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

Avaliação do *status* em ferro em gestantes com pré-eclâmpsia

Fernanda Brunacci Della Rosa

Dissertação para obtenção
do grau de Mestre

**VERSÃO
ORIGINAL**

Orientadora:
Profa. Dra. Célia Colli

São Paulo
2012

IBLIOTE
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

T22262-F

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

Avaliação do *status* em ferro em gestantes com pré-eclâmpsia

Fernanda Brunacci Della Rosa

Dissertação para obtenção
do grau de Mestre

Orientadora:
Profa. Dra. Célia Colli

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

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

Rosa, Fernanda Brunacci Della
R788a Avaliação do *status* em ferro na pré-eclâmpsia / Fernanda
Brunacci Della Rosa. — São Paulo, 2012.
66p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Colli, Célia

1. Nutrição experimental: Ciência dos alimentos 2. Ferro:
Ciência dos alimentos I. T. II. Colli, Célia, orientador.

641.1 CDD

Fernanda Brunacci Della Rosa

Avaliação do status em ferro em gestantes com pré-eclâmpsia

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Célia Colli
Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Ambrosio Fack
1º. examinador(a)

Profa. Dra. Josefina Aparecida Pellegrini Braga
2º. examinador(a)

Defesa 01/03/2013

1º de março de 2013
São Paulo, ~~dezembro de 2012.~~

Dedico este trabalho aos meus amados e amorosos pais, Luzia e Attilio, por absolutamente TUDO! Impossível colocar em palavras todo amor, admiração e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Às gestantes que, em um momento delicado e de incertezas, generosamente aceitaram participar da pesquisa.

À Prof. Dra. Célia Colli, minha orientadora, que gentilmente me aceitou em seu grupo. Obrigada pela orientação e pela oportunidade de desenvolver esta dissertação.

Aos companheiros do laboratório: Alê (Alexandre Rodrigues Lobo), Ana (Ana Lina de Carvalho Cunha Sales), Edu (Eduardo Gaievski), Dado (Eduardo de Carli) e Pry (Priscila Teixeira), sempre prontos para ajudar, seja em uma análise, seja com uma palavra amiga, seja com uma piada!

Ao Doutor Rodrigo Ruano e ao Doutor Marcelo Zugaib, que acreditaram em nosso projeto e viabilizaram nossa entrada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Doutor Marcos Tadeu Garcia, que viabilizou nossa entrada no Hospital Ipiranga.

Ao Corpo de Enfermagem do Hospital das Clínicas e do Hospital Maternidade Ipiranga.

Ao Prof. Dr. Breno Pannia Espósito do Instituto de Química da USP, que realizou as análises de ferro livre.

Às queridas Cristiane Hermes Sales e Jessica Helena Silva, a Cris e a Jé, pessoas fantásticas, que tive a sorte de conhecer nesta jornada e certamente amigas para a vida.

À querida Vivianne de Sousa Rocha, a Vivi, companheira de pesquisa e outra amiga (para a vida!), que também tive o prazer de conhecer nesta caminhada. Sem seu bom humor, sem sua ajuda em todas as etapas e sem seu apoio emocional este trabalho seria inviável.

Às minhas amigas da Nestlé Brasil: Alê (Alessandra Silva), Camila (Camila Sant' Ana), Jê (Jeane Cantanhede), Paula (Ana Paula Koge) e Rô (Rosana Agnani Salomão). Obrigada pelos "inúmeros galhos que quebraram". Todo o apoio e carinho que recebi no trabalho "daí" foi o que me deu condições para realizar o trabalho "daqui"!

A minha mãe Luzia por todo apoio, encorajamento, palavras sábias e doçura.

Ao meu pai Attilio pelas correções de texto, apoio, sugestões e caronas!

Ao meu amado marido Ricardo Della Rosa, pelo cuidado e carinho constantes, pelo ombro amigo em horas de angústias, pela paciência, pela dedicação, pelas idas até os hospitais aos sábados e aos domingos e por manter o nosso cotidiano e nossa casa funcionando nos últimos dois anos. **Sua presença está em cada linha deste trabalho.**

Tudo posso Naquele que me fortalece.

Filipenses: 4.13

*Aquilo que você ganha ao atingir seu objetivo,
não é tão importante quanto aquilo que você se torna
durante o caminho para atingi-lo.*

(autoria desconhecida)

Resumo:

BRUNACCI DELLA ROSA, F. Avaliação do *status* em ferro em gestantes com pré-eclâmpsia. 2012. Defesa de Mestrado em Ciências dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o status em ferro (Fe) na pré-eclâmpsia (PE). Participaram deste estudo caso-controle 36 gestantes, sendo 18 diagnosticadas com OE e 18 sem complicações obstétricas ou sistêmicas (controle- CT). Foram incluídas no grupo PE mulheres com pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $\geq 0,3$ g/24h, e que não apresentavam: a) hipertensão arterial crônica; b) hipertensão gestacional; c) diabetes ; d.) doenças cardíacas ou renais; e) e que não fizessem uso de suplemento contendo magnésio e que não fossem tabagistas. O sangue foi coletado das pacientes em jejum de 8 horas, para análise de concentrações de ferro sérico, ferritina, ferro livre, hepcidina bem como hemograma e parâmetros de estresse oxidativo (catalase). Foi aplicado, também, um questionário quantitativo de frequência alimentar validado para gestantes, para avaliação da ingestão dietética. Comparações entre grupos e correlações entre indicadores foram feitas por testes de *Mann Whitney* e *Spearman*, respectivamente. Foram encontradas diferenças de Fe sérico, hepcidina e ferritina, mas não de ferro livre entre os grupos. Houve maior atividade da catalase no grupo PE em comparação ao CT. Os resultados mostraram uma alteração na homeostase do ferro, como consequência da hipovolemia e maior atividade da enzima oxidante no grupo PE, uma provável tentativa do organismo de diminuir o efeito deletério do estresse oxidativo.

Palavras- chaves: estresse oxidativo, ferro, pré-eclâmpsia.

Abstract

BRUNACCI DELLA ROSA, F. Avaliação do *status* em ferro em gestantes com pré-eclâmpsia. 2012. Defesa de Mestrado em Ciências dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Preeclampsia (PE) occurs in approximately 5% of pregnancies and remains a leading cause of maternal and neonatal mortality and morbidity worldwide. Serum iron and ferritin levels were demonstrated to be significantly higher in PE and probably exacerbate oxidative stress. In this study we checked iron status and catalase activity in preeclamptic women and compared with healthy pregnancy. Blood samples were collected from 18 pregnant women diagnosed as preeclampsia and 18 normal pregnant women at Hospital das Clínicas and Hospital e Maternidade Ipiranga in São Paulo, Brazil. Mean serum iron, ferritin, and catalase were significantly higher in PE group. Mean serum hepcidin were significantly lower in PE group. No significant differences were found among hemoglobin (Hb) concentration and labile iron plasma (LPI). These results suggest that high levels of serum ferritin and iron maybe are associated with: oxidative stress; unfavorable outcome. Any pregnant with higher concentrations of serum iron and ferritin should be further investigated for preeclampsia.

Key words: preeclampsia, iron, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismo da Regulação Celular do Ferro pela Hepsidina.....	18
Figura 2: Fluxograma de atividades realizadas no HC/USP e HI.....	41
Figura 3: Classificação do estado nutricional, segundo Atalah <i>et al.</i> (1997), do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE).....	46
Figura 4: Ingestão alimentar de ferro em relação à Estimativa da Necessidade Média (EAR) e Recomendação (RDA) de ingestão para gestantes do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE).....	48
Figura 5: Bloxplot dos parâmetros do <i>status</i> em ferro do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE).....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados descritivos do grupo controle (CT), grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão) ou frequência (%).....	45
Tabela 2: Avaliação antropométrica do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).....	46
Tabela 3: Necessidade energética estimada e consumo de energia e nutrientes das gestantes do grupo controle e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).....	47
Tabela 4: Parâmetros hematológicos do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).....	49
Tabela 5: Parâmetros de estresse oxidativo, concentração de hepcidina e razão ferritina/hepcidina no grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).....	50
Tabela 6: Coeficiente de correlação (r) e nível de significância (p) em gestantes com pré- eclâmpsia (PE):.....	51

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AngII	Angiotensina II
CT	Controle
CTLF	Capacidade Total de Ligação do Ferro
DRI	<i>Referências de Ingestão Dietética</i> <i>Dietary Reference Intakes</i>
EAR	<i>Estimativa da Necessidade Média</i> <i>Estimated Average Requirement</i>
EPO	Eritropoetina
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
ET-I	Endotelina I
FER	Ferritina
FeS	Ferro sérico
FPN	Ferroportina
GDF 15	Fator de crescimento e diferenciação 15
GSHPx	Glutathione Peroxidase
Hb	Hemoglobina
HC	Hospital das Clinicas
HI	Hospital e Maternidade Ipiranga
Ht	Hematócrito
IFN- γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL- 13	Interleucina 13
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
IST	Índice de Saturação de Transferrina
LPI	<i>Labile Iron Plasma</i> (Ferro livre)
Mín- máx	mínimo – máximo
NCEP III	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NHBPEP	<i>National High Blood Pressure Education Program</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGI ₂	Prostaciclina
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PE	Pré-eclâmpsia
RDW	Variação de amplitude dos eritrócitos (<i>Red Cell Distribution Width</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tf	Transferrina
TXA ₂	Tromboxana

Sumário

Resumo.....	6
Abstract.....	7
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tabelas.....	9
Lista de Siglas e Símbolos.....	10
Apresentação.....	12
Capítulo I - Artigo de Revisão “Homeostase de Ferro na Pré-eclâmpsia”	13
Referências Bibliográficas.....	28
Capítulo II - Artigo Original “ <i>Status</i> em Ferro e sua relação com estresse oxidativo na Pré-Eclâmpsia”	35
Conclusões.....	57
Referências Bibliográficas.....	58
Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	62
Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	64

Apresentação

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome hipertensiva de baixa prevalência, porém com desfechos graves para mãe e feto.

Este trabalho é a sequência de estudos de avaliação do status de minerais em gestantes¹ desenvolvidos no Laboratório de Nutrição - Minerais da Faculdade de Farmácia da USP - São Paulo em parceria com o Depto. de Obstetrícia da FMUSP e Hospital e Maternidade Ipiranga.

Em estudos anteriores foi avaliado o status de Mg e Fe em gestantes , dois minerais importantes de serem estudados nesse caso. O ferro por ser esse um grupo de risco para anemia ferropriva; e, em contrapartida, para se identificar um corpo de indicadores do excesso de ingestão de ferro nesse grupo (considerando dieta, farinhas fortificadas e suplementos) . O magnésio, por outro lado, por sua relação com estresse oxidativo e inflamação e porque observou-se uma correlação inversa e significativa entre a ingestão alimentar de Mg e a pressão arterial sistólica em gestantes saudáveis , e que tinham inadequação de ingestão dietética do mineral;

Assim, inserido nessa linha de pesquisa, no presente estudo avaliou-se a homeostase de ferro em gestantes com pré-eclâmpsia e controles, acompanhadas nos ambulatórios de obstetrícia. O trabalho é apresentado em dois artigos: um de revisão sobre o tema e um artigo original .

