário, bem como a concentração de NO, a atividade da CAT e as concentrações de TNF- α e IL-6 foram maiores na PE do que no CT. Associações positivas entre o Mg plasmático e a proteinúria ($p=0,04$), o TNF α ($p=0,03$) e a IL-6 ($p=0,02$) foram verificadas; associações negativas foram encontradas entre a atividade da CAT e a concentração de 8-isoprostano urinário ($p=0,02$) e entre a atividade da GSH-Px e os níveis de pressão arterial diastólica ($p=0,01$). A análise ROC mostrou que o Mg plasmático e o TNF- α foram as variáveis que melhor discriminaram as gestantes com PE das CT. Os resultados mostraram que o estresse oxidativo não foi evidente na fisiopatologia da PE, possivelmente devido aos mecanismos antioxidantes compensatórios do organismo. A inflamação e os eventos inerentes à PE, como vasoconstrição, podem ter promovido as alterações no *status* de Mg.

Palavras-chave: magnésio; pré-eclâmpsia; estresse oxidativo; inflamação.

ABSTRACT

ROCHA VS. **Assessment of the magnesium status and its association with oxidative stress and inflammatory cytokines in preeclampsia.** 2013. 118 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was to assess the magnesium (Mg) status and its relationship with oxidative stress and inflammatory cytokines in preeclampsia (PE). Were included 18 healthy pregnant women (CT- control) and 18 PE, diagnosed with blood pressure $\geq 140/90$ mmHg, proteinuria $\geq 0,3$ g/24 h, and without other diseases. Blood and 24h urine were collected for analyses of the Mg status, oxidative stress [malondialdehyde (MDA), 8-isoprostane urinary and activities of the antioxidant enzymes: catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px)], nitric oxide (NO) and inflammatory cytokines concentrations [protein C reactive, interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α); Furthermore, a quantitative food frequency questionnaire was applied to pregnant women. The comparisons between groups were done by Chi-square, t-Student or Mann Whitney tests. Spearman correlation coefficient was used to verify association among variables and the Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis was performed to identify variables that better discriminated the groups ($\alpha = 5\%$). The Mg concentration, in plasma and in erythrocyte, as well as NO concentration, CAT activity and TNF- α and IL-6 concentrations were higher in PE than CT group. Positive associations between plasma Mg and proteinuria ($p=0,04$), TNF- α ($p=0,03$) and IL-6 ($p=0,02$) were verified; Negative associations were found between CAT activity and 8-isoprostane urinary concentration ($p=0,02$) and between GSH-Px activity and diastolic blood pressure levels ($p=0,01$). ROC analyses showed that plasma Mg and TNF- α were the variables which better discriminate pregnant women with PE from CT. The results showed that oxidative stress was not evident in physiopathology of PE, possibly due to compensatory antioxidant mechanisms present in the body. The inflammatory and the events inherent to PE, such as vasoconstriction, possibly have promoted changes in Mg status.

Keywords: magnesium; preeclampsia; oxidative stress; inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Possíveis sistemas envolvidos na gênese da pré-eclâmpsia	33
Figura 2 – Probabilidade de inadequação da ingestão de magnésio das gestantes do grupo controle e do grupo pré-eclâmpsia, de acordo com as <i>Dietary Reference Intakes</i> (IOM, 2005).....	62
Figura 3 – <i>Status</i> de magnésio dos grupos controle (CT) e pré-eclâmpsia (PE).....	63
Figura 4 – Atividade antioxidante das enzimas catalase e glutathione peroxidase do grupo controle (CT) e do grupo pré-eclâmpsia (PE).....	64
Figura 5 – Concentração da proteína C reativa, interleucina-6 (IL6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no grupo controle (CT) e no grupo pré-eclâmpsia (PE)..	65
Figura 6 – Curvas ROC (<i>Receiver–Operating Characteristics</i>) para Mg plasmático e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) para discriminar o grupo pré-eclâmpsia do grupo controle.....	67
Figura 7 – Fluxogramas das atividades realizadas.....	82
Figura 8 – <i>Bloxplot</i> dos parâmetros do <i>status</i> de ferro do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE).....	95
 Quadro 1 – Estudos que avaliaram o status de magnésio (Mg) na pré-eclâmpsia (PE) no período de 1992 a 2013	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados descritivos do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Mediana (Percentil 25-75); Frequência (%) 60
- Tabela 2** – Consumo de energia e nutrientes das gestantes do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Mediana (Percentil 25-75) 62
- Tabela 3** – Clearance de creatinina (Ccr), concentração de óxido nítrico (NO) e parâmetros do *status* oxidativos dos grupos controle (CT) e pré-eclâmpsia (PE). Mediana (Percentil 25-75)..... 64
- Tabela 4** – Coeficiente de correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis para grupos pré-eclâmpsia (PE) e controle (CT). 66
- Tabela 5** – Correlação entre os valores de ingestão de Mg e calorias obtidas, antes do ajuste por energia pelo método do resíduo..... 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
Ccr	<i>clearance</i> de creatinina
cel	célula
CT	controle
D	diferença entre a ingestão observada e a EAR
DRI	<i>Dietary Reference Intake</i>
EAR	<i>estimated adequate intake</i>
GSH-Px	glutathiona peroxidase
Hb	hemoglobina
HC	Hospital das Clínicas
HELLP	<i>haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets syndrome</i>
HI	Hospital Ipiranga
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICAM	molécula de adesão intracelular
IL	interleucina
IMC	índice de massa corporal
IFN- γ	interferon gama
MDA	malondialdeído
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase
eNOS	óxido nítrico sintetase endotelial
nNOS	óxido nítrico sintetase neuronal
iNOS	óxido nítrico sintetase induzível
ONOO ⁻	peróxido de nitrito
O ₂ ⁻	ânio superóxido
PE	pré-eclâmpsia
PIGF	fator de crescimento placentário
ppm	partes por milhão
QQFA	questionário quantitativo de frequência alimentar
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i>
ROC	<i>Receiver-Operating Characteristics</i>
SD _D	desvio padrão da diferença
sEndoglina	receptor solúvel de endoglina
sFlt-1	<i>soluble fms-like tyrosin kinase-1</i> (receptor solúvel do PIGF e VEGF)
TCLE	termo de esclarecimento livre e esclarecido
Th	células T <i>helper</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

TRPM	receptor transiente de potencial de melastatina
USP	Universidade de São Paulo
VCAM	molécula de adesão da célula vascular
VEFG	fator de crescimento endotelial vascular
8-isoprostano	8 iso-Prostaglandina F _{2α}

LISTA DE SÍMBOLOS

BHT	butil-hidroxi tolueno
°C	graus Celsius
Ca	cálcio
cm	centímetro
d	dia
dL	decilitro
Fe	ferro
fmol	fentomol
g	gramas
h	hora
H ₂ O	água
HCL	ácido clorídrico
HNO ₃	ácido nítrico
kcal	quilocalorias
KI	iodeto de potássio
kg	quilograma
L	litro
M	molar
Mg	magnésio
mg	miligramas
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
m ²	metro quadrado
ml	mililitros
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol	milimol
mM	milimolar
µg	micrograma
µL	microlitro
µmol	micromol
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetro
nM	nanomolar
s	segundo
U	unidade
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xvii
Apresentação	21
Capítulo 1	23
ARTIGO DE REVISÃO	23
1. Introdução	25
2. Pré-eclâmpsia: características clínicas, fatores de risco e fisiopatologia.....	26
3. Estresse oxidativo e citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia	30
4. Magnésio: função, distribuição compartimental e homeostase.....	33
5. Status de magnésio na pré-eclâmpsia	35
6. Magnésio e sua relação com o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia.....	40
7. Conclusão	42
8. Referências.....	44
Capítulo 2	51
ARTIGO ORIGINAL	51
1. Introdução	53
2. Material e métodos.....	54
3. Resultados	60
4. Discussão	68
5. Referências.....	73
APÊNDICE A – OBJETIVOS DO ESTUDO	79
APÊNDICE B – MATERIAL E MÉTODOS DETALHADOS	80
APÊNDICE C- ANÁLISE DO STATUS DE FERRO NA PRÉ-ECLÂMPsia.....	95
Anexos	97

Apresentação

A hipertensão é uma das complicações mais comuns na gravidez e, em particular, a pré-eclâmpsia (PE) tem consequências graves para mãe e para o filho. Apesar dos avanços científicos a respeito da doença, sua causa permanece desconhecida e tampouco existe um marcador biológico que possibilite seu diagnóstico precoce.

O estresse oxidativo e a inflamação, promovendo a disfunção endotelial, são considerados eventos intermediários que contribuem para a evolução dessa complicação hipertensiva. A alteração no *status* de magnésio (Mg) tem sido frequentemente associada ao aumento de radicais livre e citocinas inflamatórias em animais e humanos. No entanto, a relação do *status* de Mg com o estresse oxidativo e a inflamação na gênese da PE ainda é pouco estudada.

A hipótese deste estudo é que as gestantes com PE apresentam deficiência de Mg – e esse quadro, que irá associar-se ao estresse oxidativo e a inflamação, aumentará a gravidade dessa complicação hipertensiva.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos: *Capítulo 1*, artigo de revisão intitulado “O papel do magnésio na pré-eclâmpsia: implicações no estresse oxidativo e na inflamação”; *Capítulo 2*, artigo original intitulado “Alteração no *status* de magnésio e sua associação com o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia”. No apêndice, constam os materiais complementares deste estudo.

Capítulo 1

“O papel do magnésio na pré-eclâmpsia: implicações no estresse oxidativo e na inflamação”

Artigo de revisão

1. INTRODUÇÃO

A PE é uma complicação hipertensiva transitória que acomete 5 a 8 % das gestantes (NHBP, 2000)¹. Alguns fatores, como a ausência do diagnóstico precoce, o seu caráter heterogêneo, o risco de mortalidade materna/fetal e a prematuridade do feto, a tornaram uma das mais intrigantes doenças para a obstetrícia (KHAN *et al*, 2006). Apesar do desconhecimento de uma causa específica, o envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação são sugeridos na fisiopatologia da PE (YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).

O Mg é o segundo cátion mais abundante no meio intracelular, envolvido na estruturação de algumas enzimas, para que assumam uma conformação ativa, e como cofator de reações enzimáticas do tipo quinase, que necessitam do complexo ATP-Mg²⁺ (COLLI; SALES; ROCHA, 2013). O Mg também funciona como bloqueador natural dos canais de cálcio (Ca), promovendo o relaxamento muscular (SONTIA; TOUYZ, 2007).

Alguns estudos têm investigado se o Mg pode estar envolvido com a causa ou com o agravamento da PE. Baixas concentrações de Mg também têm sido associadas à vasoconstrição e ao aumento do tônus muscular, podendo influenciar nos níveis pressão arterial (SONTIA; TOUYZ, 2007). Além disso, relata-se o aparecimento de estresse oxidativo e inflamação diante da deficiência de Mg (MAZUR *et al*, 2007; MALPUECH-BRUGÈRE *et al*, 2000). Esse mineral tem, portanto, despertado muito interesse na comunidade científica, bem como a avaliação do seu *status* em diferentes grupos populacionais e estados fisiológicos.

Essa revisão teve o objetivo de reunir informações sobre o *status* de Mg na PE. O levantamento bibliográfico foi realizado nos bancos de dados *Pubmed* e *Science Direct*, relativos aos últimos 21 anos, usando os seguintes termos:

“magnesium AND preeclampsia”. Foram selecionados apenas os estudos de avaliação do *status* de Mg na PE, sem uso de suplemento de magnésio. Além disso, foi realizada uma abordagem geral a respeito da fisiopatologia da PE, da homeostase de Mg, bem como dos aspectos que envolvem o *status* de Mg no estresse oxidativo e na inflamação presentes na PE.

2. PRÉ-ECLÂMPSIA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, FATORES DE RISCO E FISIOPATOLOGIA

A PE é definida clinicamente por valores pressóricos $\geq 140/90$ mmHg, em dois momentos distintos, com intervalo de 6 horas, e proteinúria $\geq 0,3$ g/24 h, após a 20ª semana de gestação. Essa complicação hipertensiva é classificada como grave, quando há valores pressóricos $\geq 160/110$ mmHg, proteinúria ≥ 2 g/24 h, oligúria com menos de 500 mL/24 h, distúrbios visuais e cerebrais, edema pulmonar, função renal prejudicada, trombocitopenia e eclâmpsia, dentre outros sintomas (NHBP, 2000; HUTCHEON; LISONKOVA; JOSEPH, 2011).

Na presença de hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia, essa doença hipertensiva agrava-se para a síndrome HELLP (*haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets syndrome*). A PE é frequentemente diagnosticada no terceiro trimestre gestacional e, quando os sintomas aparecem antes da 34ª semana gestacional, os riscos podem ser maiores para a mãe e para o feto (HUTCHEON; LISONKOVA; JOSEPH, 2011).

Apesar da ausência de marcadores biológicos sensíveis para o diagnóstico precoce da PE, sabe-se que algumas mulheres são mais predispostas ao seu desenvolvimento. Os principais fatores de risco para a PE são idades extremas (< 20 anos ou > 35 anos), nuliparidade, gestação gemelar, gestação prévia com PE, história familiar da doença, afrodescendência e uso de medicamentos para induzir à

ovulação, além de hipertensão crônica, diabetes, obesidade e síndrome metabólica (ORCY *et al*, 2007; POON *et al*, 2010). Por outro lado, estudos mostraram que a exposição prolongada de mulheres ao mesmo esperma e ao cigarro podem ser fatores protetores da PE (ESPIN *et al*, 2001; BAINNBRIDGE; SIDLE; SMITH, 2005).

Embora a PE não tenha causa conhecida, sugere-se que a placenta desempenhe importante papel em sua fisiopatologia. Assim, placentação inadequada, estresse oxidativo placentário, inflamação exacerbada, angiogênese insuficiente e disfunção endotelial são algumas das condições associadas à doença (LYALL; BELFORT, 2009). A grande questão é se essas manifestações são causas ou consequências da PE.

A placenta é a principal responsável pelo fornecimento de nutrientes e oxigênio para o feto. A placentação inicia-se entre a 8^a. e a 18^a. semanas da fecundação. Nessa fase, durante a gestação normal, uma camada de células trofoblásticas extravilosas invade a parede uterina, através do endométrio e miométrio, para modificar a estrutura das artérias espiraladas da mãe. As células trofoblásticas substituem a camada muscular das artérias espiraladas por camada fibroide, o que diminui a resistência vascular, aumenta o diâmetro do vaso e, assim, permitem a adequada perfusão sanguínea para o feto (PIJNENBORG *et al*, 1983). Os trofoblastos expressam fatores angiogênicos importantes para o desenvolvimento vascular da placenta, dentre eles: o fator de crescimento placentário (PIGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o receptor de VEGF e PIGF (Flt-1) (LYALL; BELFORT, 2009; STAFF *et al*, 2013).

Na PE, essa invasão de células trofoblásticas ocorre superficialmente, sem atingir o miométrio, comprometendo as modificações nas estruturas das artérias espiraladas maternas (ZHOU *et al*, 1997). O resultado é a menor perfusão

sanguínea para o feto e, conseqüentemente, hipóxia, dano endotelial e a vasoconstrição. A hipóxia placentar leva ao desequilíbrio entre os fatores angiogênicos e antiangiogênicos, caracterizado pela diminuição da ação de VEGF e PlGF e pelo aumento da produção do receptor solúvel de VEGF, o *soluble fms-like tyrosin kinase-1* (sFlt-1), e do receptor solúvel sEndoglin, que são algumas das evidências mais recentes da placentação anormal (YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010; STAFF *et al*, 2013).

O sFlt-1 atua ligando-se ao VEGF, o que impede a interação com seu receptor endógeno (Flt-1) e o desempenho de suas ações de manutenção da função endotelial. Semelhantemente ao sFlt-1, o sEndoglin age como antagonista do fator de crescimento e transformação β (TGF- β), responsável pela diferenciação e pela proliferação celulares. O aumento das concentrações de sFlt-1 e sEndoglin é anterior ao aparecimento dos sintomas clássicos da PE, por isso, descreve-se que esses parâmetros deveriam ser incluídos como biomarcadores precoces no diagnóstico da PE (MYATT *et al*, 2013; STAFF *et al*, 2013). A produção excessiva desses receptores solúveis pode ser responsável pela função endotelial anormal na PE, gerando desequilíbrio na produção do vasodilatador: o óxido nítrico (NO) (YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).

O NO é um importante modulador da função endotelial, sintetizado pela enzima NO sintetase (NOS), a partir da L-arginina. Existem três isoformas da enzima NOS: NOS endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). As isoformas eNOS e iNOS, dependentes de Ca para sua ativação, estão presentes nas células endoteliais e nos neurônios, enquanto que a iNOS é induzido por citocinas pró-inflamatórias ou agentes pró-oxidantes, em diferentes células, como endoteliais, macrófagos, neutrófilos, células T. O iNOS libera quantidades de NO maiores do

que as demais isoformas e tem ação citotóxica, com intuito de destruir microorganismos e células tumorais. Uma das principais funções do NO é sua ação vasodilatadora e de inibição da agregação plaquetária. Todavia, o NO pode ser inativado ao reagir com ânions superóxidos, formando o peróxido de nitrito, um radical oxidante capaz de promover a peroxidação lipídica e a nitrosação da tirosina (DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2003; ESCUDERO, SOBREVIA, 2008).

A disfunção endotelial presente na PE tem sido atribuída a modificações na síntese ou na bioatividade do NO (CHOI; IM; PAI, 2002; NISHIZAWA *et al*, 2009). Todavia, as alterações nas concentrações de NO têm sido uma questão controversa (ESCUDERO e SOBREVIA, 2008). Algumas das razões podem ser: a dificuldade de medição do NO, devido a sua alta reatividade com ânions superóxidos e a quantidade de nitrito e nitrato presentes na alimentação, o que pode interferir nos resultados (CHOI; IM; PAI, 2002; NISHIZAWA *et al*, 2009). Revisões sistemáticas têm sugerido que os polimorfismos da enzima NO sintetase endotelial (eNOS) possam estar envolvido na gênese da PE (DAÍ *et al*, 2013; QI *et al*, 2013).

A disfunção endotelial, provavelmente, é a mais significativa manifestação dessa síndrome hipertensiva. Essa disfunção resulta em uma série de alterações útero-placentárias, além de hematológicas, renais, pulmonares, hepáticas e cerebrais, o que caracteriza a PE como uma síndrome multissistêmica. Resultantes da hipóxia placentária, o estresse oxidativo e a inflamatória são críticos para o desenvolvimento da PE (Figura 1) (YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).

