



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Correlação entre a Vitamina D e o Sucesso Reprodutivo

Vanessa Alexandra Guerreiro Gonçalves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Martinez Oliveira
Coorientador: Prof. Doutor António Hélio Oliani

Covilhã, maio de 2014

Agradecimentos

Ao meu orientador e coorientador pelo apoio disponibilizado para a elaboração desta tese.

À minha mãe por todo o apoio e paciência que me tem dado ao longo de todo o meu percurso, sem ela jamais teria alcançado aquilo que alcancei, jamais seria o que sou hoje.

Ao meu namorado por toda a dedicação que me tem disponibilizado, pelo carinho que me dá e pela força, que me permite continuar.

À minha irmã e cunhado que estão sempre no meu coração, e aos meus sobrinhos lindos, que sem eles nada faria sentido.

A todos os meus amigos que me têm apoiado.

Resumo

Objetivo: Vários estudos evidenciam uma elevada prevalência da deficiência de vitamina D, incluindo mulheres em idade fértil e grávidas. Podem, pois, existir, repercussões no sucesso reprodutivo, não só promovendo infertilidade, como aumentando as complicações na gravidez e condicionando a saúde do novo ser. Perspetivando um estudo prospetivo na Unidade de Medicina da Reprodução (UMR) do Centro Hospitalar Cova da Beira para avaliar a relação da reserva de vitamina D com os resultados da procriação medicamente assistida (PMA), promoveu-se uma revisão sistematizada da literatura sobre a relação entre o status daquela e a capacidade de se alcançar gravidez clínica, espontaneamente ou com auxílio médico.

Métodos: Foi realizada pesquisa bibliográfica nas bases de dados B-on; BioMed Central; Cochrane; Medscape; Embase; Google Scholar; PubMed; Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal e SciELO - Scientific Electronic Library Online utilizando como equações de pesquisa as seguintes combinações: “vitamin D” AND “IVF”; AND “ART”; AND “uterine insemination”; AND “reproduction”; AND “fertility”. Definiram-se como avaliáveis apenas os estudos que analisavam a correlação entre os níveis séricos de vitamina D e/ou presença do recetor da vitamina D e a obtenção de gravidez clínica.

Resultados e discussão: De 6139 artigos identificados, apenas dez eram avaliáveis, oito observacionais e dois interventivos. Apenas um deles foi realizado em animais. Dos oito estudos observacionais analisados, quatro encontraram uma correlação positiva significativa entre os níveis de vitamina D e o sucesso reprodutivo, um deles associou níveis elevados de vitamina D com resultados mais desfavoráveis e outros três não encontraram associação. Nos dois estudos que procederam à suplementação com vitamina D verificou-se existir um impacto positivo no sucesso reprodutivo, embora não tenha sido estatisticamente significativo. De uma maneira geral, nos estudos em que foram avaliados os níveis de vitamina D, maior parte das mulheres apresentava valores inferiores aos normais.

Conclusão: A avaliação dos níveis séricos de vitamina D e a correção da sua deficiência devem ser considerados no contexto da infertilidade humana e da procriação medicamente assistida, pois podem melhorar a sua eficácia. A revisão efetuada não é conclusiva e justifica um projeto específico a realizar na Unidade de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar da Cova da Beira.

Palavras-chave

vitamina D, 25(OH)D, infertilidade, fertilização in vitro, líquido folicular.

Abstract

Objective: Several studies have shown a high prevalence of vitamin D deficiency, including women of childbearing age and during pregnancy. This fact may have an impact on reproductive success, not only because it may increase infertility, as well as complications in pregnancy and in the future health of the new being. Looking ahead to a prospective study in Reproductive Medicine Unit (UMR) of Cova da Beira Hospital Centre to assess the relationship of the vitamin D with the results of medically assisted procreation (MAP), we have promoted a systematic review of the literature on the relationship between vitamin D status and the ability to achieve clinical pregnancy, spontaneously or with medical assistance.

Methods: Bibliographical searches were performed in the databases B-on; BioMedCentral; Cochrane; Medscape; Embase; Google Scholar; PubMed; Scientific Open Access Repository of Portugal and SciELO - Scientific Electronic Library Online equations using as search the following combinations: "vitamin D" AND " IVF" AND "ART"; AND "uterine insemination"; AND "reproduction"; AND "fertility". Were defined as evaluable only the studies that analyzed the correlation between serum vitamin D and/or presence of the vitamin D receptor and obtaining clinical pregnancy.

Results and Discussion: Of 6139 articles identified, only ten were evaluable eight observational and two interventional. Only one of them was carried out in animals. Of the eight observational studies analyzed three found a significant positive correlation between vitamin D levels and reproductive success, one associated high levels of vitamin D with less favorable results and three others found no association. In the two studies carried supplementation with vitamin D was found to be a positive impact on reproductive success, although it was not statistically significant. In general, the studies on the levels of vitamin D, most women have been assessed lower than normal values.

Conclusion: The analysis of vitamin D levels and their respective adjustment, presents itself as a parameter to be considered in the context of human infertility and medically assisted procreation, which may contribute to the improvement of its results. This revision is not conclusive and justifies a specific project to be held in Reproduction Medicine Unit (UMR) of Cova da Beira Hospital Centre.

Keywords

vitamin D, 25(OH)D, infertility, in vitro fertilization, follicular fluid.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice	VI
Lista de Tabelas	VII
Lista de Acrónimos	VIII
1 - Introdução	1
1.1 - Metabolismo da Vitamina D	1
1.2 - Níveis Séricos e Dose Diária Recomendada da Vitamina D	1
1.3 - Prevalência da Carência de Vitamina D	2
1.4 - Ações Fisiológicas da Vitamina D	2
1.5 - Ações da Vitamina D na Gravidez e na Reprodução	3
1.6 - Ações da Vitamina D na Reprodução Medicamente Assistida	6
2 - Objetivos do Presente Trabalho	7
3 - Metodologia	8
4 - Resultados	10
4.1 - Estudos Observacionais	19
4.2 - Estudos Interventivos	22
5 - Discussão	24
6 - Proposta de Investigação	28
7 - Conclusão	31
8 - Bibliografia	32

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultados da pesquisa	10
Tabela 2 - Resultados dos estudos observacionais	14
Tabela 3 - Resultado dos estudos interventivos	18
Tabela 4 - Protocolo proposto para a investigação na Unidade de Medicina da Reprodução (UMR) do CHCB	28

Lista de Acrónimos

25(OH)D	25-hidroxivitamina D
1,25(OH) ₂ D	1,25 dihidroxivitamina D
CYP27B1	1 α -hidroxilase
DDR	dose diária recomendada
VDR	recetor da vitamina D (vitamin D receptor)
CYP19	gene da aromatase P450
Th2	células T auxiliares do tipo 2
FIV	fertilização in vitro
PMA	procriação medicamente assistida
CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE
ART	reprodução medicamente assistida (assisted reproductive technology)
SOP	síndrome de ovários policísticos
FF	líquido folicular (follicular fluid)
IMC	índice de massa corporal
hCG	gonadotrofina coriónica humana (human chorionic gonadotropin)
UMR	Unidade de Medicina de Reprodução

1 - Introdução

A vitamina D não é uma “vitamina”, no verdadeiro sentido da palavra, visto que a sua principal fonte é a síntese cutânea(1), ou seja não tem como origem exclusiva a dieta(2) (menos de 10% provem dessa via(1)). Melhor se define como sendo uma preprohormona esteroide (secosteroide).

1.1 - Metabolismo da Vitamina D

Sob o mesmo termo vitamina D se incluem D_2 ou ergocalciferol e a D_3 ou colecalciferol(1). A maior parte do seu conteúdo (cerca de 95%) no organismo humano corresponde à vitamina D_3 que provém maioritariamente da sua síntese na pele por ação da radiação ultravioleta(3). Esta converte a provitamina D_3 em pré-vitamina D_3 , que sofre isomerização para colecalciferol. Este, por sua vez, é transportado para o fígado, onde é transformado em 25-hidroxivitamina D_3 ($25(OH)D_3$), ou calcidiol(1). Posteriormente é convertida na sua forma ativa (1,25-dihidroxicolecalciferol - $1,25(OH)_2D_3$ - calcitriol, responsável pela maioria das ações biológicas da vitamina D) pela enzima 1α -hidroxilase (CYP27B1), presente sobretudo nos rins, mas também noutros locais, como na placenta e no endotélio(4). De fato, o calcitriol também é sintetizado nas células-alvo ou adjacentes, para atuar de uma forma autócrina ou parácrina, respetivamente(5), tendo sido descobertos recetores de vitamina D (VDR) e 1α -hidroxilase em vários tecidos, incluindo o eixo reprodutivo feminino (6).

1.2 - Níveis Séricos e Dose Diária Recomendada da Vitamina D

É consensual que os níveis séricos de $25(OH)D$ são considerados os mais apropriados para definir o conteúdo em vitamina D(7). Esta é a forma predominante de armazenamento da vitamina D no corpo humano, com níveis cerca de mil vezes superiores aos da $1,25(OH)_2D$, que circula em concentrações muito baixas, referidas a picogramas(8). Tem semivida mais longa e níveis mais estáveis, sendo assim considerado o melhor indicador da quantidade de vitamina D no organismo(1).

Pelo contrário, a definição de níveis plasmáticos de vitamina D considerados adequados bem como a dose diária recomendada (DDR) são alvo ainda de grande debate, essencialmente pela enorme variedade de funções na saúde que lhe estão associadas. Também a variabilidade individual dos seus efeitos funcionais e a grande interligação entre os papéis do cálcio e da vitamina D criam dificuldades na respetiva individualização de efeitos(9). Apesar das divergências, são vários os especialistas que concordam haver deficiência de vitamina D se os valores séricos de $25(OH)D$ forem inferiores a 20ng/ml (50nmol/L), sendo insuficientes entre $21\text{-}29\text{ng/ml}$ e adequados os superiores a 30ng/ml (75nmol/L)(10, 11). Estas recomendações estão baseadas, essencialmente, nos efeitos extraósseos da vitamina, embora estes ainda não tenham sido standardizados(12), diferentemente do que se passa, por exemplo, com a

absorção de cálcio(13). Ora, nos últimos anos, o critério para definir o quantitativo ideal da vitamina D tem deixado de ser a concentração de 25(OH)D necessária para atingir uma boa qualidade óssea para passar a ser aquela que beneficia a saúde no geral(9), com um limiar que sendo superior, pode ser benéfico para várias doenças suscetíveis à vitamina D(12). Apesar disso, existem poucos dados relativamente aos efeitos dos limites superiores de 25(OH)D, particularmente no que diz respeito a níveis cronicamente elevados, como por exemplo >75nmol/l(14), pelo que é prudente incluir uma margem de segurança nas recomendações(7).

1.3 - Prevalência da carência de Vitamina D

Estudando a prevalência da carência da vitamina D na Europa, Johnson et al(20) detetaram em grávidas e jovens, níveis de 25(OH)D inferiores a 20ng/mL (deficiência) ou entre 20 e 32ng/mL (insuficiência) em 97% das afroamericanas, 81% das hispânicas, e 67% das caucasianas. No geral, 82% das mulheres apresentavam níveis inferiores a 32ng/mL(80ng/mL), com maior prevalência nas negras. Efetivamente, o aumento da pigmentação da pele diminui a sua produção de vitamina D(21), podendo ser necessária uma exposição solar cinco vezes superior nos indivíduos de raça negra, para se atingirem valores normais(22).

São vários os fatores que contribuem para esta “epidemia” de carência, como o receio dos efeitos adversos da exposição solar e aumento da prevalência da obesidade

1.4 - Ações Fisiológicas da Vitamina D

O papel da vitamina D no metabolismo do cálcio e na saúde óssea é indiscutível, mas também se lhe atribuem funções em diversos processos celulares vitais, como a sua diferenciação, proliferação e modulação metabólica(13). A importância da 1,25(OH)₂D como modulador pleiotrópico das funções de vários tecidos é fortalecida pela presença de biomarcadores seus em diferentes locais. Por exemplo, o seu recetor (VDR), a partir do qual se concretizam as suas ações biológicas, encontra-se presente em quase todo o tipo de células e tecidos(23).