1. ROCHA, S.V.; LAVANDA,I.; NAKANO, E.Y.; RUANO,R.; ZUGAIB,M.; COLLI, C. Calcium and magnesium status is not impaired in pregnant women. **Nutrition Research**. 2012; 32:542-46.

2. MACHADO, E. H. S. Anemia em gestantes atendidas em Unidades Básicas de Saúde da região administrativa do Butantã, município de São Paulo, em 2006 e 2008. 2011. 71f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 15-04-2011.

Capítulo I: Artigo de revisão**“Homeostase de Ferro na Pré-eclâmpsia”**

Este artigo está estruturado de acordo com as normas de publicação *da Revista da Associação Médica Brasileira*, periódico ao qual será submetido.

Artigo de revisão: Homeostase de ferro na Pré- Eclâmpsia.

Autoras: Brunacci, Fernanda; Rocha, S. Vivianne; Ruano; Rodrigo; Colli, Célia.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é uma forma de hipertensão arterial inerente à gestação. Segundo o *National High Blood Pressure Education Program* (NHBPEP)¹ a patologia se caracteriza clinicamente pelo aumento da pressão arterial em níveis iguais ou superiores a 140/90mmHg, após vinte semanas de gestação; é associada à proteinúria (≥ 300 mg/24 horas), edema nas mãos, face e parede abdominal, redução do fluxo sanguíneo, vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica.

Ainda que seja uma patologia de causas desconhecidas, observa-se que mulheres jovens, nulíparas ou de gravidez gemelar, negras, diabéticas, obesas e de baixo nível socioeconômico são as mais suscetíveis à sua intercorrência². O uso de medicamentos que induzem à ovulação e a hereditariedade também podem ser fatores de risco para o desenvolvimento da PE^{3,4}.

Apesar da baixa ocorrência - 5 a 8% das gestações - em países em desenvolvimento é a maior causa de mortalidade materna. Trata-se de uma patologia caracterizada por complicações clínicas com desfechos muito desfavoráveis para gestante e criança; seus impactos podem resultar em baixo peso ao nascer, em parto prematuro e, em casos mais extremos, em morte^{2,5}.

Estudos conduzidos desde a década de 1980 demonstraram que as gestantes que desenvolvem PE apresentam parâmetros referentes ao status em ferro maior que gestantes saudáveis.

A presença do estresse oxidativo na gestação pela ocorrência da PE já é algo bem evidenciado em estudos. Um dos fatores que poderia contribuir para o agravamento dessa condição de estresse oxidativo seria a alteração na homeostase de ferro - mineral instável e potencialmente tóxico- que acontece nessas gestantes.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi fazer uma revisão sobre o *status* em ferro em gestantes com pré-eclâmpsia.

Metodologia

Para selecionar os artigos da literatura foi realizado um levantamento bibliográfico em bases de dados de publicações eletrônicas de pesquisas conduzidas em humanos e publicadas entre o anos de 1983 à 2012. As bases de dados consultadas foram: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e *National Library of Medicine* (Pubmed).

As associações de termos empregados em português foram “*status* em ferro e pré-eclâmpsia”, “sobrecarga de ferro e gestação”; em inglês: “*iron status* and preeclampsia” e “*iron overload and pregnancy*”.

A busca por essas combinações de palavras-chave destacou trinta e oito estudos. Desses, treze eram elegíveis para este artigo, ou seja, avaliavam *status* em ferro de gestantes com pré- eclâmpsia.

Fisiopatologia da Pré- Eclâmpsia:

Ao início da gravidez, com o objetivo de garantir ao feto crescimento e desenvolvimento normais, as artérias espiraladas uterinas maternas precisam sofrer mudanças fisiológicas.

Os trofoblastos promovem a invasão das artérias espiraladas uterinas. Esta invasão ocorre em duas etapas, possibilitando alterações fisiológicas em nível intersticial e endoarterial: a primeira invasão acontece até a 12ª semana, promovendo a substituição do tecido muscular e elástico por material fibrinoide e ocorre elevada atividade proliferativa dos trofoblastos^{6, 7, 8}.

A segunda etapa ocorre entre a 14ª e a 21ª semana e, como resultado, há o aumento de diâmetro e o remodelamento das artérias, agora denominadas “artérias uteroplacentárias”, tornando-as mais flexíveis. A partir desse estágio, o suprimento de fluxo sanguíneo e a oferta de oxigênio são maiores, ininterruptos e adequados às necessidades fetais^{6, 8, 9}.

O sistema imunológico da mulher também precisa sofrer alterações para que o feto consiga se desenvolver. Para tanto, em uma gestação saudável, há um equilíbrio entre a produção de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β) que permitirão a implantação do embrião no útero e seu crescimento¹⁰.

Gestantes que desenvolvem pré-eclâmpsia apresentam um desequilíbrio entre a produção das citocinas com perfil Th2 e as citocinas com perfil Th1 (IFN- γ e TNF- α), tendo como característica a predominância do perfil Th1, e a consequência é o prejuízo na segunda etapa da invasão trofoblástica, na implantação embrionária, agravamento da disfunção endotelial e do perfil inflamatório.^{10,11}

Status em ferro na pré-eclâmpsia:

- Homeostase do Ferro

Nos anos que compuseram as décadas de 1980 e 1990, os estudos estavam dirigidos para a compreensão dos mecanismos de absorção, fatores dietéticos e do organismo que interferiam em sua biodisponibilidade, metodologia para sua avaliação, e aprimoramento da interpretação de parâmetros de status de Fe. Esse corpo de conhecimentos resultou também em revisão das necessidades de Fe para os diferentes grupos populacionais. No início da década de 2000, a descoberta do hormônio hepcidina, responsável pela regulação sistêmica do mineral, mudou o foco de pesquisas sobre homeostase de ferro, permitindo melhor dos mecanismos de seu armazenamento no organismo.

A hepcidina é sintetizada prioritariamente pelo fígado, codificado pelo gene HAMP, e sua ação é fundamental para coordenar o estoque, a utilização e a absorção do Fe^{12, 13}.

Esse hormônio é regulado pela concentração de Fe e fatores de inflamação. Tanto em situações de sobrecarga de Fe como também a presença de interleucina 6 (IL6) – citocina pró-inflamatória - há maior expressão do hormônio. Nessas situações, conforme apresentado na Figura 1, em uma tentativa de diminuir a ferremia, a hepcidina irá atuar sobre a ferroportina (FPN), induzindo a sua internalização e evitando a exportação do Fe da célula para o sangue^{14, 15}.

Em quadros de hipóxia ou anemia, observa-se a diminuição de hepcidina, permitindo ao enterócito absorver maior quantidade de Fe. Desse modo, irá ocorrer

maior exportação de Fe do sistema reticuloendotelial e enterócitos, aumentando a disponibilidade de Fe para a eritropoese ^{14, 15}.

Figura 1: Mecanismo da Regulação Celular do Ferro pela Hepcidina.

Fonte: Extraído de GANZ, 2007.

A gestante com PE apresenta quadros de hipóxia e concomitantemente de inflamação e sobrecarga de ferro. Pode se dizer, então, que ocorrem estímulos antagônicos na produção da hepcidina: a hipóxia, diminuindo sua síntese, e a inflamação e sobrecarga de ferro, aumentando a expressão do hormônio. Na inflamação há hipoferremia resultante da expressão aumentada da hepcidina. Contudo, o único estudo levantado nesta revisão com essa população mostrou que as gestantes com PE, apesar de apresentarem concentrações altas de IL6 e hepcidina, tinham concentrações de ferro plasmático e ferritina também aumentados, em relação ao grupo controle. Esses achados, segundo os autores, poderiam indicar que na PE ocorre resistência à ação hipoferremiante do hormônio ¹⁶.

- Ferro e Pré- Eclâmpsia

Se, por um lado a deficiência de ferro é fator de possíveis complicações gestacionais, por outro, sabe-se que o excesso do mineral também pode ser prejudicial, especialmente na pré-eclâmpsia.

Estudos conduzidos desde a década de 1980 demonstraram que as gestantes que desenvolveram PE apresentavam alterações dos parâmetros de Fe em comparação com gestantes saudáveis. Na ocasião, ENTMAN¹⁷ observou maiores concentrações de ferritina (FER = 59 ng/mL) e ferro sérico (FeS= 135 µg/dL) em gestantes com PE em comparação com aquelas normotensas (FER = 19 ng/mL e FeS= 62 µg/dL).

Resultados similares foram encontrados por Siddiqui *et al.*¹⁸; 40 gestantes com PE igualmente apresentavam maiores concentrações de ferritina (FER = 32.6 g/L) e ferro sérico (FeS = 23,48 µmol/L) quando comparadas às 80 gestantes saudáveis do estudo (FER = 19,89 g/L; FeS = 12.2 µmol/L).

Taheripanah e Farkusk¹⁹, do mesmo modo, evidenciaram forte correlação de ferritina com PE; no grupo PE (n=33), os valores encontrados foram: FER = 123 ng/dL; no grupo controle (n=33), 33,4 ng/dL.

Rayman *et al.*²⁰ ainda relaciona a maior concentração de ferritina com baixo peso ao nascer. Ao comparar 40 gestantes com PE e 40 saudáveis, verificou no grupo PE valores maiores de ferritina, ferro sérico e IST (%), e os fetos foram pré-termo e baixo peso ao nascer.

Alguns autores também sugerem alteração na concentração de hemoglobina e hematócrito. Zhou *et al.* (1998)²¹, em estudo de coorte feito com 829 gestantes chinesas, observou que aquelas com valores de hemoglobina extremos (> 13g/dL ou < que 10g/dL)

no segundo trimestre gestacional tinham maiores chances de parto prematuro. Observou também que, quanto maior as concentrações de hemoglobina no início da gestação - momento no qual ainda não há um grande aumento no volume plasmático - maiores as probabilidades de parto prematuro e crianças com baixo peso ao nascer.

Lao *et al.* (2000)²² selecionou 511 gestantes que apresentaram valores de hemoglobina superiores a 10 g/dl antes da 20ª. semana de gestação e, posteriormente, relacionou os valores de ferritina que elas apresentaram entre as 28ª e 30ª semanas e o peso ao nascer do RN. Observou-se que, quanto maior a concentração da ferritina, mais comum era um desfecho gestacional desfavorável com RN com baixo peso ao nascer e parto prematuro.

Em seu trabalho de revisão, Scholl e Reilly (2005)²³ observam relação entre alta concentração de hemoglobina (> 133 g/L) e de ferritina (> 40 ng/L) e parto prematuro, baixo peso ao nascer e hipertensão. São conclusões semelhantes às pesquisas de Scanlon (2000)²⁴, cujos maiores valores de hemoglobina mostrados também foram associados a ocorrências de complicações (> 130g/L no primeiro trimestre e > 126g /L no segundo trimestre). Zarfar e Iqbal (2008)²⁵ de igual modo encontraram aumento significativo na hemoglobina e hematócrito em gestantes no segundo trimestre. Todavia foram valores bem inferiores àqueles determinados em outras pesquisas (10.8 ± 0.18 g/dL).