3. *ESTRESSE OXIDATIVO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA PRÉ-ECLÂMPsia*

A fisiopatologia da PE tem sido dividida em dois estágios, um assintomático e o outro sintomático. O primeiro estágio envolve a invasão trofoblástica inadequada, que causa má-adaptação das artérias espiraladas, como já descrito acima.

A invasão trofoblástica inadequada resulta em episódios de hipóxia e reoxigenação na placenta, o que estimula o sistema xantina oxidase, uma fonte de radicais livres. Isso significa que, na porção das artérias espiraladas não remodeladas pelos trofoblastos, há fluxo sanguíneo restrito (hipóxia) e as poucas moléculas de oxigênio disponíveis para captação de elétrons da cadeia respiratória, gerados pelo sistema xantina oxidase, acabam se transformando em espécies reativas. Já na porção das artérias espiraladas modificadas pelos trofoblastos, o fluxo sanguíneo é maior e ocorre reoxigenação. Os elétrons acumulados da cadeia respiratória se ligam ao oxigênio disponível, o que gera a explosão de radicais superóxidos (O_2^-) e radicais de nitrogênio (ex. peróxido de nitrito $[ONOO^-]$, combinação de $NO + O_2^-$). A capacidade antioxidante é capaz de minimizar os danos oxidativos, mas a formação excessiva de radicais livres predispõe a placenta ao estresse oxidativo (HUNG; BURTON, 2006).

Um dos efeitos do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, que aumenta a permeabilidade da membrana placentária e a oxidação de ácidos graxos. O aumento das espécies reativas na placenta pode também provocar a apoptose de células trofoblásticas, conhecidas como micropartículas trofoblásticas, as quais caem na circulação sanguínea materna e ativam o sistema NADPH oxidase dos neutrófilos, que estimula a produção de ânions superóxidos e de citocinas inflamatórias, possivelmente pela via de sinalização celular do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B). Esses efeitos chegam à circulação materna, levados por células circulantes

como eritrócitos, leucócitos e plaquetas, que têm suas membranas oxidadas (CINDROVAS-DAVIES, 2009; ADAB *et al*, 2012).

Os danos oxidativos têm sido frequentemente avaliados pela peroxidação lipídica, através da concentração de malondialdeído e pela concentração de 8 isoprostaglandina $F_{2\alpha}$ (8-isoprostano), na urina e no plasma, e pela diminuição da capacidade antioxidante, sugerindo o estresse oxidativo como causa da PE (CHAMY *et al*, 2006; DORDEVIC *et al*, 2008; BERNARDI *et al*, 2008). Por outro lado, alguns estudos não observaram aumento dos danos oxidativos (MORRIS *et al*, 1998; REGAN *et al*, 2001) e tampouco a efetividade da suplementação de vitaminas antioxidantes C e E, na PE, foi comprovada em estudo de meta-análise (CONDE-AGUDELO *et al*, 2011). Aparentemente, a avaliação do estresse oxidativo na placenta parece indicar resultados mais claros.

O segundo estágio da PE, o sintomático, é caracterizado pela presença de inflamação generalizada. Os principais componentes da resposta inflamatória são os monócitos/macrófagos, os neutrófilos e as células *killer* e endoteliais, capazes de ativar o sistema imune adaptativo – células T *helper*, tipos Th1 (mediado por células) e Th2 (humoral) (BORZYCHOWSKY; SARGENT; REDMAN *et al*, 2006).

Na gestação normal, a tolerância imunológica do tipo Th2 é predominante em relação ao tipo Th1, produzindo citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-10, que previnem a rejeição do embrião e garantem seu desenvolvimento. Já a PE é caracterizada pela resposta imune adaptativa do tipo Th1, com o aumento de IL-1, IL-2, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- α e IFN- γ (interferon gama), bem como a ativação de macrófagos e linfócitos, resultando na exacerbação da resposta inflamatória (SHARMA; SATYAM; SHARMA, 2007; CHALLIS *et al*, 2009).

O principal contribuinte para a inflamação sistêmicas na PE parece ser o estresse oxidativo, através da liberação de micropartículas trofoblásticas na circulação, que ativam macrófagos e neutrófilos, capazes de aumentar a produção de TNF- α , do inibidor de plasminogênio ativado tipo-1 e do iNOS, que limitam a invasão trofoblástica e a remodelação das artérias espiraladas, como descrevem Ahn *et al* (2011).

O endotélio também contribui para a inflamação, ativando leucócitos, aumentando a produção de moléculas de adesão, E-selectina e ICAM, e promovendo o desbalanço entre vasodilatadores e vasoconstritores, finalizando com as alterações clássicas da PE: vasoconstrição, resistência vascular periférica e proteinúria (BORZYCHOWSKY; SARGENT; REDMAN, *et al*, 2006; RAMMA; AHMED, 2011). As interações de todos esses sistemas demonstram a complexidade que envolve a gênese da PE (Figura 1).

Figura 1 – Possíveis sistemas envolvidos na gênese da pré-eclâmpsia

4. *MAGNÉSIO: FUNÇÃO, DISTRIBUIÇÃO COMPARTIMENTAL E HOMEOSTASE*

O Mg é um cátion predominantemente intracelular, necessário em importantes vias metabólicas do organismo. Atua principalmente nas reações que necessitam de fosfatos ricos em energia, através da formação do complexo Mg-ATP^{2+} , que permite a estabilidade da molécula de fosfato e, assim, auxilia na transferência desse grupamento ao substrato da reação (COLLI; SALES; ROCHA, 2013). O Mg é um bloqueador natural dos canais de cálcio (Ca), impedindo o influxo de Ca no meio celular e a liberação desse mineral do retículo sarcoplasmático, o que promove o relaxamento muscular. Em nível vascular, o Mg é um importante modulador da função endotelial, da vasodilatação e do tônus vasomuscular (SONTIA; TOUYZ, 2007).

O Mg está distribuído em diferentes compartimentos biológicos e em concentrações variadas, totalizando, em um ser humano saudável (70kg), cerca de 24 a 28 g (ELIN, 1987). Apesar de certos compartimentos, como ossos e músculos, apresentarem os maiores percentuais de Mg no organismo humano, avaliar o Mg nesses compartimentos envolve alto custo e uso de técnicas invasivas. Assim, a avaliação do *status* de Mg limita-se aos compartimentos urinário, sérico/plasmático e eritrocitário, sendo que esses dois últimos contêm < 1% do Mg corporal (ELIN, 2010).

A excreção urinária de Mg é a forma primeira de regulação da homeostase do mineral, diante da função renal preservada. Quando a concentração sérica de Mg começa a baixar, os rins reabsorvem mais o mineral, diminuindo sua excreção, e a concentração sérica se mantém (ELIN, 1987; VORMANN, 2003).

No entanto, quando se estabelece uma hipomagnesemia sérica, os mecanismos fisiológicos de reabsorção já não são suficientes para manter as concentrações normais (ELIN, 1987; VORMAN, 2003). Em contrapartida, o Mg intracelular está ligado a ribossomos, fosfolípidios e nucleotídeos. Por essa razão, a alteração desse compartimento é mais difícil de ser detectada (ELIN, 2010).

A literatura científica vem sistematicamente destacando ingestão alimentar de Mg abaixo das recomendações em diferentes grupos populacionais, o que aumentaria o risco de deficiência do mineral no organismo (HURT e JONHSON, 2006; PETRAKOS *et al*, 2006; PINHEIRO *et al*, 2009; SALES *et al*, 2011; ROCHA *et al*, 2012). A redução da concentração sérica de Mg tem sido descrita no diabetes (SALES *et al*, 2011) e em outras situações que comprometem a absorção do mineral ou o aumento de sua excreção. Em indivíduos normais, essa redução pode ocorrer com o aumento da idade, devido à baixa ingestão (VINCENT-CROSBY *et al*, 2013).

5. STATUS DE MAGNÉSIO NA PRÉ-ECLÂMPsia

Ainda não há resultados conclusivos a respeito do *status* de Mg na PE. Alguns dos estudos feitos mostraram resultados de Mg sérico/plasmático que vão desde valores abaixo até valores acima dos observados em grupos controles (Quadro 1). Algumas possíveis explicações para os resultados contraditórios são as diferenças metodológicas entre os estudos; exemplos disso são os fatores de exclusão e a semana gestacional adotada, a ausência de informações sobre a dieta e, principalmente, a heterogenicidade genética da população e a gravidade da PE.

As baixas concentrações de Mg sérico têm sido o resultado mais frequentemente descrito em gestantes com PE, o que mostra a importância do mineral no aparecimento e no curso da doença (JAIN *et al*, 2010; GULABOGLU; BORECKI; HALICI, 2007; SUKOPAN; PHUPONG, 2005; KISTERS *et al*, 2000). Tem sido descrito que pequenas mudanças na concentração de Mg extracelular promovem alterações no tônus e na contração muscular, contribuindo para o aparecimento da hipertensão. Não se conhece o mecanismo específico de como o Mg promove essas alterações, mas seu efeito como antagonista dos canais de Ca está associado a sua deficiência em células musculares (SONTIA; TOUYZ, 2007).

A concentração de Mg no meio intracelular tem sido pouco explorada nos estudos com PE. Kisters *et al* (2000), mostraram a diminuição de Mg eritrocitário e a associação inversa entre as concentração de Ca e Mg na membrana, sugerindo que haja distúrbio no mecanismo de transporte de membrana na PE. Estudos *in vivo* têm comprovado que alterações do Mg intracelular na hipertensão arterial podem estar relacionadas com alterações do seu transportador ativo celular, TRPM7, o que contribui para inflamação e vasoconstrição (PARAVINICI *et al*, 2008; SONTIA *et al*,

2008). Mas, não há estudos que tenham avaliado a alteração no TRPM em mulheres com PE.

Diante da hipomagnesemia da gestação e em casos de eclâmpsia, a suplementação de Mg tem sido sugerida (JAIN *et al*, 2010). A efetividade da suplementação com sulfato de magnésio ($MgSO_4$) tem sido comprovada em estudos de revisão sistemática, que identificaram a redução do risco de eclâmpsia e mortalidade materna (DULEY; GÜLMEZOGLU; HENDERSON-SMART, 2003; McDONALD *et al*, 2012). Embora, não se saiba como o $MgSO_4$ atua para promover seus efeitos, seu uso tem sido associado com a vasodilatação e a diminuição da peroxidação lipídica e da fragilidade das membranas celulares (ABAD *et al*, 2010). Mas, a administração de $MgSO_4$ necessita de monitoramento adequado para evitar os riscos de toxicidade para mãe e para o feto, como hipotensão, perda dos reflexos dos tendões, arritmia cardíaca, paralisia muscular e morte (VORMANN, 2003; McDONALD *et al*, 2012). Vale destacar que o limite tolerável para a ingestão de Mg, sem riscos à saúde, é de 350 mg/d, incluindo suplementos (IOM, 1997).

Em contrapartida, alguns poucos estudos descreveram valores de Mg sérico maiores nas mulheres com PE do que nas gestantes saudáveis, sem alteração na sua excreção urinária (SEYDOUX *et al*, 1992; SANDERS *et al*, 1998) (Tabela 1). A heterogenicidade das populações estudadas é uma explicação plausível, demonstrando que existem grupos de gestantes com PE que não apresentam a deficiência do mineral. Pode-se especular se esse aumento de Mg poderia ser um mecanismo de proteção do organismo, pelo menos na fase inicial da PE, ou um efeito das alterações vasculares, como a vasoconstrição, a baixa expansão do volume plasmático e a hemoconcentração, que resultariam em alterações nas concentrações sanguíneas do mineral. No estudo de Sanders *et al* (1998), o

aumento de Mg sérico foi observado na PE grave, que apresentou níveis pressóricos maiores, portanto, mais vasoconstrição, sugerindo que essa concentração de Mg seja reflexo da gravidade da PE.

Deve-se também considerar se esse aumento de Mg não seria transitório. No entanto, nenhum estudo que observou o aumento de Mg circulante na PE, em comparação ao grupo controle, monitorou se essas concentrações poderiam se reduzir no decorrer da gestação. Tal suposição é avaliada, uma vez que se descreve que as concentrações de minerais diminuem ao longo da gestação. Em particular, as concentrações de Mg na PE se reduzem, em média, 0,13 mmol/L, a partir da 33ª semana até o final da gravidez, independentemente da gravidade da doença, como mostrado por Jain *et al* (2010). O diagnóstico da PE acontece após o aparecimento dos sintomas clássicos, geralmente no 3º trimestre da gestação (HUTCHEON; LISONKOVA; JOSEPH, 2011), período no qual as necessidades de crescimento e desenvolvimento fetais aumentam. Somado a isso, em mulheres que desenvolveram PE grave, foi identificado o aumento das concentrações de Mg no cordão umbilical (BORECKI; GULABOGLU; GUL, 2009).

A ingestão alimentar de Mg, mesmo que limitado pelos erros aleatórios e sistemáticos, é uma variável importante para a avaliação do *status* de Mg e que poderia ajudar no entendimento dessas diferenças. Todavia a dieta não é verificada na maioria dos estudos. Nós observamos ingestão alimentar de Mg de 311 mg/d em mulheres com PE (dado não publicado), menor do que a RDA para gestantes. No Brasil, deficiências de minerais têm sido observadas na população, principalmente de Mg, Ca, ferro e selênio (ROCHA *et al*, 2012; COZZOLINO 2007; PINHEIRO *et al*, 2009).

Quadro 1 – Estudos que avaliaram o status de magnésio (Mg) na pré-eclâmpsia (PE) no período de 1992 a 2013

Estudos	Amostra	País	Fatores de exclusão	Idade (anos)	Semana gestacional	Mg sérico/plasmático (mmol/L)	Mg eritrocitário (mmol/L)	Método
Ahsan <i>et al</i> , 2013	27 gestantes normotensas 44 gestantes com PE 33 gest. com eclâmpsia	Índia	História de hipertensão e convulsões, doenças associadas e uso de suplementos	24,1 ± 4,9 26,0 ± 5,4 22,8 ± 4,8	36,2 ± 2,6 35,6 ± 3,8 35,5 ± 3,4	0,81 ± 0,06 0,81 ± 0,49 0,85 ± 0,05	-	EAA
Farzin e Sajadi, 2012	60 gestantes normotensas 60 gestantes com PE	Irã	Doenças crônicas e imunes, infecções, anormalidades fetais, álcool, e etc	26,6 ± 3,7 27,4 ± 3,9	35,2 ± 1,2 35,4 ± 1,1	0,74 ^a 0,62 ^b	-	EAA
Jain <i>et al</i> , 2010	50 gestantes normotensas 25 gestantes com PE leve 25 gestantes com PE grave	Índia	Doenças crônicas e renais, diabetes, hipertensão prévia	23,92 ± 3,4 23,04 ± 3,7 22,96 ± 3,8	33 ± 7,8 34 ± 3,4 35 ± 3,6	0,79 ± 0,13 ^a 0,67 ± 0,14 ^b 0,62 ± 0,11 ^b	-	EAA
Borecki <i>et al</i> , 2009 [¶]	16 gestantes normotensas 24 gestantes com PE grave	Turquia	ND	27,5 ± 5,5 30,9 ± 7,7	33,8 ± 1,5 34,3 ± 1,2	0,77 ^a 0,68 ^b	-	Colorimétrico (Kit Olympus)
Golmohammad <i>et al</i> , 2008	52 gestantes normotensas 52 gestantes com PE	Irã	Hipertensão prévia ou outras doenças. uso de diuréticos, suplementos de magnésio e etc.	22,7 ± 1,5 ^a 25,7 ± 1,2 ^b	36,7 ± 1,1 35,2 ± 0,8	0,79 0,79	-	Kit comercial (Chim Azmoon – método Xulidl blue)
Punthumapol e Kittichotpanich, 2008	36 gestantes normotensas 35 gestantes com PE leve 33 gestantes com PE grave	Bangkok	Hipertensão, doença renal ou cardíaca, hemofilia, diabetes, tirotoxicose	25,60 ± 6,9 29,09 ± 8,0 25,60 ± 7,0	38,3 ± 1,9 ^a 36,3 ± 3,2 ^b 36,2 ± 3,5 ^b	0,85 0,85 0,93	-	Colorimétrico (Roche Cobas Integra 800)
Gulaboglu <i>et al</i> , 2007	15 gestantes normotensas 22 gestantes com PE grave	Turquia	ND	27,93 ± 5,7 32,90 ± 8,2	33,94 ± 1,65 34,32 ± 1,25	0,78 ^a 0,68 ^b	-	Colorimétrico (Kit Olympus)

Continuação								
Estudos	Amostra	País	Fatores de exclusão	Idade (anos)	Semana gestacional	Mg sérico/plasmático (mmol/L)	Mg eritrocitário (mmol/L)	Método
Sukonpan e Phupong, 2005	40 gestantes normotensas 40 gestantes com PE	Tailândia	Hipertensão prévia, doença crônica, renal, diabetes, gestação múltipla	27,0 ± 4,8 28,4 ± 4,7	38,2 ± 2 ^a 37,1 ± 3 ^b	0,85 ± 0,09 ^a 0,77 ± 0,08 ^b	-	Colorimétrico
Kumur <i>et al</i> , 2003	30 gestantes normotensas 30 gestantes com PE	Turquia	Diabetes, epilepsia, doença renal e fator-RH	28 ± 4,9 26,7 ± 5,3	-	valor sem diferença estatística	-	EAA
Kisters <i>et al</i> , 2000	25 mulheres saudáveis 18 gestantes normotensas 16 gestantes com PE	Alemanha	Diabetes, hipertensão prévia, doença cardíaca, renal e hepática	27,8 ± 5,0 26,9 ± 6,6 28,8 ± 6,7	- 33,8 ± 2,4 35,2 ± 2,1	0,93 ± 0,06 ^a 0,61 ± 0,10 ^b 0,63 ± 0,14 ^b	1,79 ± 0,21 ^a 1,38 ± 0,22 ^b 1,05 ± 0,18 ^b	EAA
Dawson <i>et al</i> , 2000	21 gestantes normotensas 15 gestantes com PE leve 4 gestantes com PE grave	EUA	Doença cardíaca ou renal	25 ± 6 23 ± 5 22 ± 4	29 - 42 36 - 43 36 - 43	-	1,81 ± 0,1 ^a 1,68 ± 0,2 ^b 1,60 ± 0,4 ^{a,b}	EAA
Sanders <i>et al</i> , 1998	24 mulheres saudáveis 6 gest. 11 ^a -15 ^a sem.gest. 10 gest. 25 ^a -30 ^a sem.gest. 18 gest.31 ^a -36 ^a sem.gest. 15 com PE grave	Holanda	Diabetes, doença renal, hipertensão prévia, sem uso de sulfato de Mg	31 31,2 ± 6,2 29,8 ± 7,0 31,1 ± 4,7 28,7 ± 5,2	- 13 ± 1,8 26,2 ± 3,0 33,9 ± 2,5 32,0 ± 3,3	0,90 ± 0,07 ^b 0,72 ± 0,06 ^a 0,65 ± 0,07 ^a 0,71 ± 0,06 ^a 0,85 ± 0,11 ^b	0,15 ± 0,01 fmol/cel - - 0,16 ± 0,02 fmol/cel	EAA
Seydoux <i>et al</i> , 1992	21 gestantes normotensas 11 hipertensão gestacional 11 gestantes com PE	Suíça	Hipertensão essencial, diuréticos, uso de suplemento de Mg, doença renal	28,5 ± 4,6 27,5 ± 6,6 28,5 ± 4,6	36,2 ± 0 37,2 ± 2,2 35,2 ± 2,3	0,70 ^a 0,68 ^a 0,78 ^b	Mg linfócito (mmol/mg prot) 59,89 59,97 57,33	EAA

Legenda: Mg = magnésio; ND = não descrito; sem. gest. = semana gestacional; EAA = espectrofotometria de absorção atômica de chama.