A 25(OH)D parece ainda desempenhar um importante papel na tolerância à glicose através dos seus efeitos na secreção de insulina e na sensibilidade a esta hormona(24), discutindo-se se é a obesidade que promove baixos níveis de vitamina D ou se, inversamente, são estes que contribuem para aquela(25). Na verdade, existe evidência de que baixos níveis de vitamina D se associam a obesidade(26), possivelmente devido à sequestração no tecido adiposo desta vitamina lipossolúvel(27), mas também de que baixos níveis de ingestão de vitamina D são um preditor independente da mesma(28).

Evidenciou-se também o papel da vitamina D nas doenças autoimunes(29), atuando quer no sistema imune inato quer no adaptativo(1). Contudo, a translação desses achados para a prática clínica, incluindo os estudos interventivos na mulher grávida, não tem ocorrido como

desejado(1). O possível papel da vitamina D no sistema imune intensifica a necessidade da definição do nível adequado de vitamina D durante a gravidez. Além disso admite-se existir um papel no desenvolvimento fetal, período de imensa proliferação e diferenciação celulares(14).

1.5 - Ações da Vitamina D na Gravidez e na Reprodução

Apesar do crescente número de investigações na última década(13) acerca do papel fisiológico da vitamina D em vários estádios da função reprodutiva, tanto feminina, como masculina, os resultados são ainda escassos.

Na reprodução, a importância da vitamina D foi inicialmente demonstrada em experiências com ratos, nas quais animais com baixos níveis tiveram ninhadas mais pequenas. Apesar de se ter concluído que a vitamina D e seus metabolitos não eram imprescindíveis para a reprodução e para o desenvolvimento fetal detetou-se, com o seu défice, uma diminuição de 75% da capacidade reprodutiva. Verificou-se, também, um aumento de outras complicações, como a diminuição do tamanho neonatal(30). Esses efeitos são idênticos aos que ocorrem tanto em ratas sem VDR, como sem 1 α -hidroxilase que, embora concebam, o fazem raramente e apresentam também hipoplasia uterina, foliculogénese comprometida, anovulação e ausência do corpo lúteo(31, 32). O tamanho reduzido da ninhada nas mães sem VDR parece ocorrer precocemente durante a gestação, no período entre a fertilização e o desenvolvimento do embrião, dada a ausência de diferença no número de sacos reabsorvidos ou embriões mortos existente entre as mães de fenótipo normal e as sem VDR(33). No mesmo estudo(33), observou-se que em ratos mutantes sem VDR, a ingestão de dietas com alto teor de cálcio restabelece a fertilidade e aumenta a taxa de conceção mas não normaliza o número ou o peso de fetos viáveis, concluindo-se que a infertilidade é afetada não apenas pela deficiência de 1,25(OH) $_2$ D, como pela hipocalcémia.

Por outro lado, foi demonstrado que tanto ratos *knockout* para 1 α -hidroxilase como para o VDR apresentam também hipogonadismo hipergonadotrófico, com níveis aumentados de LH e FSH e reduzidos de estrogénio e progesterona(34), apresentando, pelo menos nos do primeiro grupo, ovários não responsivos a níveis elevados de gonadotrofinas. Estes defeitos, em grande parte relacionados com a função do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, foram prevenidos com uma dieta rica em cálcio, fósforo e lactose levando a concluir que a infertilidade observada nos ratos com défice de 1,25(OH) $_2$ D seja um efeito indireto mediado pelo cálcio e fósforo extracelular(35).

Mais ainda, ratos sem VDR apresentaram diminuição da atividade da aromatase P450 (a enzima chave para a síntese do estradiol) no ovário, testículos e epidídimo, por supressão do gene que a codifica, o CYP19(34). Adicionalmente, a suplementação de estrogénio aumenta o peso uterino das ratas sem VDR(32), bem como previne as anomalias histológicas nas gónadas

de ambos os sexos(34), revelando a existência de um estado de deficiência de estradiol e indicando que a vitamina D tem um papel importante na produção estrogénica do ovário(36). Para além disso, em tecidos ováricos humanos a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aumentou a produção de progesterona em 13%, de estradiol em 9% e estrona em 21%(37).

No estudo realizado por Kinuta et al(34), a suplementação de cálcio em ratos sem VDR aumentou em 60% a atividade da aromatase e corrigiu embora apenas parcialmente o hipogonadismo, sem reversão da anormalidade endocrinológica, sugerindo que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é essencial para o completo funcionamento das gónadas. Apesar disso, esses ratos suplementados com cálcio são férteis(34), podendo explicar porque outros ratos sem VDR permanecem férteis(34). A ação da vitamina D na biossíntese de estrogénio é parcialmente explicada pela manutenção da homeostase do cálcio, embora uma regulação direta do gene da aromatase não possa ser negligenciada(34), tendo sido identificados VDRs em zonas reguladores do gene CYP19(38).

O VDR é também expresso nas células espermáticas humanas e a concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode afetar tanto a sobrevivência dos espermatozoides como a sua maturação(39). Por exemplo, a taxa de inseminação de fêmeas com sêmen de machos com deficiência de vitamina D é de 73%, valor que sobe para 90% se o forem de machos repletos de vitamina D(40).

Foi ainda demonstrado que a vitamina D regula a expressão da hormona anti-Mulleriana nas células da granulosa e, subseqüentemente, a seleção folicular(41).

Já o estudo de Chavarro et al não encontrou associação entre a infertilidade anovulatória e a deficiência de vitamina D, défice de cálcio ou de fósforo, ainda que não tenha excluído essa possibilidade(42). Porém, num estudo de 2012 de Ott e co., tanto o índice de massa corporal (IMC) como a deficiência de $25(\text{OH})\text{D}$ foram preditivos, de modo independente, do desenvolvimento folicular e de gravidez em mulheres anovulatórias com síndrome de ovários policísticos (SOP) submetidas à estimulação com citrato de clomifeno(43). Esta é caracterizada não só por sintomas hiperandrogénicos como hirsutismo, acne e/ou alopecia, irregularidade menstrual e ovários policísticos, como é comum a resistência à insulina(45), parecendo a deficiência de vitamina D estar envolvida na patogénese desta e da síndrome metabólica a ela associada(46). De fato, verifica-se que a deficiência deste nutriente é frequente na SOP(44), a causa mais comum de infertilidade anovulatória(25). Outros estudos têm examinado os efeitos da suplementação com vitamina D na função reprodutiva e mulheres com SOP, tendo sido demonstrada uma melhoria significativa na mesma(47).

Por outro lado, a insuficiente capacidade de eliminação dos fragmentos endometriais que refluem para dentro do peritoneu pélvico durante a menstruação, tem sido sugerida como fator permissor do desenvolvimento da endometriose(48), uma das causas de infertilidade,

podendo a vitamina D, através as suas propriedades imunomoduladoras(49), ter um importante papel no desenvolvimento e manutenção desta patologia(50).

Estudos demonstraram, também, que o calcitriol regula a expressão do homeobox A10 nas células do estroma endometrial(51). A expressão deste gene é importante para o desenvolvimento do útero e essencial para o desenvolvimento do endométrio, sendo necessário para a normal decidualização, receptividade uterina e implantação(52), podendo as interferências ao nível do funcionamento dessa via contribuir para o papel da deficiência da vitamina D(51).

Embora tenha sido sugerido que o feto e a placenta contribuem para o aumento materno de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, estudos em animais demonstraram que isso não ocorre em níveis significativos, podendo a sua produção ser apenas necessária localmente, para induzir tolerância imune na implantação e sucesso na manutenção da gravidez(53, 54). Efetivamente, as suas propriedades imunossupressoras possivelmente levam a que contribua não só para o estabelecimento como para a manutenção da unidade feto-placentária(55), já que a decídua e a placenta continuam a produzir grandes quantidades de calcitriol, durante a gravidez(56). Este papel depende, em parte, do fato da vitamina D ter um papel importante na promoção de uma resposta imune predominantemente do tipo Th2 (células T auxiliares do tipo 2), um dos passos críticos necessários para a manutenção da gravidez normal(57). Este papel na adaptação imunológica pela mãe, que é necessária para manter normalmente a gravidez, pode ter um papel protetor na ocorrência de abortos(58). Estes podem resultar também do aumento da taxa de vaginose bacteriana no primeiro trimestre da gestação pela deficiência de vitamina D(36). Assim, visto ter a vitamina D efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios, como a regulação da produção e função das citocinas e da desgranulação de produtos dos neutrófilos, pode-se esperar um efeito protetor sobre o risco de partos pré-termo(59) e abortos espontâneos, e pré-eclâmpsia, todos associados à libertação de citocinas pró-inflamatórias placentárias(60). De fato, também a pré-eclâmpsia se pode associar com a deficiência de vitamina D. Além disso, essa associação pode dever-se à insuficiência placentária, decorrente da inadequada remodelação da vasculatura materna na fase inicial da gravidez(61), podendo a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ter um papel na regulação da placenta e na angiogénese.

Contudo, embora Moller et al(62) tenham verificado que mulheres com baixos níveis de vitamina D no primeiro trimestre tenham tido uma maior taxa de aborto tardio (significância estatística não especificada), não foi notada alteração na prevalência global de aborto.

Os dados disponíveis identificam, então, a vitamina D como um ponto-chave no sucesso reprodutivo. A associação dos níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ com várias das causas de infertilidade, poderá levar à recomendação da medição dos níveis séricos desta vitamina na idade fértil, bem como à sua suplementação, se necessária, de modo a melhorar a fertilidade. Embora exista uma função regulatória da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no sistema reprodutor feminino, são necessários

mais estudos aleatorizados controlados para comprovar os seus efeitos e averiguar se é resultado de um efeito direto da vitamina ou secundário aos efeitos do cálcio e do fósforo.

Por outro lado, a vitamina D é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento humano. Bebês prematuros e com baixo peso à nascença têm baixos níveis desta vitamina e estão em risco de desenvolvimento de problemas de saúde associados a essa deficiência(5). Apesar de não ser realizado rotineiramente, a medição dos níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ juntamente com os de $25(\text{OH})\text{D}$ podia dar importantes informações no estudo de mulheres no decurso da gravidez(63).

A deficiência de vitamina D em mulheres grávidas e lactantes tem consequências inegáveis, embora nem sempre significativas, não só na mulher e no feto como, futuramente, nas crianças. Tem-se verificado, por exemplo, em estudos experimentais, que a insuficiência de $25(\text{OH})\text{D}$ é crítica para o desenvolvimento fetal, especialmente, para o desenvolvimento do seu cérebro e para as suas funções imunológicas(64). Além disso, a ingestão de vitamina D e de cálcio foi associada a um aumento do Apgar ao 1º minuto(65).

Porém, o papel da vitamina D na mãe e no feto durante a gravidez ainda permanece muito indefinido.

1.6 - Ações na Reprodução Medicamente Assistida

Estudos abordando a fertilização *in vitro* (FIV) também podem fornecer importantes informações acerca do papel da vitamina D, ao permitirem avaliar cada um dos aspetos da reprodução, desde o desenvolvimento do oócito até à implantação do embrião, sendo algumas das evidências da associação da vitamina D e a reprodução provenientes de estudos que indicam uma variabilidade sazonal na taxa de gravidez e qualidade dos embriões após a FIV (mais favoráveis na primavera que no outono)(66).

O primeiro estudo(67) que avaliou a relação entre vitamina D e o sucesso da reprodução *in vitro*, realizado em dez mulheres aparentemente saudáveis, encontrou uma associação entre os níveis aumentados de estradiol durante a estimulação ovárica induzida por gonadotrofinas e um significativo aumento dos níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($r=0,787$), sugerindo que os níveis elevados de estrogénio circulante durante a estimulação induzida pela gonadotrofina estejam associados a um aumento significativo de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no soro.