A sobrecarga de ferro, no aspecto fisiológico, pode ser primária ou secundária. A primária é decorrente de defeito primário na homeostase do ferro, como na hemocromatose hereditária, doença caracterizada pela mutação no gene HFE e pelo aumento da absorção de ferro em nível intestinal. A secundária decorre de doenças congênitas ou adquiridas, como a anemia falciforme^{26,27}.

Não existe um parâmetro específico que expresse a condição de sobrecarga de ferro nas gestantes, e nem mesmo há consenso de que este termo possa ser empregado para esse grupo. Entretanto, em mulheres não gestantes em idade fértil a “sobrecarga de ferro” é diagnosticada quando a saturação de transferrina estiver acima de 50% e/ou a ferritina sérica acima de 200 µg/L ²⁶.

O que leva a gestante com PE apresentar esse excesso de ferro sérico ainda não está claro. Em casos mais graves a PE evolui para a *Síndrome Hellp*, patologia igualmente de causas desconhecidas na qual há hemólise (H), níveis elevados de enzimas hepáticas (EL) e contagem baixa de plaquetas (LP) ^{24, 28}.

Nesses casos, o excesso de ferro sérico pode ser explicado pela presença de hemólise. Entretanto autores sugerem que mesmo ainda não apresentando a síndrome de Hellp algum dano hepático já poderia estar instalado, alterando a concentração de ferro e ferritina séricos.

Já o aumento dos valores em parâmetros hematológicos pode ser explicado pelo aumento na produção eritrócitos- em decorrência da gestação há o aumento de 30% da massa eritrocitária- concomitantemente à redução do volume plasmático (hipovolemia) consequente à vasoconstrição ²⁹.

A hipovolemia e os possíveis danos celulares decorrentes da patologia igualmente explicam altas concentrações de ferritina; entretanto cabe destacar que a síntese dessa proteína de fase aguda encontra-se alterada em função da presença da inflamação ^{23,30}.

A alteração no *status* em ferro também poderia tornar o sangue mais viscoso, dificultando a oferta de oxigênio ao feto e promovendo a restrição do crescimento intra-uterino ³⁰.

A presença da hipóxia, característica da doença, de mesma maneira pode ser apontada como um fator de mudança na homeostase do ferro, uma vez que na tentativa de melhorar a oferta de oxigênio a eritropoese pode estar aumentada; estudos demonstram maior concentração de eritropoetina na gestante com PE ³¹.

O desfecho gestacional na PE são neonatos com baixo peso ao nascer, condição esta definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS)³² como peso inferior à 2.500 gramas, independentemente da idade gestacional” e é igualmente comum que o ciclo gravídico não contemple as usuais 40 semanas.

Na literatura, não há evidências de que a suplementação de ferro possa ocasionar um quadro de síndrome hipertensiva gestacional. Possivelmente, o excesso de ferro pode, agravar a patologia ^{30,33,34}

- Ferro e estresse oxidativo na Pré - Eclâmpsia

A gestação é um momento de grande estresse oxidativo. A placenta, órgão rico em mitocôndrias, tem alta atividade metabólica na gravidez normal e mais ainda na gravidez com complicações como PE ou diabetes ^{35, 36}.

Uma das causas do aumento de estresse oxidativo das gestantes com PE são as alterações fisiológicas decorrentes de uma invasão trofoblástica ineficiente e que resultam em menor diâmetro e flexibilidade das artérias uterinas e, como consequência, há a disfunção endotelial ⁸.

Esse quadro acarreta menor fluxo sanguíneo, ocasionando hipóxia e lesão endotelial, que promovem a liberação de potentes vasoconstritores como tromboxanas (TXA₂), endotelina I (ET-1) e angiotensina II (Ang II) concomitante com o aumento na produção de peróxidos lipídicos que prejudicam a síntese de prostaciclina (PGI₂), cuja

ação é vasodilatadora ^{4, 8, 28, 37}; as concentrações plasmáticas dos fatores angiogênicos - fator de crescimento placentário (PIGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) – parecem estar diminuídos, fato que limita a angiogênese uteroplacentária, prejudica a revascularização e intensifica o estresse oxidativo⁶.

Além do estresse oxidativo, outra alteração fisiológica que acontece na gestação saudável é ao aumento de 50% do volume plasmático e do débito cardíaco concomitante ao aumento de 30% da massa eritrocitária; modificações essas que podem levar a chamada “anemia fisiológica” ^{29,38}.

A gestante com PE, diferentemente da gestante saudável, parece não apresentar anemia fisiológica. Nestas mulheres tem-se observado o aumento na concentração de ferro sérico, hemoglobina, hematócrito e ferritina ^{17, 18, 22, 30}.

O excesso de ferro pode ser potencialmente tóxico, uma vez que contribui para a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROS) ^{39,40,41}. O excesso na produção de EROs dificulta sua neutralização pelo organismo pela atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) e catalases e, como resultado do estresse oxidativo a célula, pode ter a suas funções alteradas.

O ferro absorvido no enterócito pode ser armazenado ou exportado para o plasma, em ambas as condições geralmente o mineral encontra-se associado às proteínas *ferritina* e *transferrina* (Tf), respectivamente ^{42,43}.

Em situações patológicas que resultam em sobrecarga de ferro, como as anemias talassemicas e a hemocromatose, uma fração do Fe, o *labile plasma iron* (LPI) pode não se ligar à transferrina (NTBI) e quando em altas concentrações podem comprometer órgãos como coração e fígado ^{44, 45}.

Estudo caso-controle realizado com gestantes indianas a partir da 28ª semana gestacional, mensurou as enzimas com ação antioxidante (SOD, GSHPx e catalase) e outros parâmetros de estresse oxidativo como malondialdeído (MDA) e a forma oxidada da enzima glutathiona (GSSG). Concluiu, então, que na ocorrência da PE há a diminuição das concentrações séricas das enzimas antioxidantes, diminuição da atividade da GPx e SOD em nível eritrocitário e aumento significativo nas concentrações do MDA eritrocitário e GSSG. Os autores também verificaram que a atividade da catalase era maior nas mulheres com PE, possivelmente como um mecanismo compensatório do organismo na tentativa de neutralizar as EROS ⁴⁶.

A presença do estresse oxidativo não pode ser apontada como causa da PE e ainda não há resultados consistentes quanto ao efeito da suplementação com antioxidantes na evolução da doença.

Trabalhos com suplementação de vitaminas C e E não evitaram a ocorrência da PE em gestantes com baixo ou alto risco ^{47, 48}. Já a suplementação com selênio mostrou que o mineral poderia ter uma ação protetora contra o desenvolvimento da PE ⁴⁹. A vitamina D parece também exercer papel protetor: mulheres com PE e que tiveram filhos com peso abaixo do esperado tinham menor concentração da vitamina⁵⁰. Como forma de prevenção a suplementação precoce de vitaminas A, B6, B12, C, E e ácido fólico em gestantes de risco pode ser eficaz. ⁵¹

Concomitantemente com estresse oxidativo, e agravando o quadro, a síntese de óxido nítrico (NO) encontra-se diminuída na PE. O NO, em condições fisiológicas inibe a agregação plaquetária, promove a vasodilatação, melhora a perfusão sanguínea, regula a

pressão e induz a produção de superóxido dismutase, uma enzima com ação antioxidante que neutraliza a formação de peróxido de nitrito⁵².

Cabe ainda destacar que a gestante com PE pode apresentar níveis elevados de LDL colesterol. A oxidação dessa molécula ativa a NADPH oxidase, enzima que contribui para a formação do ânion superóxido. Essa molécula igualmente compromete a já deficiente biodisponibilidade do NO, como também facilita a formação do peróxido de nitrito⁵³.

Basher *et al.*(2006)³⁴ e Kolusari *et al.* (2008)⁵⁴ acreditam que o ferro sérico, significativamente maior na gestantes com PE pode ser uma possível contribuição na formação de radicais livres provenientes do metabolismo desse mineral.

Achados semelhantes são descritos em outros trabalhos comparando gestantes saudáveis com gestantes com PE (leve e grave) observaram-se correlações positivas entre concentrações de ferro e PE. Em mulheres com a forma grave da doença ainda foi relatado aumento nos níveis de colesterol, peroxidação lipídica e diminuição de vitamina E⁵⁵; baixo peso ao nascer²⁰; baixas concentrações de vitamina E, magnésio e zinco sérico, contribuindo para um ambiente pró oxidativo^{33,54}.

Deste modo, o excesso de ferro e o estresse oxidativo podem ser fatores que contribuem para o agravamento da pré-eclâmpsia; ou seja, excesso de radicais livres e o possível desequilíbrio entre suas quantidades e a quantidade de agentes antioxidantes⁵⁶.

Suplementação de Ferro na Pré- Eclâmpsia

Estudo realizado com gestantes saudáveis e eutróficas, no início do segundo trimestre gestacional, com idades entre 17 e 35 anos, feto único, não fumantes, sem antecedentes de PE ou aborto e não anêmicas (Hb > 13,2g/dL) selecionou um grupo para

receber suplemento (150mg de sulfato ferroso – 50 mg de ferro elementar) e outro que recebeu placebo. Ao final da gestação verificou-se que, não houve diferenças estatísticas na ocorrência de parto prematuro, partos cesarianos, peso ao final da gestação, duração da gestação e mortalidade perinatal. Entretanto o grupo suplementado com sulfato ferroso apresentou maiores frequências de síndromes hipertensivas gestacionais, crianças com pesos inferiores e maiores concentrações de hemoglobina⁵⁷. Este mesmo grupo de pesquisadores, em trabalho anterior concluiu que a suplementação do ferro em mulheres com as mesmas características descritas causou deficiência de zinco e ferro ⁵⁸

No Brasil, o Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Suplementação de Ferro, preconiza a suplementação diária de 60mg de ferro elementar e 5mg de ácido fólico para todas as gestantes a partir da 20ª semana gestacional. Aliada à esta política, também existe desde junho de 2004 o programa de fortificação das farinhas de trigo e milho em 4,2 mg de ferro/100 g de farinha⁵⁹.

O papel da fortificação das farinhas na diminuição da prevalência de anemia entre as gestantes ainda não é consenso; enquanto alguns estudos apontam um impacto positivo com a diminuição de 25% para 20% em nível nacional sugerindo que a fortificação associadas à outras políticas públicas tenham papel favorável⁶⁰, outro artigo de revisão publicado recentemente conferiu resultado significativo apenas no município de Teresina, Brasil, e ressalta limitações da política de fortificação como a dificuldade de acesso à alimentos fortificados por população de baixa renda, o tipo de ferro utilizado e qualidade na produção da farinha⁶¹.

Em análise de amostras de farinha de trigo, fubá e rosca para determinar concentrações de ferro lábil redox ativo verificou que esta forma do mineral representava

entre 1 a 9% do ferro total das farinhas, quantidade considerada como possível fator de risco para pessoas submetidas sistematicamente à ingestão de produtos derivadas destas farinhas e que apresentem sobrecarga de ferro⁶².