Letras diferentes significam que houve diferença estatística $p < 0,05$.

* determinação da concentração de Mg no sangue total.

6. MAGNÉSIO E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO E AS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA PRÉ-ECLÂMPSIA

O Mg tem sido implicado no aparecimento de muitas doenças crônicas, como hipertensão, diabetes e aterosclerose, sugerindo que a deficiência desse mineral colabore com prejuízos ao *status* oxidativo e inflamatório (MAZUR *et al*, 2007).

A relação do Mg com os sintomas clínicos inflamatórios foi primeiramente descrita por Kruse *et al* (1932). Outros estudos, realizados em animais submetidos à restrição alimentar de Mg, verificam a redução na concentração de Mg extracelular, a ativação de células do sistema imune, a ativação de células fagocitárias – neutrófilos e macrófagos – o aumento de citocina IL-6, de ânio superóxido, de peroxidação lipídica e da pressão arterial, em comparação ao controle (MALPUECH-BRUGÈRE *et al*, 2000; BLACHE *et al*, 2006).

Apesar de a PE ser uma complicação particular da gestação humana, em ratas prenhas, alimentadas com dieta moderada em Mg (200ppm/kg dieta), por 12 semanas, foi observada redução de Mg plasmático, aumento na concentração de NO e na pressão arterial sistólica, sugerindo que o estresse imposto pela gravidez e pela dieta altere a concentração de Mg nos compartimentos (SCHOOLEY e FRANZ, 2002). Em outro estudo, utilizando ratas prenhas submetidas a modelo de indução dos sintomas da PE, foram observados diminuição da concentração de Mg no músculo do vaso e aumento da concentração de Ca, o que poderia alterar a modulação do tônus muscular do vaso (EBOSE; CAMPBELL; OKORODUDU, 2007).

Em humanos, a relação do Mg com a inflamação também tem sido observada. Em mulheres, na faixa etária de 43 a 69 anos, foi verificada correlação inversa entre a ingestão de Mg e os níveis de proteína C reativa (SONG *et al*, 2007). Outro trabalho, com 1.653 pessoas, entre 45 e 65 anos de idade, mostrou que,

nessa relação, entre o consumo de Mg e a proteína C reativa, o Mg é mediador da inflamação de baixa intensidade (BO *et al*, 2006).

Embora não se conheça uma via específica de interação do Mg, estudos descrevem que baixas concentrações de Mg extracelular podem promover o aumento de Ca no meio intracelular, o que modula a constrição vasomotora. A abertura dos canais de Ca também resulta em ativação das células fagocitárias. A ativação dessas células, como os neutrófilos, estimula o complexo enzimático NADPH oxidase a aumentar a formação de ânions superóxidos e a produção de citocinas inflamatórias e de NO, que, ao combinar-se com o ânio superóxido, formam o peróxido de nitrito, um radical danoso que diretamente oxida a glutathione intracelular, diminuindo a capacidade antioxidante celular (BUSSIERÈ *et al*, 2002; LIBAKO *et al*, 2010; WEGLIICKI, 2012).

Além disso, a deficiência de Mg promove a liberação do neuropeptídeo – substância P, capaz de provocar inflamação neurogênica, como sistematicamente observado por Weglicki (2012). Na célula endotelial, diante da deficiência de Mg, ocorre o aumento de radicais livres e a ativação da NF- κ B, que regula a produção de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão (MAIER, 2012).

Por outro lado, o aumento da ingestão de Mg tem sido associado inversamente com a concentração de proteína C reativa, IL-6, TNF- α e marcadores da disfunção endotelial (VCAM e E-selectina) (CHACKO *et al*, 2010). Estudo recente demonstrou, *in vitro* e *in vivo*, que a suplementação de MgSO₄ (6mg/dL) reduz os monócitos e a produção de citocinas IL-6 e TNF- α , sem afetar a atividade fagocitária da célula. Tal efeito foi mediado pelo aumento e pela estabilidade dos níveis da proteína inibidora I κ B- α , que diminui a fosforilação do NF- κ B e, por conseguinte,

diminui a produção de citocinas, o que sugere o efeito protetor que o Mg pode exercer sobre o organismo (SUGIMOTO *et al*, 2012).

Assim, o Mg parece exercer importante influência sobre mecanismos que envolvem o estresse oxidativo e a inflamação. Além disso, a deficiência desse mineral tem sido encontrada em alguns estudos com gestantes que desenvolveram PE. É razoável sugerir que, nessa complicação hipertensiva, quando a deficiência desse mineral é identificada, os processos inflamatórios e oxidativos podem predispor a PE mais grave. Todavia, não existem estudos que avaliaram o *status* de Mg na PE e sua associação com esses eventos.

7. CONCLUSÃO

O *status* de Mg parece ser um importante modulador da função vascular. Embora a hipomagnesemia seja o achado mais frequente na PE, não é consenso entre os estudos, o que mostra que há grupos de mulheres com a doença, nas quais não se observa a deficiência do mineral ou, pelo menos, não naquela semana gestacional em que foi feita a observação. Nesses casos, a adequação de Mg sérico parece que não protegeu as mulheres do quadro hipertensivo. A ausência de dados de ingestão alimentar é um viés importante para avaliação do *status*, já que estudos, em animais e humanos, têm mostrado a associação entre ingestão de Mg e os processos inflamatórios e oxidativos.

O estresse oxidativo e as citocinas pró-inflamatórias estão presentes no desenvolvimento da PE, contribuindo para a disfunção endotelial e o aparecimento dos sintomas clínicos. A deficiência de Mg pode causar alteração nas concentrações de Ca intracelular, o que promove aumento do tônus muscular do vaso e ativação endotelial, geração de radicais livres, produção de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão. Todavia, estudos, que se propõem a avaliar o Mg na PE,

limitam-se a avaliar o *status* do mineral, sem associações entre esse eventos que contribuem para fisiopatologia da PE. Portanto, o papel no Mg na PE ainda não está completamente entendido, tampouco está claro se a deficiência de Mg pode ser a causa ou a consequência dessa síndrome hipertensiva.

8. REFERÊNCIAS

- Abad C; Carrasco MJ; Piñero S; Delgado E; Chiarello DI; Teppa-Garrán A; Proverbio T; *et al.* Effect of magnesium sulfate on the osmotic fragility and lipid peroxidation of intact red blood cells from pregnant women with severe preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*, 2010; 29: 38-53.
- Ahn H.; Park J; Gilman-Sanchs A; Kwak-Kim J. Immunologic Characteristics of Preeclampsia, a Comprehensive Review. *American J Reprod Immunology*, 2011; 65: 377-394.
- Adab C; Proverbio T; Piñero S; Botana D; Chiarello DI; Marín R.; Proverbio F. Preeclampsia, placenta, oxidative stress, and PMCA. *Hypertension in pregnancy*, 2012; 31: 427-41.
- Ahsan T; Banu S; Nahar Q; Ahsan M; Khan MNI; Islam SN. Serum Trace Elements Levels in Preeclampsia and Eclampsia: Correlacion with the Pregnancy Disorder. *Biol.Trace Elem. Res.*, 2013; 152: 327-332.
- Bainbridge SA; Sidle EH; Smith GN. Direct placental effects of cigarette smoke protect women from pre-eclampsia: the specific roles of carbon monoxide and antioxidant systems in the placenta. *Medical Hypotheses*, 2005; 64: 17-27.
- Bernardi F; Guolo F; Bortolin T; Petronilho F; Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*, 2008; 34: 948–951.
- Blache D; Devaux S; Joubert O; Loreau N; Schneider M; Durand P; Prost M, *et al.* Long-term moderate magnesium-deficient diet shows relationships between blood pressure, inflammation and oxidant stress defense in aging rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006; 41: 277-284.
- Bo S; Durazzo M; Guidi S; Carello M; Sacerdote C; Silli b; Rosato R; Cassader M; Gentile L; Pagano G. Dietary magnesium and fiber intakes and inflammatory and metabolic indicators in middle-aged subjects from a population-based cohort. *Am J Clin Nutr*, 2006; 84: 1062–9.
- Borecki B; Gulaboglu M; Gul M. Iodine and magnesium levels in maternal and umbilical cord blood of preeclampsia and normal pregnant women. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009; 129: 1-8.
- Borzychowski AM; Sargent IL; Redman CWG. Inflammation and pre-eclampsia. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2006; 11: 309 -316.
- Bussière FI; Guexx E; Rock E; Girardeau JP; Tridon A; Mazur A; Rayssiguier Y. Increased phagocytosis and production of reative oxygen species by neutrophils during magnesium deficiency in rats and innnibition by high magnesium concentration. *British Journal Nutrition*, 2002; 87:107-13.

Chacko SA; Song Y; Nathan L; Tinker L; De Boer IH; Tylavsky F; Wallace R; *et al.* Relations of Dietary Magnesium Intake to Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in an Ethnically Diverse Cohort of Postmenopausal Women. *Diabetes Care*, 2010; 33: 304-310.

Challis JR; Lockwood CJ; Myatt L; Norman JE; Strauss III JF; Petraglia F. Inflammation and Pregnancy. *Reproductive Sciences*. 2009; 16: 206-215.

Chamy VM; Lepe J; Catalán A; Retamal D; Escobar JA; Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biological Research*, 2006; 39: 229-236.

Choi JW; Im MW; Pai SH. Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Annals of clinical laboratory science*, 2002; 32: 257-263.

Cindrova-Davies, T. Gabor Than Award Lecture 2008: Pre-eclampsia – From Placental Oxidative Stress to Maternal Endothelial Dysfunction. *Placenta*, 2009; 30: S55–S65.

Colli C; Sales CH; Rocha VS. Assessment of magnesium status. In: BERHARDT, LV. (org.). *Advances in medicine and biology*. Hauppauge: Nova Science Publishers Inc, 2013; 40: 191-216.

Conde-Agudelo A; Romero R; Kusanovic JP; Hassan SS. Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2011; 204: 503-12.

Cozzolino SMF. Deficiências de minerais. *Estudos Avançados*, 2007; 21: 119-126.

Dai B; Tiecheng L; Zhang B; Zhang X; Wang, Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. *Gene*, 2013 [ARTICLE IN PRESS]

Dawson EB; Evans DR; Kelly R; Hook JWV. Blood cell lead, calcium, and magnesium levels associated with pregnancy-induced hypertension and preeclampsia. *Biological Trace Elements Research*, 2000; 74: 107-116.

Dordević NZ; Babić GM; Marković SD; Ognjanović BI; Stajn AS; Zikić RV; Saicić ZS. Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women. *Reproductive toxicology*, 2008; 25: 213-218.

Duley L; Gülmezoglu AM; Henderson-Smart D J. Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2003; 4: 1-69.

Dusse LMS; Vieira LM; Carvalho MG. Revisão de óxido Nítrico. *J Bras Pat Med Lab*, 2003; 39: 343-50.

Escudero C, Sobrevia L. A Hypothesis for Preeclampsia: Adenosine and Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Placental Microvascular Endothelium. *Placenta*, 2008; 29: 469-483.

Ebose EJ, Campbell PI, Okorodudu AO. Electrolytes and pH changes in pre-eclamptic rats. *Clinica chimica acta international journal of clinical chemistry*, 2007; 384:135-140.

Elin RJ. Assessment of magnesium *status*. *Clin Chem*, 1987; 33: 1965-70.

Elin RJ. Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy. *Magnesium Res*, 2010; 23: 1-5.

Espin MS; Fausett MB; Fraser A; Kerber R; Mineau G; Carrillo J; Varner WV. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, 2001; 344: 867-72.

Farzin L; Sajadi F. Comparison of serum trace element levels in patients with or without pre-eclampsia. *Journal of Research Medical Science*, 2012; 17: 938-41.

Golmohammad S; Amirabi A; Yazdian M; Pashapour N. Evaluation of serum calcium, magnesium, copper, and zinc levels in women with pre-eclampsia. *IJMS*, 2008; 33.

Gulaboglu M; Borecki B; Halici Z; Placental tissue iodine level and blood magnesium concentration in pre-eclamptic and normal pregnancy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 2007; 98: 100-4.

Hung T; Burton GJ. Hypoxia and Reoxygenation: A possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwanese J Obstet Gynecol*, 2006; 45: 189 - 200.

Hunt CD; Jonhson LK. Magnesium requirements: new estimations for men and women by cross-section statistical analyses of metabolic magnesium balance data. *Am J Clin Nutr*, 2006; 84: 843-52.

Hutcheon JA; Lisonkova S; Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2011; 25: 1–13.

Jain S, Sharma P, Kulshreshtha S, Mohan G, Singh S. The role of calcium, magnesium, and zinc in pre-eclampsia. *Biological Trace Element Research*, 2010; 133: 162-170.

Khan KS; Wojdyla D; Say L; Gülmezoglu AM; Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*, 2006; 367: 1066 – 74.

Kisters K, Barenbrock M, Louwen F, Hausberg M, Rahn K H, Kosch M. Membrane, intracellular, and plasma magnesium and calcium concentrations in preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, 2000; 13: 765-769.

Kruse HD, Orent ER, Mccollum EV. Studies on magnesium deficiency in animals. I. Symptomatology resulting from magnesium deprivation. *J Biol Chem*, 1932; 96: 519–539.

Kumru S; Aydin S; Simsek M; Sahin K; Yaman M; Ay GUL. Comparasion of serum copper, zinc, calcium and magnesium levels in preeclamptic. *Biological Trace Elements Research*, 2003; 94: 105- 112.

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Magnesium. In: Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, editor. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (USA): National Academy Press; 1997, 190-249p.

Libako P, Nowacki W, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. Phagocyte priming by low magnesium status: input to the enhanced inflammatory and oxidative stress responses. *Magnesium research*, 2010; 23: 1-4.

Lyll F; Belfort M. Pré-eclâmpsia: etiologia e prática clínica. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamerican do Brasil, 2009.

Maier JAM. Endothelial cells and magnesium: implications in atherosclerosis. *Clinical Science*, 2012; 122: 397-407.

Malpuech-Brugère C, Nowacki W, Daveau M, Gueux E, Llnard C, Rock E, Lebreton J, Mazur A; Rayssiguier Y. Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. *Biochimica Biophysica Acta*, 2000; 1501: 91-98.

Mazur A, Maier JAM, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007; 458: 48-56.

McDonald SD, Lutsiv O, Dzaja N, Duley L. A systematic review of maternal and infant outcomes following magnesium sulfate for pre-eclampsia/eclampsia in real-world use. *International journal of gynaecology and obstetrics*, 2012; 118: 90-6.

Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJR, Knight M, Linton EA, Dhir S, Anggard EE, Redman CWG. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 1998; 105: 1195–99.

Myatt L; Clifton R; Roberts J; Spong C; Wapner R; Thorp JJr; Mercer B; Peaceman A; Ramin S; Carpenter M; Sciscione A; Tolosa J; Saade G; Sorokin G; Anderson G. Can changes in angiogenic biomarkers between the first and second trimesters of pregnancy predict development of pre-eclampsia in a low-risk nulliparous patient population? *An Intern. J. Obst. Gynec*, 2013; 18.

Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Tada S, Kurahashi H, et al. Analysis of nitric oxide metabolism as a placental or maternal factor underlying the etiology of pre-eclampsia. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 2009; 68: 239-247.

Orcy RB; Pedrini R; Piccinini P; Schroender S; Martin-Costa SH; Ramos JGL; Capp E; Corleta H; Von E. Diagnóstico, fatores de risco e patogênese da pré-eclâmpsia. *Rev HCPA*, 2007; 27: 43-6.

Paravicini TM, Yogi A, Mazur A, Touyz RM. Dysregulation of vascular TRPM7 and Annexin-1 is associated with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia. *Hypertension*, 2008; 53: 423-29.

Peng B, Koga K, Cardenas I, Aldo P; Mor G. Phagocytosis of apoptotic trophoblast cells by human endometrial endothelial cells induces proinflammatory cytokine production. *American journal of reproductive immunology*, 2010; 64: 12-19.

Petrakos G; Panagopolus P; Koutras I; Panagiotakos AKD; Economou A; Kanellopoulos N; Salamalekis E; Zabelas AA comparison of the dietary and total intake of micronutrients in a group of pregnant Greek women with the Dietary Reference Intakes. *Eur J Obs Gyn Reprod Biology*, 2006; 127: 166–171.

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, 1983; 4: 397–41.

Pinheiro MM, Schuch NJ, Genaro PS, Ciconelli RM, Ferraz MB, Martini LA. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Nutr J*, 2009; 8: 1-8.

Poon LCY; Kametas NA; Chelemen T; LeaL A; Nicolaides KH Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. *Journal of Human Hypertension*, 2010; 24: 10-14.

Punthumapol C, Kittichotpanich B. Serum calcium, magnesium and uric acid in preeclampsia and normal pregnancy. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmai het thangphaet*, 2008; 91: 968-973.

Qi HP; Fraser WD; Luo ZG; Julien P; Audibert F; Wei SQ. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of preeclampsia. *Am. J. Perinatol*, 2013 [ARTICLE IN PRESS].

Ramma W; Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochemical Society Transactions*, 2011; 39: 1619-27.

Redman CWG; Sargent IL. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, 2007; 76: 61-67.

Regan CL, Levin RJ, Baird DD, Ewell MG, Martz KL, Sibai BM, Rokach J, Lawson JA, Fitzgerald GA. No evidence for lipid peroxidation in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*, 2001; 185: 572–578.

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 183: S1–22.

Rocha VS; Lavanda I; Nakano EY; Ruano R; Zugaib M; Colli C. Calcium and magnesium status is not impaired in pregnant woman. *Nutrition Research*, 2012; 32: 542-546.