2- Objetivos do Presente Trabalho

Uma vez que os dados expostos apontam para a possibilidade de existência dum papel da vitamina D na fertilidade humana, pretende-se investigá-lo em doentes submetidos a procriação medicamente assistida (PMA) na Unidade de Medicina Reprodutiva do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB). É neste contexto que se integra o presente trabalho que tem como objetivos específicos, através duma revisão sistematizada da literatura científica, avaliar as relações:

- Entre a reserva de vitamina D (ou a ausência do seu recetor) e os resultados da procriação medicamente assistida, quanto à capacidade de se conseguir gravidez clínica;
- Entre a reserva de vitamina D (ou a ausência do seu recetor) e alcançar a gravidez clínica em geral.

Considerando-se poder ser limitado o número de publicações nessa área, a análise foi alargada aos estudos que relacionam os níveis dessa vitamina com a capacidade de se alcançar gravidez clínica em geral.

3- Metodologia

De acordo com a metodologia própria de uma revisão sistematizada,

3.1 - Foram consultadas as seguintes bases de dados:

- B-On - Biblioteca do Conhecimento Online;
- BioMedCentral;
- The Cochrane Collaboration;
- e-Medicine, Medscape;
- EMBASE - Elsevier Biomedical Database;
- Google Scholar - Google Académico;
- PubMed;
- Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal;
- SciELO - Scientific Electronic Library Online.

3.2 - Utilizando como palavras-chave:

1. “vitamin D” AND “IVF”;
2. “vitamin D” AND “ART”;
3. “vitamin D” AND “uterine insemination”;
4. “vitamin D” AND “reproduction”;
5. “vitamin D” AND “fertility”.

3.3 - Na seleção dos artigos analisados consideraram-se como primários os seguintes tipos de estudos:

- PROD - Prospetivos randomizados com ocultação dupla;
- PROS - Prospetivos randomizados com ocultação simples;
- PSO - Prospetivos sem ocultação;
- RSL - Revisão sistematizada da literatura;
- MA - Meta-análise.

3.4 - Definiram-se como incluíveis os artigos que analisassem:

- A correlação entre os níveis séricos de vitamina D e a capacidade de alcançar a gravidez clínica;
- A correlação entre a presença ou ausência do VDR e a capacidade de alcançar a gravidez clínica.

3.5 - Excluindo-se os correspondentes a:

- RNSL - Revisão não sistematizada da literatura

Bem como os artigos que não satisfizessem os critérios de inclusão e os que avaliassem a relação entre a vitamina D e as repercussões na gravidez para além dos seus momentos mais precoces, da sua deteção clínica (a menos que avaliassem também a relação com a capacidade de se alcançar a gravidez clínica, sendo, então analisada essa parte do artigo) por interferir com vários parâmetros, fora do alvo da presente análise.

3.6 - A pesquisa limitou-se ao período temporal de:

- 1995 até 2013, inclusive.

3.7 - Incidiu sobre trabalhos escritos nas seguintes línguas:

- Português, Inglês, Espanhol, Francês, Italiano.

Evolução da pesquisa:

- A equação de pesquisa inicial “vitamin D” AND “ART”, foi substituída por “vitamin D” AND “assisted reproductive technology”, visto existirem muitos artigos não relacionados com o tema com essa sigla;
- Nas equações de pesquisa em que o número de referências identificadas era muito elevado, sem criar a possibilidade de ocultar artigos essenciais à análise, uma vez que se pretendia incluir trabalhos com doseamento da vitamina D e/ou com a determinação da presença/ ausência do VDR, restringiu-se a pesquisa substituindo “vitamin D” pelas seguintes equações:
 - a) “vitamin D levels”
 - b) “vitamin D”, “VDR”
 - c) “level of vitamin D”
- ✓ Nos resultados encontrados relacionados com o tema incluíram-se também revisões e livros, embora excluídos da seleção final;
- ✓ Os artigos que incidiram sobre a relação entre a presença/ausência de VDR e o sucesso reprodutivo tiveram como principal objetivo avaliar o papel do cálcio na restauração da fertilidade, pelo que também não foram selecionados como artigos a serem analisados.

Embora não seja o tema principal do trabalho, foi necessário para enquadrar o tema e para a análise da relevância do problema, consultar vários artigos acerca dos níveis séricos adequados de vitamina D, do seu metabolismo e da prevalência da sua deficiência na população, entre outros que se foram tornando pertinentes aquando da realização do trabalho, como por exemplo referências bibliográficas dos artigos selecionados.

4- Resultados

Como resultado da pesquisa efetuada, e satisfazendo os critérios de seleção referidos, restaram dez artigos sobre os quais se debruça a presente análise. Não foi possível ter acesso ao trabalho integral de um dos artigos selecionados(68), ainda assim incluído por ser discutido nas revisões sistemáticas consultadas e por o abstract ser muito completo. Um outro artigo foi apenas abordado na discussão, por não existir informação suficiente disponível acerca do mesmo(69).

Na Tabela 1 descrevem-se os resultados iniciais obtidos.

Tabela 1: Resultados da pesquisa

Base de Dados	Palavras-Chave Utilizadas	Nº de ref. utilizadas	Nº de ref. relacion. com o tema	Nº de artigos selec.
B-on (pesquisa 25-27/10/2013)	“vitamin D” AND “IVF”	188	22	5
	“vitamin D” AND “ART”	0	-	-
	“vitamin D” AND “uterine insemination”	1	0	-
	“vitamin D” AND “reproduction”	4339		
	“vitamin D levels” AND “reproduction”	475	21	4
	“vitamin D”, “VDR” AND “reproduction”	479	11	0
	“level of vitamin D” AND “reproduction”	3	1	1
	“vitamin D” AND “fertility”	1038		
	“vitamin D levels” AND “fertility”	96	3	1
	“vitamin D”, “VDR” AND “fertility”	92	14	0
“level of vitamin D” AND “fertility”	4	1	1	
Biomed Central (pesquisa 21/10/2013)	“vitamin D” AND “IVF”	7	1	0
	“vitamin D” AND “ART”	0	-	-
	“vitamin D” AND “uterine insemination”	0	-	-
	“vitamin D” AND “reproduction”	1805		
	“vitamin D levels” AND “reproduction”	255	2	1
	“vitamin D”, “VDR” AND “reproduction”	247	1	0
	“level of vitamin D” AND “reproduction”	18	1	0
“vitamin D” AND “fertility”	59	2	1	

Cochrane (pesquisa 20/10/2013)	“vitamin D” AND “IVF”	4	0	-
	“vitamin D” AND “ART”	0	-	-
	“vitamin D” AND “uterine insemination”	0	-	-
	“vitamin D” AND “reproduction”	11	0	-
	“vitamin D” AND “fertility”	29	1	0
Pubmed (pesquisa 21/10/2013)	“vitamin D” AND “IVF”	12	7	4 [®]
	“vitamin D” AND “ART”	0	-	-
	“vitamin D” AND “uterine insemination”	2	1	0
	“vitamin D” AND “reproduction”	1418		
	“vitamin D levels” AND “reproduction”	450	35	5 [®]
	“vitamin D”, “VDR” AND “reproduction”	86	20	3 [®]
	“level of vitamin D” AND “reproduction”	217	15	2
	“vitamin D” AND “fertility”	76	24	1
Scielo (pesquisa 17/10/2013)	“vitamin D” AND “IVF”	0	-	-
	“vitamin D” AND “ART”	0	-	-
	“vitamin D” AND “uterine insemination”	0	-	-
	“vitamin D” AND “reproduction”	2	0	-
	“vitamin D” AND “fertility”	2	0	-
Google Académico (Pesquisa 27/10/2013 até 03/11/2013)	“vitamin D” AND “IVF”	1770		
	“vitamin D levels” AND “IVF”	203 ^{©₁}	22	7 [®]
	“vitamin D”, “VDR” AND “IVF”	119 ^{©₂}	22	3 [®]
	“level of vitamin D” AND “IVF”	35 ^{©₃}	11	4 [®]
	“vitamin D” AND “reproduction”	18100		
	“vitamin D levels” AND “reproduction”	5430		
	“vitamin D”, “VDR” AND “reproduction”	1240		
	“level of vitamin D” AND “reproduction”	803		
	“vitamin D” AND “ART”	448	31	3
	“vitamin D” AND “fertility”	1400		
	“vitamin D levels” AND “fertility”	1350 ^{©₄}	53	5
	“vitamin D”, “VDR” AND “fertility”	1410 ^{©₅}	46	3 [®]
	“level of vitamin D” AND “fertility”	176 ^{©₆}	12	3

® - Incluindo 1 revisão sistemática (“Vitamin D and Fertility: a Systematic review”)

©₁ 119 sem citações, não incluídas

- ©₂ 81 sem citações, não incluídas
- ©₃ 32 sem citações, não incluídas
- ©₄ 1280 sem citações, não incluídas
- ©₅ 1400 sem citações, não incluídas
- ©₆ 165 sem citações, não incluídas

Alguns dados curiosos da pesquisa:

- ✓ Na base de dados Embase foram encontrados 0 resultados com qualquer uma das equações de pesquisa;
- ✓ Não foram utilizadas equações de pesquisa que eliminassem certas palavras que apareciam várias vezes como tema principal de artigos não relacionados (ex.: “bone”, “osteoporosis”, “cancer”), de modo a evitar que alguns dos artigos relevantes fossem excluídos, dado alguns deles referirem esses termos na introdução ou na bibliografia;
- ✓ No motor de busca Google Académico não se conseguiram selecionar os artigos referentes ao tema, de entre os encontrados com a palavra-chave “reproduction”, integrada na equação de pesquisa, devido ao enorme número de resultados, maior parte sem qualquer relação com o tema.

Além disso,

- Verificou-se que os artigos selecionados nos outros motores de busca (utilizados para pesquisa anteriormente à feita no Google Académico, por maior precisão na apresentação dos resultados) eram todos detetados com as outras combinações utilizadas;
 - No Google Académico apareceram quase sempre os mesmos artigos com as várias equações de pesquisa, fazendo com que os resultados encontrados com o termo “reproduction” estivessem na sua maioria incluídos nas outras pesquisas, dado o seu significado abrangente.
- ✓ Na B-on, o total de referências não corresponde a trabalhos diferentes, visto existir alguma repetição dos artigos, por provirem de bases bibliográficas diferentes;
 - ✓ Foram considerados como relacionados com o tema os artigos que avaliavam a associação entre a vitamina D e certas características de várias causas de infertilidade, essencialmente SOP e endometriose, mesmo que não diretamente o seu padrão reprodutivo, quando considerados pertinentes para compreender a possível implicação da vitamina nessa patologia;
 - ✓ Não foram encontrados artigos que avaliassem a relação entre o doseamento dos níveis de vitamina D no homem e o sucesso numa futura gravidez na mulher;
 - ✓ Os artigos que incidiram sobre a relação entre a presença/ausência de VDR e o sucesso reprodutivo não preenchiam os critérios de inclusão.

Utilizando os critérios atrás definidos identificaram-se apenas dez que constituem o grupo em análise.

Dos artigos selecionados, apenas dois(56, 68) foram retrospectivos, tendo sido igualmente incluídos por avaliarem os mesmos parâmetros pretendidos. Apenas em dois dos estudos houve suplementação(70, 71), sendo todos os restantes meramente observacionais. Sete desses artigos avaliaram o sucesso reprodutivo em mulheres submetidas a técnicas de procriação medicamente assistida(16, 56, 68, 72-75) e apenas um deles foi realizado em animais(70). Esses artigos objeto do estudo são apresentados na Tabela 2.

Dos estudos selecionados apenas um deles(71) avaliou o efeito da vitamina D numa causa de infertilidade específica, nomeadamente a SOP, todos os outros realizados em humanos que preenchiam os critérios de inclusão avaliaram mulheres com infertilidade em geral(71).

Ao considerar como indicadores de qualidade dos trabalhos serem prospetivos, terem critérios de inclusão/exclusão definidos (de modo a eliminar variáveis de confundimento) e serem reprodutíveis, verificou-se que apenas três dos artigos têm alta qualidade metodológica(56, 72, 74). Todos os estudos utilizaram um grupo comparativo ou de referência.

Apenas num(70) dos estudos selecionados não foi analisada a prevalência da deficiência de vitamina D, dos restantes, apenas num (73) não foi observada uma maior prevalência de níveis de vitamina D inferiores à normalidade considerada no estudo.