O consumo contínuo de alimentos fortificados poderia do mesmo modo alterar a microbiota intestinal. Apesar de não existirem pesquisas publicadas com gestante nessa área, um trabalho realizado com crianças africanas com idades entre 6 à 14 anos apresentou como resultados o aumento na população de enterobactérias potencialmente patogênicas no grupo que consumiu alimentos fortificado. Tal panorama foi explicado pela fortificação de ferro; nesta população a prática da fortificação foi ineficaz na prevenção da anemia⁶³.

Comentários Finais

Ainda que, isoladamente, parâmetros do status em ferro não possam ser utilizados como preditores de risco de desenvolvimento da PE, a relação, descrita por vários autores, entre FER alta, PE e desfecho gestacional desfavorável merece ser destacada.

Deste modo, a análise precoce desses parâmetros em gestantes com fatores de riscos para a doença associado à outros parâmetros já conhecidos (proteinúria, pressão arterial sistêmica) poderia ser utilizada como um instrumento de atenção básica à saúde desta gestante em uma tentativa de promover condutas clínicas que possam prevenir ou postergar o surgimento desta complicação hipertensiva.

Cabe ressaltar que a recomendação (*RDA*)⁶⁴ de Fe para gestante é de 27mg /d sendo que valores superiores à 45mg/d podem trazer efeito adverso como a diminuição na biodisponibilidade do zinco, mineral com ação antioxidante.

Visto que o excesso do ferro igualmente parece aumentar os impactos negativos na saúde do binômio mãe - filho, deve ser visto com cautela a prática rotineira de suplementar o mineral em gestante com PE e naquelas não anêmicas que apresentem fatores de risco para desenvolvimento da PE, uma vez que essa população através da alimentação e de produtos fortificados é sistematicamente exposta ao consumo do mineral.

Referências Bibliográficas

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(1):S1-22.
2. FERRÃO, M; PEREIRA, A.C.L.; GERSGORIN, H.C.T.S.; PAULA, T.A.A.; CORRÊA, R.R.M.; CASTRO, E.C. C. Efetividade do tratamento de gestantes hipertensas. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 2006; 52 (6): 390-94.
3. POON, L.C.Y.; KAMETAS, N.A.; CHELEMEN,T.; LEAL,A.; NICOLAIDES, K.H Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. **Journal of Human Hypertension.** 2010; 24: 10-14.
4. CAVALLI, R.C.; SANDRIM, V.C.; SANTOS, J.E.T; DUARTE,G . Predição de pré-eclâmpsia. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2009; 31(1):1-4.
5. GILBERT, J.S.; RYAN, M.J.; LA MARCA, B.B.; SEDDEK, M.; MURPHY, S.R.; GRANGER, J.P. Pathophysiology of hypertension during pré-eclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2008; 294:541–50.
6. OLIVEIRA, L.G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2010; 32 (12): 609-16

7. HUPPERTZ, B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008;51(4);970-5.
8. LYALL, F.; BELFORT M. **Pré-eclâmpsia: etiologia e prática clínica**. Rio de Janeiro. McGraw Hill Interamerican do Brasil, 2009.
9. KAHHALE, S.; ZUGAIB, M. Fisiopatologia na Pré-Eclâmpsia. In: **Síndromes Hipertensivas**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1995. Cap 2, p. 15-17
10. LIMA, T.H.B.; DAHER,S; SASS,N; MATTAR,R; FRANCHIM,C.S.; BARREIRO, E.G.; ROCHA, J.E.S. Polimorfismos de genes de citocinas na pré-eclâmpsia. **FEMINA**. 2009; 37 (4): 213-16
11. SAITO, S.;SAKAI,M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. **J Reprod Immunol**. 2003; 59 (2): 161-73.
12. GROTTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2008; 30 (5): 390-97.
13. LEMOS, A.R *et al*. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por deficiência de ferro. **Rev. Assoc. Med. Bras**. 2010; 56 (5): 596-99.
14. GANZ, T. Molecular control of iron transport. **J Am Soc Nephrol**. 2007;18:394-400.
15. GANZ, T.; NEMETH,E. Hepcidin and iron homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. 2012; 1813 (9): 1434-43.
16. TOLDI, G.; STENCZER,B.; MOLVAREC, A.; TAKATS, Z.; *et al*. Hepcidin concentrations and iron homeostasis in preeclampsia. **Clin Chem Lab Med**. 2010; 48 (10): 1423-26.
17. ENTMAN, S.S; RICHARDSON, L.D.; KILLAM, A.P. Altered Ferrokinetics in Toxemia of Pregnancy: A Possible Indicator of Decreased Red Cell Survival. **Clin Exp Hypertens B**. 1983; 2(1):171-8.
18. SIDDIQUI, I.A.; JALLEL,A.; KADRI,H.M.;SAEED, W.A.;TAMIMI,W. Iron status parameters in pre-eclamptic women. **Arch Gynecol Obstet**. 2010; oct

19. TAHERIPANAH, R.; FARKUSH, P.B. Relation between serum ferritin and iron parameters with preeclampsia. **Journal of Family and Reproductive Health**. 2007; 1 (2):87-91.

20. RAYMAN, M.; BARLIS,J.; EVANS,R.W.; REDMAN, C.W.; KING, L.J.; Abnormal iron parameters in the pregnancy syndrome preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2002; 187 (2): 412-18.

21. ZHOU, Y., GENBACEV, O., DAMSKY, C.*et al.* Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in preeclampsia. **J. Reprod. Immunol**. 1998; 39: 197–213.

22. LAO, T; TAM, K.F.; CHAN, L.Y. Third trimester iron status and pregnancy outcome in non-anaemic women; pregnancy unfavourably affected by maternal iron excess. **Human Reprod**. 2000; 15(8): 1843- 48.

23. SCHOLL, T; REILLY,T. Anaemia, Iron and Pregnancy Outcome. **Journal of Nutrition**. 2000; 130 (2): 443 – 48.

24. SCANLON, K.S.; YIP, R.; SCHIEVE, L.A.; COGSWELL, M.E. High and low hemoglobin levels during pregnancy: differential risks for preterm birth and small for gestational age. **Obstet Gynecol** 2000;96:741– 48.

25. ZARFAR,T; IQBAL,Z. Iron status in preeclampsia. **Professional Med J**.2008;15(1): 74-80

26. CANÇADO, D.R. Sobrecarga de ferro e quelação na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 2007; 29 (3): 316-326.

27. SANTOS, P.C.J.L; CANÇADO, D.R.; TERADA, C.T.; GUERRA-SHINOHARA,E.M. Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 2009; 31(3): 192 – 202.

28. HUBEL, C.A. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Pre-eclampsia. **Exp. Biol. Med**. 1999; 222 (3): 222 -25.

29. RODRIGUES, L. P.; JORGE, S.R.P.F. Deficiência de ferro na gestação, parto e puerpério. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2010; 32(2): 53-56.
30. YIP, Ray. Significance of as abnormally low or high hemoglobin concentration during pregnancy: special consideration or iron nutrition. **Am J Clin Nutr** 2000; 72 (1): 272- 79.
31. LURIE, S.; MAMET, Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** . 2000; 93(2): 185–192
32. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control: a guide for programme managers. Geneva: WHO, 2000/2001
33. ADAM, B.; MALATYALIOGLU, E.; ALVUR, M; TALU, C. Magnesium, Zinc and Iron levels in pré-eclâmpsia. **J Matern Fetal Med**. 2001; 10 (4): 246-50.
34. BASHER, K; DEB, K. Alteration in iron status in pre-eclâmpsia. **Mymensingh Med J**. 2006; 15 (1): 22-24.
35. PERACOLI, J. C. *et al.* . Síndrome HELLP recorrente: relato de dois casos. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**. 1998; 20 (3): 165-67.
36. BENEDETTO, C. et al., Biochemistry of HELLP syndrome. **Adv Clin Chem**. 2011;53:85-104
37. TEIXEIRA, S.A.M. Importância do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. **Femina**. 2006; 34(8):565-70
38. VITOLO, M. R. Fatores de Risco. In: _____. **Nutrição: da gestação à adolescência**. Rio de Janeiro: Reichamann & Affonso Editores, 2003. p. 13- 15.
39. CASANUEVA, E; VITERI, F. Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. **J. Nutr**. 2003 133: 170- 08.
40. RAMAN, L.; PAWASHE, A.B.; YASODHARA, P. Hyperferritinemia in pregnancy induced hypertension and eclampsia. **J Postgrad Med**. 1992; 38(2): 65-67.

41. LÓPEZ-JARAMILLO, P.; CASAS, J.P.; SERRANO, N. Pré-eclâmpsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms. **Braz J Med Biol Res.** 2001; 34:127-35.
42. GROTO, H.Z.W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 2010; 32 (7): 8-17
43. LORENZI, T.F. Manual de Hematologia: propedêutica e clinica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
44. RACHMILEWITZ, E.A.; WEIZER-STERN, O.; ADAMSKY, K.; *et al.* Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? **Ann Y Acad Sci.** 2005; 1054: 118-23.
45. GANZ, T.; NEMETH,E. Hpcidin and iron homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.** 2012; 1813 (9): 1434-43.
46. SUHAIL, M.; SUHAIL, F.; KHAN, H. Role of vitamins C and E in regulating antioxidant and pro-oxidant markers in preeclampsia. **J Clin Biochem Nutr.** 2008; 43 (3): 210-20.
47. POSTON, L.; BRILEY, A.L.; SEED,P.T.;KELLY, F.J.;SHENNAM, A.H. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. **Lancet.** 2006;367(9517):1145-54.
48. ROBERTS, J.M. *et al.* Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension. **N Engl J Med.** 2010;362(14):1282-91.
49. TARA,F. *et al.* Selenium Supplementation and the Incidence of Pre-eclampsia in Pregnant Iranian Women: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Trial. 2010; **Taiwan J Obstet Gynecol.** 2010; 49(2):181-87.
50. ROBINSON, C.J.; WAGNER, C.L.; HOLLIS,B.W.; BAATZ, J.E.; JOHNSON, D.D. Maternal vitamin D and fetal growth in early-onset severe preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol.** 2011; 204 (6): 556.e 1-4

51. RUMIRIS, D.; PURWOSUNU, Y.; WIBOWO, N.; FARINA, A.; SEKIZAWA, A. Lower rate of preeclampsia after antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status. **Hypertens Pregnancy**. 2006; 25 (3): 241-53.

52. DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 2003; 39 (4): 343-50.

53. SANKARALINGAN, S.; XU, Y.; SAWAMURA, T.; DAVIDGE, S.T. Increased lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in the maternal vasculature of women with preeclampsia: role for peroxynitrite. **Hypertension**. 2009; 53(2):270-7.

54. KOLUSARI A *et al.* Catalase activity, serum trace element and heavy metal concentrations, and vitamin A, D and E levels in pre-eclâmpsia. **J Int Med Res**. 2008; 36 (6): 1335-41.

55. SERDAR, Z.; GUR, E.; DEVELIOGLU, O. Serum iron and copper status and oxidative stress in severe and mild pre-eclâmpsia. **Cell Biochem Funct**. 2005; 24 (3):209-15.

56. RUMBOLD, A.R.; DULEY, L.; CROWTHER, C.A.; HASLAM,R.R. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. **Cochrane Database Syst Rev**. 2005; 19 (4).