Sales CH; Pedrosa LFC; Lima JG; Lemos TMAM; Colli C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Clin Nutr*, 2012; 30: 359-364

Sanders, R.;Kojinenberg, A.;Huijgen, H.; Wolf, H.; Boer, K.; Sanders, G.T.B. Intracellular and extracellular, Ionized and Total Magnesium in Pre-eclampsia and Uncomplicated Pregnancy. *Clin, Chem. Lab. Med*, 1998; 37: 55-9.

Schooley, M.C.; Franz, K.B. Magnesium deficiency during pregnancy in rats increases systolic blood pressure and plasma nitrite. *Am. J. Hypertension*, 2002; 15: 1081-86.

Seydoux, J., Girardin, E., Paunier, L., & Béguin, F. Serum and intracellular magnesium during normal pregnancy and in patients with pre-eclampsia. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 1992; 99: 207-211.

Sharma A; Satyam A; Sharma JB. Leptin, IL-10 and Inflammatory Markers (TNF- α , IL-6 and IL-8) in Pre-Eclamptic, Normotensive Pregnant and Healthy Non-Pregnant Women. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007; 58: 21–30.

Song Y; Li TY; Dam van MR; Manson JE; Hu FB. Magnesium intake and plasma concentrations of markers of systemic inflammation and endothelial dysfunction in women. *Am J Clin Nutr*, 2007; 85: 1068 –74.

Sontia B, Montezano ACI, Paravicini T, Tabet F, Touyz RM. Downregulation of renal TRPM7 and increased inflammation and fibrosis in aldosterone-infused mice: effects of magnesium. *Hypertension*, 2008; 51: 915-21.

Sontia B; Touyz RM. Role of magnesium in hypertension. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007; 458: 33-39.

Staff AC; Benton SJ; von Dadelszen P; Roberts JM; Taylor RN; Powers RW; Charnock-Jones S; Redman CWG. Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. *Hypertension*, 2013; 61: 1-12.

Sugimoto J; Rimani AM; Valentin-Torres AM, Lucinao AA, Kitchen CMR, Funderburg N; Mesiano S; Bernstein HB. Magnesium Decreases Inflammatory Cytokine Production: A Novel Innate Immunomodulatory Mechanism. *J Immunol* 2012; 188: 6338-6346.

Sukonpan K., Phupong V. Serum calcium and serum magnesium in normal and preeclamptic pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2005; 273: 12-16.

Vincent Crosby FRCP; Elin RJ; Twycross R; Mihalyo M; Wilcock A. Magnesium. *Journal of pain and symptom management*, 2013; 45: 137 – 44.

Vormann, J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med*, 2003; 24: 27-37.

Weglicki WB. Hypomagnesemia and Inflammation: Clinical and Basic Aspects. *Annu Rev Nutr*, 2012; 32: 4,1– 4,17.

Young BC; Levine RJ; Karumanchi SA. Pathogenesis of Preeclampsia. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2010; 5: 173-92.

Zhou Y; Fisher SJ; Janatpour M; Genbacev O; Dejana E; Wheelock M; Damsky CH. Human Cytotrophoblasts Adopt a Vascular Phenotype as They Differentiate: A Strategy for Successful Endovascular Invasion? *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2139-2151.

Capítulo 2

“Alteração do *status* de Mg e sua associação com o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia”

Artigo original

1. INTRODUÇÃO

A PE é uma síndrome hipertensiva, considerada uma das principais causas de mortalidade materna e fetal. Por razões desconhecidas, na PE, a placentação ocorre de modo inadequado, resultando em estresse oxidativo, na inflamação materna exacerbada e no aparecimento dos sintomas clássicos da doença, que são o aumento da pressão arterial e a proteinúria (6).

Esses mecanismos fisiopatológicos da PE têm sido amplamente estudados. Alguns estudos têm mostrado que a diminuição de Mg pode resultar em inflamação e na produção de radicais livres (7, 8). É possível especular que as alterações no *status* de Mg podem influenciar os processos oxidativos, a inflamação e a função endotelial, que são críticos para o desenvolvimento da PE.

O Mg é um mineral importante para a estrutura de enzimas da via glicolítica e para reações do organismo, que necessita desse mineral como cofator enzimático, além de participar na modulação do tônus vascular e da contração muscular (1). Embora o Mg desempenhe papel crítico para o funcionamento do organismo, nossos estudos têm mostrado a inadequada ingestão alimentar de Mg em diabéticos (3) e em gestantes (2), o que pode resultar em deficiência de Mg, frequentemente associada à PE (4, 5).

Apesar dessas evidências, até o presente, não há estudos que associem o *status* de Mg com estresse oxidativo e a inflamação na PE. Assim, a hipótese deste estudo é que as gestantes com PE apresentam deficiência de Mg, que contribui para o agravamento do estresse oxidativo e da inflamação. O objetivo foi avaliar a ingestão alimentar de Mg e sua concentração no plasma, no eritrócito e na urina,

bem como verificar se há associação entre o *status* de Mg, os marcadores de estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na PE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa (protocolo CAAE # 1105.0.015.018-09) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sendo autorizado pela diretoria do Hospital Ipiranga (São Paulo, SP, Brasil). O termo de consentimento foi assinado por todas as participantes.

a. População estudada

Esse estudo caso-controle foi realizado no Hospital das Clínicas e no Hospital Ipiranga, em São Paulo, entre abril de 2011 e setembro de 2012. O número amostral foi definido em 17 gestantes por grupo, com a finalidade de detectar diferenças estatísticas entre os grupos, na ordem de um desvio padrão para a concentração de Mg plasmático e parâmetros de estresse oxidativo e inflamação, considerando nível de significância de 5 % e poder de 80 %.

As gestantes foram distribuídas em dois grupos: controle (CT) (n = 18) e pré-eclâmpsia (PE) (n = 18). O grupo PE foi constituído por mulheres com pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $> 0,3$ g/24 h (9), diagnosticadas a partir da 20ª semana de gestação pelo serviço médico dos hospitais. Nos dois grupos, foram excluídos os casos com: a) hipertensão arterial crônica; b) hipertensão gestacional; c) gestação múltipla; d) diabetes; e) doença cardíaca; f) hábito de fumar e g) uso de suplementos contendo magnésio.

b. Casuística

Inicialmente, as gestantes foram selecionadas a partir das informações contidas no prontuário médico. No primeiro encontro, elas foram convidadas a participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Em sequência, as gestantes eram questionadas quanto às seguintes informações: idade (anos), ocupação, renda familiar, número de gestações e história familiar de PE. As mulheres também recebiam instruções sobre a coleta de sangue e de urina de 24 h. No segundo encontro, foi realizada a avaliação antropométrica e a aferição da pressão arterial. Após 8 h de jejum, a coleta de 20 mL de sangue venoso foi realizada em tubos vacutainer sem anticoagulante, para obtenção do soro, e tubos com anticoagulante (10µL de citrato de sódio/mL de sangue ou EDTA 7,2 mg), para obtenção de plasma e eritrócito. A urina, coletada nas 24 h anteriores à colheita de sangue, foi aliquoteada e armazenada. Um questionário quantitativo de frequência alimentar, validado para gestantes, foi aplicado por nutricionista envolvida na pesquisa.

c. Antropometria e medida da pressão arterial

O peso corporal foi aferido com as gestantes descalças e usando pouca roupa, em balança (Toledo®, São Paulo, Brasil) com precisão de 50 g. A estatura foi medida com estadiômetro (Toledo®, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,5 cm. O índice de massa corpórea (IMC) ($\text{peso}/\text{altura}^2$) gestacional foi calculado para a classificação do estado nutricional de acordo com semana de gestação, conforme sugerido por Atalah *et al* (9). A pressão arterial foi aferida, por enfermeira, no braço esquerdo e com a gestante sentada, utilizando esfigmomanômetro de mercúrio.

d. Análises bioquímicas

Todo material utilizado para a análise de Mg foi previamente desmineralizado com HNO_3 a 30 % por 12 h. O *status* de Mg foi avaliado em amostras de urina, plasma e eritrócitos, por espectrometria de absorção atômica de chama (*AAAnalyst 100, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA*). Nas amostras e na curva padrão, foi acrescentado óxido de lantânio a 5 %, para concentração final de lantânio de 0,1% (10). Amostras de referência certificada (*Trace Element Serum L1 e Urine Blank-Seronorm, Billingstad, Norway*) e padrões secundários (*pool* de urina, plasma e eritrocitário) foram utilizados para acompanhar o desempenho das análises, que apresentaram exatidões de 101 % e precisões de 84 a 99 %.

A função renal foi determinada pelo cálculo do *clearance* de creatinina (Ccr), após a análise de creatinina sérica e urinária. A concentração de creatinina no soro e na urina de 24 h foi realizada pela reação da Jaffe, utilizando reagentes da Labtest Diagnostica® (Lagoa Santa, MG, Brasil). O cálculo do Ccr foi realizado pela fórmula abaixo e os valores expressos em mL/s/1,73 m².

Ccr

$$= \left(\frac{1.73 \times \text{creat. urinária} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \times \text{volume urinário} \left(\frac{\text{mL}}{\text{seg}} \right)}{\text{creatin. sérica} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)} \right) / \text{superfície corporal (m}^2\text{)}$$

A concentração do malondialdeído (MDA) foi determinada em amostras de plasma, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão). No método realizado, o MDA é liberado do peróxido de lipídio, em meio ácido, reagindo com ácido tiobarbitúrico (TBA), formando o complexo cromogênio (TBA-MDA) e medido a 532 nm (12).

A concentração de 8-isoprostano urinário foi determinada por ensaios enzimáticos utilizando o *kit 8-isoprostane EIA* (Cat. nº. 516351, Cayman Chemical

Co, EUA). As amostras de urina foram diluídas em água desmineralizada, na proporção de 1:20 e lidas em leitor de microplacas (Spectra MAX 190 da Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) a 412 nm.

A concentração de óxido nítrico (NO), em amostras de soro, foi determinada por quimiluminescência em fase gasosa, com o ozônio, utilizando o equipamento NO Analyzer (^{TM280} Sievers Inc, EUA).

As atividades das enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) foram determinadas em eritrócitos lisados com água desmineralizada, na proporção 1:200 e 1:2000, respectivamente. Para GSH-Px, 30 µL do hemolisado foram incubados em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, glutathione redutase 0,08 M, glutathione oxidase 9,6 U/mL, NADPH 1,2 mM. Após adição de terc-butil hidroperóxido 0,46 %, a atividade de GSH-Px foi monitorada por 6 min, a 340 nm e 37 °C. Para o ensaio da CAT, foi preparado meio reacional com tampão TRIS HCL 1M pH 8,0 e peróxido de hidrogênio 30 mM. Imediatamente após acréscimo de 20 µL do hemolisado em microplaca, a atividade da enzima foi lida por 6 min, a 230 nm e 37°C, em leitora de microplaca (13; 14). A atividade enzimática foi expressa em U/g Hb. A concentração de hemoglobina (Hb) foi medida em papa de eritrócitos, pelo método de cianeto de hemoglobina com *kit* da Labtest Diagnóstica ® (Lagoa Santa, MG, Brasil).

A proteína C reativa, a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), foram quantificados no soro por ensaios enzimáticos, utilizando-se os *kits*: *Human C-Reactive protein Immunoassay* (Cat. nº. DCRP00), *Human IL-6 Immunoassay* (Cat. nº. S6050) e *Human TNF-α Immunoassay* (Cat. nº. STA00C) da marca R&D Systems Inc. (Millipore Corporation, Billerica, MN, EUA). As placas

foram lidas em leitora de microplaca (Spectra MAX 190 da Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA).

e. Ingestão alimentar de Mg

Para avaliação do consumo alimentar, foi aplicado, por nutricionista treinada, o questionário quantitativo de frequência alimentar (QQFA) validado para gestantes (15). Os dados obtidos foram analisados pelo sistema *on line* NutriQuanti (www.zeroonze.com.br/consumo). As Referências de Ingestão Dietética (DRI) foram usadas para estimar a adequação da ingestão alimentar de Mg e macronutrientes (16, 17). A probabilidade de inadequação alimentar do mineral foi determinada com base na diferença (D) entre a ingestão individual observada e a Estimativa de Necessidade Média (EAR) para a idade e o estado fisiológico. Em seguida, calcula-se o desvio padrão de D (SD_D) e, posteriormente, a relação dos dois (D/SD_D), para situar, sob a curva de Gauss, o quanto a ingestão do indivíduo se distancia da média de uma população de referência (18).

f. Análise estatística

A análise estatística foi feita com o *software* SPSS (Chicago, IL, USA) versão 14.0. Os dados dietéticos foram ajustados por energia, pelo método do resíduo (19), para reduzir os erros inerentes às medições da dieta. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os testes de Qui-quadrado, exato de *Fisher*, *t-Student*, para amostras independentes, e *Mann-Whitney* foram feitos para verificar as diferenças entre as variáveis de interesse para os grupos CT e PE.

A associação entre as variáveis foi avaliada pelo coeficiente de correlação de *Spearman*. Além disso, as variáveis, que apresentaram-se estatisticamente diferentes nos dois grupos, foram analisadas com o uso da curva *Receiver-*

Operating Characteristics (ROC). As variáveis preditoras foram definidas pela maior área sob a curva e seus pontos de cortes foram estabelecidos considerando a melhor combinação de sensibilidade e especificidade que discriminasse o grupo PE do grupo CT. Nas análises estatísticas foi considerado α de 5%.

3. RESULTADOS

Na Tabela 1, são apresentados os dados que descrevem as gestantes do grupo CT e do grupo PE, quanto aos aspectos socioeconômicos, obstétricos e antropométricos.

Tabela 1 – Dados descritivos do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE).

Variáveis	Grupo CT (n=18)	Grupo PE (n=18)	<i>p</i>
<i>Dados socioeconômicos</i>			
Idade (anos)	27 (24 - 32)	22 (18 - 30)	0,091 ^a
Escolaridade (anos)	12 (11 - 12,2)	12 (9 - 12)	0,323 ^a
Renda per capita (R\$) ^e	778 (450 – 1.011)	622 (373 – 933)	0,463 ^a
Ocupação			
Dona de casa ou desempregada	2 (11%)	4 (22%)	0,658 ^c
Atividade empregatícia	16 (89%)	14 (78%)	
<i>Dados clínicos</i>			
Semanas gestacionais	31,5 (28,8 - 33,3)	31,5 (26,8 - 35,0)	0,939 ^b
Pressão arterial sistólica (mmHg)	103 (100 - 110)	160 (150 - 161)	<0,001 ^b
Pressão arterial diastólica (mmHg)	70 (60 - 71)	100 (90 - 110)	<0,001 ^b
Proteinúria (g/24h)	0,1 (0,08 – 0,2)	0,7 (0,4 – 2,0)	<0,001 ^a
História familiar de PE			
não	13 (72 %)	8 (44 %)	0,227 ^c
não sabe	3 (17 %)	4 (78 %)	
sim	2 (11%)	6 (33%)	

Paridade

Nulípara	7 (39%)	12 (67%)	0,095 ^d
Primípara ou múltipara	11 (61%)	6 (33%)	

Dados antropométricos

Peso gestacional (kg)	68 (64 - 80)	78 (67 - 88)	0,104 ^a
Altura (m)	1,61 (1,59 - 1,67)	1,63 (1,56 - 1,68)	0,435 ^b
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	27,2 (24,1 - 32,0)	29,6 (25,8 - 34,0)	0,236 ^b
Baixo peso	4 (22,2%)	3 (17%)	0,551 ^d
Eutrofia	6 (33,3%)	3 (17%)	
Sobrepeso	4 (22,2%)	7 (38%)	
Obesidade	4 (22,2%)	5 (28%)	

Mediana (Percentil 25-75); Frequência absoluta (%); ^a teste de *Mann-Whitney*; ^b teste *t-Student*; ^c teste exato de Fisher; ^d teste Qui-quadrado; ^e calculado com base no salário mínimo vigente (no ano 2012) do Brasil.

A ingestão de carboidratos e lipídios foi maior nas mulheres com PE, mas a média de ingestão de Mg não diferiu entre os grupos (Tabela 2). Todas as mulheres apresentaram consumo de Mg entre os percentis 15 e 85, região classificada como incerta quanto à probabilidade de adequação ou de inadequação da ingestão alimentar (Figura 2).

Tabela 2 – Consumo de energia e nutrientes das gestantes do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Mediana (Percentil 25-75)

Nutrientes ^a	Grupo CT (n=16)	Grupo PE (n=15)	<i>p</i> ^b
Caloria (kcal/d)	2.370 (1.911 – 2.693)	2.784 (2.109 – 3.154)	0,323
Carboidratos (g/d)	301 (276 - 317)	346 (306 - 364)	0,001
Proteína (g/kg/d)	1,4 (1,1 -1,9)	1,4 (1,2 -1,6)	0,480
Lipídio (g/d)	91 (87,7 -94,1)	99 (88,7 - 106,5)	0,037
Magnésio (mg/d)	291 (250 - 333)	311 (280 - 341)	0,346

^a recomendações segundo as DRI, valores de *Estimated Average Requirement* (EAR) para gestantes: Carboidratos = 135 g/d; Proteínas = 0,88 g/kg/d; Lipídios = 20-35% do valor calórico total (DRI, 2005); Magnésio = 335 mg/d de 14 a 18 anos, 290 mg/d de 19 a 30 anos e 300 mg/d de 31 a 50 anos (DRI, 1997)

^b valor de *p* calculado pelo teste *t-Student*

Figura 2 – Probabilidade de inadequação da ingestão de magnésio das gestantes do grupo controle e do grupo pré-eclâmpsia, de acordo com as *Dietary Reference Intakes* (IOM, 2005). Legenda - Os valores de ingestão de Mg foram ajustados pelo método do resíduo, segundo Willet *et al* (1997). P: percentil; EAR: *Estimated Average Requirement*; RDA: *Recommended Dietary Allowance*; D: diferença entre ingestão de Mg e a EAR; SD_D: desvio padrão de D.

As gestantes com PE não apresentaram diferenças na função renal, verificada pelo Ccr (Tabela 3) e na excreção urinária de Mg em relação às CT (CT = $3,03 \pm 1,25$ mmol/d; PE = $2,64 \pm 1,14$ mmol/d). Porém, as concentrações de Mg plasmático (CT = $0,70 \pm 0,05$ mmol/L; PE = $0,82 \pm 0,12$ mmol/L) e Mg eritrocitário (CT = $2,03 \pm 0,25$ mmol/L; PE = $2,29 \pm 0,36$ mmol/L) foram maiores no grupo PE (Figura 3).