Foram vários os estudos que consideraram como significativamente estatístico valores de $p < 0.05$ (16, 56, 72, 75). Os restantes não apresentam de modo explícito o valor de significância estatística.

Tabela 2 - Resultados dos estudos observacionais

Artigo (referência nº)	Tipo de estudo	Nº de participantes	População avaliada	Valores de referência	Local do doseamento
Garbedian et al; 2013[75]	PSO, cohort observacional	173	Mulheres inférteis submetidas à FIV	Insuficiência ou deficiência < 75 nmol/L; Suficiência > 75 nmol/L - 25(OH)D sérica	Soro
Hirouzabadi et al; 2013[74]	PSO	2021	Mulheres inférteis submetidas à FIV	Deficiência < 10ng/mL; Insuficiência - 10-29 ng/ml; Suficiência - 30 - 100 ng/mL - 25(OH)D sérica	Soro e líquido folicular
Ruddick et al; 2012[56]	Cohort retrospectivo, observacional	208	Mulheres inférteis submetidas à FIV	Deficiência < 20ng/mL; Insuficiência - 20-30 ng/ml; Suficiência > 30 ng/mL - 25(OH)D sérica	Soro
Moller et al; 2012[62]	PSO, observacional	153	Mulheres caucasianas saudáveis, com planos de engravidar	Deficiência severa < 25nmol/L; Suficiência > 50nmol/L 25(OH)D plasmática	Plasma
Aleyasin et al; 2011[72]	PSO, cohort, observacional	82	Mulheres inférteis submetidas à ART	Deficiência < 20ng/ml; Insuficiência - 20-30ng/ml; Suficiência > 30ng/ml - 25(OH)D no líquido folicular	Soro e fluido folicular
Ruddick et al; 2011[68]	Retrospectivo, observacional	64	Mulheres inférteis receptoras de oócitos por FIV	Deficiência < 20ng/mL; Insuficiência - 20-30 ng/ml; Suficiência > 30 ng/mL - 25(OH)D sérica	Soro
Amifandis et al; 2010[73]	PSO, observacional	101	Mulheres inférteis submetidas à FIV-ICSI	Hipovitaminose < 20ng/ml; Normal - 20.1 - 30 ng/ml; Hipervitaminose > 30 ng/ml - 25(OH)D no líquido folicular	Soro e líquido folicular
Ozkan et al; 2009[16]	PSO, cohort observacional	84	Mulheres inférteis submetidas à FIV	Deficiência < 20ng/mL; Insuficiência - 20-30 ng/ml; Suficiência > 30 ng/mL - 25(OH)D sérica	Soro e líquido folicular

Tabela 2 (continuação) - Resultados dos estudos observacionais

Artigo (ref. n°)	Correlação entre níveis vitamina D soro e líquido folicular	Prevalência do estado de vitamina D	Resultado na reprodução	Critérios de seleção	Técnica de doseamento da vitamina D
Garbedian et al; 2013[75]	-	Insuficiência: 54,9%; Suficiência: 45,1%	Taxa de gravidez clínica: Insuficiência - 34,7%; Suficiência - 52,5% (p<0.001); Taxa de implantação - Insuficiência - 25.6%; Suficiência - 34.5% (p=0.6); Transferência embrionária (dia 5) - Insuficiência - 58.9%; Suficiência - 71.8% (p=0.054); Parâmetros do ciclo de FIV - Sem correlação significativa com os níveis de vitamina D.	Incluídas mulheres entre os 18 e os 41 anos, níveis de FSH <12 IU/L (nível basal, 3º dia do ciclo), capazes de fornecer consentimento informado. Excluídos ciclos reprodutivos provenientes de terceiros, ex utilizando oócitos doados ou "barriga de aluguer" e aquelas com anomalias uterinas não corrigíveis.	Não apresentado
Firouzabadi et al; 2013[74]	Significativamente correlacionados (r=0.83; p=0.001);	Deficiência: 22.6%; Insuficiência: 70.1%; Suficiência: 7.2%	Taxa de gravidez: Deficiência - 31.1%; Insuficiência - 63.5%; Suficiência - 5.4% (P=0.094); Taxa de fertilização: Deficiência - 43.17%, Insuficiência - 53.37%; Suficiência - 58.77% (p=0.054); Taxas de implantação: Deficiência - 17.33% Insuficiência: 15.26%; Suficiência 18.75% (p=0.579); Boa qualidade dos embriões - Deficiência - 82.6%, com insuficiência - 90.25 e suficiência - 86.7% (p=0.372).	Incluídas as mulheres que aceitaram um protocolo standard longo de FSH<10(IU/L), idade entre os 20 e 39 anos, sem doenças hepáticas, renais e cardíacas, endometriose, síndrome de Cushing, hiper ou hipotireoidismo, hiperprolactinemia, IMC< 18Kg/m2 ou >29Kg/m2. Excluídos casais com forte fator masculino.	Imunoensaio enzimático

Tabela 2 (continuação) - Resultados dos estudos observacionais

<p>Moller et al; 2012[62]</p>	<p>-</p>	<p>Níveis <50nmol/L: 31%; >80nmol/L: 12%</p>	<p>Taxa de raidez: Tertil de 25(OH)D plasmático mais baixo - 56%; Tertil médio - 68%; Tertil mais alto - 59%.</p>	<p>Incluídas mulheres entre os 25 e os 35 anos, com planos de gravidez imediata; saudáveis, sem antecedentes de infertilidade ou de aborto nos últimos 6 meses. Excluídas as mulheres que não planeavam engravidar.</p>	<p>Cromatografia líquida - espectrometria de massa tandem</p>
<p>Ruddick et al; 2012[56]</p>	<p>-</p>	<p>Deficiência: 21%; Insuficiência: 37%; Suficiência: 42%</p>	<p>Taxa de gravidez clínica - Mulheres brancas não-hispanicas - Insuficiência - 44%; Deficiência - 19% (p=0.04); Suficiência - 51%; Tendência oposta entre os asiáticos. Taxas de fertilização - Sem associação com o status de vitamina D Parâmetros de estimulação ovariana e marcadores de qualidade embrionária - Sem correlação com os níveis de vitamina D</p>	<p>Excluídas mulheres com ciclos prévios de IVF no USC fertility; ou que tenham feito transferência intratubárica de zigotos.</p>	<p>Radioimunoensaio</p>
<p>Aleyasin et al; 2011[72]</p>	<p>Significativamente correlacionados (r=0.77; p=0.001)</p>	<p>Todas as participantes, exceto uma</p>	<p>Taxa de gravidez química - Tertil de 25(OH)D no líquido folicular mais baixo - 35.7%; Tertil médio: 33.3%; Tertil mais alto -37.0%; Taxa de gravidez clínica- Tertil de 25(OH)D no líquido folicular mais baixo - 28.6%; Tertil médio e mais alto- 29.6%; Progressão da gravidez: Tertil de 25(OH)D no líquido folicular mais baixo - 21.4% Tertil médio - 29.6%; Tertil mais alto - 18.5% (p=0.959, 0.955, e 0.604, respectivamente); Taxa de fertilização: Tertil de 25(OH)D no líquido folicular mais baixo para o mais alto 79.0%, 67.8% e 68.3% (p=0.018); Taxa de implantação - Tertil de 25(OH)D no líquido folicular mais baixo para o mais alto 12.6%, 9.6% 13% e 15.9% (p=0.791); Qualidade embrionária: Sem correlação linear com os níveis de 25(OH)D no líquido folicular e soro (r=0.073, p=0.517; r=0.018, p=0.784, respectivamente); Padrões de resposta ovariana - Sem diferenças significativas entre os tertis de 25(OH)D no líquido folicular.</p>	<p>Excluídas mulheres com >38 anos, doenças sistêmicas, consumidoras de drogas que interferissem com o metabolismo da Vitamina D, amenorreia hipotalâmica ou galactorreia. Excluídos também casais que necessitassem de extração espermática testicular ou de aspiração do esperma.</p>	<p>Imunoensaio Enzimático</p>

Tabela 2 (continuação) - Resultados dos estudos observacionais

Ruddick et al; 2011[68]	-	Deficiência - 28%; Insuficiência - 41%; Suficiência - 31%	Taxa de gravidez: Deficiência - 39%; Insuficiência - 38%; Suficiência - 70% (P=0.02).	Não apresentado no abstract	Não apresentado no abstract
Anifandis et al; 2010[73]	Altamente correlacionados (r=0.79; p<0.001)	Hipovitaminose: 30,7%; Normal: 45,37%; Hipervitaminose: 19,44%	<p>Taxa de gravidez clínica:</p> <p>Hipovitaminose: 32,7% (p=0.047); Níveis normais: 32,3%; Excesso:14,5%;</p> <p>Qualidade dos embriões: Níveis vitamina no líquido folicular significativamente correlacionados de modo negativo (r=-0,27; p=0,027); Score médio de qualidade embrionária nas com hipovitaminose- 7.96±2.6 ng/ml; Normal- 7.02±2.5ng/ml; Hipervitaminosa- 5.6±3.6ng/ml (FF).</p>	Não descrito	Imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA), sensibilidade de 0.2µU/ml
Ozkan et al; 2009[16]	Altamente correlacionados (r=0.94; p<0.001)	Deficiência: 27%; Insuficiência: 36%; Suficiência: 37%	<p>Taxa de implantação e gravidez: Aumento significativo ao longo dos tertis de 25(OH)D (p=0.041 e p=0.029 respectivamente);</p> <p>Taxa de gravidez clínica: Tertil mais alto de vitamina D sérica quase 4x > probabilidade que as no tertil mais baixo (OR 3.83, 95% IC 1.20-12.28, p=0,024); Tertil mais baixo de vitamina D no líquido folicular - 75% < probabilidade de comparativamente com as do tertil mais alto (OR 0.25, 95% IC 0,07-0,84 p=0,026);</p> <p>Níveis de vitamina D no líquido folicular e parâmetros de resposta ovariana - sem correlação significativa.</p>	Ajustamento por idade, IMC, etnia, nº de embriões transferidos	Não apresentado

Tabela 3 - Resultados dos estudos interventivos

Artigo (referência n°)	Tipo de estudo	N° de participantes	População avaliada	Valores de referência	Local do doseamento
Firouzabadi et al; 2012[71]	PSO randomizado interventivo	100	Mulheres com SOP	Deficiência severa < 10ng/ml; Normal - 20-49,0ng/ml	Soro
Coffey et al; 2012[70]	PSO randomizado interventivo	40	40 PIC Camborough-22 gilt	-	Plasma

Tabela 3 (continuação) - Resultados dos estudos interventivos

Artigo (referência n°)	Prevalência do estado de vitamina D	Resultado na reprodução	Critérios de seleção	Técnica de doseamento da vitamina D	Suplementação
Firouzabadi et al; 2012[71]	Deficiência severa - 35%; Deficiência - 83%; Após suplementação: Deficiência de vitamina D recompensada em 74%	Melhoramento da regularidade menstrual: Grupo I - 70%, Grupo II - 58% (p=0.054); Da maturação folicular: Grupo I - 28%, Grupo II - 22% (p=0.698); Da infertilidade: Grupo I - 18%, Grupo II - 12% (p=0.401).	Incluídas mulheres entre os 20-40 anos com SOP, originais do Irão	Radioimunoensaio	Grupo I - (n=50) Metformina 1500mg/dia; Grupo II - (n=50) Metformina 1500mg/dia + Cálcio 1000mg/dia e Vitamina D 100000IU/mês por 6 meses
Coffey et al; 2012[70]		Concentração plasmática de 25(OH)D3 ao dia - 43: CTL = 53.8ng/ml, 25OHD3 =57.4ng/ml; p=0.66); 25(OH)D3 ao dia -13: 89.7ng/ml vs CTL = 57.4ng/ml; dia 46: 95.8 vs 55.7ng/ml e dia 89 92.8 vs 58.2ng/ml Taxa de gravidez - Aumento de 23% nos alimentados com 25(OH)D3 comparativamente com CTL (77.8% vs 55.0%, respetivamente; p=0.21) Dimensão da ninhada: CTL = 10.2; 25(OH)D3 = 12.7; p=0.04		Ensaio de diluição isotópica - limite mínimo de deteção de 25(OH)D3 de 5ng/ml	Grupo com dieta controlo (CTL) - 2.500UI D3/Kg de dieta Grupo com dieta experimental (25(OH)D3) - 500UI D3/Kg de dieta + 50µ 25(OH)D3/Kg de dieta Início da dieta (2.7Kg 1x/dia) 43 dias antes do acasalamento

4.1 - Estudos observacionais

Nos quatro estudos (16, 72-74) que compararam os níveis séricos e os do líquido folicular (FF) da vitamina D verificou-se existir uma correlação positiva significativa entre ambos.

Os dados obtidos dos estudos observacionais, acerca do papel da concentração de vitamina D no soro e no FF como preditor independente do sucesso da PMA ou de alcançar a gravidez clínica no geral, são conflitantes. Dos oito estudos observacionais analisados, quatro(16, 56, 68, 75) encontraram uma correlação positiva significativa entre os níveis de vitamina D e o sucesso reprodutivo, um deles associou níveis mais altos de vitamina D com resultados mais desfavoráveis(73) e outros três (62, 72, 74) não encontraram uma associação significativamente estatística.

Assim, Ozkan e colaboradores(16), utilizando a análise multivariável de regressão logística (ajustada para os parâmetros que se sabem afetar o sucesso da FIV: idade, IMC e número de embriões transferidos) reportaram que por cada aumento de 1ng/ml de 25(OH)D no FF a probabilidade de engravidar aumenta 6% ($p=0.03$), apresentando, as 26 mulheres que engravidaram, níveis de vitamina D folicular significativamente maiores (34.42ng/ml+-15.58 vs 25.62ng/ml+-10.53), do que as que não engravidaram ($p=0.013$). Também Garbedian et al(75), utilizando a mesma metodologia mas reavaliando a transferência embrionária ao 5º dia, mostraram que o nível de 25(OH)D sérica pode ser um preditor independente de gravidez clínica (odds ratio ajustada de 1.01, 95%, IC - 1.00-1.03). Houve um aumento das taxas de gravidez clínica com o aumento nos níveis de 25(OH)D sérica e obtiveram-se taxas superiores de gravidez clínica por embrião transferido entre as mulheres com níveis suficientes de vitamina D relativamente às insuficientes (54.7% vs 37.9%, $p<0.001$). O estudo realizado por Rudick et al(56), efetuado em 188 mulheres (das 208 elegíveis), suporta também a correlação entre os níveis de vitamina D e o sucesso da FIV. Neste, a relação entre o status de vitamina D e as taxas de gravidez diferiram consoante a raça, estando a deficiência de vitamina D significativamente associada a menores taxas de gravidez em brancas não-hispânicas, mas não em asiáticas, possivelmente devido às baixas taxas de sucesso de FIV que nestas se verificaram. De fato, entre as mulheres brancas não-hispânicas, as taxas de gravidez diminuíram com níveis mais baixos de vitamina D, enquanto nas asiáticas se observou o inverso (maiores taxas de gravidez para níveis inferiores de vitamina D sérica). Ajustando para a idade, número e qualidade dos embriões transferidos, entre as brancas não-hispânicos as possibilidades de engravidar foram quatro vezes superiores em pacientes com valores normais de vitamina D comparativamente às com níveis deficientes. Também noutro estudo realizado pelos mesmos autores(68), neste caso em mulheres recetoras de oócitos, se observaram relações significativas entre as taxas de gravidez e os níveis de vitamina D da recetora, verificando-se maiores taxas quando os níveis de vitamina eram normais. Nessa análise, a média dos níveis de vitamina nas mulheres recetoras foi de 28.5ng/mL entre as que engravidaram e 23.4ng/mL entre as que não engravidaram ($P=0.04$), existindo também uma diferença entre as raças, maiores nas caucasianas que nas africanas ($p=0.04$). De igual forma

as taxas de gravidez clínica também diferiram entre as etnias, sendo mais elevadas entre as mulheres recetoras caucasianas e hispânicas (61% e 50% respetivamente) e mais baixas entre as afroamericanas e asiáticas (20% e 31% respetivamente)(68) (significância estatística não especificada no abstract).

Apesar desses dados promissores, quatro estudos não confirmaram estes achados. No de Anifandis et al(73), os resultados em termos do sucesso reprodutivo das mulheres com hipovitaminose pouco diferiram das com níveis normais, e as que tinham níveis excessivos apresentaram piores desfechos. Uma vez que se verificou existir uma significativa correlação negativa entre os níveis de vitamina no FF e os níveis de glicose nesse fluído ($r=-0.25$, $p<0.05$) sugeriu-se que é a presença de valores séricos e foliculares excessivos de vitamina D, em combinação com baixos níveis de glicose no FF (presente nas mulheres com valores superiores a 30ng/ml de 25(OH)D no FF) que tem impacto negativo no sucesso da FIV.

Por outro lado, Aleyasin et al(72) verificaram níveis séricos médios de 25(OH)D de 8.13 ng/ml no grupo das mulheres que alcançaram a gravidez clínica e 8.29 no das que não engravidaram ($p=0.235$), tendo no FF valores médios de 9.19 (variação entre 5.25-19.51)ng/ml e de 10.34 (variação entre 5.89-9.69)ng/ml, respetivamente ($p=0.433$). Donde concluíram que a deficiência de vitamina D não desempenha um papel fulcral nos resultados da PMA. Por sua vez, Firouzabadi et al(74) observaram níveis de vitamina D no FF das mulheres que engravidaram de 22.17 ± 17.21 ng/ml e de 26.14 ± 19.33 ng/ml nas que não engravidaram, relação não significativamente estatística ($P=0.17$). De igual forma, Moller(62) e colaboradores, analisando 145 mulheres, chegaram à conclusão que as concentrações plasmáticas de 25(OH)D não afetam a fertilidade, tendo-se observado níveis de 25(OH)D plasmática de 59nmol/l nas mulheres que engravidaram e 57nmol/l nas que o não conseguiram ($p=0.60$).

Se, na maioria, a presença de **gravidez clínica** foi definida pela observação de saco gestacional na cavidade uterina por ultrassonografia transvaginal(16, 72-75), Aleyasin et al(72), Garbedian et al(75) e Rudick et al(56) definiram-na apenas quando foram detetados batimentos cardíacos fetais.

Nos estudos analisados, verificaram-se ainda discordâncias nas conclusões relativas às **taxas de implantação**. Assim, o estudo efetuado por Ozkan et al(16) posiciona-se a favor de uma correlação significativa com níveis de vitamina D, enquanto que os de Garbedian et al(75) e Aleyasin et al(72), ainda que tenham encontrado maiores taxas no grupo das mulheres com níveis de vitamina D suficientes ou ao longo dos tertis (do com menor valor para o maior) de 25(OH)D no FF, respetivamente, não obtiveram uma correlação significativamente estatística.

A implantação foi evidenciada pela presença de um nível sérico de gonadotrofina coriónica humana (hCG) positivo às 12 semanas após a transferência dos embriões no estudo realizado

por Ozkan et al(16) e pela presença de saco gestacional visível pela ultrassonografia transvaginal no efetuado por Garbedian et al(75). Em ambos, a taxa de implantação foi calculada pelo número de sacos gestacionais observados à ultrassonografia dividido pelo número de embriões transferidos multiplicado por 100.

A **taxa de fertilização** foi definida por Anifandis et al(73) como a razão entre o número de oócitos com dois pronúcleos e o total de oócitos injetados, embora não tenham sido apresentados os valores da mesma. No estudo efetuado por Aleyasin et al(72) foi encontrada uma diminuição significativa da mesma ao longo dos tertis (do menor para o maior) de 25(OH)D no FF. Pelo contrário Rudick et al(56) e Firouzabadi et al(74) concluíram, respetivamente, que essa taxa não se associa com a reserva de vitamina D e que não existe uma correlação significativa entre essas variáveis ($p=0.579$), ainda que no segundo caso a taxa de fertilização tenha sido ligeiramente superior no grupo das mulheres com níveis suficientes.

No que diz respeito aos **parâmetros de resposta ovárica** os resultados foram mais consensuais, uma vez que em nenhum dos estudos em que esse parâmetro foi analisado, se detetou uma correlação significativa com os níveis de vitamina D. Apesar disso, Ozkan et al(16) observaram uma tendência positiva na resposta (duração da hiperestimulação ovariana controlada, número de folículos, número de oócitos recolhidos, e estradiol máximo) à medida que aumentavam os níveis de vitamina D ($p>0.05$). Anifandis et al(73), embora com resultados divergentes no que respeita à taxa de gravidez clínica, observaram, também, um aumento, ainda que não significativo, no número de oócitos recolhidos (3.9+3.2 nas mulheres com hipovitaminose; 5.91+4.3 nas com níveis normais e 6.14+5 nas com excesso de vitamina D) com níveis de vitamina D superiores no FF.

Por sua vez, Garbedian et al(75), analisando os parâmetros do ciclo de FIV, como o nível de estradiol no dia da administração da hCG, espessura do endométrio, o número de oócitos recolhidos - média de 1.8 em ambos os grupos - não encontraram diferença entre as mulheres com níveis de 25(OH)D suficientes e insuficientes. Na mesma linha de resultados, Aleyasin et al(72), que analisaram aos níveis de estradiol, número de oócitos recolhidos e de embriões transferidos, não observaram alterações significativas nesses parâmetros entre os grupos com diferentes níveis de 25(OH)D no FF. Por exemplo, transferiram em média 4 embriões tanto no grupo das mulheres que engravidaram como no das que não engravidaram.

De igual forma, Rudick et al(56), tendo em conta os mesmos parâmetros que Aleyasin et al(72) verificaram que, embora o número de embriões transferidos diferisse significativamente entre os vários níveis de vitamina D, não se observou qualquer tendência, já que a maioria dos embriões transferidos foi de mulheres com níveis de vitamina D no grupo intermédio.

Foram vários os estudos que avaliaram a **qualidade embrionária**. Para Anifandis et al(73) a pior qualidade verificava-se nas mulheres com excesso de vitamina D. Aleyasin et al(72), Rudick et al(56) e Firouzabadi et al(74), por seu turno, não observaram uma correlação linear entre a qualidade embrionária e os níveis de 25(OH)D no FF e soro, analisado pelo número médio de blastómeros ou percentagem média de fragmentação, no segundo estudo mencionado. Os restantes estudos não avaliaram essa variável.

Foram observados níveis de 25(OH)D inferiores nas mulheres com **IMC** mais elevado em três dos estudos que analisaram essa correlação. Assim, Ozkan et al(16) e Garbedian et al(75) verificaram uma significativa correlação inversa entre ambas as variáveis ($p=0.035$ e $p=0.02$ respetivamente). Rudick et al(56), por outro lado, observaram que as mulheres com deficiência de vitamina D eram mais pesadas ($p=0.03$), ainda que todos os valores de IMC estivessem dentro da normalidade. Pelo contrário, tanto Anifandis et al(73) como Aleyasin et al(72, 73) e Moller et al(62), não observaram alterações significativas entre as mulheres com diferentes níveis de vitamina D, no que diz respeito ao IMC.

Aleyasin et al(72) verificaram que 16.7% das mulheres inférteis que engravidaram e 22.4% das que não engravidaram tinham como causa de infertilidade a síndrome de ovários policísticos. Nestas os níveis séricos e foliculares de 25(OH)D não foram significativamente diferentes das que tinham outras causas de infertilidade ($p=0.938$ e 0.158 , respetivamente).

Rudick et al(56), por sua vez, verificaram que as mulheres com deficiência de vitamina D tinham maior probabilidade de terem uma diminuição da reserva ovárica ($p=0.01$), não se associando o status de vitamina D com quaisquer outros diagnósticos de infertilidade.

4.2 - Estudos interventivos

Firouzabadi et al(71), indo ao encontro de vários dos estudos observacionais, observaram um efeito benéfico da vitamina D na infertilidade, tendo-se constatado uma melhoria na infertilidade mais evidente no grupo de mulheres com suplementação com cálcio e vitamina (grupo II) comparativamente ao grupo não suplementado com esses elementos (grupo I), embora não considerada estatisticamente significativa (gravidez - avaliada pelos títulos de β -hCG - de 18% vs 12%, respetivamente; $p=0.401$). Foi também observado um efeito benéfico na perda de peso no grupo suplementado (II), tendo o **IMC** diminuído quase significativamente nesse grupo (IMC antes do tratamento de 26.89 ± 2.14 vs 26.91 ± 2.35 no grupo II e I respetivamente - $p=0.965$; e 25.49 ± 1.88 vs 26.28 ± 2.15 , após o tratamento - $p=0.054$). Observou-se também uma melhoria nas irregularidades menstruais neste grupo (ciclos menstruais regularizados pós tratamento: 70% vs 58%, nos grupos II e I, respetivamente; $p=0.211$) e na maturação folicular (após 6 meses, número de folículos maiores que 14mm 28% vs 22%; grupos II e I respetivamente, $p=0.698$). Ainda assim, os resultados apesar de diferentes não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Pelo contrário os níveis

de 25(OH)D entre os dois grupos foram significativamente diferentes após o tratamento (24.82 ± 6.54 vs 13.79 ± 6.48 , grupo II e I respectivamente, $p=0.001$), tendo apenas 26% das mulheres permanecido com níveis deficientes de vitamina D e nenhuma com deficiência severa, após 6 meses de suplementação com cálcio e vitamina D.

Neste estudo, em que foi avaliado o efeito da suplementação na infertilidade no contexto da SOP, utilizou-se a ultrassonografia transvaginal para avaliar o crescimento folicular, sendo definidos como respondedoras aquelas que alcançaram folículos maiores de 14mm.

Coffey et al(70), no seu estudo realizado em 38 suínos, observaram um aumento significativamente maior nos níveis de 25(OH)D₃ plasmática no grupo suplementado com dieta com 25(OH)D₃ comparativamente aos alimentados com a dieta controle (vitamina D₃) ($p<0.001$). De igual forma, também se verificou uma maior tamanho na ninhada nos suínos alimentados com 25(OH)D₃ ($p=0.04$). Apesar disso, o aumento na taxa de gravidez não foi significativo ($p=0.21$).

5 - Discussão

O fato de nos quatro estudos (16, 72-74) que avaliaram a correlação entre os níveis séricos e os do líquido folicular da vitamina D se ter verificado uma correlação positiva entre ambos demonstra que os níveis de 25(OH)D no FF são preditores confiáveis das reservas corporais de vitamina D.

Ozkan et al(16), no seu estudo, observaram que, embora existisse uma correlação significativa entre os níveis séricos de vitamina D e a gravidez clínica, o mesmo não se verificava relativamente aos parâmetros da hiperestimulação ovárica, cuja relação não era significativa, o que leva a crer que o maior sucesso na FIV obtido com o aumento da vitamina D no organismo se possa dever, essencialmente, ao papel da mesma no endométrio, ao aumentar a sua recetividade, corroborado pela existência de VDRs identificados no endométrio(76). Esta percepção iria ao encontro do papel da vitamina D na implantação descrita noutros estudos(52). Ainda assim, observou-se, nesse estudo, que com níveis elevados de vitamina D existia uma ligeira melhoria nos parâmetros da resposta ovárica, como foi o caso do aumento dos níveis de estradiol, sugerindo, tal como foi postulado no animal(30), um papel da vitamina na esteroidogénese. Contrariamente, os resultados dos estudos efetuados por Garbedian et al(75) e Rudick et al(56) apontam para que seja pouco provável que a diferença observada nas taxas de gravidez clínica se deva a diferenças ao nível da esteroidogénese ovárica, já que os parâmetros de resposta ovárica não diferiram com os níveis de vitamina D. Contudo, no estudo de Garbedian, não foi avaliada a qualidade embrionária. Caso essa tivesse sido investigada talvez fosse mais provável conseguir-se determinar se as taxas de gravidez clínica e de implantação são afetadas pela qualidade embrionária ou pelo endométrio.

É importante notar, porém, que Ozkan et al(16) transferiram um número (2.56 ± 0.66) significativamente maior de embriões no grupo de sucesso na FIV, relativamente ao grupo que não engravidou (1.98 ± 1.16 ; $p=0.011$), podendo ter afetado os resultados finais. Além disso, embora tenha utilizado uma análise multivariada de regressão logística, de modo a demonstrar que os níveis de vitamina no FF determinavam de modo independente o sucesso da FIV, o total de casos foi pequeno para chegar a conclusões sólidas. Adicionalmente, a qualidade dos embriões transferidos não foi avaliada.

Ainda assim, na mesma linha com Ozkan(16), Rudick et al(68), ao observarem mulheres recetoras de oócitos, verificaram que níveis de vitamina D adequados nas recetoras foram associados a uma maior taxa de gravidez, enfatizando que o papel crítico da vitamina na gravidez possa estar ao nível do endométrio, e não associado com o número de folículos e oócitos ou com a morfologia dos embriões. Porém, também aqui não foi investigada a qualidade dos embriões transferidos em relação aos níveis de vitamina D. Outro estudo(56)

realizado por esses autores e o de Garbedian et al(75) sugerem, de igual modo, que a correlação da vitamina D com os resultados da FIV possa estar ao nível do endométrio, já que a deficiência de vitamina D não se correlacionou com os parâmetros de estimulação ovariana ou, no estudo de Rudick, com os marcadores de qualidade embrionária.

Não existem dados acerca do papel da vitamina D na maturação folicular em mulheres, sendo que estudos em ratos sem VDR sugerem que esse nutriente é fundamental para a função gonadal em ambos os sexos(34).

Garbedian et al(75), embora tenham observado uma correlação significativa entre os níveis de vitamina D e a gravidez clínica, não comprovaram, existir uma associação entre os níveis dessa vitamina e a taxa de implantação. Talvez a análise possa não ter sido suficiente para detetar as diferenças nesta última.

O estudo realizado por Aleyasin et al(72), pode estar em concordância com os resultados obtidos por Anifandis et al(73), que associaram inversamente os níveis de vitamina D e o sucesso reprodutivo, já que ainda que não tenham encontrado diferenças significativas nos níveis de vitamina D, tanto séricos, como no FF, entre as mulheres que engravidaram vs as que não engravidaram, foi observada uma taxa de fertilização significativamente mais alta no primeiro tertil de 25(OH)D. A prevalência de deficiência de vitamina D quase global nesse estudo pode ter impedido alcançar resultados mais significativos, não tendo dado para calcular efetivamente os efeitos da deficiência de vitamina D nas técnicas de reprodução assistida. Apesar disso, nesse estudo, os níveis de reserva de vitamina D não se parecem correlacionar com a probabilidade de concepção. Nesta análise já houve uma avaliação da qualidade embrionária, porém não foi observada uma correlação linear entre a mesma e os níveis de vitamina D, tanto séricos como foliculares, possivelmente também explicado pela predominante prevalência de deficiência de vitamina D neste grupo.

O fato de Anifandis et al(73) terem verificado uma correlação inversa entre o sucesso reprodutivo e os níveis de vitamina D e glicose no FF foi ao encontro de estudos já existentes que demonstravam existir uma utilização substancial de glicose pelos oócitos(77), sugerindo uma possível influência da glicose do FF no processo de fertilização. Concentrações séricas de vitamina elevadas provavelmente aumentam a utilização de insulina resultando numa modulação do metabolismo da glicose no FF, podendo ter um impacto negativo na maturação dos oócitos, crescimento das células da granulosa, qualidade embrionária e, conseqüente sucesso da FIV.

Contrariamente à associação entre os níveis de vitamina D e parâmetros como o peso ao nascimento, score de Apgar e duração da gravidez evidenciada noutros estudos, Moller et al(62) não encontraram uma associação entre esses parâmetros e os níveis plasmáticos de 25(OH)D, tanto pré-concepcionais, como durante a gravidez, mesmo após ajustamento para

possíveis variáveis de confundimento. Também num outro estudo, incluindo igualmente maioritariamente mulheres com níveis adequados de vitamina D, a suplementação com esta vitamina não afetou os resultados da gravidez, relativamente ao grupo de controlo, sugerindo que o efeito da concentração de 25(OH)D, se existente, se torne evidente clinicamente em casos de deficiência da vitamina(19). Neste estudo foi utilizado um grupo de controlo, composto por mulheres sem intenção de engravidar, apenas para comparação do efeito da gravidez e amamentação no status de vitamina D (tendo sido feitas várias medições da vitamina no decorrer desses períodos) e não na capacidade de engravidar, pelo que não foi mencionado na população de estudo.

Ambos os estudos interventivos(70, 71) foram a favor de um efeito benéfico da suplementação com vitamina D no sucesso reprodutivo. Embora os resultados obtidos nas mulheres com SOP(71) não tenham sido significativamente estatísticos, sugerem um papel positivo não só na capacidade de engravidar como na irregularidade menstrual, indo ao encontro dos resultados encontrados noutros estudos que associaram o défice de vitamina D com uma maior probabilidade de ter esta causa de infertilidade(78).

Apesar disso, Aleyasin et al(72) não encontraram diferenças significativas nos níveis de vitamina D entre as várias causas de infertilidade, incluindo também a SOP.

O fato de na maioria dos estudos analisados se ter encontrado uma maior prevalência de níveis séricos de vitamina D inferiores ao normal está em linha com a elevada prevalência de níveis insuficientes de vitamina D na população em geral, e na idade fértil em particular(79). De igual forma, Dubourdiu et al(69), no seu estudo, verificaram que 66.5% das 430 mulheres avaliadas, submetidas a FIV, apresentavam deficiência desta vitamina. Esta situação é de especial preocupação em grávidas, sobretudo de raça negra(20). No estudo realizado por Aleyasin et al(72), houve uma dominância quase total do estado de deficiência de vitamina D, podendo o fato de ter sido realizado entre agosto e março ter sido um fator contribuidor, tal como sugerido pelos resultados obtidos por Rojansky et al, mencionados anteriormente(66). Pelo contrário, o estudo realizado pelo Garbedian et al(75) detetou uma prevalência de deficiência de vitamina D quase idêntica à de suficiência. Tal pode-se ter devido ao fato de muitas das mulheres terem tomado suplementação de vitamina D (400UI) pré-natal ou de o estudo não se ter estendido aos meses de inverno. Por outro lado, no estudo realizado por Moller et al(62) foram observados níveis de 25(OH)D plasmática inferiores a 50nmol/L em 19% das mulheres analisadas no verão e de 45% nas avaliadas de novembro a abril (p=0.001). Neste estudo foi observada uma prevalência reduzida de deficiência severa de vitamina D, também possivelmente por muitas das mulheres tomarem suplementação de vitamina D.

Também a favor de um possível impacto positivo da vitamina D no sucesso reprodutivo esteve o estudo realizado por Dubourdiu et al(69), no qual se verificou uma tendência à diminuição das taxas de gravidez com níveis inferiores de vitamina D, ainda que não estatisticamente

significativa. O número de embriões recolhidos foi significativamente menor nas mulheres com baixos níveis desta vitamina, podendo ter influenciados os resultados.

Dado o papel da vitamina D em várias dimensões da saúde, o seu quantitativo corporal torna-se uma questão preocupante, não só em termos de sucesso na medicina reprodutiva e reprodução no geral, como na saúde da pessoa no seu todo, por exemplo em termos de obesidade, que parece ser mais prevalente(16, 56, 75) entre as mulheres com baixos níveis de vitamina D, indo ao encontro com o exposto na introdução e do estudo realizado por Dubourdiou et al(69), no qual foram encontrados valores de IMC significativamente maiores entre as mulheres com níveis de vitamina D inferiores à normalidade.