57. ZIAEI,S.; NORROZI, M.; FAGHIHZADEH, S.; JAFARBEGLOO, E. A randomised placebo-controlled trial to determine the effect of iron supplementation on pregnancy outcome in pregnant women with haemoglobin > or = 13.2 g/dl. **BJOG**. 2007; 114 (6): 684-8.

58. ZIAEI,S.; JANGHORBAN, R.; FAGHIHZADEH, S.; SHARIATDOUST, S. The effects of iron supplementation on serum copper and zinc levels in pregnant women with high-normal hemoglobin. **Int J Gynecol Obstet**. 2008; 100 (2): 133-35.

59. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual operacional do Programa Nacional de Suplementação de Ferro. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. Disponível em: http://nutricao.saude.gov.br/documentos/manual_ferro.pdf.

60. FUJIMORI, E *et al.* Anemia em gestantes brasileiras antes e após a fortificação das farinhas com ferro. **Rev. Saúde Pública.** 2011; disponível em:
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003489102011005000078&lng=en&nr](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003489102011005000078&lng=en&nr=m=iso)
m=iso
61. MACHADO, E.H., SZARFARC, S.C.,CYRILLO,D.C., FUJIMORI, E., COLLI,C. Reflexão sobre as estratégias de controle da anemia em gestantes no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional.** 2010; 17 (1): 104-12.
62. ESPOSITO, B. P. Redox-active labile iron in fortified flours from the Brazilian market. **Rev. Nutr.** 2007, 20 (4): 379-85
63. ZIMMERMANN, M.B., *et al.* The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 92 (6): 1406-15.
64. FOOD AND NUTRITION BOARD, INSTITUTE OF MEDICINE. Iron. In: _____. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc.** Washington D.C: National Academy Press, 2001, Cap. 9, p. 290-393.

Capítulo II: Artigo Original

“Status em ferro e sua relação com estresse oxidativo na pré-eclâmpsia”

Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é uma forma de hipertensão arterial inerente à gestação. Segundo o *National High Blood Pressure Education Program* (NHBPEP)¹ a patologia se caracteriza clinicamente pelo aumento da pressão arterial em níveis iguais ou superiores a 140/90 mm Hg, após vinte semanas de gestação; é associada à proteinúria (≥ 300 mg/24 horas), edema nas mãos, face e parede abdominal, redução do fluxo sanguíneo, vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica.

Apesar da baixa ocorrência – 5 a 8% das gestações – em países em desenvolvimento é a maior causa de mortalidade materna. Trata-se de uma patologia caracterizada por complicações clínicas com desfechos muito desfavoráveis para gestante e criança; seus impactos podem resultar em baixo peso ao nascer, em parto prematuro e, em casos mais extremos, em morte^{2,3}.

Estudos conduzidos desde a década de 1980 demonstraram que as gestantes que desenvolveram PE apresentavam parâmetros referentes ao status em ferro maior em comparação com gestantes saudáveis e que isto poderia exarcebar o já presente estresse oxidativo^{4,5,6}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o *status* em ferro na pré-eclâmpsia e identificar as condições um adequado estado nutricional seja atingido durante o ciclo gravídico. Esse conhecimento é importante para a promoção de condutas clínicas no âmbito da nutrição que possam prevenir ou postergar o surgimento da complicação hipertensiva.

Objetivos

Geral

Avaliar o *status* em ferro na pré-eclâmpsia.

Específicos

Avaliar nas gestantes

- a ingestão alimentar de ferro;
- o *status* em ferro - hemograma; ferritina sérica; ferro sérico; capacidade total de ligação do ferro (CTLF) e índice de saturação de transferrina.
- as concentrações séricas de hepcidina;
- a atividade da catalase;
- a concentração de ferro livre.

Material e Métodos

Casuística

O estudo foi caso-controle, e dele participaram gestantes voluntárias, que realizavam o acompanhamento clínico no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Hospital e Maternidade Ipiranga (HI). Elas foram divididas nos seguintes grupos:

Grupo controle: formado por gestantes saudáveis com mais de 20 semanas de gestação;

Grupo pré-eclâmpsia: formado por gestantes que foram diagnosticadas, pelo serviço médico, com PE a partir da 20ª. semana gestacional, considerando pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $> 0,3\text{g}/24\text{h}$.

Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi feito pelo Instituto de Matemática e Estatística da USP. Considerando um nível de significância de 5%, a amostra mínima estimada foi de 17 gestantes em cada grupo (total de 34 gestantes). Essa amostra permitiu resultados estatisticamente significativos com o mesmo nível de significância de 5% e poder de 95%, para diferenças mínimas detectadas na concentração de ferro, no estresse oxidativo entre os grupos na ordem de um desvio padrão.

Fatores de Inclusão

O **grupo controle** foi constituído por gestantes saudáveis a partir 20^a. semana de gestacional que faziam o acompanhamento clínico no HC ou no HI. No **grupo pré-eclâmpsia** foram incluídas as gestantes diagnosticadas pela assistência médica dos hospitais HC e HI com PE (níveis pressóricos $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $> 0,3\text{g}/24\text{h}$), a partir da 20^a. semana de gestação.

Fatores de Exclusão

Em ambos os grupos foram excluídas gestantes que apresentavam: hipertensão crônica, hipertensão gestacional, diabetes, gestação múltipla, doença renal ou cardiovascular e que declararam serem tabagistas.

Protocolo do Estudo

Às gestantes que aceitaram participar da pesquisa e após a assinatura do TCLE eram submetidas à coleta de sangue em jejum de 8 (oito) horas para determinar o Fe nos

fluidos biológicos e marcadores de estresse oxidativo. Foi realizada avaliação antropométrica e dietética, para se obter informações quanto ao consumo do Fe e de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas).

Avaliação Antropométrica (Frisancho⁷)

Para a determinação do peso corporal pré-gestacional foi considerado o peso referido pela gestante. Já o peso corporal atual foi aferido em quilogramas (kg), no momento da coleta de sangue, utilizando-se uma balança com sensibilidade de 100g. Para determinação da estatura corporal foi utilizado o estadiômetro com precisão de 0,01 centímetros (cm). As gestantes foram colocadas em posição ereta, descalças, sem acessórios nos cabelos, com roupas leves, os pés unidos e sem flectir ou estender a cabeça.

Esses dados foram utilizados para a obtenção do Índice de massa corpórea (IMC) ($\text{peso}/\text{altura}^2$) pré-gestacional e IMC gestacional, e sua avaliação seguiu a padronização de Atalah *et al*⁸.

Consumo Alimentar do Ferro

Para a avaliação do consumo alimentar foi aplicado um Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar (QQFA), desenvolvido para esse grupo⁹.

Os dados obtidos foram analisados pelo sistema *on-line* Nutri Quanti (Galante e Colli, 2007). A avaliação da ingestão de macronutrientes e ferro foi realizada de acordo com a metodologia descrita na Referências de Ingestão Dietética (*dietary reference intakes* - DRI) 2000¹⁰.

A necessidade energética total (NET) foi estimada partir da equação (IOM 2005)¹¹:

$$NEE = 354 - (6.91 \times \text{Idade}) + NAF \times [(9.36 \times \text{Peso}) + (726 \times \text{Estatura})]$$

Onde: NEE = Necessidade estimada de energia

NAF = nível de atividade física.

O NAF considerado para a população foi 1,0 visto que nenhuma gestante referiu fazer atividade física.

Para a determinação da Necessidade Energética Total (NET) de gestantes é preciso somar ao NEE o incremento de energia conforme o trimestre gestacional (8kcal/ semana) e o armazenamento de energia decorrente da própria gestação.

Deste modo, para definir a Necessidade Energética Total foram utilizadas as seguintes equações, determinadas pela IOM (2005)¹¹.

$$NET = EER + 160 \text{ kcal} + 180 \text{ kcal (2º. Trimestre)}$$

$$NET = EER + 272 \text{ kcal} + 180 \text{ kcal (3º. Trimestre)}$$

Lavagem do Material

Todo o material utilizado para a realização da pesquisa foi desmineralizado (HNO₃ a 30% por 24 horas, enxaguados com água deionizada) e secado em estufa a 37°C.

Coleta de Sangue

A coleta de sangue foi feita (realizada) pela manhã, na Clínica de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo ou no Hospital Ipiranga, com as

participantes em jejum de oito horas. Seis mililitros (mL) foram transferidos para tubos desmineralizados sem anticoagulante para a obtenção do soro necessário para as análises de CTLF e de ferro sérico. Cinco mililitros (mL) transferidos para tubo com anticoagulante EDTA, para a determinação da concentração de ferritina e análise de atividade da enzima catalase. O sangue foi separado por centrifugação (SORVALL), para obtenção do soro, e transferido para tubos de polipropileno (eppendorf) desmineralizados. Todo o material biológico foi armazenado a -80°C para posteriores análises.

Figura 2: Fluxograma de atividades realizadas no HC/USP e HI.

Análises

- Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos

A determinação de ferritina e hemogramas das gestantes saudáveis e com PE foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. As análises de concentração de ferro sérico e da capacidade total de ligação do ferro (CTLF) foram realizadas por reação colorimétrica, utilizando reagentes da marca Labtest Diagnóstica®. Através dos valores de ferro sérico e CTLF foi calculado o índice de saturação de transferrina (IST), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$IST = \frac{\text{ferro s\acute{e}rico}}{CTLF} \times 100$$

- Marcador de estresse Oxidativo

A atividade da enzima catalase foi determinada em eritrócitos lisados com água mili-Q na proporção 1:2000. Para o ensaio, foi preparado meio reacional com tampão TRIS HCL 1M pH 8,0 e peróxido de hidrogênio 30mM. Imediatamente após acréscimo de 20 µL do hemolisado, a atividade da enzima foi analisada por 6 min, em espectrofotômetro a 230 nm e 37°C.

Os resultados foram expressos em U/g Hb. A concentração de hemoglobina (Hb) foi medida pelo método de cianometaglobina com *kit* da Labtest Diagnóstica®.

- Determinação da concentração sérica de hepcidina

A concentração de hepcidina foi determinada no soro, pelo do método ELISA, desenvolvido por Kulaksiz, Janetzko e Geacintov, e comercializado pelo laboratório DRG.

Valores de referência para população adulta saudável são 13 à 54ng/ mL.

- Determinação de Ferro Livre

O ensaio LPI foi realizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo¹². Análises quadruplicadas de 20 uL de soro foram transferidos para microplacas transparentes de 96 poços de fundo chato da marca TTP. Em dois dos poços, foram adicionados uma solução denominada “m” composta por 180 ul de N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanossulfônico-salino tamponado (HBS), 40 µM de ascorbato e 50 µM DHR (dihydrorhodamine 123; Biotium, Hayward, CA, EUA). Para os outros dois outros poços foram adicionados esta mesma solução (“m”) e ainda 50 µM de um quelante de

ferro (L1 deferiprona; Apotex, Toronto, Canadá). Imediatamente após a adição do reagente as placas foram acondicionadas em equipamento OPTIMA Fluostar Multifuncional Microplate Reader (BMG Labtech Instruments, Offenburg, Alemanha), com um 485/515 nm par excitação / emissão de filtro, durante 40 min, com leituras cada min 2. As curvas de mudança de intensidade da fluorescência do DHR foram calculados a partir de medições entre os minutos 15 a 40 min. A média da concentração LPI foi determinada a partir da equação 1, onde MSTD é o declive da curva padrão:

$$LPI (\mu M) = \frac{(\overline{m} - \overline{m}_{+chel})}{m_{std}}$$

A diferença na taxa de oxidação de DHR, na presença ou na ausência do agente quelante de ferro representa o ferro não- ligado à transferrina e corresponde aos valores LPI.