Figura 3 – Status de magnésio dos grupos controle (CT) e pré-eclâmpsia (PE). Média $\pm$ desvio padrão; valor de p calculado pelo teste t-Student.

As concentrações de NO e 8-isoprostano urinário foram diferentes entre CT e PE, todavia a concentração de MDA foi semelhante para ambos os grupos (Tabela 3). A atividade enzimática da CAT na PE foi maior e não houve diferença na atividade da GSH-Px (Figura 4).

Tabela 3 – *Clearance* de creatinina (Ccr), concentração de óxido nítrico (NO) e parâmetros do *status* oxidativos dos grupos controle (CT) e pré-eclâmpsia (PE). Mediana (Percentil 25-75)

Variáveis ^a	Grupo CT (n=18)	Grupo PE (n=18)	<i>p</i> ^b
<i>Função renal</i>			
Ccr (mL/s/1,73m ²)	1,93 (1,34 - 2,27)	1,40 (1,06 - 1,98)	0,109
Óxido nítrico (μM)	5,74 (4,40 - 8,51)	9,60 (6,97 - 14,9)	0,008 ^c
<i>Status oxidativo</i>			
MDA (μmol/L)	0,52 (0,40 - 0,61)	0,61 (0,44 - 0,68)	0,189
8-isoprostano urinário (pg/mg creatinina)	1.391,37 (879,89-1.933,04)	916,99 (683,67-1.125, 40)	0,007

^a grupo CT (n=16) e grupo PE (n=15) para as variáveis: 8-isoprostano urinário e *clearance* de creatinina

^b valor de *p* calculado pelo teste *t-Student*

^c valor de *p* calculado pelo teste *Mann-Whitney*

Figura 4 – Atividade antioxidante das enzimas catalase e glutathione peroxidase do grupo controle (CT) e do grupo pré-eclâmpsia (PE). Mediana (Percentil 25-75); valor de *p* calculado pelo teste de *Mann-Whitney*.

No perfil inflamatório, foram observados o aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , na PE (Figura 5).

Figura 5 – Concentração da proteína C reativa, interleucina-6 (IL6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no grupo controle (CT) e no grupo pré-eclâmpsia (PE). As barras horizontais representam a mediana e as barras verticais os percentis 25-75; valor de p calculado pelo teste de *Mann-Whitney*.

No grupo PE, também foram verificadas relações positivas da concentração do Mg plasmático com a proteinúria, com a concentração de NO, de TNF- α e IL-6; e entre a concentração de IL-6 e a atividade da GSH-Px. Além de associações negativas entre a atividade da GSH-Px e os níveis de pressão arterial diastólica e a atividade da CAT e o 8-isoprostano urinário (Tabela 4).

No grupo controle, foram observadas associações positivas entre a concentração de Mg eritrocitário e IL-6, da concentração de NO com TNF- α e da atividade de CAT com 8-isoprostano urinário, bem como associação negativa da atividade da CAT com níveis de pressão arterial diastólica.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis para grupos pré-eclâmpsia (PE) e controle (CT).

Variáveis	Grupo PE		
	Mg plasmático r (p)	Atividade da GSH-Px r (p)	8-isoprostano r (p)
Proteinúria	0,488 (0,04)	-	-
Óxido nítrico	0,584 (0,01)	-	-
TNF- α	0,517 (0,03)	-	-
Interleucina-6	0,558 (0,02)	0,552 (0,02)	-
Atividade da CAT	-	-	- 0,518 (0,02)
Pressão arterial diastólica	-	-0,598 (0,01)	
	Grupo CT		
	Mg eritrocitário r (p)	Atividade da CAT r (p)	Óxido nítrico r (p)
TNF- α	-	-	0,596 (0,01)
Interleucina 6	0,527 (0,02)	-	-
8-isoprostano	-	0,518 (0,04)	-
Pressão arterial sistólica	-	-0,536 (0,02)	-

As avaliações das curvas ROC mostraram que o TNF- α e o Mg plasmático apresentaram as maiores áreas sob a curva. O ponto de corte para discriminar o grupo PE do CT foi $\geq 0,735$ mmol/L, para o Mg plasmático (77,8 % sensibilidade e 72,2 % de especificidade), com valor preditivo positivo de 73,7 % e valor preditivo negativo 76,4 %, e, para o TNF- α , o ponto de corte foi $\geq 1,715$ pg/mL (77,8 % de sensibilidade e 93,7 % de especificidade), com valor preditivo positivo de 93,3 % e valor preditivo negativo de 78,9 % (Figura 6).

Figura 6 – Curvas ROC (*Receiver–Operating Characteristics*) para Mg plasmático e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) para discriminar o grupo pré-eclâmpsia do grupo controle. As áreas sob a curva para Mg plasmático e TNF- α foram, respectivamente, de 0,804 [IC 95%: 0,657 - 0,951; $p=0,002$] e de 0,931 [IC 95%: 0,843 – 1,018; $p < 0,001$].

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram o aumento das concentrações de Mg, plasmático e eritrocitário, e das citocinas, IL-6 e TNF- α , sem evidente estresse oxidativo nas gestantes com PE. Embora a hipomagnesemia não tenha sido observada, a hipótese de que o *status* de Mg esteja associado ao estresse oxidativo e à inflamação na PE foi parcialmente confirmada pelas relações entre o *status* de Mg e as citocinas inflamatórias.

O Mg é importante para muitos processos fisiológicos do organismo humano, e sua homeostase depende da ingestão alimentar e, principalmente, da regulação renal. A ingestão alimentar de Mg das mulheres de ambos os grupos ficou na chamada região de incerteza, ou seja, entre 15% e 85% de probabilidade de adequação. Por outro lado, a excreção urinária de Mg foi baixa também em ambos, o que mostra a inadequação de ingestão desse mineral (1). Já a concentração de Mg circulante foi maior no grupo PE do que no CT, o que sugere que, além da regulação homeostática, estão presentes ainda alterações associadas à PE.

O aumento da concentração de Mg plasmático foi verificado também em outros estudos, principalmente na PE grave (21, 22). A PE é caracterizada por uma disfunção endotelial, que resulta em vasoconstrição e resistência vascular periférica, com consequente perda de plasma para meio extravascular e hemoconcentração (20). É possível que o aumento de Mg plasmático e eritrocitário seja um efeito secundário à vasoconstrição e à hemoconcentração inerentes à PE; portanto, um epifenômeno. Todavia, entre os estudos ainda não há consenso a respeito do *status* de Mg nessa síndrome (4, 5, 21, 22) e esses resultados contraditórios decorrem das diferenças metodológicas, como, por exemplo, os fatores de exclusão adotados e a semana gestacional das mulheres avaliadas.

O aumento da concentração de NO sérico também foi observado no grupo PE. Estudo de Nishizawa e colaboradores (23), realizado em 33 gestantes saudáveis e 33 com PE, na 30ª semana gestacional, não verificou diferença na expressão da enzima eNOS e no polimorfismo da Glu298Asp, que pudesse explicar as altas concentrações séricas de NO. O aumento desse vasodilator parece não compensar a vasoconstrição nessas mulheres, o que aponta para a resistência à ação ou a inativação do NO. A incompleta invasão dos trofoblastos na PE causa episódios de hipóxia e reoxigenação, que promovem a explosão na geração de espécies reativas, principalmente de ânions superóxidos, capazes de combinar-se rapidamente com NO. O resultado é a formação do peróxido de nitrito, que, além de inativar o NO, causa danos oxidativos às proteínas e à peroxidação lipídica (6, 24).

A peroxidação lipídica inicia-se na placenta e, posteriormente, atinge a circulação materna. Todavia, a peroxidação lipídica não foi observada no grupo PE, pela concentração de MDA e de 8-isoprostano urinário. A menor excreção de 8-isoprostano urinário tem sido associada à diminuição do *clearance* renal na PE (25), mas a avaliação do Ccr não mostrou diferença entre os grupos. Tais resultados sugerem que o dano oxidativo ainda não pôde ser detectado, pelo menos, em nível sistêmico.

Em contrapartida, a maior atividade antioxidante da CAT e a atividade da GSH-Px se associaram inversamente com a concentração de 8-isoprostano urinário e com os níveis de pressão arterial diastólica, respectivamente. Esses achados corroboram a hipótese de que, na PE, inicialmente, há o aumento na produção de radicais livres e, em resposta, os mecanismos antioxidantes do organismo são ativados, como descrito por Llurba *et al* (26), em gestantes com PE na mesma semana gestacional das do presente estudo.

Embora não tenha sido verificada associação entre o Mg e os parâmetros oxidativos, descreve-se, *in vitro*, que concentrações fisiológicas de 0,7 a 1,0 mmol

de Mg extracelular podem limitar a peroxidação lipídica provocada pelo aumento da concentração de ferro no meio (27). As alterações no *status* de ferro são relacionadas à PE e, neste estudo, também foram verificadas altas concentrações de ferro sérico e ferritina no grupo PE (Apêndice C), um indício de que haja sobrecarga de ferro nessas mulheres, o que pode contribuir com o quadro oxidativo.

Apesar do estresse oxidativo e da inflamação parecerem processos inter-relacionados na fisiopatologia da PE, no presente estudo, a inflamação foi mais evidente do que o estresse oxidativo. Estudos anteriores verificaram o estresse oxidativo nas 36^a e 37^a semanas gestacionais (28; 29), o que possivelmente indica que a inflamação antecede os danos oxidativos sistêmicos, que ocorrem mais tardiamente nessas mulheres.

As concentrações de TNF- α e de Mg plasmático apresentaram as maiores áreas sob a curva, pela análise ROC. É importante destacar que o plasma é considerado o *pool* central de Mg e o fato de ser o meio mais intercambiável do organismo (30) pode ter contribuído para que as manifestações da PE tenham sido mais observadas nesse compartimento.

Além disso, as correlações mostraram que o aumento nas concentrações de IL-6 e TNF- α foi acompanhado pelo aumento de Mg plasmático na PE. Esse aumento de Mg circulante foi descrito, em estudo com animais, como um mecanismo de resposta anti-inflamatória para reduzir as concentrações de cálcio (Ca). As altas concentrações de Ca intracelulares resultam em ativação de células fagocitárias, como os neutrófilos, capazes de aumentar a produção de espécies reativas e citocinas inflamatórias (31). Recentemente, a suplementação de Mg foi associada à maior estabilidade de I κ B α , que inibe a fosforilação do fator NF- κ B e diminui a produção de citocinas (32). Assim, é possível especular que o aumento das concentrações de Mg seja também um mecanismo de proteção do organismo, frente à inflamação e à gravidade dessa síndrome hipertensiva.

As limitações a serem consideradas são, portanto: a) a avaliação da ingestão alimentar, que estar sujeita a erros relativos à memória ou à estimativa da porção, o que foi minimizado pelo método de ajuste de energia; b) a própria heterogeneidade de respostas na PE, uma vez que diferentes sistemas biológicos podem ser alterados nessa doença.

Em conclusão, não há evidência direta de estresse oxidativo nas mulheres com PE nessa semana gestacional, possivelmente devido à efetividade dos mecanismos antioxidantes compensatórios do organismo. O quadro inflamatório e os eventos inerentes à PE, como vasoconstrição, podem ter promovido as alterações no *status* de Mg. Assim, em nosso entender, todas as alterações no *status* em Mg parecem ser mais consequência do que causa dessa síndrome hipertensiva.

Para esse grupo de gestantes com PE, que não apresentaram a deficiência de Mg circulante, é possível questionar se essas mulheres estariam mais vulneráveis ao risco de toxicidade pela suplementação de Mg. A adequação dietética de Mg poderia oferecer menos riscos e, assim, garantir a manutenção de sua homeostase no organismo, uma vez que esse mineral desempenha importantes funções para o metabolismo humano.

Sugere-se que o monitoramento das concentrações de Mg seja realizado ao longo das semanas gestacionais, para verificar as alterações compartimentais desse mineral, principalmente quando se observa aumento do mineral na PE.

Agradecimentos: à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento concedido ao projeto de pesquisa (nº 2010/17181-9), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo (nº 797185). Ao médico Marcos Tadeu e ao Hospital Ipiranga, pela colaboração durante a seleção das gestantes. À Cristiane Hermes Sales, pelo auxílio nas análises das enzimas antioxidantes, e à professora Ana Paula de Melo Loureiro e à aluna Fabiana Almeida, pela colaboração na análise de malondialdeído.

5. REFERÊNCIAS

1. Colli C; Sales CH; Rocha VS. Assessment of magnesium status. In: BERHARDT, L.V. (Org.). *Advances in medicine and biology*. Hauppauge: Nova Science Publishers Inc, 2013; 40: 191-216.
2. Rocha VS; Lavanda I; Nakano EY; Ruano R; Zugaib M; Colli C. Calcium and magnesium status is not impaired in pregnant woman. *Nutrition Research*, 2012; 32: 542-546.
3. Sales CH; Pedrosa LFC; Lima JG; Lemos TMAM; Colli C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Clin Nutr*, 2012; 30: 359-364.
4. Jain S; Sharma P; Kulshreshtha S; Mohan G; Singh S. The role of calcium, magnesium, and zinc in pre-eclampsia. *Biological Trace Element Research*, 2010; 133: 162-170.
5. Kisters K; Barenbrock M; Louwen; Hausberg M; Rahn KH; Kosch M. Membrane, intracellular, and plasma magnesium and calcium concentrations in preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, 2000; 13: 765-769.
6. Young BC; Levine RJ; Karumanchi SA. Pathogenesis of Preeclampsia. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2010; 5:173-92.
7. Touyz RM; Pu Q; He G; Chen X; Yao G; Neves MF; Viel E. Effects of low dietary magnesium intake on development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: role of reactive oxygen species. *Journal of Hypertension*, 2002; 20: 2221-32.
8. Mazur A; Maier JAM; Rock E; Gueux E; Nowacki W; Rayssiguier, Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007; 458: 48-56.
9. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 183: S1–22.
10. Atalah E; Castillo C; Castro R; Aldea A. Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas. *Rev Med Chile*, 1997; 125: 1429-36.
11. Sales CH, Rocha VS, Setaro L, Colli C. Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação do método de análise por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 2012; 71. [ARTICLE IN PRESS].
12. Cheng G-W; Wu H-L; Huang Y-L. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system. *Analytica Chimica Acta*, 2008; 616: 230.

13. Beutler E. Red Cell metabolism: a manual of biochemical methods. Orlando: Grune & Stratton, 1975.
14. Flohé L; Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 1984; 105: 114-21.
15. Barbieri P; Nishimura, RY; Crivellenti, LC; Sartorelli, DS. Relative validation of a quantitative FFQ for in Brazilian pregnant women. *Public Halth Nutrition*, 2012; 16:1-8.
16. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients). Washington (USA): National Academy Press; 2005
17. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Magnesium. In: Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, editor. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (USA): National Academy Press; 1997, 190-249p.
18. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Using dietary reference intakes for nutrient assessment of individuals. In: Dietary reference intakes: applications in dietary assessment. Washington (USA): National Academy Press; 2000, 45-69p.
19. Willett WC; Howe GR; Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 1997; 65: S1220-8.
20. Dusse LMS; Vieira LM; Carvalho, MG. Revisão sobre alterações hemostáticas na doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG). *J Bras Patologia*, 2001; 37: 267-272.
21. Sanders R; Konijnenberg A; Huijgen HJ; Wolf H; Boer K; Sanders GT. Intracellular and extracellular, ionized and total magnesium in pre-eclampsia and uncomplicated pregnancy. *Clinical chemistry and laboratory medicine CCLM FESCC*, 1999; 37: 55-59.
22. Seydoux J; Girardin E; Paunier L; Béguin F. Serum and intracellular magnesium during normal pregnancy and in patients with pre-eclampsia. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 1992; 99: 207-211.
23. Nishizawa H; Pryor-Koishi K; Suzuki M; Kato T; Sekiya T; Tada S; Kurahashi H; Udagawa Y. Analysis of Nitric Oxide Metabolism as a Placental or Maternal Factor Underlying the Etiology of Pre-Eclampsia. *Gynecol Obstet Invest*, 2009; 68: 239-247.
24. Escudero C; Sobrevia L. A Hypothesis for Preeclampsia: Adenosine and Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Placental Microvascular Endothelium. *Placenta*, 2008; 29: 469-483.
25. McKinney ET; Shouri R; Hunt RS; Ahokas RA; Sibai BM. Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin f2alpha levels in normotensive and preeclamptic

- pregnancies. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2000; 183: 874-877.
26. Llurba E; Gratacós E; Martín-Gallán P; Cabero L; Dominguez C. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. Free Radical Biology & Medicine, 2004; 37: 557-70.
 27. Kostellow AB; Morrill GA. Iron-catalyzed lipid peroxidation in aortic cells in vitro: protective effect of extracellular magnesium. Atherosclerosis, 2004; 175: 15–22.
 28. Sharma JB; Sharma A; Bahadur A; Vimala N; Satyam A; Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. Intern J Gynec Obst, 2006; 94: 23-37.
 29. Bernardi F; Guolo F; Bortolin T; Petronilho F.; Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. J Obstet Gynaecol Res, 2008; 34: 948–951.
 30. Sabatier M; Pont F; Arnaud MJ; Turnlund JR. A compartmental model of magnesium metabolism in healthy men based on two stable isotope tracers. American journal of physiology Regulatory integrative and comparative physiology, 2003; 285: 656-63.
 31. Bussière FI, Gueux E, Rock E, Girardeau JP, Tridon A, Mazur A, *et al.* Increased phagocytosis and production of reactive oxygen species by neutrophils during magnesium deficiency in rats and inhibition by high magnesium concentration. Br J Nutr, 2002; 87: 107-13.
 32. Sugimoto J; Rimani AM; Valentin-Torres AM, Lucinao AA, Kitchen CMR, Funderburg N; Mesiano S; Bernstein HB. Magnesium Decreases Inflammatory Cytokine Production: A Novel Innate Immunomodulatory Mechanism. J Immunol 2012; 188: 6338-6346.

APÊNDICE

Apêndice A – Objetivos do estudo

Objetivo geral

Avaliar o *status* de Mg e a sua relação com o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia.

Objetivos específicos

Avaliar, nas gestantes:

- ❖ A probabilidade de inadequação da ingestão alimentar de Mg e as concentrações de Mg plasmático, eritrocitário e urinário
- ❖ A concentração de óxido nítrico e dos marcadores do *status* oxidativo – malondialdeído, 8-isoprostano urinário e atividade das enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase e catalase)
- ❖ A concentração da proteína C reativa, da interleucina 6 e do fator de necrose tumoral- α – marcadores de inflamação
- ❖ A relação entre os parâmetros de Mg e os parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação.

Apêndice B – Material e métodos detalhados

1. Casuística

Esse estudo caso-controle foi realizado no período de abril de 2011 a setembro de 2012, com gestantes voluntárias que faziam acompanhamento clínico ou foram encaminhadas ao serviço obstétrico do Hospital das Clínicas (HC), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e do Hospital Ipiranga, da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. As gestantes foram distribuídas nos seguintes grupos: **a) controle (CT)**: formado por gestantes sem complicações obstétricas e sistêmicas, que estavam com mais de 20 semanas de gestação, e **b) pré-eclâmpsia (PE)**: formado por gestantes diagnosticadas, pelo serviço médico, com pré-eclâmpsia, considerando pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $> 0,3$ g/24 h, a partir da 20ª semana gestacional, conforme definido pelo *National High Blood Pressure Education Program* (2000).

O protocolo deste estudo foi submetido aos comitês de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da USP (nº 541), e do Hospital das Clínicas, da USP (nº 1305/09), e contou com a autorização da direção geral do Hospital Ipiranga (Anexo A). Todas as mulheres foram esclarecidas sobre o procedimento aos quais seriam submetidas e sobre o objetivo da pesquisa. Os procedimentos da pesquisa iniciavam-se após assinatura do TCLE pelas participantes.

2. Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi feito pelo Instituto de Matemática e Estatística da USP. Inicialmente, a amostra mínima estimada foi de 17 gestantes em cada grupo (total de 34 gestantes). Essa amostra permite resultados estatisticamente significativos, com nível de significância de 5 % e poder de 80 %,

para diferenças mínimas detectadas na concentração de Mg plasmático, no estresse oxidativo e na resposta inflamatória entre os grupos na ordem de um desvio padrão.

3. Fatores de exclusão

Foram excluídos em ambos os grupos os casos com: hipertensão crônica, hipertensão gestacional (antes da 20ª semana gestacional), gestação múltipla, diabetes, doença cardíaca, uso de suplemento em magnésio e hábito de fumar (Anexo B).

4. Protocolo de estudo

As participantes foram submetidas à coleta de sangue e de urina de 24 h, para determinação do Mg nos fluidos biológicos, bem como avaliação dos marcadores de estresse oxidativo, óxido nítrico e citocinas inflamatórias. Foram realizadas avaliações antropométrica e dietética (questionário de frequência alimentar), para a obtenção de informações quanto ao consumo do Mg e a ingestão de macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) (Figura 7).

5. Avaliação antropométrica e pressão arterial

O peso corporal foi aferido no momento da entrevista com as gestantes descalças e usando pouca roupa. As medidas foram feitas em balança (Toledo, São Paulo, Brasil) com precisão de 50 g. A estatura corporal foi determinada com estadiômetro (Toledo, São Paulo, Brasil), com precisão de 0,5 cm. Esses dados foram utilizados para a obtenção do IMC (peso/altura^2) gestacional, classificados segundo a padronização de Atalah *et al* (1997), que considera a semana gestacional

(Anexo C). A pressão arterial foi aferida, por enfermeira do serviço médico, no braço esquerdo com a gestante sentada, usando esfigmômetro de mercúrio.

Figura 7 – Fluxogramas das atividades realizadas

6. Avaliação do consumo alimentar

Para avaliação do consumo alimentar, foi aplicado um QQFA, validado, para gestantes (OLIVERIA *et al*, 2010; BARBIERI, 2011). No QQFA, a gestante descreveu, para o pesquisador, a frequência e a quantidade de consumo de determinados alimentos (Anexo D). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o *software DietSys*, com informações nutricionais obtidas do sistema *on line* NutriQuanti (www.zeroonze.com.br/consumo).

Os dados obtidos com o QQFA foram ajustados por energia pelo método do resíduo, segundo sugerido por Willet, Howe e Kushi (1997). As estimativas de ingestão de macronutrientes e de Mg das gestantes foram avaliadas segundo as *Referências de Ingestão Dietética* (DRI) (IOM, 1997; IOM 2005).

O cálculo de probabilidade de inadequação alimentar de Mg foi feito inicialmente, determinando-se a diferença (D) entre a ingestão individual observada e a Estimativa de Necessidade Média (EAR), para a idade e o estado fisiológico; em seguida, calculou-se o desvio padrão de D (SD_D) e, posteriormente, a relação dos dois (D/SD_D) para situar, sob a curva de GAUSS, o quanto a ingestão do indivíduo se distancia da média de uma população de referência (IOM, 2000).

É importante destacar que o programa NutriQuanti é um sistema disponível na internet, que foi desenvolvido com o propósito de auxiliar na análise de dietas em pesquisa na área de ingestão alimentar. Esse programa contém as informações da Tabela Brasileira de Composição de Alimento - TACO (2006), da Tabela de Composição de Alimentos: suporte para decisão nutricional (PHILIPPI, 2001), da Tabela de Composição de Alimentos do IBGE (IBGE, 1996) e da *Table of Nutrient Retention Factors* (USDA, 2003). Em especial para o Mg, o NutriQuanti foi

enriquecido com os dados de análises de alimentos-fonte de Mg, feitas em nosso laboratório.

7. Coleta de sangue

Após jejum de oito horas, 20 mL de sangue (volume total) foram coletados por profissional experiente, utilizando material descartável, nos Serviços de Obstetrícia do Hospital das Clínicas de São Paulo. Do volume total, cinco mL foram transferidos para tubo com anticoagulante (citrato de sódio-10 μ L/mL), para obtenção do plasma e da papa eritrocitária para análise de Mg, e quatro mL para o tubo vacutainer contendo EDTA (7,2 mg - ref 367861), para análises de parâmetros oxidantes e antioxidantes. O sangue restante foi distribuído em tubos vacutainer sem anticoagulante (ref. 367953), para a obtenção do soro, para análise dos marcadores de inflamação e óxido nítrico.

O sangue foi separado por centrifugação, para obtenção do soro e de plasma. Após a retirada do plasma, a massa eritrocitária foi lavada com NaCl a 0,9 %. Todo o material biológico obtido foi transferido para microtubos estéreis de polipropileno e armazenado a -80°C, para posterior análise.

8. Coleta de urina de 24 horas

Para a coleta de urina 24 horas, foi fornecido às pacientes um frasco desmineralizado de 2L. As participantes foram instruídas a coletar a urina, nas 24h que antecederiam o dia da coleta de sangue. No recebimento das amostras de urina, o conteúdo do frasco era homogeneizado e o volume urinário medido. Alíquotas eram retiradas para as análises de creatinina urinária e de 8-isoprostano urinário, que foi armazenada com butil-hidroxi tolueno (BHT) a 0,01%, para evitar a oxidação. O volume restante foi acidificado com ácido clorídrico (HCL) a 3 mol/L para impedir a

precipitação de Mg na urina e sua melhor conservação (ELIN, 1987). Todas as amostras retiradas foram conservadas a -80°C .

9. Análises bioquímicas

Determinação de Mg

As determinações de Mg foram feitas em amostras de plasma, urina e eritrócitos. As amostras de cada tipo foram tratadas de maneira específica. As leituras foram feitas com o *Espectrofotômetro de Absorção Atômica da Perkin-Elmer* (modelo *AAnalyst 100*), nas seguintes condições: λ 285,2 nm, fenda 0,7 nm, chama: oxidante ar/acetileno. As curvas padrão foram preparadas com MgCl_2 , em intervalos de 0,05 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Titrisol Merck, Darmstadt, Alemanha). Nas amostras e na curva padrão foi acrescentada solução de óxido de lantânio a 5 %, como $\text{La}_2\text{O}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha), para concentração final de lantânio de 0,1% (SALES *et al*, 2012).

Uma amostra de referência certificada (*Trace Element Serum L1 e Urine Blank– Seronorm, Billingstad, Norway*) e padrões secundários (*pool* de urina, plasma e eritrocitário) foram utilizados para acompanhar o desempenho das análises. Todo material utilizado foi previamente tratado (HNO_3 a 30% por 12 horas), enxaguado com água desmineralizada e seco em ambiente adequado.

Função renal

A função renal foi avaliada pelo cálculo de *clearance* de creatinina. Foi analisada a creatinina no soro e na urina de 24h, pela reação de Jaffe, utilizando *kit* de reagentes da Labtest Diagnostica® (Santa Lagoa, MG, Brasil). O cálculo do

clearance de creatinina (Ccr, expresso em mL/s/1,73 m²) foi determinado pela relação:

Ccr

$$= \left(\frac{1.73 \times \text{creat.urinária} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \times \text{volume urinário} \left(\frac{\text{mL}}{\text{seg}} \right)}{\text{creatin. sérica} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)} \right) / \text{superfície corporal (m}^2\text{)}$$

Marcadores de inflamação

As concentrações séricas das citocinas inflamatórias, da proteína C reativa, da interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram determinadas por ensaios enzimáticos, utilizando-se os kits: *Human C-Reactive protein Immunoassay* (Cat. n°. DCRP00), *Human IL-6 Immunoassay* (Cat. n°. S6050) e *Human TNF- α Immunoassay* (Cat. n°. STA00C) da marca R&D Systems Inc. (Millipore Corporation, Billerica, MN, EUA). As placas foram lidas em leitora de microplaca (Spectra MAX 190 da Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

Marcadores de estresse oxidativo

Concentração urinária de 8 iso - Prostaglandina F_{2 α} (8-isoprostano)

A concentração de 8-isoprostano urinário foi determinada por ensaios enzimáticos utilizando o kit *8-isoprostane EIA* (Cat.n°. 516351, Cayman Chemical Co, USA). As amostras de urina foram diluídas em água desmineralizada, na proporção de 1:20, e a análise seguiu o protocolo fornecido pelo fabricante. As placas foram lidas em leitor de microplacas (Spectra MAX 190 da Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) a 412 nm.

Concentração de malonaldeído

A concentração do malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, foi determinada em amostras de plasma, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão). No método usado, o MDA foi liberado do peróxido lipídico, durante o aquecimento no meio ácido, e 1 mol de MDA reagiu com 2 moles do ácido tiobarbitúrico (TBA), formando o complexo cromogênio (TBA-MDA), medido em 532 nm. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ (CHENG; WU; HUANG, 2008).

Para cada amostra de plasma (250 μL), foram adicionados 36 μL de BHT 0,2% e 12,5 μL de NaOH 10N em microtubos de polipropileno, aquecidos a 60 °C em equipamento *vortemp*. Após a adição de 1.500 μL da solução de TCA 7,2 % com KI 1%, o tubo foi homogenizado e centrifugado a 1.461 xg. Após centrifugação, 1.000 μL do sobrenadante foram transferidos para tubo rosqueável, 500 μL do TBA foram adicionados e novamente aquecidos a 90°C. A extração do complexo MDA - TBA foi feita com o acréscimo de 250 μL n-butanol; cerca de 100 μL do sobrenadante foram injetados no HPLC.

As condições de leitura foram as seguintes: temperatura no mostrador 4°C, temperatura da coluna 30°C, fase móvel de 65 % de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) filtrado e 35 % de metanol grau HPLC; volume de injeção de 50 μL ; taxa de fluxo de 1 mL/min; tempo de corrida de 10 min. A detecção foi realizada fluorimetricamente, com excitação de 515 nm e emissão de 543 nm. A concentração de MDA foi calculada a partir da equação da reta gerada pela curva de calibração, cujas concentrações variavam de 0,5 a 10 $\mu\text{mol/L}$.

Determinação da atividade enzimática

Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada em lisados da papa eritrocitária obtida após centrifugação do sangue total a 4 °C. A lise dos eritrócitos foi feita com água desmineralizada na proporção de 1:200 (papa:água).

A atividade da GSH-Px foi indiretamente medida por reação atrelada com a glutathiona redutase. A glutathiona oxidada (GSSG), produzida com a redução de hidroperóxidos (terc-butil hidroperóxido) pela GPx, foi reciclada para o seu estado reduzido (GSH) pela glutathiona redutase (GR) e pelo NADPH (BEUTLER, 1975; FLOHÉ; GLUNZÉ, 1984; TORRES, 2009).

A atividade da GSH-Px foi medida pela quantidade da enzima que causou a oxidação de 1 nmol de NADPH para NADP⁺ por minuto, com temperatura controlada. O ensaio foi realizado em microplacas contendo 30 µL do hemolisado (1:200) e meio de reação formado por tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0, glutathiona redutase a 0,08M, glutathiona oxidase a 9,6 U/mL, NADPH 1,2 mM. Após adição do substrato, terc-butil hidroperóxido 0,46 %, a atividade da GSH-Px foi monitorada por 6 min, no comprimento de onda de 340 nm e 37°C.

A atividade da GPx (U/gHb) foi determinada pela fórmula abaixo, deduzida a partir da Lei de Lambert Beer.

$$\text{atividade da GPx (nmol/min/mL)} = \frac{k}{\varepsilon \times b} \times \frac{0,2 \text{ mL}}{Y \text{ mL}} \times \text{diluição da amostra}$$

Onde: k = inclinação da curva (min⁻¹)

b = caminho óptico da placa de Elisa ∴ 0,524 (cm)

$\epsilon_{\text{NADPH}^+} = 6,22 \text{ (nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$, que corresponde ao coeficiente de extinção do NADPH

Y = volume de amostra adicionada, neste ensaio: $30 \text{ }\mu\text{L} = 0,03 \text{ mL}$

Determinação da atividade da catalase

O método baseia-se na avaliação da decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase. Sua atividade da enzima foi quantificada pelo decaimento da absorbância durante 6 min, a 37°C e comprimento de onda de 240 nm.

A análise foi realizada em papa eritrocitária, as quais foram obtidas após centrifugação do sangue total, a 4°C , e lisadas em água desmineralizada na proporção de 1:2000 (papa:água). Para o ensaio da catalase, foi preparado meio reacional com tampão TRIS-HCL (1M, pH 8,0) e peróxido de hidrogênio a 30 mM. Imediatamente, após o acréscimo de $20 \text{ }\mu\text{L}$ do hemolisado, a absorbância foi lida por 6 min, a 230 nm e 37°C (BEUTLER, 1975).

A atividade da catalase (U/gHb) foi determinada pela fórmula abaixo, deduzida a partir da Lei de Lambert Beer.

$$\text{atividade da catalase } (\mu\text{mol/min/mL}) = \frac{k}{\epsilon \times b} \times \frac{Y}{y} \times \text{diluição da amostra}$$

Onde: k = inclinação da curva de crescimento (min^{-1})

b = caminho óptico da cubeta (cm) = 1

$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,071 \text{ (}\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$

Y = volume final, neste caso, $1000 \text{ }\mu\text{L}$

y = quantidade da amostra no volume total do ensaio. Neste caso, $20 \text{ }\mu\text{L}$

Determinação de hemoglobina

A concentração de hemoglobina (Hb) foi medida em amostras de papa de eritrócito lisado na proporção de 1:4, pelo método de cianometaglobina, usando-se o *kit* de reagentes da Labtest Diagnostica® (Santa Lagoa, MG, Brasil).

Determinação do NO

A concentração de NO foi determinada em amostras de soro, por quimioluminescência, utilizando-se o Analyzer (NOATM 280, Sievers' Inc, USA). Inicialmente, as amostras de soro foram desproteinizadas e uma alíquota de 10 µL foi injetada no aparelho. Em seguida, utilizando-se o cloreto de vanádio a 90 °C, os produtos nitrato/nitrito, presentes no soro, foram reduzidos a NO e a concentração de NO foi medida por quimioluminescência em fase gasosa após reação com ozônio. Uma curva de calibração foi construída a partir da solução de nitrato de sódio a 10 mM, em diferentes concentrações. Os valores foram expressos em µM.

10. Análise estatística

A análise estatística foi feita com o *software* SPSS (Chicago, IL, USA) versão 14.0. Os dados dietéticos foram ajustados por energia pelo método do resíduo (19), para reduzir os erros inerentes às medições da dieta. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os testes de Qui-quadrado, exato de *Fisher*, *t-Student* e *Mann-Whitney* para amostras independentes foram feitos para verificar as diferenças entre as variáveis de interesse para os grupos CT e PE.

A associação entre as variáveis foi avaliada pelo coeficiente de correlação de *Spearman*. Além disso, as variáveis, que apresentaram-se estatisticamente diferentes nos dois grupos, foram analisadas com o uso da curva *Receiver-Operating Characteristics* (ROC). As variáveis preditoras foram definidas pela maior

área sob a curva e seus pontos de cortes foram estabelecidos considerando a melhor combinação de sensibilidade e especificidade que discriminasse o grupo PE do grupo CT. Nas análises estatísticas foi considerado α de 5%.

Análise estatística dos dados dietéticos

Após verificar a normalidade da distribuição do Mg ingerido, os valores foram ajustados em relação à energia pelo cálculo do nutriente residual (WILLET, HOWE, KUSHI, 1997), para evitar dados distorcidos por diferenças no consumo energético. O cálculo teve 4 etapas:

O primeiro passo foi verificar se havia uma correlação positiva entre o consumo energético e a ingestão de Mg das gestantes de cada grupo (Tabela 5).