No estudo realizado por Coffey et al(70), realizado em suínos, em que foram utilizadas doses iguais de vitamina D sob duas formulações diferentes, detetaram-se diferenças entre os níveis de vitamina D plasmática obtidos com essas duas dietas, sendo maiores no caso do grupo com suplementação de 25(OH)D₃. O mecanismo responsável por tal diferença ainda não está completamente esclarecido, porém, foram obtidos resultados idênticos em humanos, tendo a 25(OH)D₃ sido muito mais potente que a vitamina D₃ na elevação dos níveis séricos de 25(OH)D(80). Apesar de não ter sido significativamente estatística a diferença nas taxas de gravidez, os resultados encontrados sugerem um possível papel benéfico na suplementação com 25(OH)D₃ para a melhoria das mesmas. Neste estudo o peso médio dos fetos não diminuiu nos alimentados com 25(OH)D₃, como costuma acontecer quando aumenta o tamanho da ninhada, possivelmente pelo papel da deficiência de vitamina D na diminuição do tamanho dos fetos(30).

Tendo por base os resultados encontrados, apesar de nem sempre conclusivos e concordantes, e os estudos já anteriormente realizados e abordados no tópico da introdução será lícito especular que tanto níveis inferiores como superiores ao normal podem ter consequências adversas no sucesso reprodutivo. Os mecanismos através dos quais a vitamina D exerce tais ações permanecem por esclarecer mas o papel crítico para os resultados da FIV dos níveis dessa vitamina no FF pode refletir a qualidade dos embriões(73). As grandes discrepâncias entre os resultados respeitantes à relação entre a vitamina D e a fertilidade, são difíceis de explicar, porém, o fato de todos os estudos apresentarem como limitação uma amostra pequena, talvez tenha contribuído para não se alcançarem resultados concordantes e esclarecedores em termos significativos. Por outro lado, apenas os estudos interventivos foram aleatorizados. Apesar disso, a maioria dos estudos encontram-se a favor de algum benefício da presença de níveis séricos adequados dessa vitamina em algum componente da fertilidade. Ainda assim, são necessários mais estudos para elucidar tal observação(73), sendo necessário ter em conta que o fato de não ter sido avaliado o papel do cálcio e fósforo nos resultados dos estudos analisados, poderá ter levado a um enviesamento de resultados por, conforme descrito na literatura, o efeito da vitamina D na reprodução poder estar relacionado com os níveis séricos desses iões(33).

6 - Proposta de Investigação

Como os estudos nesta área, sobretudo em humanos, são limitados e alguns deles com resultados incongruentes e sendo esta uma abordagem que se pode tornar num modo simples de melhorar a fertilidade da mulher, propõe-se a realização de um trabalho que vise avaliar, não só a reserva de vitamina D em mulheres que se submetem a PMA, como também o efeito da suplementação desta vitamina na fertilidade das que apresentem níveis plasmáticos inferiores à normalidade, comparando os resultados desta técnicas em função dos níveis de vitamina D. Propõe-se ainda determinar os níveis de 25(OH)D no FF, de modo a confirmar a sua correlação, evidenciada nos estudos atrás mencionados, com os seus níveis séricos.

Essencialmente, sugere-se um estudo que determine se o nível de 25(OH)D no FF ou no soro de mulheres inférteis submetidas a técnicas de reprodução assistida se associa ao seu sucesso e se os efeitos da suplementação nesses resultados são benéficos.

Tabela 4 - Protocolo proposto para a investigação na Unidade de Medicina da Reprodução (UMR) do CHCB

Tipo de estudo	Estudo prospetivo de intervenção
Amostra	Mulheres inférteis submetidas à FIV e ICSI, no Hospital Pêro da Covilhã, num período a determinar
Técnica	
<ul style="list-style-type: none">• Determinação dos níveis plasmáticos de vitamina(OH)D total (ergocalciferol e colecalciferol) em cada uma das mulheres, no momento de análise hormonal determinado pelo protocolo da unidade.• Após a determinação dos valores, dividir a amostra em 2 grupos, um composto pelas mulheres que apresentam níveis de 25(OH)D < 30 nmol/l (tomando-se como referência este valor como limiar inferior da normalidade) e outro com valores superiores.<ul style="list-style-type: none">• Grupo de mulheres com níveis séricos inferiores à normalidade subdividir, aleatoriamente, em dois. Num desses grupos proceder à suplementação com vitamina D.• Medir novamente o valor de vitamina D no sangue e, neste momento, também no FF, no dia da punção dos oócitos (utilizando-se o líquido excedente), cerca de 15 dias depois da 1ª análise, consoante a resposta individual.<ul style="list-style-type: none">• Realizar ecografia e quantificar os níveis de βhcG para avaliar quais as mulheres que conseguiram engravidar e comparar o número total entre os diferentes grupos.	

Dadas as divergências quanto aos níveis séricos adequados de vitamina D na literatura, propõe-se a adoção dos utilizados como referência no laboratório do CHCB, que considera como limiar mínimo de normalidade níveis de vitamina D de 30nmol/L, por irem ao encontro de algumas das recomendações propostas na literatura(12).

No que diz respeito à suplementação, por ausência de dados esclarecedores, existe alguma dificuldade na definição da dose mais apropriada para tentar melhorar o sucesso da PMA nas mulheres com baixos níveis de vitamina D. Com base em dados canadenses(82), tem-se como prudente a suplementação com 2000UI, dado o curto período de administração, mesmo independentemente do valor sérico inicial de 25(OH)D, sem risco de hipervitaminose.

O período de suplementação, também por ausência de estudos nesta área, será um pouco arbitrário, por não se saber, ao certo, em que fase do desenvolvimento folicular a vitamina D pode atuar. Como tal, e porque o objetivo é melhorar o sucesso da PMA com suplementação após a detecção dos valores séricos de vitamina D inferiores ao normal aquando da realização das análises hormonais, sugere-se a suplementação apenas desde esse momento. A duração da mesma diferirá consoante o período de tempo de análise. Assim, se o tempo for curto propõe-se uma suplementação que permita avaliar o efeito da mesma no sucesso dessas técnicas apenas na sua fase inicial, ou seja, na capacidade de engravidar. Como se pretende verificar se a intervenção se traduz em valores séricos adequados dessa vitamina, bem como a relação desses níveis com os do líquido folicular, e de modo a evitar análises adicionais às do protocolo já definido no hospital em causa, recomenda-se que a suplementação decorra até ao momento da punção dos oócitos, altura em que, de acordo com o habitual protocolo da unidade se procede a uma outra análise sanguínea e se recolhe o líquido folicular.

Foi feito um levantamento das várias formas farmacêuticas de vitamina D em Portugal. Na seleção de qual a administrar sugere-se a exclusão de todas as que se apresentem combinadas com qualquer outra substância, optando-se, por motivos de segurança e de comodidade, pela administração via oral. A escolha do colecalciferol (Vigantol) deve-se ao fato de ser o único fármaco que corresponde a uma das formas de vitamina D avaliadas neste estudo. Por outro lado, como a produção sintética de vitamina D3 é efetuada de modo similar à forma produzida naturalmente na pele, diferentemente da vitamina D2(83), pode induzir menor risco de toxicidade.

Como não existem critérios standard para reportar os resultados, incluindo o sucesso das técnicas, dos estudos em infertilidade, é difícil a formulação de uma hipótese concreta acerca da melhoria que se poderia conseguir, nos resultados de PMA, com níveis séricos normais de vitamina D. Como tal, considera-se adequado assumir os valores do estudo de Ozkan(16), onde se encontrou uma percentagem de gravidez entre as mulheres com os níveis mais altos de vitamina D de 47% e entre as com níveis inferiores de 20%. Desta forma, para se detetar uma diferença de 27%, com um “power” de 80% e alfa de 0,05 seriam necessárias pelo menos 102 pacientes.

Seria também benéfico que neste mesmo estudo se doseassem paralelamente os níveis de cálcio e fósforo, no intuito de obter correlações mais credíveis e diferenciar os papéis de cada um dos fatores. A avaliação dos valores séricos destes nutrientes e da vitamina D no homem

também é promissora. Dado a inexistência de estudos que comparem esses valores com o sucesso reprodutivo propõe-se que se faça também essa análise neste estudo e, inclusive que se compare os valores com os do líquido seminal.

7 - Conclusão

Não obstante a ausência de consenso acerca dos limites de normalidade dos níveis séricos de vitamina D, considerando os mais divulgados observou-se uma elevada prevalência de deficiência de vitamina D nos estudos analisados.

Apesar das recentes descobertas promissoras, dada a etiologia multifatorial da infertilidade, é difícil concluir acerca do papel de um único nutriente na sua gênese. Além disso, embora exista uma base fisiopatológica para um possível papel da vitamina D na fertilidade e para serem os seus níveis séricos e foliculares marcadores do sucesso reprodutivo no geral e da PMA em particular, a heterogeneidade dos estudos e a ausência da definição de um limiar adequado para a concentração de vitamina D no FF obscurecem também a relação exata entre essas duas entidades.

Dado o aumento de prevalência da infertilidade, é de extrema relevância realizarem-se investigações respeitantes à definição de um nível sérico adequado de vitamina D para uma fertilidade normal, que favoreça não apenas a espontânea, como facilitando o sucesso de técnicas de reprodução medicamente assistida, seja ao nível da qualidade de embriões ou da implantação. Este esclarecimento seria um forte impulso para que os resultados obtidos nos diferentes estudos pudessem se traduzir em recomendações úteis e aplicáveis à população em geral, e às grávidas em particular.

Apesar das divergências nos resultados encontrados, a avaliação da reserva de vitamina D como parte da rotina propedêutica da infertilidade (sobretudo nas populações que possam ter fatores de risco associados, como uma baixa exposição solar ou uso regular de protetor solar, raça negra, IMC elevado ou baixa ingestão de vitamina D) e consequente suplementação adequada, poderá aumentar não só a taxa de sucesso de FIV e da gravidez no geral, como diminuir o risco de complicações obstétricas e neonatais, sendo necessários estudos adicionais para sustentar esta abordagem.

Enquanto se aguardam resultados de mais estudos que avaliem a relação entre a deficiência da vitamina D e vários estados patológicos, é importante não descurar a evidência existente de estudos laboratoriais e observacionais(1) acerca do papel desta vitamina na saúde geral e na reprodução em particular. Havendo, contudo, dados favoráveis à suplementação de vitamina D nas mulheres com níveis insuficientes submetidas a PMA, propõe-se a realização dum ensaio na UMR do CHCB com base nos resultados desta revisão sistemática. A análise da taxa de implantação (por determinação de níveis de hCG) e de gravidez clínica (por observação ecográfica de saco gestacional e, posteriormente, de embrião) será a mais apropriada para avaliar esses resultados, dadas as múltiplas influências de outros parâmetros ao longo da gravidez. Importa ter em conta, na definição desse protocolo, que ainda existe uma grande lacuna na definição dos níveis séricos mais apropriados e das doses de

suplementação mais indicadas em cada caso, essencialmente quando a exposição solar é inadequada ou a cor da pele limita a quantidade de vitamina D formada a partir da radiação ultravioleta, que garantam que existe um adequado suprimento desta vitamina durante a gravidez, ajustado às necessidades cruciais existentes durante este período. É assim imperioso rever o impacto da vitamina D na gravidez para fornecer recomendações baseadas em evidências acerca dessa suplementação, podendo este ensaio contribuir neste sentido.

Embora as pessoas com infertilidade possam não recuperar drasticamente os seus níveis de fertilidade exclusivamente com o tratamento com vitamina D, a suplementação com esta vitamina é fácil e barata podendo ser muito benéfica em termos de saúde reprodutiva, mesmo quando realizada por períodos curtos, como os de tratamento em PMA. Deverão, porém, ser investigados os possíveis efeitos negativos dos níveis muito elevados de vitamina D e precisar o seu limiar superior(63).

Apesar do muito que não está claro sobre os diferentes papéis da vitamina D na saúde no geral e na reprodução em particular, nomeadamente na PMA, existe evidência suficiente para permitir afirmar que assume papel de marcador clinicamente promissor nestas áreas, e possivelmente noutras também.

Justifica-se, pois, o ensaio planeado e interventivo na UMR. Porém se poderá clarificar algumas das questões ainda por esclarecer, existirão outras tantas que necessitarão de outras abordagens. Poderá a vitamina D, pelo seu papel no sistema imune, influenciar o sucesso dessas técnicas? Será que o fato desta vitamina influenciar a decidualização é o principal responsável ou o de poder influenciar a esteroidogénese e o desenvolvimento folicular? Existirá alguma relação entre a insuficiência de vitamina D e complicações da gravidez, como a pré-eclâmpsia e a diabetes gestacional? Permitirá a avaliação dos níveis séricos de 25(OH)D durante a gravidez correlacioná-los com os resultados perinatais ou dever-se-ão ter em conta essencialmente os valores pré-concepcionais? E, naturalmente, qual o impacto desta vitamina na técnicas de PMA, considerando como sucesso das mesmas o nascimento de um bebé saudável? Estas e outras questões permanecem por responder mas é especulável que, apesar das dificuldades da sua resolução, sejam esclarecidas dentro de relativamente pouco tempo, dada a rápida proliferação de materiais acerca desta vitamina, recentemente descoberta como uma “hormona da boa saúde”.

Bibliografia

1. Wagner CL, Taylor SN, Dawodu A, Johnson DD, Hollis BW. Vitamin D and its role during pregnancy in attaining optimal health of mother and fetus. *Nutrients*. 2012;4(3):208-30.
2. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. 2010;31(12):1027-34.
3. Alpert PT, Shaikh U. The effects of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems. *Biol Res Nurs*. 2007;9(2):117-29.
4. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3-5):316-21.
5. Murguía-Peniche T. Vitamin D, vitamin A, maternal-perinatal considerations: old concepts, new insights, new questions. *J Pediatr*. 2013;162(3 Suppl):S26-30.
6. Johnson LE, DeLuca HF. Vitamin D receptor null mutant mice fed high levels of calcium are fertile. *J Nutr*. 2001;131(6):1787-91.
7. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):53-8.
8. Gilchrist BA. Sun exposure and vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):570S-7S.
9. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(1):50-60.
10. Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, Plebani M, Shoenfeld Y, Wang TJ, et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev*. 2010;9(11):709-15.
11. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009;19(2):73-8.
12. Lanham-New SA, Buttriss JL, Miles LM, Ashwell M, Berry JL, Boucher BJ, et al. Proceedings of the Rank Forum on Vitamin D. *Br J Nutr*. 2011;105(1):144-56.
13. Heaney RP. Vitamin D in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(5):1535-41.
14. Lewis S, Lucas RM, Halliday J, Ponsonby AL. Vitamin D deficiency and pregnancy: from preconception to birth. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1092-102.
15. Camargo CA, Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, Epton MJ, et al. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics*. 2011;127(1):e180-7.
16. Ozkan S, Jindal S, Greenesid K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, et al. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1314-9.
17. Lapillonne A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Med Hypotheses*. 2010;74(1):71-5.
18. Yu CK, Sykes L, Sethi M, Teoh TG, Robinson S. Vitamin D deficiency and supplementation during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(5):685-90.
19. Hollis BW, Johnson D, Hulsey TC, Ebeling M, Wagner CL. Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. *J Bone Miner Res*. 2011;26(10):2341-57.
20. Johnson DD, Wagner CL, Hulsey TC, McNeil RB, Ebeling M, Hollis BW. Vitamin D deficiency and insufficiency is common during pregnancy. *Am J Perinatol*. 2011;28(1):7-12.
21. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet*. 1982;1(8263):74-6.
22. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet*. 1989;2(8671):1104-5.
23. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008;29(6):726-76.
24. Alvarez JA, Ashraf A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol*. 2010;2010:351385.
25. Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D and fertility: a systematic review. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(5):765-78.

26. Yildizhan R, Kurdoglu M, Adali E, Kolusari A, Yildizhan B, Sahin HG, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;280(4):559-63.
27. Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg F, Hexeberg S, Moan J. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticancer Res.* 2009;29(9):3713-20.
28. Kamycheva E, Joakimsen RM, Jorde R. Intakes of calcium and vitamin d predict body mass index in the population of Northern Norway. *J Nutr.* 2003;133(1):102-6.
29. Michaëlsson K, Baron JA, Snellman G, Gedeberg R, Byberg L, Sundström J, et al. Plasma vitamin D and mortality in older men: a community-based prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(4):841-8.
30. Halloran BP, DeLuca HF. Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. *J Nutr.* 1980;110(8):1573-80.
31. Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, et al. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13):7498-503.
32. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* 1997;16(4):391-6.
33. Kovacs CS, Woodland ML, Fudge NJ, Friel JK. The vitamin D receptor is not required for fetal mineral homeostasis or for the regulation of placental calcium transfer in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(1):E133-44.
34. Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology.* 2000;141(4):1317-24.
35. Sun W, Xie H, Ji J, Zhou X, Goltzman D, Miao D. Defective female reproductive function in 1,25(OH)₂D-deficient mice results from indirect effect mediated by extracellular calcium and/or phosphorus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(6):E928-35.
36. Liu NQ, Hewison M. Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Arch Biochem Biophys.* 2012;523(1):37-47.
37. Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L, et al. Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Horm Metab Res.* 2010;42(10):754-7.
38. Sun T, Zhao Y, Mangelsdorf DJ, Simpson ER. Characterization of a region upstream of exon I.1 of the human CYP19 (aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells. *Endocrinology.* 1998;139(4):1684-91.
39. Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jørgensen A, Rajpert-De Meyts E, Kristensen DM, Jørgensen N, et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Hum Reprod.* 2010;25(5):1303-11.
40. Uhland AM, Kwiecinski GG, DeLuca HF. Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats. *J Nutr.* 1992;122(6):1338-44.
41. Wojtusik J, Johnson PA. Vitamin D regulates anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells of the hen. *Biol Reprod.* 2012;86(3):91.
42. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner B, Willett WC. A prospective study of dairy foods intake and anovulatory infertility. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1340-7.
43. Ott J, Wattar L, Kurz C, Seemann R, Huber JC, Mayerhofer K, et al. Parameters for calcium metabolism in women with polycystic ovary syndrome who undergo clomiphene citrate stimulation: a prospective cohort study. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(5):897-902.
44. Wehr E, Trummer O, Giuliani A, Gruber HJ, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(5):741-9.
45. Wehr E, Möller R, Horejsi R, Giuliani A, Kopera D, Schweighofer N, et al. Subcutaneous adipose tissue topography and metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *Wien Klin Wochenschr.* 2009;121(7-8):262-9.
46. Wehr E, Pilz S, Schweighofer N, Giuliani A, Kopera D, Pieber TR, et al. Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(4):575-82.
47. Wehr E, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Effect of vitamin D₃ treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. *J Endocrinol Invest.* 2011;34(10):757-63.

48. Somigliana E, Panina-Bordignon P, Murone S, Di Lucia P, Vercellini P, Vigano P. Vitamin D reserve is higher in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2007;22(8):2273-8.
49. O'Brien MA, Jackson MW. Vitamin D and the immune system: beyond rickets. *Vet J.* 2012;194(1):27-33.
50. Casteels K, Bouillon R, Waer M, Mathieu C. Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1995;4(4):313-8.
51. Du H, Daftary GS, Lalwani SI, Taylor HS. Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)₂D₃ in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2005;19(9):2222-33.
52. Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS. Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther.* 2000;7(16):1378-84.
53. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev.* 1997;18(6):832-72.
54. Zehnder D, Evans KN, Kilby MD, Bulmer JN, Innes BA, Stewart PM, et al. The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha-hydroxylase expression in human placenta and decidua. *Am J Pathol.* 2002;161(1):105-14.
55. Anagnostis P, Karras S, Goulis DG. Vitamin D in human reproduction: a narrative review. *Int J Clin Pract.* 2013;67(3):225-35.
56. Rudick B, Ingles S, Chung K, Stanczyk F, Paulson R, Bendikson K. Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2012;27(11):3321-7.
57. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr.* 1995;125(6 Suppl):1704S-8S.
58. Hyppönen E. Preventing vitamin D deficiency in pregnancy: importance for the mother and child. *Ann Nutr Metab.* 2011;59(1):28-31.
59. Chesney RW. Vitamin D and The Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin. *J Pediatr.* 2010;156(5):698-703.
60. Díaz L, Noyola-Martínez N, Barrera D, Hernández G, Avila E, Halhali A, et al. Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *J Reprod Immunol.* 2009;81(1):17-24.
61. Novakovic B, Sibson M, Ng HK, Manuelpillai U, Rakyan V, Down T, et al. Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. *J Biol Chem.* 2009;284(22):14838-48.
62. Møller UK, Strey M, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(7):862-8.
63. Christesen HT, Falkenberg T, Lamont RF, Jørgensen JS. The impact of vitamin D on pregnancy: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012;91(12):1357-67.
64. Pasco J, Wark J, Carlin J, Ponsonby A, Vuillermin P, Morley R. Maternal vitamin D in pregnancy may influence not only offspring bone mass but other aspects of musculoskeletal health and adiposity. *Medicine Hypotheses.* 2008;71(2):266-9.
65. Sabour H, Hossein-Nezhad A, Maghbooli Z, Madani F, Mir E, Larijani B. Relationship between pregnancy outcomes and maternal vitamin D and calcium intake: A cross-sectional study. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(10):585-9.
66. Rojansky N, Benshushan A, Meirsdorf S, Lewin A, Laufer N, Safran A. Seasonal variability in fertilization and embryo quality rates in women undergoing IVF. *Fertil Steril.* 2000;74(3):476-81.
67. Potashnik G, Lunenfeld E, Levitas E, Itskovitz J, Albutiano S, Yankowitz N, et al. The relationship between endogenous oestradiol and vitamin D₃ metabolites in serum and follicular fluid during ovarian stimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1992;7(10):1357-60.
68. Rudick B, Ingles SAFS, K. Chung, R. Paulson, Bendikson K. The role of vitamin D levels on IVF outcomes in donor-recipient cycles. *Fertil Steril.* 2011;95:S8.
69. Dubourdieu S, Freour T, Masson D, Dessolle L, Chaze B, Barriere P. Impact of Vitamin D deficiency on IVF outcome: an observational study. 2011; O-96.
70. Coffey JD, Hines EA, Starkey JD, Starkey CW, Chung TK. Feeding 25-hydroxycholecalciferol improves gilt reproductive performance and fetal vitamin D status. *J Anim Sci.* 2012;90(11):3783-8.

71. Firouzabadi R, Aflatoonian A, Modarresi S, Sekhvat L, MohammadTaheri S. Therapeutic effects of calcium & vitamin D supplementation in women with PCOS. *Complement Ther Clin Pract*. 2012;18(2):85-8.
72. Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, Safdarian L, Fallahi P, Mohajeri MR, et al. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;159(1):132-7.
73. Anifandis GM, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Liakos N, Pournaras S, et al. Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:91.
74. Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet*. 2013.
75. Garbedian KM, Boggild MM, Moody JM, E. Liu KM. Effect of vitamin D status on clinical pregnancy rates following in vitro fertilization. *Canadian Medical Association Journal Open*. 2013;1(2):77-82.
76. Viganò P, Lattuada D, Mangioni S, Ermellino L, Vignali M, Caporizzo E, et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):415-24.
77. Józwiak M, Teng C, Battaglia FC. Concentrations of monosaccharides and their amino and alcohol derivatives in human preovulatory follicular fluid. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(11):791-6.
78. Mahmoudi T, Gourabi H, Ashrafi M, Yazdi RS, Ezabadi Z. Calcitropic hormones, insulin resistance, and the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1208-14.
79. Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr Rev*. 2008;66(10 Suppl 2):S153-64.
80. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Stöcklin E, Sidelnikov E, Willett WC, Edel JO, et al. Oral supplementation with 25(OH)D3 versus vitamin D3: effects on 25(OH)D levels, lower extremity function, blood pressure, and markers of innate immunity. *J Bone Miner Res*. 2012;27(1):160-9.
81. Viljakainen HT, Saarnio E, Hytinantti T, Miettinen M, Surcel H, Mäkitie O, et al. Maternal vitamin D status determines bone variables in the newborn. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(4):1749-57.
82. Vitamin D supplementation: Recommendations for Canadian mothers and infants. *Paediatr Child Health*. 2007;12(7):583-98.
83. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.