Analise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo Departamento de Estatística do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo. Previamente à análise do IME, foram realizadas análises descritivas das variáveis de interesse, tais como cálculo de frequências, medidas de posição, de dispersão (desvio padrão), e, conforme pertinência, aplicação de testes não paramétricos (Teste de Mann Whitney), para identificar diferenças significativas entre o grupo controle e grupo pré-eclâmpsia. Correlação de Sperman foi realizada procurando associação entre os diversos parâmetros. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (IC 95%).

Limitações do estudo

Destaca-se que a limitação desse estudo foi o uso de suplementação de ferro foi maior nas gestantes com PE do que nas CT, uma estratégia clínica do hospital aplicada a todas as gestantes internadas. Na tentativa de corrigir esse viés, a coleta de sangue nas mulheres com PE foi realizada no dia seguinte a sua internação, para que a suplementação afetasse minimamente as análises bioquímicas.

Resultados

A tabela 1 apresenta as características dos grupos estudados. Observou-se, também, que as gestantes do grupo PE tinham menor escolaridade e menor renda que as do grupo CT. Em ambos os grupos a prevalência de consumo de bebida alcoólica foi baixa. Como preconizado pelo Ministério da Saúde, a grande maioria fazia uso de suplemento de ácido fólico e o sulfato ferroso. Cabe destacar que as gestantes com PE ingeriam diariamente, 80 mg de ferro, na forma de sulfato ferroso e as gestantes controle ingeriam 60 mg.

Tabela 1 - Dados descritivos do grupo controle (CT), grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão) ou frequência (%)

Variáveis	Grupo CT (n=18)	Grupo PE (n=18)	<i>P</i> [*]
Idade (anos)	28 (5,4)	25 (9,4)	0,62
Semanas gestacionais	31 (3,9)	31 (4,8)	
Pressão arterial sistólica (mmHg)	104 (7,2)	157 (11,3)	0,00
Pressão arterial diastólica (mmHg)	67 (6,8)	101 (11,4)	0,00
Proteinúria (g/24h)	0,13 (0,1)	1,27 (1,2)	0,00
História familiar de PE (%)	11,1	33,3	-
Paridade	1,0 (0,93)	0,89 (1,3)	0,53
Suplemento vitamínico-mineral (%)			
não ingeriu	5,5	0,0	-
Ácido fólico	22,2	5,5	-
sulfato ferroso	0,0	5,5	-
Ácido fólico + sulfato ferroso	73	89	-

- Dados antropométricos

Como esperado, houve forte correlação entre o IMC pré-gestacional e o peso gestacional, tanto para gestante saudáveis ($r = 0,928$; $p = 0,00$) como no grupo PE ($r = 0,945$; $p = 0,00$). Em relação ao estado nutricional gestacional aproximadamente 67% das mulheres com PE apresentaram sobrepeso ou obesidade (Figura 3).

Tabela 2: Avaliação antropométrica do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).

Variáveis	Grupo CT (n=18)	Grupo PE (n=18)	<i>p</i> *
Peso pré-gestacional (kg)	63,2 (11,3)	65,8 (10,5)	0,38
Peso gestacional atual (kg)	71,9 (11,3)	78,6 (14,9)	0,1
Ganho de peso (kg)	8,8 (5,1)	13,3 (5,8)	0,26
Altura (m)	1,61 (0,6)	1,63 (1,0)	0,71
IMC pré-gestacional (kg/m ²)	24,4 (4,8)	24,9 (5,0)	0,66
IMC gestacional (kg/m ²)	27,7 (4,3)	29,7 (7)	0,51

* valor de p calculado pelo teste Mann Whitney

Figura 3: Classificação do estado nutricional, segundo Atalah *et al* (1997), do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE)

- Ingestão alimentar

A tabela 3 mostra os resultados obtidos com a aplicação do Questionário de Frequência Alimentar. O consumo de proteína foi elevado para ambos os grupos. Observa-se que o valor energético total ingerido foi superior ao recomendado no grupo PE, possivelmente justificando a maior incidência de sobrepeso + obesidade.

A ingestão de ferro proveniente da alimentação foi maior no grupo PE do que no grupo CT.

Tabela 3: Necessidade energética estimada e consumo de energia e nutrientes das gestantes do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).

Nutrientes [¥]	Grupo CT (n=16)	Grupo PE (n=15)	RDA
Necessidade energética (kcal/d)	2439 (139)	2522 (152)	
Energia consumida (kcal/d)	2417 (718)	2681 (743)	
Carboidrato (%VCT)	54 (15)	55 (19)	45-65
Proteína (%VCT)	18 (8)	18 (6)	10- 35
Lipídeo (% VCT)	36 (10)	36 (14)	20- 35
Ferro dietético(mg/d)	14,9 (2)	16,9 (8)	27
Ferro total (mg/d) [‡]	74,9 (9,4)	96,1 (8,2)	27

[¥] A ingestão alimentar de macronutrientes e ferro foram ajustados por energia, pelo método do resíduo, segundo Willet et al.

[‡] ingestão de ferro da dieta + ingestão de suplemento de sulfato ferroso

A ingestão de ferro proveniente de alimentos ficou bem abaixo da EAR para a maioria das gestantes. **(Figura 4)**

Figura 4: Ingestão alimentar de ferro em relação à Necessidade Média Estimada (EAR) e Recomendação (RDA) para gestantes do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE)

- Dados bioquímicos

A tabela 4 apresenta a média os parâmetros hematológicos de gestantes saudáveis e com PE.

Tabela 4: Parâmetros hematológicos do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).

Variáveis	Grupo CT (n= 18)	Grupo PE (n = 18)	p*
Hemoglobina (g/dL)	12 (0,62)	12,5 (0,91)	0,055
Hematócrito (%)	35,7 (1,79)	37,5 (3,12)	0,04
VCM (fL)	90,4 (5,48)	89,8 (4,65)	0,72
HCM (pG)	30,5 (6,15)	30,1 (2,92)	0,56
CHCM (g/dL)	33,7(1,11)	33,5 (0,88)	0,50
RDW –CV (%)	12,1(1,01)	12,6 (1,59)	0,21

* valor de p calculado pelo teste Mann Whitney

Figura 5: Bloxplot dos parâmetros do status em ferro do grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). *valor de p calculado pelo teste Mann Whitney

Tabela 5: Parâmetros de estresse oxidativo, concentração de hepcidina e razão ferritina/hepcidina no grupo controle (CT) e grupo pré-eclâmpsia (PE). Média (desvio padrão).

Variáveis	Grupo CT (n= 18)	Grupo PE (n = 18)	P
Ferro livre ($\mu\text{mol/L}$)	0,09 (0,13)	0,15 (0,14)	0,35
CAT ($\times 10^4$ U/gHb)	15 (2,95)	19,7 (5,37)	0,01
Hepcidina (ng/mL)	55,1 (16,02)	47,6 (9,85)	0,09
Razão ferritina/hepcidina	4,35 (2,93)	0,77 (0,5)	0,00

*valor de p calculado pelo teste Mann Whitney

Correlações:

Foram encontradas associações positivas entre a concentração de ferritina e os valores de pressão arterial sistólica e diastólica, proteinúria e atividade enzimática da catalase. Não houve correlação entre a ingestão alimentar de ferro e os parâmetros de status em ferro.

Tabela 6: Parâmetros de Fe e pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD). Coeficiente de correlação (*r*) e nível de significância (*p*) em gestantes com pré-eclâmpsia

Variáveis	PAS	PAD	Ferritina
	<i>r (p)</i>	<i>R (p)</i>	<i>r (p)</i>
Ferritina	0,763 (0,00)	0,660 (0,00)	-
Ferro sérico	0,427 (0,00)	0,358 (0,03)	0,371 (0,03)
Proteinúria	0,795 (0,00)	0,801, (0,00)	0,686 (0,00)
Atividade da catalase	-	-	0,427 (0,01)

Discussão:

A Pré-Eclâmpsia é uma síndrome multissistêmica de causas desconhecidas específica da gestação que expõe a mãe e o filho à sérios riscos à saúde¹³.

Apesar da obesidade pré-gestacional ser um fator de risco para o desenvolvimento da patologia neste estudo não houve diferença significativa entre os grupos para este parâmetro. O IMC gestacional, como esperado, apresentou forte correlação com o IMC pré-gestacional e foi significativamente maior no grupo PE; situação esperada visto que é amplamente conhecida a correlação entre alto IMC gestacional e desenvolvimento de PE¹⁴.

Os resultados desse estudo são similares à outro realizado no Rio de Janeiro/BR com 1.287 gestantes atendidas na rede pública, no qual 26% das gestantes apresentavam sobrepeso ou obesidade pré-gestacional e 11% baixo peso¹⁵.

O consumo energético das gestantes com PE foi maior do que as necessidades, entretanto este dado, isoladamente, não justifica o maior IMC gestacional e ganho de peso neste grupo uma vez que, é característica da doença a presença de edemas.

Este aporte calórico acima do ideal pode trazer consequências para a saúde da mãe e feto visto que esta relacionada às maiores chances de ganho de peso excessivo e este, além de associado com PE também é associado ao desenvolvimento diabetes gestacional¹⁵.

A ingestão alimentar de ferro foi muito similar entre os grupos e ambas bem abaixo do recomendado. Todavia, quando considerado a ingestão de ferro na forma de sulfato ferroso – 60mg para as saudáveis e 80mg para a PE- há uma grande diferença

entre os grupos e ambos acima da UL, valor tido como máximo da ingestão de um nutriente sem que traga malefícios à saúde ¹⁰.

No atual estudo as gestantes do grupo PE apresentaram concentrações séricas de ferro (PE = 167,4µg/dL; CT = 118,54µg/dL); ferritina (PE = 98,2 ng/mL; CT = 19,4 ng/mL); hematócrito e IST (PE = 37,5%; CT = 24,8%), superiores às gestantes CT; também foi observada uma tendência de valores superiores de hemoglobina.

Ainda que, isoladamente, parâmetros do status em ferro não possam ser utilizados como preditores para o risco do desenvolvimento da PE, coloca-se em foco a relação entre o aumento da concentração de ferritina com surgimento da PE e desfecho gestacional desfavorável – parto prematuro e baixo peso ao nascer ^{16, 17, 18, 19, 20, 21}.

Alguns autores também relacionaram baixo peso ao nascer com maiores concentrações de ferro sérico ²².

Analisando individualmente as gestantes do grupo PE foi possível constatar esta relação entre os maiores valores de ferritina e hemoglobina com o parto prematuro e óbito fetal, desfecho que ocorreu com quatro dos dezoito conceptos; entretanto tal relação não ocorreu com ferro sérico.