Tabela 5 – Correlação entre os valores de ingestão de Mg e calorias obtidas, antes do ajuste por energia pelo método do resíduo

Grupos	Correlação
Controle	$r = 0,8078$
Pré-eclâmpsia	$r = 0,8431$

Posteriormente, utilizando-se o consumo energético como variável independente, e a ingestão de Mg como variável dependente, fez-se a análise de regressão linear simples. A partir destes coeficientes de regressão (β_0 ; β_1) obtidos, foi determinado o valor estimado de consumo de Mg de cada indivíduo, correspondente ao consumo médio de energia individual, conforme a equação:

$$\text{Ye nutriente} = \beta_0 + \beta_1 \times \text{energia média individual (Equação 1)}$$

Onde: Ye nutriente = quantidade estimada de nutriente

β_0 = intercepto da regressão linear simples

β_1 = tangente

Após aplicação dessa fórmula, o valor encontrado para o nutriente estimado (Y_e) foi subtraído do valor de ingestão de Mg (Y observado), obtendo-se o valor do resíduo (Y residual).

$$Y \text{ residual} = Y \text{ observado} - Y_e \text{ nutriente} \quad (\text{Equação 2})$$

Como o resíduo varia entre cada pessoa e a sua média é zero, calcula-se o valor de uma constante (C) para esses valores, utilizando os coeficientes da regressão linear e a ingestão média de energia de cada grupo, pela seguinte fórmula:

$$C = \beta_0 + (\beta_1 \times \text{energia média do grupo}) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: C =constante

β_0 = intercepto da regressão linear simples

β_1 = tangente

Assim, a soma do valor da constante encontrada com o valor do resíduo (Y residual) de cada pessoa determina o valor de Mg ajustado (Y ajustado), sem correlação com a energia total consumida. A média de ingestão do grupo antes e após do ajuste em relação à energia permaneceu igual; no entanto, houve diminuição da dispersão dos valores e, por conseguinte, do desvio padrão.

$$Y \text{ ajustado} = Y \text{ residual} + C \quad (\text{Equação 4})$$

Referências

- Atalah E; Castillo C; Castro R; Aldea A. Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas. *Rev Med Chile*, 1997; 125: 1429-36.
- Barbieri P; Nishimura, RY; Crivellenti, LC; Sartorelli, DS. Relative validation of a quantitative FFQ for in Brazilian pregnant women. *Public Halth Nutrition*, 2012; 16:1-8.
- Beutler E. *Red Cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Orlando: Grune & Stratton, 1975.
- Cheng G-W; Wu H-L; Huang Y-L. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system. *Analytica Chimica Acta*, 2008; 616: 230.
- Elin RJ. Assessment of magnesium *status*. *Clin Chem*, 1987; 33:1965-70.
- Flohé L; Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 1984; 105: 114-21.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients). Washington (USA): National Academy Press; 2005
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Magnesium. In: Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, editor. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (USA): National Academy Press; 1997, 190-249p.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Using dietary reference intakes for nutrient assessment of individuals. In: Dietary reference intakes: applications in dietary assessment. Washington (USA): National Academy Press; 2000, 45-69p.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estudo Nacional de Despesa Familiar. Tabela de composição dos alimentos. 4. ed. Rio de Janeiro, 1996.
- Oliveira T; Marquiti FD; Carvalhaes MABL; Sartorelli DS. Desenvolvimento de um Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar (QQFA) para gestantes usuárias de unidades básicas de saúde de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 2010; 26:2296-2306.
- Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. Brasília, DF, 2001
- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* , v.183, S1–22, 2000.
- Sales CH, Rocha VS, Setaro L, Colli C. Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação do método de análise por espectrofotometria de absorção

atômica com chama. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 2012; 71. [ARTICLE IN PRESS].

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e Pesquisa da UNICAMP- São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>

Torres LHL. Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2009.

United States Department of Agriculture (USDA). Table of Nutrient Retention Factors, 2003. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/>.

Willett WC; Howe GR; Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. Am J Clin Nutr, 1997; 65: S1220-8.

Apêndice C- Análise do *status* de ferro na pré-eclâmpsia

Projeto de mestrado: *Status* de ferro na pré-eclâmpsia

Aluna: Fernanda Brunacci Della Rosa

Orientação: Prof^a Célia Colli

Figura 8 – *Bloxplot* dos parâmetros do *status* de ferro do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Teste Mann-Whitney para comparação entre médias ($p < 0,05$) Legenda: CTLF-capacidade total de ligação do ferro; IST-índice de saturação de transferrina.

Anexos

ANEXO A – Comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/18/2010
Protocolo CEP/FCF/541

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Avaliação do status em magnésio de gestantes com pré-eclâmpsia e sua relação com o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a resistência insulínica
Pesquisador Responsável:	Vivianne de Sousa Rocha
Orientador:	Profa. Dra. Celia Colli
Instituição:	FCF/USP e HC/FM/USP
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	Não se aplica

II - Sumário Geral do Protocolo:

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação hipertensiva específica da gestação que afeta cerca de 5 a 10 % das mulheres, e representa 27 % das mortes maternas e 18 % dos óbitos fetais apenas na América Latina, sendo uma das maiores causas de mortalidade e morbidade perinatais.

Apesar de muitas hipóteses já terem sido propostas para elucidar a gênese da PE, pouco se descobriu sobre suas causas. Atualmente, os fatores relacionados com o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a resistência insulínica promovendo a disfunção endotelial placentar e vascular são os mais aceitos para explicar a gênese da PE. Contudo, suas causas ainda permanecem desconhecidas, sendo possível que sua origem seja multifatorial. Estudos mostram que essas gestantes apresentam baixas concentrações de Mg sérico e que a deficiência deste mineral também tem sido implicada em processos associados a PE, como o estresse oxidativo, a resposta inflamatória levando a disfunção endotelial, todavia pouco se sabe sobre o mecanismo que o envolve.

Os objetivos do presente estudo são:

Objetivo geral: Avaliar o estado nutricional de magnésio em gestantes com pré-eclâmpsia e sua relação com o estresse oxidativo, resposta inflamatória e resistência insulínica.

Objetivos específicos: Avaliar nas gestantes:

- A adequação da ingestão alimentar de Mg;
- A concentração de Mg plasmático, eritrocitário e urinário;
- A concentração de Isoprostanos e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione peroxidase) – marcadores do estresse oxidativo;
- A concentração de nitrito (NO₂);
- A concentração de interleucina 6, da proteína C reativa e do fator de necrose tumoral – marcadores da resposta inflamatória;
- A resistência insulínica, por meio da concentração de glicose e insulina de jejum;
- A relação entre os parâmetros de Mg com demais parâmetros de estresse oxidativo, de inflamação e resistência insulínica.

Página 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

Tipo de estudo: Caso-controle e observacional do tipo transversal.

Descrição da Casuística:

Serão recrutadas 90 mulheres com mais de 20 semanas de gestação com (n=45) e sem (n=45) pré-eclampsia, no Hospital das Clínicas da FM/USP.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Mulheres com mais de 20 anos e com mais de 20 semanas de gestação. O grupo pré-eclampsia se diferenciará do grupo controle pela presença de níveis pressóricos superiores a 140/90 mmHg e proteinúria superior a 0,3g/24h.

Serão critérios de exclusão:

Gestantes fumantes, diabéticas, com hipertensão crônica, com gestação múltipla ou doença renal ou cardiovascular.

Aspectos éticos descritos no projeto:

Os aspectos éticos são descritos de forma adequada.

III – Situação do Projeto: APROVADO em reunião de 01/03/2010.

O pesquisador deverá:

- Comunicar ao CEP:
 - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial em setembro/2011 e relatório final em maio/2013.

São Paulo, 02 de março de 2010.

Prof. Dra. Evira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP/FCF/21/2012

São Paulo, 28 de fevereiro de 2012.

Ilmo(a). Sr(a),
Vivianne de Sousa Rocha
Orientador: Profa. Dra. Célia Colli
FBA

Senhor(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 27 de fevereiro de 2012, aprovou as alterações do projeto intitulado "Avaliação do 'status' em magnésio de gestantes com pré-eclâmpsia e sua relação com o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a resistência insulínica" (Protocolo CEP nº 541), a saber:

- Inclusão do Hospital Ipiranga e do Dr. Marcos Taceu Garcia na equipe;
- Inclusão da análise das concentrações de malonaldeído por HPCL, marcador de peroxidação.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariza Landgra
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/01/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1305/09**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DO STATUS EM MAGNÉSIO DE GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPsia E SUA RELAÇÃO COM ESTRESSE OXIDATIVO, RESPOSTA INFLAMATÓRIA E RESISTÊNCIA INSULÍNICA**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Rodrigo Ruano**

Pesquisador (a) Executante: **Vivianne de Sousa Rocha**

CAPPesq, 28 de Janeiro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 1305/09

Título: AVALIAÇÃO DO STATUS EM MAGNÉSIO DE GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPSIA E SUA RELAÇÃO COM ESTRESSE OXIDATIVO, RESPOSTA INFLAMATÓRIA E RESISTÊNCIA INSULÍNICA

Pesquisador Responsável: Rodrigo Ruano

Pesquisador Executante: Vivianne de Sousa Rocha

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 07/03/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• Carta datada de 17/01/12 - Inclusão do Dr. Marcos Tadeu Garcia no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; Carta datada de 19/01/12 - Modificações no Protocolo; Relatório Parcial do Estudo

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 12 de Março de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO B – Ficha de acompanhamento

FICHA DE ACOMPANHAMENTO Pesquisa: Status de Fe e Mg em gestantes com pré eclâmpsia	Nº ____ ____
--	--------------

Dados pessoais:

grupo: _____

data: ____/____/____

1. Nome: _____

2. Idade _____ Data de nascimento ____/____/____ Profissão: _____

3. Endereço: _____

4. Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

5. CEP: _____ - _____ email: _____

6. Telefones para contato: _____ RGHC: _____

Dados clínicos para exclusão na pesquisa:

7. É fumante? (não) (sim) (parei), quanto tempo? _____

8. Tem hipertensão crônica (antes da gestação)? (não) (sim)

9. Tem hipertensão gestacional (antes da 20ª gestação)? (não) (sim)

10. Sua gestação atual é gemelar? (não) (sim)

11. Tem: diabetes, doença renal, problemas no coração ou na tireóide? (não) (sim), se sim qual(is)? _____

11. Toma alguma vitamina ou mineral? (não) (sim), se sim complete a tabela:

Nome da vitamina/ mineral ¹	Uso
	(0) 1 por dia, (1) 2 por dia, (2) 3 por dia, (3) 4 ou + por dia (4) 1-3 por semana, (5) 4-6 por semana
	(0) 1 por dia, (1) 2 por dia, (2) 3 por dia, (3) 4 ou + por dia (4) 1-3 por semana, (5) 4-6 por semana
	(0) 1 por dia, (1) 2 por dia, (2) 3 por dia, (3) 4 ou + por dia (4) 1-3 por semana, (5) 4-6 por semana

¹O uso de suplemento de Ferro não excluirá a gestante da pesquisa, veja a lista nº1 de suplementos que exclui a gestante do estudo

Dado sócio econômico (Obs: ²Em caso de dúvida, veja lista 2):

11. Você estudou até que ano? _____ série _____ grau _____ Outros _____

13. Renda familiar mensal: (0) >1 s.m. (1) 1-2 s.m. (2) 2-3 s.m. (3) 3-5 s.m. (4) 5-7,5 s.m.

(5) 7,5 -10 s.m. (6) > 10 s.m. , quantos? _____ sm=salário mínimo

FICHA DE ACOMPANHAMENTO

Pesquisa: Status de Fe e Mg em gestantes com pré eclâmpsia

Nº _____

Quantas pessoas moram na casa? _____

Dados obstétricos e gerais (Obs: ³ dados coletados do prontuário médico):14. Semanas gestacionais³: _____ Data da última menstruação³: ____/____/____15. Pressão arterial³: _____ mmHg Proteinúria³: _____ g/24h16. Peso pré-gestacional³: _____ kg (até a 13ª semana gestacional)

17. Peso gestacional atual: _____ kg Estatura: _____ m

18. Número de gestações anteriores: _____ Número de filhos? _____

aborto ou nasceu morto? (não) (sim), qts _____

Todos são filhos do mesmo parceiro? (não) (sim), quantos _____

19. Você ou algum familiar teve pré eclâmpsia? (não) (sim), quem? _____ qts PE? _____

21. Faz uso de algum medicamento? (não) (sim), se sim qual?

Medicamento	Uso
	(0) 1 por dia, (1) 2 por dia, (2) 3 por dia, (3) 4 ou + por dia (4) 1-3 por semana, (5) 4-6 por semana
	(0) 1 por dia, (1) 2 por dia, (2) 3 por dia, (3) 4 ou + por dia (4) 1-3 por semana, (5) 4-6 por semana
	(0) 1 por dia, (1) 2 por dia, (2) 3 por dia, (3) 4 ou + por dia (4) 1-3 por semana, (5) 4-6 por semana

22. Você ingere bebida alcoólica? (não) (sim), quantidade: _____

frequência: _____

23. Quantas horas você gasta em? sono: _____ sentado (no trabalho ou casa): _____

ANEXO C – Tabela de avaliação do estado nutricional da gestante

Semana gestacional	Baixo peso (BP) IMC $\leq$	Adequado (A) IMC entre	Sobrepeso (S) IMC entre	Obesidade (O) IMC $\geq$
6	19,9	20,0 24,9	25,0 30,0	30,1
8	20,1	20,2 25,0	25,1 30,1	30,2
10	20,2	20,3 25,2	25,3 30,2	30,3
11	20,3	20,4 25,3	25,4 30,3	30,4
12	20,4	20,5 25,4	25,5 30,3	30,4
13	20,6	20,7 25,6	25,7 30,4	30,5
14	20,7	20,8 25,7	25,8 30,5	30,6
15	20,8	20,9 25,8	25,9 30,6	30,7
16	21,0	21,1 25,9	26,0 30,7	30,8
17	21,1	21,2 26,0	26,1 30,8	30,9
18	21,2	21,3 26,1	26,2 30,9	31,0
19	21,4	21,5 26,2	26,3 30,9	31,0
20	21,5	21,6 26,3	26,4 31,0	31,1
21	21,7	21,8 26,4	26,5 31,1	31,2
22	21,8	21,9 26,6	26,7 31,2	31,3
23	22,0	22,1 26,8	26,9 31,3	31,4
24	22,2	22,3 26,9	27,0 31,5	31,6
25	22,4	22,5 27,0	27,1 31,6	31,7
26	22,6	22,7 27,2	27,3 31,7	31,8
27	22,7	22,8 27,3	27,4 31,8	31,9
28	22,9	23,0 27,5	27,6 31,9	32,0
29	23,1	23,2 27,6	27,7 32,0	32,1
30	23,3	23,4 27,8	27,9 32,1	32,2
31	23,4	23,5 27,9	28,0 32,2	32,3
32	23,6	23,7 28,0	28,1 32,3	32,4
33	23,8	23,9 28,1	28,2 32,4	32,5
34	23,9	24,0 28,3	28,4 32,5	32,6
35	24,1	24,2 28,4	28,5 32,6	32,7
36	24,2	24,3 28,5	28,6 32,7	32,8
37	24,4	24,5 28,7	28,8 32,8	32,9
38	24,5	24,6 28,8	28,9 32,9	33,0
39	24,7	24,8 28,9	29,0 33,0	33,1
40	24,9	25,0 29,1	29,2 33,1	33,2
41	25,0	25,1 29,2	29,3 33,2	33,3
42	25,0	25,1 29,2	29,3 33,2	33,3

Fonte: ATALAH E et al. *Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas*. Revista Médica de Chile, 125(12):1429-1436, 1997.

ANEXO D - Questionário quantitativo de frequência alimentar para gestantes**Questionário de frequência alimentar quantitativo**

data: ____/____/____

Nome: _____ grupo: _____

Alimento	Quantas vezes você come	Frequência	Porção média	Sua porção	Codificação
Pão francês ou forma	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade / 2 fatias (50g)	P M G EG	
Rosca doce ou sonho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 unidades P (60g)	P M G EG	
Bolo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 fatia grande (100g)	P M G EG	
Pão integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 fatias (50g)	P M G EG	
Torrada, polvilho, biscoito salgado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	5 unidades (33g)	P M G EG	
Biscoito doce s/recheio (maisena, cookies)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	10 unidade (50g)	P M G EG	
Biscoito doce recheado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	7 unidade (87,5g)	P M G EG	
Geleia, mel, melado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 colher de sobremesa (10g)	P M G EG	
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 ponta de faca (5g)	P M G EG	
Margarina () comum / () light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 ponta de faca (5g)	P M G EG	
Requeijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 ponta de faca CH (10g)	P M G EG	
Queijo branco (fresco, ricota, cottage)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 pedaços M (50g)	P M G EG	
Queijo amarelo (provolone, mussarela, prato)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 fatias M (30g)	P M G EG	
Mortadela, salame, presunto, peito de peru, salsicha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 fatias M (40g)	P M G EG	
Leite () integral () desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 copo CH (250g)	P M G EG	
Achocolatado ou cappuccino (pó)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 colheres de sobremesa (22g)	P M G EG	
Vitamina de fruta c/ leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 copo G (300g)	P M G EG	
Mingau	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 prato fundo raso (200g)	P M G EG	
Iogurte integral (coalhada, natural, fruta)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 copo requeijão (200g)	P M G EG	
Iogurte desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 copo P (150g)	P M G EG	
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 copo CH (250g)	P M G EG	
Suco de outras frutas (natural)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 copo CH (250g)	P M G EG	
Suco artificial ou refrigerante	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 copo CH (250g)	P M G EG	
Café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 xícara (50g)	P M G EG	
Abacaxi	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 fatias médias (200g)	P M G EG	
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade média (80g)	P M G EG	
Mexerica, laranja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade média (160g)	P M G EG	
Goiaba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 unidades (360g)	P M G EG	
Manga, caqui	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade média (180g)	P M G EG	
Maçã, pera	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade média (93g)	P M G EG	
Melancia, melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 fatia média (200g)	P M G EG	
Mamão formosa e papaia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 fatia média (170g)	P M G EG	
Morango	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	9 unidades médias (108g)	P M G EG	
Pêssego	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	3 unidades médias (300g)	P M G EG	
Abacate ou abacatada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 fatia média (147,5g)	P M G EG	
Uva	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 cacho P (170g)	P M G EG	
Acelga, alface, repolho (cru ou cozidos)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 prato de sobremesa (36g)	P M G EG	
Agrão, almeirão, rúcula, couve	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 pires CH (50g)	P M G EG	
Beterraba (crua ou cozida)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 fatias G (52g)	P M G EG	
Cenoura (crua ou cozida)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 colheres de Sp CH (30g)	P M G EG	

Pepino	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 pires CH (120g)	P M G EG	
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade M (90g)	P M G EG	
Abobora	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 pires (135g)	P M G EG	
Abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade P (72g)	P M G EG	
Mandioca, batata, purê de batata ou mandioquinha () frito () cozido	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 es M (95g)	P M G EG	
Brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 ramo M (30g)	P M G EG	
Outros legumes (vagem, chuchu)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 esc M (90g)	P M G EG	
Milho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	4 colheres Sp CH ou 1 espiga (100g)	P M G EG	
Arroz branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 esc CH M (170g)	P M G EG	
Risoto, arroz carreiro ou a grega, canja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 colher de arroz CH (134g)	P M G EG	
Arroz integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 colher de arroz CH (134g)	P M G EG	
Feijão cozido	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 concha M (156g)	P M G EG	
Feijão temperado (feijoadinha, com bacon)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	3½ concha M (273g)	P M G EG	
Miojo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 pacote (80g)	P M G EG	
Lasanha ou massas recheadas c/ carne	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 esc G ou 1 ped P (122,5g)	P M G EG	
Macarrão / outras massas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 esc M CH (220g)	P M G EG	
Quando consome massa, qual tipo de molho adicionado? () branco () bolonhesa ou frango () alho e óleo () ao sugo () 4 queijos					
Carne bovina frita/ carne de panela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 filé M ou 3 ped M (100g)	P M G EG	
Carne refogada () bife grelhado () moída	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 filé M (100g) 4 colheres de Sopa CH (120g)	P M G EG	
Strogonofe de carne, bife a role, carne c/ legumes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 colheres de Arroz CH (80g)	P M G EG	
Frango frito	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 filé M (180g)	P M G EG	
Frango assado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 filé M (180g)	P M G EG	
Strogonofe de frango, fricassê, frango xadrez	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 colheres de Sopa CH (120g)	P M G EG	
Carne de porco () pernil ou lombo () linguiça	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1,5 filé P (150g) 1 gomo (60g)	P M G EG	
Bacon ou torresmo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	6 fatias (600g)	P M G EG	
Peixe cozido	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 filé M (100g)	P M G EG	
Peixe frito	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 filé M (100g)	P M G EG	
Atum	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 colheres de Sopa CH (32g)	P M G EG	
Sardinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 unidades (82g)	P M G EG	
Ovo () cozido () frito () omelete	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade (50g)	P M G EG	
Fígado ou moela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade M (30g)	P M G EG	
Dobradinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	3 colheres de S CH (97,5g)	P M G EG	
Frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	5 colheres de S CH (100g)	P M G EG	
Castanhas, nozes, amendoim	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	8 unidades (20g)	P M G EG	
Sopa de legumes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 prato fundo CH (310g)	P M G EG	
Doces com frutas ou picolé de frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 c S CH (80g)/1 picolé (60g)	P M G EG	
Doces com leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 fatia M (69g)	P M G EG	
Sorvete de massa	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 bola G (100g)	P M G EG	
Chocolate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 bombom ou 1 filé (30g)	P M G EG	
Paçoca, pé de moleque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 unidades (60g)	P M G EG	
Salgado frito	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade G (100g)	P M G EG	

Salgado assado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade M (80g)	P M G EG	
Salgadinho tipo Chips ou pipoca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 pct (96g) ou 1 saco M (20g)	P M G EG	
Lanches, cachorro quente, hambúrguer	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 unidade (125g)	P M G EG	
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	2 fatias (210g)	P M G EG	
Açúcar (adicionado em bebidas)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M G	1 colher de sobremesa (16g)	P M G EG	

Com qual frequência a senhora consome vegetais e quantas porções?

Frequência	Quantas vezes você come
D S M G	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Com qual frequência a senhora consome frutas e quantas porções?

Frequência	Quantas vezes você come
D S M G	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Quando consome frango retira a pele? 1 () não 2 () as vezes 3 () sim

Quando consome carne retira a gordura aparente? 1 () não 2 () as vezes 3 () sim

Quando consome atum é com água ou óleo? () óleo () água

Como tempera a salada e com que frequência?

() azeite extra-verde () óleo vegetal () molho industrial () sal

Frequência	Quantas vezes você come
D S M G	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Que tipo de gordura a senhora usa para preparar as refeições?

Óleo vegetal: () soja () milho () girassol () canola () composto () margarina () manteiga
() banha () azeite

Frequência	Quantas vezes você come
D S M G	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Há algum alimento que consome pelo menos 1x na semana e não foi citado?

Alimento	Frequência por semana	Quantidade consumida	COD

ANEXO E - Normas para defesa **Universidade de São Paulo****Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação****Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação:

pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO F – Ficha do Aluno

29/03/12

Ficha do Aluno

Janus – Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 – 5765055/2 – Vivianne de Sousa Rocha

Email: vrocha@usp.br
Data de Nascimento: 23/11/1982
Cédula de Identidade: RG - 2.093.628 - PI
Local de Nascimento: Estado do Piauí
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Universidade Federal do Piauí - Piauí - Brasil - 2006
Mestrado: Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2009

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 05/06/2009
Início da Contagem de Prazo: 05/06/2009
Data Limite: 05/06/2013
Orientador: Prof(a). Dr(a). Celia Colli - 05/06/2009 até o presente. E.Mail: cecolli@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/06/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 05/06/2009
 Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012**Impresso em:** 29/03/12 10:24:24

29/03/12

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 5765055/2 - Vivianne de Sousa Rocha

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MCP5839-1/5	Fisiopatologia de Doenças Vasculares: Disfunção Endotelial, Desequilíbrio Redox e Inflamação (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	17/08/2009	06/09/2009	45	3	100	B	N	Concluída
EDM5791-5/3	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	19/08/2009	30/11/2009	120	8	83,3	A	N	Concluída
MCP5850-1/1	Como Escrever um Trabalho Científico (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	28/09/2009	05/10/2009	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5803-1/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	01/03/2010	14/03/2010	30	2	100	A	N	Concluída
HEP5800-1/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2010	11/05/2010	90	6	100	A	N	Concluída
HINT5758-1/2	Doenças Crônicas não Transmissíveis do Espectro da Síndrome Metabólica: Fisiopatologia, Epidemiologia e Controle (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/05/2010	15/06/2010	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	21
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012

Impresso em: 29/03/12 10:24:24

ANEXO G – Currículo Lattes

Vivianne de Sousa Rocha Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5397450334302550>

Última atualização do currículo em 09/05/2013

Resumo informado pelo autor

Formada em Nutrição pela Universidade Federal do Piauí (2006) e mestre em Ciência de Alimentos na área de concentração de Nutrição Experimental pela Universidade de São Paulo (2009). Atualmente, é aluna de doutorado pela mesma Instituição (Início: junho/2009). Bolsista do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino da CAPES (2009-2013) e aluna de Iniciação Científica do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/CNPq (2005/2006). Atua nas áreas de: avaliação do consumo alimentar, minerais e gestantes.

(Texto informado pelo autor)

Formação acadêmica/titulação

- 2009** Doutorado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Status em magnésio na pré-eclâmpsia e sua relação com o estresse oxidativo e a resposta inflamatória
Orientador: Célia Colli
- Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2007 - 2009** Mestrado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Avaliação bioquímica e do consumo alimentar de magnésio em gestantes no terceiro trimestre gestacional. Ano de obtenção: 2009
Orientador: Célia Colli
- Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2001 - 2006** Graduação em Nutrição.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Formação complementar

- 2011 - 2011** Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento do Ensino-CAPES.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Redação Acadêmica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Bioestatística Avançada.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Bioestatística Básica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Treinamento em Nutrição Social.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **ROCHA, VS**; LAVANDA, L; NAKANO, E. Y.; RUANO, R.; ZUGALB, M.; COLLI, C.
Calcium and magnesium status is not impaired in pregnant women. Nutrition Research, v.32, p.542-542, 2012.
2. **MARRERO, D. N.**, Sousa, Mariana Séfora Bezerra, **PRES, L. V.**, **SILVA, A. M. O. E.**, **ROCHA, VS**
Concentrações Sérica e Dietética de Cálcio e Fósforo em Pacientes Renais Crônicos em Hemodiálise. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v. 26, p. 187-191, 2011. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v.26, p.187 - 191, 2011.

3. ★ MARTINS, F. S., NOGUEIRA, N. N., MARREIRO, D. N., CARVALHO, C. M. R. G., MONTE, S. J. H., MOITA NETO, J. M., **ROCHA, VS.**, **CARDOSO, B. V. S.**
Concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco em idosos portadores e não-portadores de catarata senil em um serviço oftalmológico especializado de Teresina-PAU, Arquivos Brasileiros de Oftalmologia (Impresso), **Ucr**, v.71, p.674 - 678, 2008.
4. MARREIRO, D. N., LEMOS, J. O., MOURA, J. F., FRANCO, N. O., PIRES, L. V., SILVA, A. M. O. E., **ROCHA, VS.**, SOUSA, A. F., FERREIRA, C. M., MARREIRO, A. C.
Estado nutricional de pacientes renais crônicos em hemodiálise, Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v.22, p.189 - 193, 2007.

Artigos aceitos para publicação

1. SALES, C. H., **ROCHA, VS.**, SETARO, L., COLLI, C.
Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação de métodos de análise por espectrofotometria de absorção atômica de chama. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 2013.

Capítulos de livros publicados

1. COLLI, C., SALES, C. H., **ROCHA, VS.**, SALES, A. L. C. C., Lobo, A.R.
Magnésio In: Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença, 1 ed, São Paulo : Manole, 2013, v.1, p. 1-1288.
2. ★ COLLI, C., SALES, C. H., **ROCHA, VS.**
Assessment of magnesium status (AT PRESS). In: Advances in Medicine and Biology. 0 ed. Hauppauge NY : Nova Science Publishers Inc, 2012, v.40, p. 0-.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ★ **ROCHA, VS.**, Della Rosa, Fernanda Brunacci, Ruano, Rodrigo, Zugaib, Marcelo, COLLI, C.
Alteração na compartimentalização do magnésio e atividade das enzimas antioxidantes na pré-eclâmpsia: dados preliminares In: Encontro SBAN: nutrição clínica, 2012, Natal.
Encontro SBAN: nutrição clínica, São Paulo: Nutrire, 2012, v.37, p.24 - 24
2. ★ Della Rosa, Fernanda Brunacci, **ROCHA, VS.**, Ruano, Rodrigo, Zugaib, Marcelo, COLLI, C.
Alteração no status de ferro na pré-eclâmpsia: dados preliminares In: Encontro SBAN: nutrição clínica, 2012, Natal.
Encontro SBAN: nutrição clínica, São Paulo: Nutrire, 2012, v.37, p.24 - 24
3. Achtschin, C. G., Lobo, A.R., **ROCHA, VS.**, SALES, C. H., Quintal, T.G., Crisma, A.R., Nakajima, K., Borelli, P., COLLI, C.
Effects of dietary iron overload on health growing rats In: XV Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo., 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo : Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 2010, v.46, p.63 - 63
4. Lobo, A.R., SALES, C. H., **ROCHA, VS.**, Borelli, P., Crisma, A.R., Nakajima, K., Figueiredo, R., Galevski, E.H.S., Santos, L.A.S., COLLI, C.
Iron bioavailability and magnesium status in anemic rats fed inulin-type fructans In: XV Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo, 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo : Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 2010, v.46, p.69 - 69
5. Lobo, A.R., SALES, C. H., **ROCHA, VS.**, Borelli, P., Crisma, A.R., Nakajima, K., Galevski, E.H.S., Santos, L.A.S., COLLI, C.
Iron bioavailability and magnesium status in anemic rats fed inulin-type fructans: preliminary results. In: Bioavailability 2010, 2010, Davis.
Asilomar: UC Davis Program in International & Community Nutrition., 2010. p.23 - 23
6. SALES, C. H., **ROCHA, VS.**, ATCHIL, C. G., GALANTE, A. P., COLLI, C.
Comparação entre softwares para estimativa do consumo alimentar In: 10 Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Nutrição e Alimentação-SBAN, 2009, São Paulo, 2.
Nutrire (São Paulo), 2009, v.34, p.1 - 493
7. **ROCHA, VS.**, LAVANDA, L., NAKANO, E. Y., RUANO, R., ZUGAIB, M., COLLI, C.
Ingesta dietética de magnésio y su relación con la presión arterial de mujeres sanas en el tercer trimestre gestacional In: XV Congreso Latinoamericano de Nutrición, 2009, Chile.
Revista Chilena de Nutrición (Impresa), Chile, 2009, v.36, p.635 - 635
8. **ROCHA, VS.**, LAVANDA, L., NAKANO, E. Y., RUANO, R., ZUGAIB, M., COLLI, C.
Magnesium status of healthy women in the third trimester of pregnancy In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo.
XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009.
9. **ROCHA, VS.**, Lavanda, Ivana, Nakano, Eduardo, Ruano, Rodrigo, Zugaib, Marcelo, COLLI, C.
Status em magnésio de mulheres saudáveis no terceiro trimestre gestacional In: 10 Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Nutrição e Alimentação-SBAN, 2009, São Paulo.
Nutrire (São Paulo), São Paulo, 2009, v.34, p.1 - 493
10. **ROCHA, VS.**, Lavanda, Ivana, Ruano, Rodrigo, Zugaib, Marcelo, COLLI, C.
Cálcio e magnésio: ingestão e excreção urinária em gestantes In: XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008, São Paulo.
XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008.
11. SALES, C. H., SETARO, L., **ROCHA, VS.**, COLLI, C.
Magnésio plasmático e urinário: validação de métodos de análise In: XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008, São Paulo.
XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008.
12. SALES, C. H., COLLI, C., NACIMENTO, D. A., MEDeiros, A. C. Q., **ROCHA, VS.**, PEDROSA, L.F.C.
Construção de valores de referência para magnésio plasmático em estudantes da UFRN In: Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas, 2007, São Paulo.
Nutrire-Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas, São Paulo: Nutrire, 2007, v.32, p.85 - 85
13. MARTINS, F. S., **CARDOSO, B. V. S.**, **ROCHA, VS.**, NOGUEIRA, N. N.

- Consumo alimentar de calorias, macronutrientes e zinco em idosos portadores e não-portadores de glaucoma In: XII Congresso da Sociedade Brasileira de Glaucoma, 2007, Pernambuco.
XII Congresso da Sociedade Brasileira de Glaucoma. , 2007.
14. MARREIRO, D. N., SOUSA, A. F., NOGUEIRA, N. N., MATIAS, J. P., MARTINS, L. M., MARQUES, R. C., OLIVEIRA, F. E., PERES, G. R., ROCHA, VS
Efeito da suplementação com zinco sobre o metabolismo dos hormônios tireoidianos na síndrome de down In: Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas, 2007, São Paulo.
Nutrire-Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas, São Paulo: Nutrire, 2007, v.32, p.86 - 86
 15. MARREIRO, D. N., PERES, G. R., NOGUEIRA, N. N., LEAL, F. L. T., CARDOSO, B. V. S., MARTINS, L. M., ROCHA, VS, SOUSA, A. F.
Efeito do exercício físico sobre a concentração plasmática de zinco em judocas adolescentes In: Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas, 2007, São Paulo.
Nutrire-Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas. São Paulo: Nutrire, 2007, v.32, p.265 - 265
 16. NOGUEIRA, N. N., MARTINS, F. S., MATIAS, J. P., MARREIRO, D. N., CARVALHO, C. M. R. G., CARDOSO, B. V. S., ROCHA, VS, SOUSA, A. F.
Estudo comparativo das concentrações de zinco eritrocitário entre portadores e não-portadores de catarata senil In: Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas, 2007, São Paulo.
Nutrire-Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas. São Paulo: Nutrire, 2007, v.32, p.256 - 256
 17. MARTINS, F. S., CARDOSO, B. V. S., ROCHA, VS, NOGUEIRA, N. N.
Estudo comparativo das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco entre idosos portadores e não-portadores de glaucoma In: XII Congresso da Sociedade Brasileira de Glaucoma, 2007, Pernambuco.
XII Congresso da Sociedade Brasileira de Glaucoma. , 2007.
 18. NOGUEIRA, N. N., ROCHA, O. A. M. S., MARREIRO, D. N., MONTE, S. J. H., AMORIM, A. C., ROCHA, VS, CARVALHO, C. M. R. G., MACEDO, A. S.
Zinco eritrocitário no cordão umbilical de recém-nascidos assistidos em maternidade pública no nordeste do Brasil In: Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas, 2007, São Paulo.
Nutrire-Nono congresso nacional da SBAN- A ciência da alimentação e nutrição: novos paradigmas. São Paulo: Nutrire, 2007, v.32, p.269 - 269
 19. PERES, G. R., MARREIRO, D. N., LEAL, F. L. T., SOUSA, A. F., MARTINS, L. M., CARDOSO, B. V. S., ROCHA, VS
Comparação entre a bioimpedância e o somatório de dobras cutâneas como método de avaliação da composição corporal em judocas adolescentes In: XV Seminário de iniciação científica da UFPI, 2006, Teresina.
XV Seminário de iniciação científica da UFPI. , 2006.
 20. CARDOSO, B. V. S., MARTINS, F. S., ALMONDES, K. G. S., PERES, G. R., MARREIRO, D. N., CARVALHO, C. M. R. G., ROCHA, VS, NOGUEIRA, N. N., MATIAS, J. P.
Concentração de zinco plasmático e consumo alimentar em portadores e não-portadores de catarata senil In: VII Congresso Norte-Nordeste de nutrição parenteral e enteral, 2006, Natal.
VII Congresso Norte-Nordeste de nutrição parenteral e enteral , 2006.
 21. SOUSA, A. F., MARREIRO, D. N., NOGUEIRA, N. N., MONTE, S. J. H., MARTINS, L. M., PERES, G. R., ROCHA, VS, MATIAS, J. P., MARQUES, R. C., OLIVEIRA, F. E.
Concentração plasmática de zinco e sua relação com o metabolismo dos hormônios tireoidianos em crianças e adolescentes com síndrome de Down In: XV Seminário de iniciação científica da UFPI, 2006, Teresina.
XV Seminário de iniciação científica da UFPI. , 2006.
 22. ROCHA, VS, NOGUEIRA, N. N., MARREIRO, D. N., MARTINS, F. S., ANDRADE, N. C., CARDOSO, B. V. S., MATIAS, J. P., BITTENCOURT, S.
Zinco eritrocitário em portadores de catarata senil assistidos em clínica privada em Teresina-Piauí In: XV Seminário de iniciação científica da UFPI, 2006, TERESINA.
XV Seminário de iniciação científica da UFPI. , 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. ROCHA, VS, NOGUEIRA, N. N., MARREIRO, D. N., AMORIM, A. C., MONTE, S. J. H., ALMEIDA, F. A. S., SANTOS JUNIOR, J. R., ROCHA, O. A. M. S.
Concentração de zinco plasmático e eritrocitário no cordão umbilical de recém-nascidos de uma maternidade pública de Teresina-Pi In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI, 2006, Teresina.
XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI. TERESINA: UFPI, 2006, v.14.
2. PIRES, L. V., ROCHA, VS, MARREIRO, D. N., NOGUEIRA, N. N., MONTE, S. J. H., SANTOS JUNIOR, J. R., EULALIO, J. M. L., MARTINS, L. M., CLEMENTINO, A. H.
Indicadores bioquímicos do estado nutricional relativo ao zinco de pacientes obesos mórbidos resistentes à insulina submetidos à cirurgia bariátrica In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI, 2006, Teresina.
XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI. Teresina: UFPI, 2006, v.XIV.
3. ARAUJO, C. C., CARVALHO, C. M. R. G., NOGUEIRA, N. N., MARREIRO, D. N., MONTE, S. J. H., ROCHA, VS, SOUSA, M. B., ANDRADE, N. C., ALMEIDA, F. A. S.
Perfil nutricional relativo ao zinco em idosos institucionalizados In: XV Seminário de iniciação científica da UFPI, 2006, Teresina.
XV Seminário de iniciação científica da UFPI. , 2006.

Artigos em revistas (Magazine)

1. ROCHA, VS, SETARO, L., ELMAN, I.
Frutos do Mar. Dieta Já. São Paulo, p.46 - 48, 2008.