A hiperferritinemia é característica de estados de inflamação; entretanto no caso da PE poderia ser explicada não apenas por tal estado inflamatório como também pelo aumento de sua síntese ou ainda como decorrência da ferritina proveniente de danos celulares já que na progressão da doença é comum o comprometimento hepático ²³.

Tanto o aumento da síntese de ferritina como a saturação de transferrina podem ser vistos como um mecanismo de defesa do organismo em um esforço de neutralizar o ferro livre (potencialmente tóxico) e, portanto diminuir a geração de radicais livres.

Outro possível mecanismo que pode explicar alterações na homeostase do ferro culminando com as altas concentrações seria a presença da hipóxia e o aumento da eritropoese na tentativa do organismo em melhorar a oferta de oxigênio; o aumento das concentrações de hemoglobina e hematócrito associados à presença da vasoconstrição-característica da doença- conferem maior viscosidade ao sangue e a oferta de oxigênio para os tecidos e para o feto fica prejudicada; ou seja, apesar de haver ferro sua função quanto à oferta de oxigênio aos tecidos não ocorre de maneira efetiva^{24, 25}. Sabe-se que na gestante com PE a expressão de EPO é maior³⁸.

Neste estudo, igualmente houve forte correlação da ferritina e do ferro sérico com os níveis de PAS e PAD e com proteinúria, sintomas clássicos da doença, ou seja, quanto mais altos os valores destes parâmetros mais grave a manifestação da doença.

O impacto da ferritina sobre níveis tensionais já foi anteriormente relatado¹⁶ e é fortemente relacionado com problemas cardiovasculares²⁶

A maior concentração de ferro sérico também esta presente na PE, fato observado no atual estudo e em pesquisas de outros autores^{22, 27}. Não é consenso se isto acontece em consequência da doença ou se precede as manifestações clínicas²⁸; tampouco se é decorrente da hemoconcentração, de danos hepáticos ou ainda, em casos mais graves, devido à hemólise^{16, 28}.

Apesar da evidente hemoconcentração que poderia ser assinalada como causa da do aumento de concentração de ferro sérico, quando se olha para outros minerais como selênio, zinco e cálcio suas concentrações são mais baixas na gestante com PE^{5, 27, 40}.

Apesar das altas concentrações de ferro sérico e ferritina, os valores de hepcidina foram menores no grupo PE. Por um lado, na presença de altas concentrações de ferritina a hepcidina age na ferroportina, internalizando a molécula e impedindo o acesso do ferro para o plasma²⁹; por outro lado, a presença de alguns fatores como a hipóxia, característica da fisiopatologia da PE, pode inibir a ação da hepcidina, aumentando a concentração de ferro e tornando-o mais disponível para a eritropoese. Portanto, é possível que, na PE, a presença de hipóxia, constitua um fator mais determinante e robusto na ação do hormônio do que o próprio *status* em ferro.

Outro possível mecanismo, porém não analisado no presente estudo, seria a ação do fator de crescimento e diferenciação 15 (GDF-15), uma citocina responsiva ao estresse oxidativo e utilizada como marcador de eritropoese ineficaz. Tal citocina encontra-se elevada em quadros de PE e, tem sido creditada a ela a ação de agir sobre a hepcidina, anulando sua ação^{30,31}.

Atualmente coloca-se em foco a utilização da razão hepcidina/ferritina ao invés de apenas utilizar a hepcidina, como forma de avaliar dano hepático em algumas patologias. Neste trabalho houve grande diferença entre esta razão nos grupos CT e PE, sugerindo que as gestantes com PE podem já estar apresentando o referido dano hepático, característica típica da progressão e agravamento da doença.

Ressalta-se ainda, que apesar de não haver diferença estatística para o ferro livre (LPI) entre os grupos, houve correlação entre este parâmetro e ferritina ($r = 0,371$; $p = 0,026$), e entre ferritina e a atividade da enzima catalase. É sabido que o ferro age como catalisador em reações para formação de radicais livres. Na tentativa de impedir sua ação oxidante, o organismo lança mão de mecanismos de proteção contra o excesso de ferro,

aumentando a concentração de ferritina e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes^{32,33}. Alguns estudos verificaram o aumento da atividade da catalase na PE, como uma forma de o organismo tentar neutralizar as EROs^{5, 6, 34}.

Ainda que todas as alterações no status em ferro não sejam responsáveis pelo aparecimento da PE parece evidente que o excesso de ferro tem efeitos adversos e, possivelmente, agrave a patologia^{18, 19, 35,36,37}.

Deste modo, a análise precoce destes parâmetros de ferro em gestantes com fatores de riscos para a doença associado à promoção de condutas clínicas poderia ser utilizada como um instrumento de atenção básica à saúde desta gestante em uma tentativa de prevenir ou postergar o surgimento desta complicação hipertensiva.

Visto que o excesso do ferro parece aumentar a chance de acontecer importantes impactos negativos tanto na saúde da gestante como na do feto, chama-se igualmente a atenção quanto à prática rotineira de suplementar o mineral em gestantes não anêmicas.

Destaque-se que a limitação do presente estudo foi a ingestão de sulfato ferroso ter sido maior nas gestantes com PE do que nas gestantes do grupo CT. Esse procedimento era uma estratégia clínica do hospital aplicada a todas as gestantes internadas. Na tentativa de corrigir esse viés, a coleta de sangue nas mulheres com PE foi realizada no dia seguinte à sua internação, para que a suplementação afetasse minimamente as análises bioquímicas.

Conclusões

- Embora se observasse inadequação de ingestão de ferro nos dois grupos estudados, quando se somou à ingestão dietética de ferro, o total de Fe proveniente do suplemento de FeSO₄, a ingestão diária foi maior do que ao ***Limite Superior Tolerável de Ingestão*** (UL), mais ainda no grupo pré-eclâmpsia ;
- Pode-se dizer que as gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram um início de quadro de sobrecarga de Fe, uma vez que a atividade da catalase, as concentrações de ferritina sérica e ferro sérico e IST estavam e a razão hepcidina/ferritina diminuída
- É importante reconsiderar os níveis de suplementação de ferro recomendados para as gestantes

Referências Bibliográficas

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(1):S1-22.
2. FERRÃO, M; PEREIRA, A.C.L.; GERSGORIN, H.C.T.S.; PAULA, T.A.A.; CORRÊA, R.R.M.; CASTRO, E.C. C. Efetividade do tratamento de gestantes hipertensas. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 2006; 52 (6): 390-94.
3. GILBERT, J.S.; RYAN, M.J.; LA MARCA, B.B.; SEDDEK, M.; MURPHY, S.R.; GRANGER, J.P. Pathophysiology of hypertension during pré-eclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2008; 294:541–50.
4. ENTMAN, S.S; RICHARDSON, L.D.; KILLAM, A.P. Altered Ferrokinetics in Toxemia of Pregnancy: A Possible Indicator of Decreased Red Cell Survival. **Clin Exp Hypertens B**. 1983; 2(1):171-8.
5. KOLUSARI A *et al.* Catalase activity, serum trace element and heavy metal concentrations, and vitamin A, D and E levels in pre-eclâmpsia. **J Int Med Res**. 2008; 36 (6): 1335-41.
6. CASANUEVA, E; VITERI, F. Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. **J. Nutr.** 2003 133: 170- 08.
7. FRISANCHO, A.R. **Antropometric standards for the assesment of growth and nutrition status.** The University of Michingan Press, 1993.
8. ATALAH, E.; CASTILLO, C.; CASTRO, R.; ALDEA, A. Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas. **Rev Med Chile**, v.125, p.1429-36, 1997.
9. OLIVEIRA, T; MARQUITTI, F. D.; CARVALHAES, M. A. B.L.; SARTORELLI, D. S. 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 (12): 2296- 2306.

10. **FOOD AND NUTRITION BOARD, INSTITUTE OF MEDICINE. Iron. In: __. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington D.C: National Academy Press, 2001, Cap. 9, p. 290-393.**

11. **FOOD AND NUTRITION BOARD, INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Washington, DC: National Academy Press: 2005.**

12. ESPÓSITO, B.P.; BREUER, W.; P SIRANKAPRACHA; POOTRAKUL, P.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. **Blood**, Estados Unidos, v. 102, n. 7, p. 2670-2677, 2003.

13. OLIVEIRA, L.G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. **Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 2010; 32 (12): 609-16.

14. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol.** 2010; 202:255.e1-7.

15. MARANO,D.; GAMA,S.G.N.;PEREIRA,A.P.E.; SOUZA JUNIOR, P.R. Adequação do ganho ponderal de gestantes em dois municípios do Estado do Rio de Janeiro (RJ), Brasil, 2008. *Ver. Bras. Ginecol. Obstet.* 2012; 34 (8): 386-93.

16. GUPTA, S.; NANDA,S.; SINGH, U.; BANSAL, S.; LAL, H. Evaluation of the changes in serum iron levels in pre-eclampsia. **Indian J Clin Biochem.** 1997; 12(1):91-4.

17. Xu H, Perez-Cuevas R, Xiong X, et al. An international trial of antioxidants in the prevention of preeclampsia (INTAPP). **Am J Obstet Gynecol.** 2010; 202:239.e1-10.

18. RAYMAN, M.; BARLIS,J.; EVANS,R.W.; REDMAN, C.W.; KING, L.J.; Abnormal iron parameters in the pregnancy syndrome preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.** 2002; 187 (2): 412-18.

19. TAHERIPANAH, R.; FARKUSH, P.B. Relation between serum ferritin and iron parameters with preeclampsia. **Journal of Family and Reproductive Health**. 2007; 1 (2):87-91.
20. ZARFAR,T; IQBAL,Z. Iron status in preeclampsia. **Professional Med J**.2008;15(1): 74-80
21. SIDDIQUI, I.A.; JALLEL,A.; KADRI,H.M.;SAEED, W.A.;TAMIMI,W. Iron status parameters in pre-eclamptic women. **Arch Gynecol Obstet**. 2010; oct.
22. Sizoo, B.; AARLBERG, M.M.; BOUMAN, A.; DEKKER, A.; GUSTAAF, A. he Role of Serum Iron Levels in Diagnosing Hypertensive Disorders in Pregnancy. **Hypertension in Pregnancy**. 1997; 16 (3): 425-33
23. HUBEL, C.A. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Pre-eclampsia. **Exp. Biol. Med**. 1999; 222 (3): 222 -25.
24. YIP, Ray. Significance of as abnormally low or high hemoglobin concentration during pregnancy: special consideration or iron nutrition. **Am J Clin Nutr** 2000; 72 (1): 272- 79.
25. SOLLIMAN, A.A.; CSORBA,R.; YILMAZ,A.; VON TEMPELHOFF, G.F. Rheologic results and their correlation to hemostatic changes in patients with moderate and severe preeclampsia: An observational cross-sectional study. **Clin Hemorheol Microcirc**. 2012; oct.
26. HOLAY, M.P.; CHOUDHRAY,A.A.; SURYAWANSHI Serum ferritin-a novel risk factor in acute myocardial infarction. **Indian Heart J**. 2012 Mar-Apr;64(2):173-7.
27. KIM, J.; KIM, Y.J.; LEE,R.; MOOM, J.H.; JO,I. Serum levels of zinc, calcium, and iron are associated with the risk of preeclampsia in pregnant women. **Nutr Res**. 2012; 32 (10): 764-69.
28. ROBERTS, J.M.; HUBEL, C.A. Oxidative stress in preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**. 2004; 190 (5): 1177-78.
29. DE DOMENICO, I.; WARD,D.M.; KAPLAN,J. Hepcidin regulation: ironing out the details. **J Clin Invest**. 2007; 117(7):1755–1758.

30. LIU, Q.; DAVIDOFF, O.; NISS, K.; HAASE, V.H. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. **J Clin Invest.** 2012; disponível em <<http://www.jci.org/articles/view/63924>>

31. SUGULLE, M.; DECHEND, R.; HERSE, F. Circulating and placental growth-differentiation factor 15 in preeclampsia and in pregnancy complicated by diabetes mellitus. **Hypertension.** 2009; 54 (1): 106-12.

32. SERDAR, Z.; GUR, E.; DEVELIOGLU, O. Serum iron and copper status and oxidative stress in severe and mild pre-eclâmpsia. **Cell Biochem Funct.** 2005; 24 (3):209-15.

33. 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.** v.34, n.6, p.948–951, 2008.

34. SUHAIL, M.; SUHAIL, F.; KHAN, H. Role of vitamins C and E in regulating antioxidant and pro-oxidant markers in preeclampsia. **J Clin Biochem Nutr.** 2008; 43 (3): 210-20.

35. SCHOLL, T; REILLY,T. Anaemia, Iron and Pregnancy Outcome. **Journal of Nutrition.** 2000; 130 (2): 443 – 48.

36. ADAM, B.; MALATYALIOGLU, E.; ALVUR, M; TALU, C. Magnesium, Zinc and Iron levels in pré-eclâmpsia. **J Matern Fetal Med.** 2001; 10 (4): 246-50.

37. BASHER, K; DEB, K. Alteration in iron status in pre-eclâmpsia. **Mymensingh Med J.** 2006; 15 (1): 22-24.

38. LURIE, S.; MAMET, Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol .** 2000; 93(2): 185–192

- 40.KATZ,O. *et al.* Severe pre-eclampsia is associated with abnormal trace elements concentrations in maternal and fetal blood. **J Matern Fetal Neonatal Med.** 2012; 25(7): 1127-30.

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Hospital das Clínicas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você a participar como voluntária de uma pesquisa, cujo título é **“Avaliação do status de ferro em gestantes com pré-eclâmpsia”**. Este estudo está sendo conduzido pela nutricionista e aluna de mestrado em Ciências dos Alimentos: Fernanda Brunacci Della Rosa, sob a orientação da Prof^a. Dra. Célia Colli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e com a colaboração do Dr. Rodrigo Ruano e Marcelo Zugaib do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Para a mulher, a gravidez é um período de muitas mudanças no corpo e uma boa alimentação é importante para garantir a saúde da mãe e da criança. Tanto a falta de ferro quanto o seu excesso podem ser prejudiciais a gestação. O excesso de ferro no nosso organismo tem sido associado à pré-eclâmpsia e com processos que levam a dano na célula. A pré-eclâmpsia é o aumento da pressão arterial durante a gravidez, e quando não tratada pode prejudicar a gestação e o crescimento do bebê. O ferro é um mineral que se encontra especialmente em carnes e leguminosas. Neste estudo, nós iremos investigar a quantidade de ferro vinda da sua alimentação e a quantidade de ferro no seu sangue. Estes dados serão importantes para realizar futuras prevenções.

Caso queira participar, precisaremos fazer uma coleta do seu sangue (15 mL), antes do café da manhã (jejum de 8 h), que será realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e pediremos que você colete toda a urina de um dia inteiro em frasco que será fornecido e o armazene na geladeira; este frasco deverá ser entregue no mesmo hospital, quando terminar de coletar a urina de um dia inteiro. Além disso, você precisará responder a algumas perguntas sobre sua alimentação habitual e anotar tudo o que comer durante três dias de uma semana.

Os desconfortos e riscos da pesquisa são mínimos. Você poderá sentir tonturas por estar em jejum para fazer o exame e/ou poderá ficar, por um tempo, com uma mancha um pouco arroxada no local da coleta de sangue. O exame será feito, por uma pessoa experiente usando material descartável e depois da coleta você receberá um lanche.

Sempre que tiver alguma dúvida sobre o estudo, é só se comunicar por telefone, e-mail ou nos endereços que estão atrás desta folha. Você não terá nenhum gasto ou pagamento para participar e poderá desistir do estudo a qualquer momento, sem nenhum problema e seu acompanhamento médico estará garantido durante toda a gestação. Os resultados desta pesquisa serão divulgados apenas em revistas e congressos científicos, e o seu nome e identidade serão mantidos em segredo.

Declaro que, após ter entendido tudo o que está escrito neste documento e o que o

pesquisador me explicou, aceito participar como voluntário desta pesquisa, e por isso preencho os dados solicitados.

Nome:.....

Documento de Identidade Nº :.....Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....

Nº:.....Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....

.....

Telefone:..... Celular:

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Caso você tenha dúvidas, segue os dados do grupo para que entre em contato.

Aluna de mestrado: Fernanda Brunacci Della Rosa e a Professora:Dra. Célia Colli

Localização: Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Bloco 14, no Campus da Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 580, Butantã, São Paulo-SP, Cep: 05508-900

Telefones: (11) 3091-3651/ (11) 8142-2514 (Fernanda Brunacci)

Médico Rodrigo Ruano

Localização: Divisão de Obstetrícia, Faculdade de Medicina/USP

Av. Éneas de Carvalho Aguiar, 255, 10º andar, São Paulo/SP, CEP: 05403-000

Telefone: (11) 3069-6209

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Localização: Avenida Lineu Prestes, 580, Bloco 13-A, Butantã, São Paulo-SP

Telefone: (11) 3091-3677.

Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Localização: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar.

Telefone: (11) 3069-6442 ramais 16,17,18 ou 20. Fax: (11) 3069-6442 ramal 26.

E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

SUA COLETA DE SANGUE SERÁ REALIZADA NO DIA: ____/____/2011;

A COLETA DE URINA DEVERÁ SER REALIZADA DIA: ____/____/2011, UM DIA ANTES DA DATA PARA COLETA DE SANGUE.

Anexo 2

**Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo**
Serviço do Prof. Marcelo Zugaib
Comissão Interna para Avaliação de Projetos de Pesquisa - CIAPP

quinta-feira, 20 de janeiro de 2011

A Comissão Interna para Análise de Projetos de Pesquisa da Clínica Obstétrica, de acordo com os pareceres em anexo, APROVOU o seguinte projeto de pesquisa:

Projeto número: 270/10

AVALIAÇÃO DO STATUS EM FERRO DE GESTANTES COM PRÉ ECLÂMPSIA

Pesquisador responsável: **Rodrigo Ruano**

Pesquisador executante: **Fernanda Brunacci Della Rosa**

Prof. Marcelo Zugaib
Presidente da Comissão Interna para Análise de
Projetos de Pesquisa da Clínica Obstétrica

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/61/2011

Protocolo CEP/FCF/575

CAAE: 0015.0.018.015-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Avaliação do <i>status</i> em ferro de gestantes com pré eclâmpsia
Pesquisador Responsável:	Fernanda Brunacci Della Rosa
Orientador:	Profa. Dra. Celia Colli
Instituição:	FCF/ USP E FM/USP

II - Sumário Geral do Protocolo:

A pré eclâmpsia (PE) caracteriza-se clinicamente pelo aumento da pressão arterial em níveis iguais ou superiores à 140/90 mmHg, após 20 semanas de gestação, é associada à proteinúria, edema nas mãos, face e parede abdominal, redução do fluxo sanguíneo, vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica, ocorrendo entre 5% a 8% das gestações. Se por um lado, a deficiência de ferro é fator de possíveis complicações gestacionais, por outro lado, sabe-se que o excesso do mineral pode ser prejudicial na pré eclâmpsia. Têm-se observado em gestantes que desenvolvem PE o aumento nos níveis de ferro sérico, hemoglobina, hematócrito e ferritina.

A meta da pesquisa é compreender o papel deste mineral na PE, para garantir o adequado estado nutricional durante o ciclo gravídico e a promoção de condutas clínicas no âmbito da nutrição que possam prevenir ou postergar o surgimento desta complicação hipertensiva.

Protocolo experimental: No Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as participantes serão submetidas à coleta de sangue e à coleta de urina de 24 horas para determinação do Fe nos fluidos biológicos e marcadores de estresse oxidativo. Será realizada avaliação antropométrica e dietética (recordatório alimentar, de 24 horas e registro alimentar de 3 dias), para a obtenção de informações quanto ao consumo do Fe e de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas).

Os objetivos do presente estudo são:

Geral: Avaliar o *status* em ferro de gestantes com pré eclâmpsia.

Específicos: Avaliar nas gestante:

- a ingestão alimentar de ferro;
- o *status* de ferro – níveis de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), amplitude de variação do tamanho dos eritrócitos (RDW), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); ferro sérico; ferritina sérica; capacidade total de ligação do ferro (CTLF) e índice de saturação de transferrina.
- avaliar concentrações séricas de hepcidina;
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo.

Tipo de estudo:

Estudo observacional do tipo transversal, no qual participarão gestantes voluntárias. Elas serão divididas nos seguintes grupos:

Grupo controle: formado por gestantes saudáveis que estejam com mais de 20 semanas de gestação;

Grupo pré eclâmpsia: formado por gestantes que tenham sido diagnosticadas, pelo serviço médico, com pré eclâmpsia a partir da 20ª semana gestacional, considerando pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $> 0,3g/24h$.

Descrição da Casuística:

90 gestantes voluntárias (45 Controle e 45 com PE), que realizarem acompanhamento clínico no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número calculado pelo Inst. de Matemática e Estatística da USP, nível de significância de 5%).

As participantes serão submetidas a:

- 1) Avaliação antropométrica - para cálculo do IMC.
- 2) Coleta de sangue - será realizada pela manhã, na clínica de obstetrícia do Hospital das Clínicas de São Paulo, com as participantes em jejum de 8 horas. Seis mL serão transferidos para tubo desmineralizado sem anti-coagulante para obtenção do soro necessário para as análises de CTLF e ferro sérico. Cinco mL serão transferidos para tubo com anti-coagulante EDTA, para determinação de ferritina e da enzima catalase. O sangue será separado por centrifugação, para obtenção do soro, que será transferido para tubos de polipropileno desmineralizados. Todo o material biológico será armazenados a -80°C para posterior análise. **Total de 11-15 mL.**

- 3) Coleta de urina de 24 horas.

Nas amostras 2 e 3 serão realizadas determinação do Fe nos fluidos biológicos e marcadores de estresse oxidativo.

- 4) Avaliação dietética - recordatório alimentar de 24 horas e registro alimentar de 3 dias), para a obtenção de informações quanto ao consumo do Fe e de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas).

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 25 de abril de 2011.

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 dezembro/2011 e relatório final em julho/2012.

São Paulo, 26 de abril de 2011.

Prof.ª. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP