MARIANNA DURANTE UNGER

Determinação dos níveis séricos de vitamina D em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nefrologia
Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Rosa Maria Affonso Moysés

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Unger, Marianna Durante
Determinação dos níveis séricos de vitamina D em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira / Marianna Durante Unger. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.
Área de concentração: Nefrologia.
Orientadora: Rosa Maria Affonso Moysés.

Descritores: 1.Vitamina D 2.Deficiência de vitamina D 3.Hormônio paratireóideo 4.Hiperparatireoidismo secundário 5.Doenças ósseas 6.Doença crônica

DEDICATÓRIA

Para minha família: pai, mãe, irmã e marido.

Ninguém um dia recebeu mais amor e apoio incondicional do que eu tive de vocês.

Eu também amo vocês.

DEDICATÓRIA

À Drª. Vanda Jorgetti, chefe deste grupo, que me aceitou e transmitiu-me seus conhecimentos. Acompanhá-la em toda sua sabedoria me fez crescer profissionalmente, mas, também, e principalmente, com seus exemplos de simplicidade, sinceridade e amor ao próximo, tornou-me uma profissional da saúde mais humana e consciente da importância social da profissão por mim escolhida. Minha admiração infinita e gratidão!

DEDICATÓRIA

À minha querida orientadora Drª. Rosa Maria Affonso Moysés –

V*ocê tem um dom verdadeiro de ensinar*.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre guiar meus passos ajudando-me a encontrar o melhor caminho a seguir. Com certeza, foi Ele que me guiou até aqui, colocando pessoas tão especiais ao meu lado.

Agradeço aos meus pais, razões de minha vida, exemplos de honestidade, perseverança, caráter e amor. Não sei como teria chegado até aqui sem a ajuda de vocês que participaram efetivamente do desenvolvimento deste projeto. Pai, a coleta de dados seria impossível sem a sua ajuda. Mãe, seus conselhos e sua paciência são muito importantes para mim. Obrigada por tudo, nunca vou esquecer todas as vezes que vocês abriram mão de seus compromissos para auxiliar nos meus, antes mesmo que eu solicitasse. Meu eterno agradecimento por toda a dedicação.

Meu companheiro, que durante este longo período se tornou meu marido tão amado. Obrigada por entender meus momentos de ausência, mergulhada em artigos e estatísticas, por entender minha agitação e meu nervosismo. Obrigada pela compreensão constante e apoio para o desenvolvimento deste projeto.

Minha irmã, Thaísa, muito obrigada por você ser, além de minha irmã, minha melhor amiga. Acho que você nem imagina como nossas conversas são importantes. Obrigada, também, ao meu cunhado Osvaldo, seu bom humor é contagiante.

Meu irmão de coração, Rogério que sempre foi um exemplo de que com coragem e dedicação pode se chegar bem longe. A minha cunhada Lílian e a nossa pequena Giulianna, por todo carinho que recebo de vocês em todos os momentos.

Minha admiração e gratidão especial a quem acompanhou cada detalhe deste projeto, Dr^{a}. Rosa Maria Affonso Moysés. Lembro exatamente do dia em que você disse-me que seria minha orientadora. Um grande presente. Obrigada por sua paciência e constante incentivo, por tornar o desenvolvimento deste estudo um processo prazeroso. Obrigada não somente por me orientar, mas, também, por participar efetivamente em todas as fases da tese.

À Dr^{a}. Lílian Cuppari, por lembrar, confiar e indicar-me a este grupo. Por ser um exemplo de nutricionista e mostrar a importância da nutrição de maneira tão competente. Sei de seu “carinho” pela vitamina D, assim como o meu. Suas

sugestões e colaboração, principalmente no exame de qualificação, foram fundamentais para o aprimoramento da presente tese.

À Dr[a]. Ana Lúcia Sassaki a ao Dr. Paulo A. Lotufo, pela confiança depositada neste trabalho, disponibilizando o Hospital Universitário – USP para coleta de dados.

À Maria Cláudia T. Magalhães e toda a equipe do laboratório de coleta do Hospital Universitário- USP. Obrigada por abrirem as portas de seu local de trabalho e por me ajudarem na difícil missão de coletar dados para a pesquisa.

À Dr[a]. Silvia Titan, por auxiliar com todo seu conhecimento estatístico. Sua colaboração foi muito importante e ajudou a engrandecer este projeto.

A todos os pós-graduandos do Grupo de Osteodistrofia Renal que tive a oportunidade de conviver durante estes anos, a amiga Ana Ludimila, Bia, Juliana, Daniela, Melani, Andréia, Rodrigo B., Rodrigo A., Cris Karohl, Cristiane, Luciene. Concluir uma pós-graduação é um sonho que alimentamos. Quando chega a hora, as responsabilidades e as obrigações são muitas, e, quando passa, muito mais que a sensação de dever cumprido sentimos um vazio e surgem novos planos e projetos. Viemos de diferentes lugares, cidades e Estados, alguns chegando e outros saindo, mas o importante é que todos ganharam amigos e pessoas queridas.

Às biólogas Luciene e Fabiana, ao Vagner e a Meire, sempre dispostos a ajudar nas mais diferentes missões.

À Luciene e Márcia, responsáveis pelas dosagens realizadas nesta pesquisa no laboratório de hormônios do Hospital das Clínicas. Obrigada pela disponibilidade e paciência em todas as confirmações dos resultados.

A todos os voluntários, fundamentais na pesquisa. Sem a boa vontade e disponibilidade de todas estas pessoas a realização deste trabalho seria impossível. OBRIGADA!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq - que me concedeu uma bolsa durante a realização deste doutorado, fato este que muito contribuiu para viabilização da presente tese.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – que concedeu bolsa de auxílio à pesquisa e possibilitou desta forma a realização deste projeto.

E finalmente, de maneira geral, gostaria de agradecer todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a elaboração deste trabalho. Acredito que qualquer trabalho científico só se realiza com a dedicação de um grupo de pessoas e este não foi diferente.

"*Quando você quer alguma coisa, todo o Universo conspira para que você realize o seu desejo*" (Paulo Coelho)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referência: adaptado do *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva da Souza Aragão, Sueli Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO..... 01

2 OBJETIVO..... 24

2.1 Objetivo geral..... 24

2.2 Objetivos específicos..... 24

3 MÉTODOS..... 25

3.1 Comitê de Ética..... 25

3.2 Voluntários..... 25

3.3 Critérios de inclusão e exclusão..... 26

3.4 Formulário da pesquisa..... 26

3.4.1 Dados de identificação..... 26

3.4.2 História clínica..... 26

3.4.3 Etnia..... 27

3.4.4 Estilo de vida..... 27

3.5 Parâmetros antropométricos..... 27

3.6 Amostras de sangue..... 28

3.7 Dosagens bioquímicas..... 28

3.8 Dosagem e classificação da vitamina D..... 29

3.9 Segunda coleta: análise após verão..... 30

3.10 Análise estatística..... 30

4 RESULTADOS..... 32

4.1 Primeira análise- após inverno..... 32

4.1.1 Características da amostra..... 32

4.1.2 Análise dos fatores preditivos dos níveis séricos de 25 vitamina D..... 36
4.1.3 Análise dos fatores associados à hipovitaminose D 41
4.2 Segunda análise – após verão..... 45
4.3 Paratormônio..... 54
4.3.1 Análise dos fatores preditores dos níveis séricos de paratormônio..... 54
4.3.2 Análise dos fatores associados ao hiperparatiroidismo secundário..... 57
4.4 Associação 25 vitamina D e PTH..... 60
5 DISCUSSÃO..... 62
6 CONCLUSÃO..... 80
7 ANEXOS..... 81
8 REFERÊNCIAS..... 90

LISTA DE ABREVIATURAS

25(OH)D	25-hidroxivitamina D, calcidiol
1,25$(OH)_2$D	1,25-dihidrixivitamina D, calcitriol
HPTS	hiperparatiroidismo secundário
Et al.	e outros
UVB	raios ultravioleta tipo B
DMO	densidade mineral óssea
UI	unidade de medida internacional
DBP	proteína transportadora de vitamina D
PTH	paratormônio
CaSR	receptor sensível ao cálcio
RNA*m*	ácido ribonucleico mensageiro
FGF-23	fator de crescimento de fibroblasto-23
GH	hormônio do crescimento
IGF-1	fator de crescimento semelhante a insulina
VDR	receptor nuclear de vitamina D
RXR-VDR	complexo receptor-esteróide
RANKL	fatores de ativação nuclear
RANK	Receptores dos fatores de ativação nuclear
TLR 1/2	receptores *toll-like* 1/2
PCR	proteína C reativa
IL6	interleucina 6
DM	*diabetes mellitus*
EM	esclerose múltipla
TSH	hormônio estimulador da tireóide
TGF-α	fator de crescimento tumoral alfa
DII	doenças inflamatórias intestinais
EAI	encefalomielite auto-imune
DRIs	*dietary reference intakes*
AI	referência para ingestão adequada

RDA	cota diária recomendada
EUA	Estados Unidos da América
CPBA	*competitive protein binding assay*
RIA	*radioimmunoassay*
HPLC	*competitive protein binding assay after purification by high-performance liquid chromatography*
HU	hospital universitário
IMC	índice de massa corporal
OMS	organização mundial de saúde
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
M	sexo masculino
F	sexo feminino
IBGE	instituto brasileiro de geografia e estatística
vs.	*versus*
HAS	hipertensão arterial sistêmica

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
%	percentual
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
>	maior
<	menor
±	mais ou menos, aproximadamente
nmol/ml	nanomol por microlitro
ng/ml	nanograma por microlitro
mg/dl	miligrama por decilitro
UI	Unidade internacional
U/L	Unidades por litro
g/L	Grama por litro
pg/ml	Picograma por microlitro
µg	micrograma
Kg	kilograma
Kg/m^2	kilograma por metro quadrado
°C	graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Síntese e catabolismo da vitamina D..... 08

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos dados bioquímicos..... 29
Quadro 2 - *Status* de 25(OH)D em estudos populacionais com adultos (> 15 anos) em ordem de latitude..... 64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos valores de 25(OH)D (ng/ml) na amostra estudada..... 35

Gráfico 2- Distribuição dos valores de 25Dlog na amostra estudada..... 35

Gráfico 3 - Correlação entre os níveis de 25(OH)D e PTH..... 36

Gráfico 4 - Correlação entre os níveis de 25(OH)D e IMC..... 37

Gráfico 5 - Correlação entre os níveis de 25(OH)D e idade..... 37

Gráfico 6 - Níveis de 25(OH)D (ng/ml) de acordo com a cor da pele..... 38

Gráfico 7 - Níveis de 25(OH)D (ng/ml) de acordo com IMC (Kg/m²)..... 39

Gráfico 8 - Distribuição do incremento de 25(OH)D após o verão na amostra estudada..... 48

Gráfico 9 - Correlação entre os níveis de PTH e IMC..... 54

Gráfico 10 - Correlação entre os níveis de PTH e FA..... 55

Gráfico 11 - Correlação entre os níveis de PTH e idade..... 55

Gráfico 12 - Correlação entre os níveis de PTH e fósforo..... 56

Gráfico 13 - Curva ROC entre os níveis séricos de 25(OH)D e a presença de hiperparatiroidismo secundário..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Causas da hipovitaminose D..... 15

Tabela 2 - Variáveis demográficas e bioquímicas dos voluntários estudados..... 33

Tabela 3 - Regressão linear - Análise univariada das variáveis associadas à vitamina D..... 40

Tabela 4 - Regressão linear - Análise multivariada das variáveis preditivas da vitamina D..... 40

Tabela 5 - Regressão linear - Análise multivariada das variáveis preditivas da vitamina D excluindo a glicemia..... 41

Tabela 6 - Prevalência de hipovitaminose D de acordo com diferentes pontos de corte..... 41

Tabela 7 - Características demográficas e bioquímicas dos voluntários com insuficiência de 25 vitamina D..... 43

Tabela 8 - Regressão logística: Análise univariada dos fatores associados à hipovitaminose D..... 44

Tabela 9 - Regressão logística: Análise multivariada dos fatores associados hipovitaminose D..... 44

Tabela 10 - Comparação das variáveis demográficas e bioquímicas após o inverno entre os voluntários na primeira e segunda coleta de dados..... 46

Tabela 11 - Média das variáveis bioquímicas pesquisadas após o inverno e verão..... 47

Tabela 12 - Prevalência de hipovitaminose D de acordo com diferentes pontos de corte..... 48

Tabela 13 - Características demográficas e bioquímicas dos voluntários com insuficiência de 25 vitamina D após o verão..... 50

Tabela 14 - Variáveis demográficas e bioquímicas após inverno de acordo com a variação de vitamina D..... 52

Tabela 15 - Regressão logística: Análise univariada dos fatores preditivos da

normalização após o verão..... 53
Tabela 16 - Regressão logística: Análise multivariada dos fatores associados à normalização dos níveis séricos de vitamina D após o verão..... 53
Tabela 17 - Regressão linear - Análise univariada das variáveis associadas ao paratormônio..... 56
Tabela 18 - Regressão linear - Análise multivariada das variáveis associadas ao Paratormônio..... 57
Tabela 19 - Características demográficas e bioquímicas dos voluntários de acordo com níveis de PTH (pg/ml)..... 58
Tabela 20 - Regressão logística - Análise univariada das variáveis associadas ao hiperparatiroidismo secundário..... 59
Tabela 21 - Regressão logística - Análise multivariada das variáveis associadas ao hiperparatiroidismo secundário..... 59
Tabela 22 - Prevalência de hiperparatiroidismo secundário entre os voluntários pesquisados de acordo com 25(OH)D..... 60
Tabela 23 - Prevalência de hiperparatiroidismo secundário entre os voluntários pesquisados no inverno e verão..... 61

Unger MD. *Determinação dos níveis séricos de vitamina D em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira* (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

A insuficiência de vitamina D (25(OH)D < 30 ng/ml) é frequentemente subdiagnosticada, especialmente em paises onde a radiação solar é considerada suficiente. A diminuição desse hormônio está relacionada ao desenvolvimento de alterações ósteo-metabólicas, hiperparatireoidismo secundário (HPTS) e maior risco de doenças crônicas. OBJETIVO: Determinar os níveis de 25(OH)D e sua relação com o metabolismo mineral em uma amostra de voluntários clinicamente estáveis imediatamente após o inverno e verão. MÉTODO: Corte transversal em São Paulo, 603 voluntários (118M e 485F) entre 18-90 anos (47,8 $\pm$ 13,4) selecionados no Hospital Universitário- USP em setembro e outubro de 2006. Posteriormente, no período de março e abril de 2007, foram reconvocados para coleta de sangue 209 voluntários (31M e 178F) entre 18-81 anos (47,4 $\pm$ 11,5). Hipovitaminose D foi considerada quando <30 ng/ml e HPTS quando <87 pg/ml. RESULTADOS: Após o inverno o valor médio de 25(OH)D foi de 21,4 (16,2 - 28,7) ng/ml e 77,4% dos indivíduos apresentaram hipovitaminose D. Os negros apresentaram níveis de 25(OH)D reduzidos quando comparados aos brancos (p = 0.019). A vitamina D se associou a idade (β = -0,07, p = 0,03) e a cor da pele (β = 2,16, p = 0,02). A insuficiência de vitamina D foi associada ao paratormônio (β = 0,014, p = 0,011). Foi verificado aumento significativo nos níveis de 25(OH)D após o verão [22,0 (16,6 – 28,8) vs. 34,0 (26,1 – 43,5), p < 0.001], com conseqüente redução no PTH. As prevalências de hipovitaminose D e HPTS foram menores após o verão. A normalização dos níveis séricos de vitamina D na segunda análise foi dependente da idade (β = -0,049, p = 0,03). O HPTS foi associado ao clearance de creatinina (β = 0,20, p < 0,001). Uma menor prevalência da HPTS foi demonstrada quando 25(OH)D > 40 ng/mL (p = 0,027). CONCLUSÃO: Foi verificada maior prevalência de hipovitaminose D e HPTS após o inverno. Esta prevalência foi reduzida, mas não sanada após o verão. Níveis $\geq$ 40 ng/mL estão associados à menor prevalência de HPTS. Nossos dados sugerem a necessidade de implantação de políticas públicas de monitorização da deficiência da vitamina D nas populações sob maior risco e suplementação nos casos em que isto seja necessário.

Descritores: 1. Vitamina D 2. Deficiência de vitamina D 3. Hormônio paratireóideo 4. Hiperparatiroidismo secundário 5. Doenças ósseas 6. Doenças crônicas.

Unger MD. *Determination of the vitamin D levels in healthful individuals of the Brazilian population* (thesis). São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.

Vitamin D insufficiency (25(OH)D <30 ng/mL) is frequently under-diagnosed, mainly in countries where solar radiation is abundant. The reduction of this hormone is related to the development of bone metabolic alterations, secondary hyperparathyroidism (SHPT) and greater risk of chronic illnesses. OBJECTIVE: To evaluate the status of vitamin D and the relationship of circulating 25(OH)D with serum parameters of mineral metabolism in the cohort of healthy volunteers after the winter and summer. METHODS: Cohort study in São Paulo (SP), 603 volunteers (118M and 485W), between 18-90 years (47.8 $\pm$ 13.4) selected in the University Hospital in September and October of 2006. Later, in the period of March and April of 2007, they had been contacted for new blood collection, 209 volunteers (31M and 178F) between 18-81 years (47.4 + 11.5). Hypovitaminosis D was when 25(OH)D < 30ng/mL and SHPT was considered when PTH > 87pg/mL. RESULTS: After the winter, the average value of 25(OH)D was 21.4 ng/mL (16.2 – 28.7) and 77.4% of the individuals had presented vitamin D deficiency. The afro-Americans presented levels of 25(OH)D reduced when compared with the Caucasians (p = 0.019). Vitamin D was dependent on age (β = -0.07, p = 0.03) and the color of the skin (β = 2.16, p = 0.02). Vitamin deficiency D was associated with PTH (β = 0.014, p = 0.011). Significant increase in the levels of 25(OH)D was observed after summer [22.0 (16.6 – 28.8) *vs*. 34.0 (26.1 – 43.5), p<0.001] with consequent reduction in the PTH. The prevalence of hypovitaminosis D and SHPT decreased after summer. The normalization of the vitamin D levels in the second analysis was dependent on age (β = -0.049, p = 0.03). The SHPT was associated to creatinine clearance (β = 0.20, p < 0.001). Lower prevalence of the SHPT was demonstrated when 25(OH)D $\geq$ 40ng/mL (p = 0.027). CONCLUSION: In SP, after winter, a significant prevalence of hypovitaminosis D and SHPT was observed. This prevalence was reduced, but not solved after summer. Levels $\geq$ 40 ng/mL were associated with a lower prevalence of HPTS. Our data suggest that our country needs to establish a permanent monitoring of serum vitamin D in selected populations and treat those who are at a higher risk of hypovitaminosis D.

Descriptors: 1. Vitamin D 2. Vitamin D deficiency 3. Parathyroid hormone 4. Hyperpatathyroidism secondary 5. Bone disease 6. Chronic disease.

1. INTRODUÇÃO

O termo "vitamina D" é utilizado para representar um grupo de hormônios esteróides com diferentes graus de atividade, mas com ações biológicas semelhantes.[1]

A vitamina D é considerada um nutriente essencial, que pode ser obtido através de produção endógena (por exposição solar) e obtenção exógena (dieta e alimentos fortificados). Evidências demonstram uma alta prevalência de insuficiência e deficiência dessa vitamina, principalmente em sua forma de armazenamento [25-hidroxivitamina D; calcidiol; 25(OH)D; 25 vitamina D], sendo que essa redução é influenciada por diversos fatores, como idade, altitude, pigmentação da pele, tempo de exposição solar e ingestão alimentar. A forma ativa da vitamina D [1,25-dihidrixivitamina D; calcitriol; $1,25(OH)_2D$] age diretamente no metabolismo do cálcio e homeostase óssea e a diminuição desse metabólito é relacionada com o desenvolvimento de osteomalácia, osteoporose, raquitismo e risco aumentado de fraturas. A concentração de 25 vitamina D é considerada fator determinante na fisiopatologia do hiperparatiroidismo secundário (HPTS).[2] Atualmente, diversos estudos denotam que a redução no *status* da 25 vitamina D também está associada a maior risco de esclerose múltipla, câncer, doenças cardiovasculares e alterações imunológicas.

A principal limitação para o diagnóstico da hipovitaminose D está relacionada a dificuldades técnicas de dosagem e falta de padrões de referência de normalidade. No nosso país, não há até hoje nenhum estudo que tenha avaliado o padrão de normalidade da vitamina D. Sendo assim, também não temos nenhuma política de saúde que proponha medidas preventivas e curativas específicas para nossos habitantes, principalmente as prováveis populações de risco.[3,4]

Histórico

A vitamina D é uma molécula universalmente presente nos seres vivos e, embora chamada de vitamina, na realidade é um hormônio esteróide, por possuir um receptor nuclear e capacidade de regulação da expressão gênica. Ela é um dos primeiros esteróides a surgir ao longo da evolução, antes mesmo dos esteróides supra-renais e sexuais[1]. Durante a evolução, os fitoplânctons e zooplânctons

existentes nos oceanos por mais de 500 milhões de anos produziam vitamina D quando expostos a luz solar. A função da vitamina D nestas formas de vida iniciais ainda não está bem esclarecida, entretanto, mas acredita-se que o processo de fotossíntese da vitamina D foi utilizado para determinar a importância da luz solar para os organismos vivos.[1] O primeiro agente identificado foi designado como vitamina D_2 (ergocalciferol), ao passo que a estrutura da vitamina D_3 (colecalciferol) só foi descrita quatro ou cinco anos mais tarde por Horst & Reinhardt.[2]

A descoberta desta vitamina ocorreu no início do século vinte, e acredita-se que essa molécula desempenhou um papel fundamental na seleção, que isolou as várias etnias humanas cuja pele era mais ou menos pigmentada, e também que sua presença ou ausência condicionou a sobrevida ou o declínio de certas populações.[3,4]

As primeiras evidências sobre a necessidade de exposição solar para saúde humana foram descritas a partir da revolução industrial no norte europeu. Por volta do ano de 1900, arquivos mostram uma alta prevalência de raquitismo na Europa e nos Estados Unidos, principalmente na Holanda e em Boston, em 80% e 90% das crianças, respectivamente.[3,4]

Durante este período, diversas pesquisas foram desenvolvidas.[5] O tratamento era baseado principalmente no aumento na exposição solar, na utilização de luz artificial (lâmpadas de mercúrio) e fortificação alimentar. Neste período, os pesquisadores já tinham conhecimento de que os alimentos forneciam quantidades muito reduzidas de vitamina D. A primeira tentativa de fortificação alimentar relatada foi proposta por Steenbock[6] através do conceito de irradiar os alimentos com raios UVB. Posteriormente, iniciou-se a fortificação do leite com ergocalciferol (vitamina D_2). Esta simples fortificação foi essencial para erradicar o raquitismo em alguns países. Em 1930, a vitamina D era considerada um milagre e diversos produtos alimentares começaram a ser fortificados, incluindo pães, lanches e manteiga.[7]

Entretanto, após a II Guerra Mundial o processo de fortificação alimentar não foi adequadamente monitorado e uma quantidade excessiva foi acrescida em alguns tipos de leite, causando intoxicação entre crianças e adolescentes. Este fato fez com que a fortificação fosse banida em muitos países, o que se mantém até os dias de hoje. Atualmente, os Estados Unidos é o único país que produz uma quantidade significativa de alimentos fortificados com vitamina D.[7]

A alimentação fornece vitamina D_2 através de plantas e leveduras, e a vitamina D_3 na sua forma natural é obtida a partir de peixes gordurosos e óleo de fígado de peixe. Quando proveniente da alimentação, a vitamina D é absorvida juntamente com as gorduras no intestino delgado, auxiliada pela bile produzida no fígado. Após a absorção intestinal, a vitamina D é incorporada nos quilomicrons e transportada através do sistema linfático para a circulação.[7]

Síntese cutânea da vitamina D

Embora as funções fisiológicas da vitamina D em sua forma mais simples ainda não estejam totalmente compreendidas, já se reconhece que a síntese cutânea após exposição solar é um fator fundamental nos vertebrados que necessitam deste hormônio para aumentar a eficiência na absorção do cálcio dietético. A vitamina D_3 é encontrada em animais vertebrados na forma de 7-dehidrocolesterol (pró-vitamina D_3, precursor do colesterol). Durante a exposição solar, os fótons ultravioleta (UV-B) com energia entre 290 e 315 nm estimulam a fotólise do 7-dehidroxicolesterol até a formação da pré-vitamina D_3.[8]

Uma vez sintetizada, a pré-vitamina D_3 pode ser termicamente isomerizada a colecalciferol ou absorver radiação ultravioleta e formar isômeros biologicamente inertes (lumisferol e taquisferol); entretanto, a ingestão excessiva de vitamina D pode levar à intoxicação. O processo de síntese ocorre na epiderme, onde aproximadamente 50% da pré-vitamina D_3 é convertida em vitamina D_3 em até 2 horas. O prolongamento da exposição solar não aumenta a produção de pré-vitamina D_3 e sua síntese pode ser afetada por diversos fatores.[9]. Segundo Matsuoka *et al.*[10] o uso de filtro solar com fator de proteção 8 pode reduzir a produção de vitamina D_3 em 97,5%. Outro fator importante que diminui essa conversão é a melanina. Sabe-se que ela compete com o 7-dehidroxicolesterol por fótons ultravioleta.[1] A melanina humana surgiu como um fator de proteção para a produção excessiva de D_3, principalmente em populações mais próximas ao equador, sendo assim, um protetor solar natural. Este fator é evidenciado principalmente em negros, com baixa ingestão de vitamina D e que residem em países de alta latitude.[11,12]

A produção cutânea da vitamina D pode ainda ser influenciada pela latitude, pelo ângulo de incidência dos raios solares, sexo e pela idade.[1] Quando o ângulo da

irradiação solar se torna mais oblíquo, os fótons UVB são mais eficientemente absorvidos pela camada de ozônio da atmosfera, e, conseqüentemente, um menor número deles alcança a superfície da Terra. No inverno, diversos estudos denotam uma deficiência na conversão de 7-dehidrocolesterol em pré-vitamina D_3, principalmente em países de alta latitude.[13] Bargerlux & Heaney[14] descrevem a variação cíclica na concentração de vitamina D em função da temperatura e latitude, com picos no verão e redução significativa no inverno. Relatam também que uma única exposição à radiação solar é suficiente para produzir cerca de 10.000 UI de vitamina D_3, o que significa cinqüenta e vinte e cinco vezes acima da recomendação alimentar em adultos e idosos, respectivamente. Assim, uma rápida exposição solar equivale a 10.000 a 25.000 UI de vitamina D_3 por via oral.[15]

A exposição solar é a maneira mais efetiva de produção da vitamina D_3. Em pesquisa randomizada, comparando grupos que se expunham ou não ao sol, Sato *et al*[16] verificaram que aqueles que se expunham apresentavam níveis mais elevados de 25 vitamina D e maior densidade mineral óssea (DMO), assim como redução na incidência de fratura óssea quando comparado ao grupo não exposto.

Sabe-se que a carência de 25 vitamina D em idosos está relacionada com a síntese cutânea, sendo que a absorção intestinal da vitamina D não está diminuída. Os idosos têm diminuição na concentração de pró-vitamina D (7-dehidroxicolesterol).[17] Outras causas desta redução nos idosos seriam menor exposição solar, ingestão alimentar inadequada e interações medicamentosas. Esses fatores poderiam contribuir para a deficiência de vitamina D e, conseqüentemente, para a perda de massa óssea.

A obesidade também tem sido apontada como uma causa de deficiência de vitamina D. A associação entre aumento da adiposidade e redução da concentração sérica de 25 vitamina D foi descrita há mais de 30 anos. A hipótese primária para esta relação é o fato da vitamina D ser uma substância lipossolúvel que facilmente pode ser "seqüestrada" e estocada no tecido adiposo sendo que sua liberação para a circulação, em situações de necessidade, é muito lenta, pois indivíduos obesos apresentam lipólise reduzida.[18]

Mesmo com a associação bem determinada, atualmente diversos estudos questionam o papel da obesidade na deficiência de vitamina D. Estes questionamentos discutem a hipótese do tecido de gordura ser apenas um "estoque"

de vitamina D ou pela presença da enzima de ativação da vitamina D, 1-α hidroxilase, nas células adiposas, o que justificaria uma maior utilização local da 25 vitamina D. Outro fator importante é que os obesos se expõem pouco ao luz solar. A presença de 1-α hidroxilase nos adipócitos é um dado relevante, pois já foi descrito que sua atividade é semelhante a 1-α hidroxilase identificada nas células prostáticas, vasculares e, principalmente, no tecido renal.[19,20] Worstman *et al*[21], descrevem que o aumento na concentração sérica de 25 vitamina D é 53% menor em obesos quando comparados a voluntários eutróficos após exposição solar independente do conteúdo de precursor cutâneo de vitamina D.

Diversos estudos mostram uma diferença significativa nos níveis de 25 vitamina D entre homens e mulheres. As mulheres normalmente apresentam níveis reduzidos quando comparadas aos homens. Entretanto, a diferença fisiológica entre os dois sexos que podem justificar esta diferença ainda não está bem descrita.[18]

Visto os fatores que interagem com a síntese de vitamina D, para analisar a prevalência da hipovitaminose em populações é necessário dividir os indivíduos de acordo com a idade, localização geográfica e estação do ano em que vai se aplicar a pesquisa. Em 1992, McKenna[22] realizou uma metanálise, no qual revisou 117 trabalhos sobre os valores de normalidade de metabólitos da vitamina D em diferentes populações no período de 1971 a 1990. O autor relatou dificuldades para obter os resultados em algumas populações, como idosos saudáveis, devido ao pequeno número de pesquisas com esta população.

Metabolismo da vitamina D

Logo após a síntese nas células da epiderme ou absorção intestinal, a vitamina D penetra no leito capilar da derme, onde se liga a uma proteína transportadora de vitamina D (DBP). Esta ligação ocorre porque os metabólitos de vitamina D são moléculas lipossolúveis que devem ser transportados no plasma por proteínas plasmáticas. A DBP é uma proteína de alta afinidade, reduzido metabolismo hepático e excreção biliar, o que resulta em uma meia-vida longa. Sua concentração plasmática é vinte vezes maior que a concentração dos metabólitos de vitamina D. Os níveis de DBP não são regulados pela vitamina D, mas estão reduzidos nos casos de

doença hepática, síndrome nefrótica e desnutrição e aumentados na gestação e uso de estrógenos.[23]

No fígado, a vitamina D é hidroxilada formando a 25-hidroxivitamina D (calcidiol; 25 vitamina D) pela enzima 25-hidroxilase presente na mitocôndria hepática. Ao longo do tempo, foi considerado controverso se a 25 hidroxilação da vitamina D é realizada por uma ou duas enzimas e qual a localização desta enzima nas frações mitoncondriais ou microssomais do fígado. Segundo Jones, uma pesquisa recente estabeleceu que uma enzima mitocondrial humana (CYP27A1) e diversas microssomais citocromo P450s (incluindo CYP2R1, CYP3A4 e CYP2J3) são capazes de processar a 25 hidroxilação.[24] A 25 vitamina D apesar de apresentar pouca atividade biológica é a forma mais abundante, e portanto, o marcador do *status* de vitamina D em humanos. Este metabólito não sofre regulação hormonal, sendo substrato dependente; como conseqüência, o aumento na ingestão de vitamina D e/ou síntese cutânea acarreta um aumento de produção da 25 vitamina D.[18, 25,26]

Posteriormente, para se tornar ativa, a 25 vitamina D sofre nova hidroxilação no carbono 1 por uma outra enzima, a 1-α hidroxilase, presente principalmente nos rins. Esse processo ocorre na mitocôndria das células do túbulo proximal e resulta na formação da 1,25-dihidroxivitamina D.[15] O citocromo P450 CYP27B1 representa a enzima 1-α hidroxilase clonada a partir de experimentos com ratos em 1997. Sabe-se que esta enzima mitocondrial renal 1-α hidroxilase é formada por três proteínas: citocromo P450, ferredoxina e ferrodoxina redutase, sendo fortemente suprimida pela presença da $1,25(OH)_2D$ e estimulada pelo paratormônio (PTH).[24]

Apesar de ser o rim o principal sítio de ativação da 25 vitamina D, estudos recentes têm demonstrado que a enzima 1-α hidroxilase também é encontrada em queratócitos, testículos, cérebro, células ósseas, macrófagos, placenta, células prostáticas, células cancerígenas de cólon e em ilhotas pancreáticas.[26,27] Também já se demonstrou a expressão de 1-α hidroxilase em células paratireoideanas humanas.[27]

No rim, a atividade da 1-α hidroxilase é estreitamente regulada para manter a homeostase do cálcio. Por sua vez, o cálcio, pode regular a enzima diretamente, através de alterações no cálcio sérico ou indiretamente através do PTH. Atualmente não é bem definido o papel do receptor sensível ao cálcio (CaSR) na supressão direta da 1-α hidroxilase. O PTH e a restrição de fósforo também apresentam papel importante estimulando diretamente as células renais a produzirem 1-α hidroxilase. O

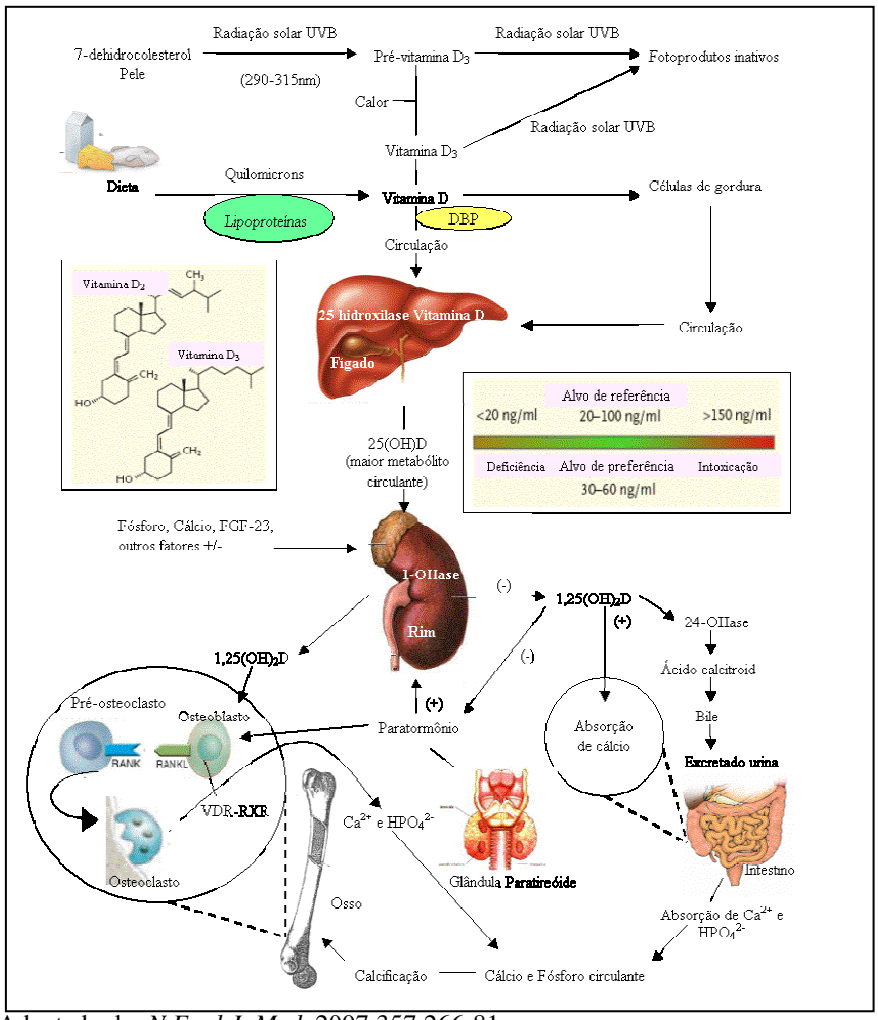
tratamento com $1,25(OH)_2D$ reduz o RNA*m* da 1-α hidroxilase; entretanto, evidências recentes descrevem que este fato se dá não por uma ação direta da $1,25(OH)_2D$, mas sim, por seu efeito na supressão do PTH.[24]

A regulação extrarenal da 1-α hidroxilase é diferente daquela encontrada nas células renais, pois resulta em ações autócrinas e parácrinas após a síntese de $1,25(OH)_2D$ e este é um conceito que vem ganhando ênfase nas últimas duas décadas. A produção ou a degradação de $1,25(OH)_2D$ nestes casos é controlada por fatores locais como citocinas e fatores de crescimento que otimizam os níveis de $1,25(OH)_2D$ para as ações específicas, ainda não bem descritas.[23]

As membranas celulares dos organismos responsivos à vitamina D contêm também uma segunda enzima, a 24-hidroxilase, que converte a 25 vitamina D em 24,25 dihidroxivitamina D, considerado um metabólito inativo.[18,28] A 24-hidroxilação da 25 vitamina D e $1,25(OH)_2D$ é o primeiro mecanismo e passo inicial da cascata metabólica de inativação e degradação dos metabólitos de vitamina D. Atualmente, sabe-se que a 24-hidroxilase é principalmente regulada pelo paratormônio (PTH) e a $1,25(OH)_2D$.[26]

Após o catabolismo da $1,25(OH)_2D$ em compostos hidrossolúveis, a vitamina D é excretada principalmente através da bile e da urina. O mecanismo de conversão da $1,25(OH)_2D$ em compostos biologicamente inativos e excretáveis previne a intoxicação de vitamina D e auxilia na regulação da calcemia, conforme ilustrado na FIGURA 1.[18]

FIGURA 1 - Síntese e catabolismo da vitamina D



Adaptado de: *N Engl J Med.* 2007;357:266-81.

Regulação corporal da vitamina D

Alguns fatores são importantes e atuam diretamente, estimulando ou suprimindo a síntese de vitamina D. Entre eles destacam-se o paratormônio (PTH), o fósforo e o fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23).[18]

O PTH é um hormônio produzido pelas glândulas paratireoideanas e que regula a homeostase do cálcio no organismo. Sua síntese é estimulada principalmente diante de hipocalcemia. Nessa situação, o PTH estimula a atividade da enzima 1-α hidroxilase aumentando a síntese de $1,25(OH)_2D$, que estimula a absorção intestinal de cálcio. A elevação do cálcio sérico, por sua vez, inibe a produção e secreção de PTH pelas células paratireoideanas.[29]

A concentração sérica de fosfato inorgânico influencia a síntese de $1,25(OH)_2D$ independente dos níveis de PTH. Assim, na deficiência de fósforo ocorre aumento da atividade da enzima 1-α hidroxilase e, ao contrário, em situações de elevação da carga de fósforo, a atividade dessa enzima é inibida. Dessa forma, a síntese de $1,25(OH)_2D$ é regulada promovendo maior ou menor absorção intestinal de fósforo.[30]

O fator de crescimento de fibroblasto 23 é um hormônio secretado pelos osteócitos que suprime a síntese da $1,25(OH)_2D$, suprimindo a transcrição da enzima 1-α hidroxilase, e estimula a fosfatúria, pela internalização do co-transportador sódio-fósforo e supressão da atividade da 1-α hidroxilase nas células renais, reduzindo a síntese de $1,25(OH)_2D$.[30,31]

Durante a gestação, lactação e crescimento os hormônios esteróides, prolactina, hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) estimulam a síntese renal de $1,25(OH)_2D$ com objetivo de suprir as necessidades de cálcio que estão aumentadas.[29]

Mecanismo de ação da vitamina D nos órgãos-alvo

A vitamina D exerce suas ações através de vias não genômicas e genômicas. Um espaço de tempo significativo é verificado entre a administração da $1,25(OH)_2D$ e a resposta do órgão-alvo. A via não genômica é responsável por gerar respostas rápidas, ainda não bem descritas. Provavelmente, a vitamina D atua estimulando proteínas nas membranas celulares responsáveis pelo controle de fluxo intracelular. Este mecanismo de ação é responsável, por exemplo, pelo estímulo rápido na absorção intestinal de cálcio.[1]

A ação genômica da vitamina D depende da ligação desta com o seu receptor nuclear (*vitamin D receptor*- VDR). O VDR é encontrado em todos os tecidos responsivos, tais como intestino delgado, cólon, osteoblastos, linfócitos T e B, ilhotas pancreáticas e em outros órgãos, como o cérebro, coração, pele, gônadas, próstata, mama e células mononucleares.[7] Este mecanismo de ação da vitamina D acontece quando a $1,25(OH)_2D$, após se dissociar da proteína de ligação da vitamina D (DBP), entra através da membrana celular por difusão simples e interage no núcleo celular com VDR, formando um complexo receptor-esteróide (RXR-VDR). A ativação

através dessa ligação possibilita a interação do RXR-VDR com genes responsivos à vitamina D ou na modulação de sua própria expressão gênica.[29]

Funções da vitamina D no organismo

A função clássica da vitamina D no organismo é sua ação no metabolismo mineral, evidenciada principalmente no intestino, nos ossos e nas paratireóides. Na ausência de vitamina D, somente 10 a 15% do cálcio e 60% do fósforo dietéticos são absorvidos, sendo que a ligação da $1,25(OH)_2D$ com o seu receptor no enterócito aumenta a eficiência de absorção intestinal do cálcio para 30 a 40% e do fósforo para 80%.[18]

No intestino, sua ação resulta em aumento da absorção de cálcio, atuando principalmente na porção proximal do intestino delgado, mas é provável que outros segmentos participem, pois possuem VDR.[29] A ligação da $1,25(OH)_2D$ ao VDR no enterócito estimula a síntese de RNA*m* da proteína de ligação do cálcio aumentando a captação do cálcio pela borda em escova, facilitando o seu transporte. Após a captação do cálcio pela borda em escova, proteínas intracelulares, como as proteínas de ligação do cálcio, ajudam no transporte deste mineral pela célula, enquanto enzimas contraluminais favorecem sua passagem para o fluido extracelular, havendo troca com o sódio. Várias enzimas dependentes de cálcio, como a fosfatase alcalina e a adenosina trifosfatase, também são estimuladas.[32,33] Estudos denotam que a redução na ingestão de cálcio estimula um "fator endógeno" de mensagem ao intestino e esqueleto, informando a necessidade de mobilização deste mineral. Esse "fator endógeno" posteriormente aumenta a concentração da $1,25(OH)_2D$.[33]

No tecido ósseo, a $1,25(OH)_2D$ apresenta duas diferentes vias de ação, uma direta nos osteoblastos estimulando a formação óssea e outra indireta nos osteoclastos aumentando a reabsorção óssea. A $1,25(OH)_2D$ no tecido ósseo é reconhecida pelos VDR presentes nos osteoblastos maduros. Esta ligação estimula a expressão de fatores de ativação nuclear (denominados *RANKL*) no osteoblasto que se ligam aos seus receptores (denominados *RANK*) presentes em pré-osteoclastos, o que induz a sua diferenciação em osteoclasto maduro. O osteoclasto maduro remove cálcio e fósforo do osso com objetivo de manter os níveis normais destes minerais na circulação; este processo é denominado reabsorção óssea.[18,29]

A $1,25(OH)_2D$ atua também nas células paratireoideanas através dos receptores de vitamina D alterando, dessa forma, a síntese e secreção de PTH. Sua principal ação é a inibição da transcrição do RNA*m* do pré-pró-PTH.[34] Deve-se ressaltar que essa supressão na secreção de PTH não ocorre de forma aguda. É necessário um período de uma a duas horas para que ocorra uma diminuição global da concentração de RNA*m* do pré-pró-PTH. Após 12 a 14 horas, a concentração sérica de PTH reduz-se de forma significativa.[23] Pesquisas recentes descrevem a associação inversa entre a concentração sérica de PTH e a 25 vitamina D. Como hoje se sabe que as células paratireoideanas possuem 1-α hidroxilase, a hidroxilação da 25 vitamina D ocorre dentro das paratireóides, inibindo a síntese de PTH.[23] Desta maneira, os níveis séricos de $1,25(OH)_2D$ não seriam os marcadores ideais da situação de carência ou excesso de vitamina D.[35]

A $1,25(OH)_2D$ já demonstrou uma multiplicidade de outras funções fisiológicas não relacionadas ao metabolismo ósseo denominadas de funções "não clássicas". Desta forma, a $1,25(OH)_2D$ pode exercer ações endócrinas, autócrinas e parácrinas e, direta ou indiretamente, controla mais de 200 genes.[29] Entre as ações não calcêmicas da vitamina D, investigou-se no passado a sua ação no tratamento de leucemias como um agente antineoplásico. Acredita-se que a produção local de $1,25(OH)_2D$ nas mamas, cólon, próstata entre outros tecidos, regula genes envolvidos na proliferação celular (*p21* e *p27*), assim como genes que inibem a angiogênese e induzem a diferenciação e apoptose, especialmente em situações patológicas.[36] Dusso *et al.*[23] descrevem que a indução por $1,25(OH)_2D$ do gene da proteína *p21* é suficiente para a diferenciação direta de monócitos em macrófagos maduros.

A eficácia da $1,25(OH)_2D$ no sistema endócrino é atribuída principalmente ao seu efeito pró-diferenciação em monócitos-macrófagos, células dentríticas e linfócitos. Também já é bem fundamentada a relação causal entre função de $1,25(OH)_2D$-VDR e a imunidade inata e adaptativa a infecções, sendo que infecções de repetição são comumente associadas ao raquitismo dependente de vitamina D e que o enfraquecimento do sistema imunológico acompanha a deficiência de $1,25(OH)_2D$ na doença renal crônica.[18,23,29]

A vitamina D é considerada também um potente imunomodulador local estimulado por macrófagos. Quando monócitos ou macrófagos são estimulados através de receptores *toll-like* 1/2 (TLR 1/2) por um agente infeccioso, como por

exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* ou por lipopolissacarídeos, há um estímulo na expressão de VDR e de 1-α hidroxilase. De acordo com Holick (2007), níveis de 25 vitamina D ≥ 30 ng/ml fornecem substrato suficiente para conversão local de 25 vitamina D em $1,25(OH)_2D$. Este, por sua vez, migra ao núcleo celular para estimular a produção de RNAm da catelicidina, um peptídeo capaz de promover a imunidade inata e destruição de agentes infecciosos. Esta produção local de por macrófagos ativados pode explicar a associação entre a hipovitaminose D com a maior suscetibilidade a infecções microbacterianas.[18,23] A $1,25(OH)_2D$ sintetizada por monócitos e macrófagos age também em linfócitos T possibilitando a síntese de citocinas e nos linfócitos B, na regulação das imunoglobulinas.[18,36,37]

Dados recentes denotam também que os níveis reduzidos de 25 vitamina D estão relacionados com situações de estresse metabólico como a inibição da síntese de renina, por ação renal direta, aumento na produção e sensibilidade da insulina e, principalmente, no aumento da contratibilidade miocárdica.[36,38,39]

O sistema renina-angiotensina apresenta um papel central na regulação da pressão arterial, eletrólitos e homeostase do volume corporal. Diversos estudos epidemiológicos e clínicos sugerem associação entre exposição solar inadequada e níveis reduzidos de 25 vitamina D com elevação da pressão arterial e atividade da renina plasmática.[40,41] Dusso *et al.*[23] denotam em sua revisão que camundongos VDR-*null* apresentam aumento na expressão de renina e na produção de angiotensina II levando a hipertensão, hipertrofia cardíaca e polidipsia.

A hipovitaminose D está associada a aumento de marcadores inflamatórios, incluindo a proteína C reativa (PCR) e interleucina-6 (IL6).[42] Estudos observacionais recentes demonstraram que há elevação nos níveis de PCR em voluntários com níveis reduzidos de vitamina D. Entretanto, os resultados após suplementação de vitamina D são conflitantes.[43,44]

Em modelos experimentais, a deficiência de vitamina D é associada a casos mais agressivos de *diabetes mellitus* (DM), provavelmente relacionados a anormalidades da função imune e aumento da resistência periférica à insulina. Os dados de um estudo epidemiológico na Finlândia mostram que o consumo elevado de vitamina D reduz em 80% o risco de diabetes tipo 1 em crianças.[45] A descoberta da atividade da 1-α hidroxilase nas células pancreáticas reforça possibilidade do controle autócrino na secreção de insulina pela $1,25(OH)_2D$.[18]

Atualmente, pesquisa-se a importância da $1,25(OH)_2D$ em outras enfermidades, como no tratamento da psoríase, esclerose múltipla (EM), nos seus efeitos na contratilidade miocárdica e ação muscular, na prevenção de doenças inflamatórias e na promoção da secreção do hormônio estimulador da tireóide (TSH).[37]

Mesmo já tendo seu papel descrito antes, foi na década de 80 que a vitamina D foi enfatizada na terapêutica de doenças de pele incluindo a psoríase. As propriedades antriproliferativas da $1,25(OH)_2D$ em queratócitos aumenta a expressão da citocina TGF-α resultando na inibição de sinais mitogênicos de outras citocinas. A imunosupressão das células de *Langerhans* pode ainda mediar a eficácia do esteróide no tratamento de melanoma e escleroderma. O complexo $1,25(OH)_2D$-VDR é ainda essencial para o desenvolvimento normal da pele e de cabelos. O papel fundamental do VDR, nestes casos, foi demonstrado pelo desenvolvimento de alopécia em pacientes com raquitismo resistente a vitamina D hereditário e em camundongos VDR-*null*.[46]

A atrofia da musculatura esquelética com anormalidades eletrofisiológicas na contração e relaxamento muscular ocorre na hipovitaminose D na doença renal crônica ou no tratamento prolongado com anticonvulsivantes. Estes defeitos podem ser atribuídos à redução do cálcio sérico; entretanto, há algumas evidências de estudos com camundongos VDR-*null* da ação direta da $1,25(OH)_2D$ no crescimento e diferenciação da musculatura esquelética.[23,47]

Holick descreve que viver em locais com alta latitude aumenta o risco de esclerose múltipla e doença de Crohn, ao passo que residir em locais com cerca de 35 graus de latitude nos primeiros 10 anos de vida reduz o risco de EM em 50%. Entre homens e mulheres, o risco de EM reduz 41% para cada aumento de 20 ng/mL na concentração sanguínea de 25 vitamina D acima de 24 ng/ml. Mulheres com ingestão de vitamina D acima de 400 UI/dia tinham redução no risco de desenvolver EM em 42%; resultados semelhantes foram verificados para artrite e osteoartrite.[18,29]

Em relação à eficácia da $1,25(OH)_2D$ na estabilização ou manutenção da tolerância imunológica, alguns estudos descritos por Dusso *et al.*[23] demonstraram a inibição da $1,25(OH)_2D$ por indução de doenças em estudos experimentais de encefalomielite auto-imune (EAI), tiroidites, doenças inflamatórias intestinais (DII), lúpus eritematoso sistêmico e artrite.

A forte associação entre o *status* de vitamina D e a suscetibilidade a infecções, doenças autoimunes, comprometimento do sistema imunológico e celular gera grandes questionamentos dos estudiosos deste hormônio. Alguns autores relatam a importância de se determinar valores de referência populacionais não somente com o objetivo de manter o equilíbrio do metabolismo mineral, mas visando manter níveis que assegurem as diversas funções da vitamina D.[18, 23, 48]

Hipovitaminose D: causas, conseqüências e diagnóstico

A hipovitaminose D é um problema de saúde coletiva mundial, negligenciado mesmo após diversos estudos. Sua elevada prevalência, principalmente em populações de risco, cursa com efeitos adversos à saúde óssea, como osteoporose, osteopenia, osteomalácia, aumento do risco de fraturas, raquitismo e má formação de condrócitos em crianças.[49] Além disto, dos pacientes diagnosticados com fibromialgia, síndrome do cansaço crônico, miosites, e outras doenças do colágeno não específicas, 40 a 60 % apresentam hipovitaminose D ou osteomalácia.[7] A redução nos níveis de vitamina D no organismo, principalmente entre os idosos, leva também a alterações musculares.[49]

Na tabela 1 encontram-se descritas as principais causas de hipovitaminose D. Destacam-se a redução da síntese cutânea, da absorção intestinal e as alterações metabólicas.

TABELA 1: Causas da hipovitaminose D	
Causa	**Efeito**
Redução da síntese cutânea	
Uso filtro-solar- absorção da radiação UVB pelo filtro-solar	Redução na síntese de vitamina D_3 – 92,5% e 99% com fator de proteção 8 e 15, respectivamente
Pigmentação da pele- absorção da radiação UVB pela melanina	Redução na síntese de vitamina D_3 em 99%
Idade- redução da 7-dehidrocolesterol na pele	Redução na síntese de vitamina D_3 em 75% a partir dos 70 anos
Estação do ano, latitude, hora do dia- quantidade de fótons UVB que atingem a pele através do ângulo solar *Zenith* (ângulo mais obliquo)	Em latitude norte acima de 35 graus (Atlanta), pequena ou nenhuma vitamina D pode ser produzida de Novembro a Fevereiro
Pacientes com lesões por queimadura- redução da 7-dehidrocolesterol na pele	Reduzida quantidade de vitamina D pode ser produzida
Redução na biodisponibilidade	
Má absorção- reduzida absorção de gorduras em função a fibrose cística, doença celíaca, doença de Whipple's, doença de Crohn's, cirurgia de *bypass*, medicamentos para redução do colesterol entre outras	Reduz a capacidade do organismo de absorver a vitamina D
Obesidade- mobilização de vitamina D para o tecido adiposo	Menor disponibilidade de vitamina D
Aumento do catabolismo	
Anticonvulsivantes, glicocorticóides, anti-inflamatórios não esteróide, imunossupressores	Ativação da conversão da 25 vitamina D_3 e $1,25(OH)_2D_3$ para ácido calcitróico
Leite materno	
Baixa concentração de vitamina D no leite materno	Aumento no risco de deficiência de vitamina D em crianças com alimentação por amamentação exclusiva
Redução na síntese de 25 vitamina D_3	
Insuficiência hepática	
Disfunção leve a moderada	Causa má absorção de vitamina D, mas a produção da 25 vitamina D_3 ainda é possível
Disfunção de $\geq$90%	Resulta na incapacidade de produzir suficiente 25 vitamina D_3

TABELA 1: Causas de hipovitaminose D	
Aumento na excreção renal de 25 vitamina D_3	
Síndrome nefrótica- perda da 25 vitamina D_3 ligada a VDR na urina	Resulta na perda substancial da 25 vitamina D_3 na urina
Redução da síntese de $1,25(OH)_2D_3$	
Insuficiência Renal Crônica	
Estágio 2 e 3 (taxa de filtração glomerular estimada de 31-89ml/min/1.73m^2)	
Hiperfosfatemia aumenta FGF-23, o qual reduz a ação da 25 hidroxivitamina D-1-α hidroxilase	Causa redução na fração de excreção de fósforo e na concentração sérica da $1,25(OH)_2D_3$
Estágio 4 e 5 (taxa de filtração glomerular estimada de <30ml/min/1.73m^2)	
Incapacidade de produzir quantidade adequada da $1,25(OH)_2D_3$	Causa hipocalemia, hiperparatireoidismo secundário e doença óssea renal
Desordens hereditárias- Raquitismo	
Raquitismo por deficiência pseudovitamina D (raquitismo dependente de vitamina D tipo 1)- mutação na 25 hidroxivitamina D-1-α hidroxilase	Causa redução ou não na síntese da $1,25(OH)_2D_3$
Raquitismo resistente a vitamina D (Raquitismo dependente de vitamina D tipo 2)- mutação no gene do receptor de vitamina D	Causa completa ou parcial resistência a ação da $1,25(OH)_2D_3$, resultando em concentração elevada da $1,25(OH)_2D_3$
Raquitismo dependente de vitamina D tipo 3- superprodução de elementos responsivos a hormônio ligando proteínas	Previne a ação da $1,25(OH)_2D_3$ na transcrição, causando resistência na célula-alvo e concentração elevada da $1,25(OH)_2D_3$
Raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominate- mutação no gene do FGF-23, prevenindo ou reduzindo a degradação	Causa fosfatúria, menor absorção intestinal de fósforo, hipofosfatemia e redução na atividade da 25 hidroxivitamina D-1-α hidroxilase, resultando em concentração reduzida da $1,25(OH)_2D_3$
Raquitismo hipofosfatêmico ligado ao X- mutação no gene *PHEX*, estimulando níveis elevados de FGF-23 e outras fosfatoninas	Causa fosfatúria, menor absorção intestinal de fósforo, hipofosfatemia e redução na atividade da 25 hidroxivitamina D-1-α hidroxilase, resultando em concentração reduzida da $1,25(OH)_2D_3$

TABELA 1: Causas de hipovitaminose D	
Desordens adquiridas	
Osteomalácia induzida por tumor- secreção por tumor de FGF-23 e outras fosfatoninas	Causa fosfatúria, menor absorção intestinal de fósforo, hipofosfatemia e redução na atividade da 25 hidroxivitaminaD-1-αhidroxilase, resultando em concentração reduzida da $1,25(OH)_2D_3$
Hiperparatireoidismo primário- aumento do PTH causando aumento no metabolismo da 25 vitamina D_3 para $1,25(OH)_2D_3$	Redução na concentração da 25 vitamina D_3 e aumento na concentração da $1,25(OH)_2D_3$ que pode sem encontrar normal ou elevada
Desordens granulomatosas, sarcoidose, tuberculose e outras condições incluindo linfomas- converção nos macrófagos da 25 vitamina D_3 para $1,25(OH)_2D_3$	Redução na concentração da 25 vitamina D_3 e aumento na concentração da $1,25(OH)_2D_3$ que pode sem encontrar normal ou elevada
Hipertireoidismo- estimula metabolismo da 25 vitamina D_3	Reduz a concentração da 25 vitamina D_3

Adaptado de: *N Engl J Méd*. 2007;357:266-81.

A mensuração da concentração sérica de vitamina D é de grande importância clínica no acompanhamento da doença renal e das glândulas paratireóides, e indicada na pesquisa de outros distúrbios no metabolismo do cálcio, como a hipercalcemia maligna e a intoxicação por vitamina D. Atualmente, o maior questionamento em relação à vitamina D é a análise da concentração sérica de 25 vitamina D e de $1,25(OH)_2D$ para indicar quais seriam os níveis normais.[18] Holick[48] denota que a única maneira de se determinar a deficiência ou intoxicação de vitamina D (tanto a vitamina D_2 como a D_3) é medindo a concentração sérica da 25 vitamina D, já que esta é considerada o metabólico circulante de maior concentração, com uma vida média de 2 semanas. A concentração plasmática da $1,25(OH)_2D$ não deve ser utilizada como marcador do *status* de vitamina D por apresentar uma concentração aproximadamente 1000 vezes inferior a de 25 vitamina D. Além disto, indivíduos com insuficiência (25 vitamina D entre 15 e 30 ng/ml) ou deficiência (25 vitamina D $\leq$ 15 ng/ml) de vitamina D desenvolvem mecanismos compensatórios, aumentando a produção de PTH. Este, por sua vez, estimula os rins a aumentarem a síntese de $1,25(OH)_2D$. Portanto, nos indivíduos com deficiência de vitamina D, a concentração

de 25 vitamina D está significantemente reduzida, enquanto a de $1,25(OH)_2D_3$ pode estar normal ou até ligeiramente elevada.[50,51]

Atualmente se desconhece quais são os reais valores de normalidade da 25 vitamina D, principalmente pela influência de fatores externos. Habitualmente, os valores normais de vitamina D são aqueles encontrados na média da população saudável (considerando um intervalo de ± 2 desvios-padrão).[52]

No passado, indivíduos com concentração de 25 vitamina D variando entre 8 e 50 nmol/L (3,2 e 20 ng/ml) eram diagnosticados com hipovitaminose D.[53] Atualmente, não existe mais esta definição. Como uma alternativa, Oversen *et al*[54] descrevem, baseados na população americana, uma escala gradual que define hipovitaminose D quando a concentração de 25 vitamina D encontra-se abaixo de 100nmol/L (40 ng/ml), insuficiência de vitamina D abaixo de 50nmol/L (20 ng/ml) e deficiência de vitamina de <25nmol/L (10 ng/ml). As doenças clássicas relacionadas com a deficiência de vitamina D (raquitismo e osteomalácia graves) são causadas quando a concentração de 25 vitamina D encontra-se abaixo de 10 nmol/L (4 ng/ml). Outras variáveis que influenciam significativamente a determinação do valor de normalidade de vitamina D são os seus efeitos na absorção intestinal de cálcio e a relação inversa entre PTH e 25 vitamina D.[37,53] A eficiência máxima no transporte intestinal de cálcio induzida pela vitamina D dá-se quando a concentração de 25 vitamina D é de, pelo menos, 31,2 nmol/L (12,4 ng/ml).[48] Níveis ainda maiores não aumentam a absorção, ocorrendo provavelmente um *platô*.

Alguns indivíduos com exposição solar crônica apresentam uma concentração de 25 vitamina D maior que 250 nmol/L (100 ng/ml), sem sinais e sintomas clínicos de intoxicação. Já uma concentração de 25 vitamina D acima de 325 nmol/L (130 ng/ml) associa-se a hipercalcemia e outros sinais e sintomas de intoxicação por vitamina D.[55] Entretanto, Vieth *et al.*[56] denotam que adultos, recebendo uma dose diária de 10.000 UI de vitamina D_3 durante 5 meses, não apresentaram sinais de toxicidade. Em sua discussão descrevem alguns estudos que sugerem que a intoxicação de vitamina D pode ocorrer se forem ofertadas mais de 10.000 UI ao dia por vários meses e anos, sendo que os sintomas (hipercalcemia e hiperfosfatemia) só são descritos com níveis de 25 vitamina D $\geq$ 150 ng/ml.

Porém, determinar os limites inferiores de normalidade para a vitamina D tem sido motivo de muitas controvérsias. Sabe-se que a concentração sérica de 25

vitamina D abaixo de 20 nmol/L (8 ng/ml) está associada com o desenvolvimento de osteomalácia em adultos considerados saudáveis. Na prática, a maioria dos ensaios considera o intervalo de normalidade adequado para 25 vitamina D entre 37,5 nmol/L (15 ng/ml) e 100-120 nmol/L (40-48 ng/ml), sendo considerado como ponto de corte o valor de 30 ng/ml.[57]

Como descrito anteriormente, níveis séricos de 25 vitamina D por volta de 200 nmol/L (80 ng/ml) não são raros em indivíduos saudáveis com alta exposição solar. Já em indivíduos sem exposição solar freqüente, Carnevale *et al*[58] verificaram a variação na concentração de 25 vitamina D entre 48 e 78 nmol/L (19,2 e 31,2 ng/ml). Por sua vez, os mesmos autores determinaram a hipovitaminose D como uma concentração sérica de 25 vitamina D inferior a 30 nmol/L (12 ng/ml). Estes verificaram também, em ensaio clínico longitudinal de avaliação na concentração de vitamina D em adultos saudáveis, uma variação no diagnóstico de carência vitamínica de 17,8% e 27,6% no inverno e 2,2% e 3,4% no verão em homens e mulheres, respectivamente, concluindo que os homens apresentam uma concentração significativamente maior de 25 vitamina D e cálcio sérico que as mulheres, tanto no inverno quanto no verão.

Recomendação nutricional de vitamina D

As fontes alimentares de vitamina D são limitadas e sua contribuição na manutenção do *status* dessa vitamina assume grande importância apenas em indivíduos com baixa exposição solar. Os principais alimentos considerados fontes naturais de vitamina D são os óleos de peixes de água fria, como salmão e sardinha. As recomendações para vitamina D são normalmente expressas por unidades internacionais (UI) ou microgramas (µg). Uma unidade internacional de vitamina D corresponde a 0,025µg de colecalciferol. Desta forma, 1µg equivale a 40 UI.[18]

Estima-se que o organismo humano necessite diariamente uma média de 3000 a 5000 UI ao dia de colecalciferol.[59] Em 1997, o comitê da *National Academy of Science*, *Food and Nutrition Board*, estabeleceu através do documento *Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes (DRIs)*, os valores de referência para ingestão adequada (AI) de cálcio e vitamina D em diversas grupos etários, considerando que a AI é o nível de ingestão de um determinado nutriente que deve

ser utilizado como base quando as evidências científicas não são suficientes para se estabelecer a sua Cota Diária Recomendada (RDA).[59]

Seguindo as *DRIs*, nos EUA a recomendação de ingestão da vitamina D é de 200 UI diariamente para crianças e adultos jovens, de 400 UI para indivíduos entre 51 e 70 anos, e de 600 UI para indivíduos acima de 71 anos. No Reino Unido a recomendação para pessoas acima de 65 anos é de 400 UI.[60]

Estudos de comparação entre a recomendação e a ingestão de vitamina D denotam, em diversas populações, ingestão inadequada do nutriente, sendo que muitos autores questionam estas recomendações. Compston[60] sugere que a ingestão de 800 UI/ dia de vitamina D deve ser admitida para a população geral, evidenciando esta como uma quantidade segura, sem efeitos adversos e que possibilita a manutenção e recuperação da concentração de vitamina D. O autor descreve também que a fortificação alimentar ou a suplementação de vitamina D devem ser estimuladas, principalmente em idosos e na população de risco.

Vieth[61] também defende a necessidade de uma ingestão acima de 800 UI/dia de vitamina D na tentativa de manter os níveis séricos de 25 vitamina D acima de, pelo menos, 30 ng/ml . O autor relata estudos randomizados, com o consumo médio de 800 UI/dia de vitamina D, que mostraram efeito na supressão do PTH, manutenção da densidade mineral óssea e redução na pressão arterial.

Holick[18] denota a importância das recomendações nutricionais da vitamina D, sendo que diversos autores recomendam de 800 a 1000 UI/dia quando não há exposição solar adequada.

Dosagem de vitamina D

Os métodos utilizados atualmente para dosagem de vitamina D ainda não são padronizados, o que dificulta a comparação entre diferentes estudos. Mensurar a concentração sérica de 25 vitamina D tem despertado o interesse dos laboratórios nos últimos anos. Diversos métodos já foram testados.

A variação entre os laboratórios dificulta a comparação entre populações. Atualmente, a atenção voltada para esta questão é para se padronizar, ou pelo menos harmonizar, os resultados. Contudo, os laboratórios utilizam métodos diferentes, o que resulta em resultados radicalmente discordantes em amostras semelhantes.[60,62]

Brinkley *et al*[57] enviaram amostras para seis diferentes laboratórios, os quais utilizavam técnicas diferentes de dosagem, e os resultados mostraram uma variação de até o dobro entre as amostras em questão. Na teoria, pode-se explicar estas disparidades nos resultados em razão da diferença nos testes. Entretanto, o mesmo autor encaminhou amostras duplicadas, para o mesmo laboratório, alterando a identificação e aumentando a concentração da vitamina em 20 ng/ml. Apenas dois laboratórios obtiveram resultados satisfatórios, e o pior resultado encontrou apenas 10% da 25 vitamina D adicionada.

Uma outra dificuldade em relação aos ensaios, é que alguns deles não são capazes de identificar a 25 vitamina D_2, mas apenas a 25 vitamina D_3. Em indivíduos que não realizam suplementação alimentar isto não é um problema. No entanto, a maior parte da suplementação é realizada com o ergocalciferol (vitamina D_2). Desta maneira, a vitamina D adicionada através de alimentos enriquecidos pode não estar sendo mensurada, levando ao diagnóstico incorreto de deficiência de vitamina D.[62]

Lips *et al*[52] em sua pesquisa, também compararam a variação dos resultados em diferentes métodos de dosagem da 25 vitamina D. Os métodos pesquisados foram: *competitive protein binding assay* (CPBA), *radioimmunoassay* (RIA), *competitive protein binding assay after purification by high-performance liquid chromatography* (HPLC), *competitive protein binding assay after ethanol extraction*. Os autores concluíram que todos eles foram capazes de identificar os diferentes valores de vitamina D, mas que não era possível comparar os valores obtidos pelos diferentes métodos.

Epidemiologia da deficiência de vitamina D

Cerca de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo apresentam hipovitaminose D, sendo que, entre os idosos que vivem nos Estados Unidos e na Europa a inadequação no estado nutricional de vitamina D está presente em 40-100% dos casos.[18] Estudos semelhantes em adultos saudáveis, de diferentes países, diferem na determinação no ponto de corte para identificar hipovitaminose D, com uma variação entre 12 e 75 nmol/L (4,8 – 30 ng/ml). Sendo assim, a prevalência da carência de vitamina D apresenta-se discordante entre as populações.[58,63,64] Além da variação climática,

deve-se ressaltar a suplementação e fortificação alimentar com vitamina D em alguns países.

A deficiência de vitamina D é mais comum nos países da Europa quando comparados aos Estados Unidos, sendo que 40% dos adultos europeus apresentam deficiência de vitamina D durante o inverno. Dados europeus mostraram que a deficiência de vitamina D é surpreendentemente mais comum em indivíduos que vivem em países com maior irradiação solar como Itália, Espanha e Grécia do que entre aqueles que residem em locais onde a exposição solar é considerada inadequada. Esse aparente paradoxo parece ser resultado da maior preocupação com ações de prevenção nos países com pouca insolação.[3]

Assim como os idosos, as crianças também são consideradas grupo de risco para deficiência de vitamina D. Em Boston e no Maine estima-se que 52% de adolescentes negros e hispânicos e 48% de meninas na fase da pré-adolescencia e apresentam níveis de 25 vitamina D próximos de 20 ng/ml, respectivamente.[35,54]

Na Arábia Saudita, estudos demonstraram uma alta prevalência de osteomalácia, raquitismo e deficiência de vitamina D em mulheres e crianças, em conseqüência do hábito desta população de vestir-se com roupas escuras, que recobrem todo o corpo, impedindo a exposição solar.[33]

Ainda com base em estudos epidemiológicos, Gannagé-Yared *et al*[38] compararam, em sua pesquisa, a ingestão e níveis séricos de vitamina D entre 316 adultos na zona rural e urbana no Líbano. Em toda a amostra, a ingestão de vitamina D era muito reduzida (100 IU/ dia), sendo ainda menor na população rural, provavelmente pelo consumo exclusivo de alimentos *in natura* e ausência de alimentos fortificados. Entretanto, os níveis séricos de 25 vitamina D destes indivíduos foram maiores, principalmente entre os homens. Os autores relacionam este fato ao maior tempo de exposição solar entre homens da área rural e a ao fato de que nas grandes cidades, a poluição impede pelo menos em parte a ação dos fótons UVB.[5]

Estima-se que mais de 50% dos afro-americanos nos Estados Unidos apresentam risco crônico e sazonal de deficiência de vitamina D.[65] Holick[48] observou que 84% destes afro-americanos acima de 65 anos tinham deficiência de vitamina D, no final do mês de agosto, na cidade de Boston. Este fato deve-se à redução na

ingestão de leite suplementado, devido à alta prevalência de deficiência de lactase e significativa redução na síntese cutânea de vitamina D.

No Brasil sempre se considerou que a prevalência de hipovitaminose D seria pequena em função da localização, na sua maior parte, na região tropical onde a incidência de luz solar é considerada abundante. Em Recife, região com significativa irradiação solar durante todo o ano, verificou-se que crianças desnutridas apresentam os mesmos níveis de 25 vitamina D que crianças eutróficas da mesma região, indicando a importância da irradiação solar. Os autores também observam que, comparando as concentrações de vitamina D, os dois grupos de crianças brasileiras apresentavam valores superiores aos das crianças inglesas.[67]

Por outro lado, um estudo que incluiu 250 idosos residentes em São Paulo observou uma elevada e inesperada prevalência de deficiência (15,4%) e insuficiência (41,9%) de vitamina D. Estes achados são bastante semelhantes aos encontrados em países com menor irradiação solar.[68] Também com dados brasileiros Peters *et. al.*[69], em pesquisa com 136 adolescentes saudáveis, na cidade de Piracicaba, mostraram uma alta prevalência de insuficiência vitamina D (60%), sugerindo que o Brasil ser um país ensolarado não pode ser considerado como um fator de prevenção neste caso. É importante enfatizar que na cidade de São Paulo e em Piracicaba, onde foram realizadas estas duas últimas pesquisas com idosos e adolescentes, o índice de poluição é elevado quando comparado com outras regiões urbanas. A poluição também é responsável pela redução na captação de luz solar pela pele.[11]

Embora a deficiência grave de vitamina D com conseqüências como raquitismo e osteomalácia seja rara no Brasil, estima-se que a prevalência de hipovitaminose D em toda população seja elevada, especialmente entre idosos, negros, pessoas que trabalham em ambientes fechados e que raramente se expõem ao sol ou ainda naqueles que usam protetor solar regularmente. Porém, estudos populacionais são necessários para conhecer a incidência e a prevalência de inadequação no estado nutricional de vitamina D na nossa população para que se possam estabelecer ações de prevenção e tratamento particularmente nos grupos de risco.[70]

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de hipovitaminose D em uma amostra de indivíduos saudáveis da população

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer quais fatores são preditivos dos níveis séricos de 25 vitamina D
- Estabelecer quais fatores estão associados à hipovitaminose D
- Avaliar se há variação sazonal na 25 vitamina D nestes indivíduos
- Estabelecer quais níveis de vitamina D estão associados à maior prevalência de hiperparatiroidismo secundário;

3. MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

O trabalho foi submetido ao Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (registro do projeto n°. 0660.0.015.000-06) e ao Comitê de ética em pesquisa com seres humanos- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (registro do projeto n° 777/06). Todos os voluntários concordaram em participar do estudo por meio da leitura e assinatura do Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento que lhes foi fornecido.

3.2 Voluntários

Este foi um estudo de corte transversal, realizado entre setembro e outubro de 2006 (final do inverno), com a participação de voluntários entre os funcionários e pacientes em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, além de alunos de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao comparecer ao ambulatório do Hospital Universitário para consulta anual de avaliação pelo médico do trabalho, os funcionários-USP foram convidados pelo pesquisador a participar do estudo. Estes eram selecionados previamente pelo pesquisador, que analisava seu prontuário da medicina do trabalho, para verificação dos critérios de inclusão e exclusão. A seleção entre os pacientes foi realizada da mesma forma; entretando, estes voluntários faziam parte dos ambulatórios de rotina do hospital. Todos os voluntários incluídos na pesquisa respondiam oralmente ao pesquisador ao formulário da pesquisa. Posteriormente, na mesma ocasião, o voluntário era encaminhado para realização das medidas antropométricas e agendamento da coleta de sangue. Neste momento os voluntários recebiam as informações necessárias (local, horário do exame e jejum) para coleta de sangue nos próximos 4 dias.

No dia estabelecido para coleta de sangue o voluntário se apresentava na recepção do laboratório de coleta do Hospital Universitário. Após conferência de

todos os dados da ficha de identificação e dos tubos de coleta, o sangue do voluntário era coletado por profissionais de saúde.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no projeto todos os voluntários com idade entre 18-80 anos, homens e mulheres, funcionários ou pacientes em acompanhamento nos ambulatórios do Hospital Universitários da Universidade de São Paulo que compareceram para consulta médica no período de coleta de dados e, se encaixavam nos critérios da pesquisa, com bom estado geral de saúde no momento da avaliação.

Foram excluídos os voluntários que apresentaram, no momento da avaliação, algum evento agudo ou doença crônica descompensada como creatinina sérica acima de 1,2 mg/dl, glicemia superior a 200 mg/dl e albumina inferior a 3,5 g/L ou aqueles em uso de medicamentos que afetem o metabolismo do cálcio ou fisiologia esquelética (cálcio, bisfosfonato, suplemento de vitamina D e corticóide).

3.4 Formulário da pesquisa

O formulário da pesquisa foi elaborado pelo pesquisador e seu orientador durante o desenvolvimento da pesquisa. Neste formulário havia dados de identificação, história clínica e de estilo de vida.

3.4.1 Dados de identificação

Os dados de identificação pesquisados foram: nome completo, data da entrevista (dia, mês, ano), data de nascimento (dia, mês, ano), idade (anos), telefone para contato, sexo (masculino ou feminino), endereço completo (endereço, bairro, CEP, cidade), e-mail para contato.

3.4.2 História clínica

Para determinar a história clínica e de saúde de cada voluntário, os participantes foram questionados sobre: antecedentes familiar e pessoal de hipertensão

arterial, diabetes, doença renal crônica, obesidade, dislipidemias, hepatopatias, osteoporose, câncer (sim ou não). Também questionava-se se o voluntário fazia uso de algum medicamento e, entre as mulheres, se a menopausa já havia se iniciado.

3.4.3 Etnia

A etnia foi questionada ao voluntário, sendo que este deveria se auto determinar branco, amarelo ou outra etnia (mulatos, pardos, negros). Para análise de dados, agrupamos os voluntários amarelos com os de outras etnias. Desta forma, para esta variável estudamos duas categorias, brancos e não brancos.

3.4.4 Estilo de vida

Quanto ao estilo de vida, os voluntários foram questionados sobre atividade ocupacional, estimativa de renda mensal (reais), meio de transporte utilizado (próprio, coletivo, outros), uso de filtro solar (sim ou não; se sim, número do fator de proteção e local de aplicação), prática de atividade física [sim ou não; se sim, aeróbica ou anaeróbica, por quanto tempo (minutos por dia) e freqüência (dias por semana)].

3.5 Parâmetros antropométricos

As medidas antropométricas foram aferidas pelo pesquisador após a aplicação do formulário de pesquisa. As medidas realizadas foram peso, estatura e índice de massa corporal (IMC).

Peso: o peso corporal representa o somatório dos compartimentos de minerais, água (intra e extracelular), glicogênio, proteínas e gordura. O peso foi aferido com indivíduo sem sapato, com a menor quantidade de roupa possível, com valores expressos em kilogramas. Utilizou-se balança Filizola (São Paulo, Brasil) com capacidade de 150 kg e precisão de 100 gramas.

Estatura: para obtenção da estatura, os indivíduos foram colocados sobre a plataforma da balança, de costas para seu marcador, com os pés unidos, em posição ereta, com olhar no horizonte. A leitura foi realizada no 0,5 centímetro mais próximo

quando a haste horizontal da barra vertical da escala de estatura encostou-se à cabeça do indivíduo.

IMC: para este cálculo utiliza-se a fórmula, IMC (kg/m²) = Peso/ Altura². O IMC foi classificado de acordo com valores recomendados pela organização mundial de saúde (OMS)[71]: eutrofia = IMC $\leq$ 25 Kg/m², sobrepeso = IMC entre 25 e 30 Kg/m² e obesidade = IMC $\geq$ 30 Kg/m².

3.6 Amostras de sangue

No dia agendado para coleta de sangue cada voluntário era identificado e os tubos de ensaio eram conferidos. O braço do voluntário era posicionado em linha reta do ombro ao punho, sem dobrar o cotovelo e a mão voltada para cima. O garrote foi utilizado durante a localização das veias, tornando-as proeminentes. A punção era feita com agulha descartável perpendicularmente à superfície da pele. Foi colhida dos voluntários, em jejum de 8 horas, uma amostra de 20 mL de sangue em tubos de ensaio com tampa de polietileno à vácuo, com gel separador e EDTA. O garrote era retirado após a venopunção. Após a coleta, a agulha era retirada e era feito um curativo com adesivo específico no local da punção.

As amostras de sangue coletadas e refrigeradas dos voluntários foram centrifugadas (3500 rpm por 10 minutos) no laboratório no dia da coleta de sangue para obtenção do soro. Uma parte do soro obtido destes tubos era separado em três microtubos de *eppendorf* e congelados a temperatura de -20°C, dando origem a soroteca.

O tubo em gel restante e o tubo de EDTA eram transportados refrigerados em caixa térmica para o laboratório central do Hospital da Clínicas de São Paulo no mesmo dia da coleta.

3.7 Dosagens bioquímicas

Os tubos de ensaio entregues no laboratório central do Hospital da Clínicas de São Paulo eram conferidos no balcão de entrega de material, sendo verificados os

dados de cada voluntário no tubo e na requisição de exame devidamente preenchida e carimbada com o número do protocolo de pesquisa (PR385) pelo pesquisador.

Todas as análises realizadas no laboratório de bioquímica (albumina, cálcio total, cálcio ionizado, fósforo, creatinina, fosfatase alcalina, glicose) ou hormônios (paratormônio, proteína C reativa) do Hospital das Clínicas foram feitas de acordo com os métodos padronizados pelo hospital descritos no quadro abaixo.

Consideramos os valores de referência para cada exame de acordo com o método utilizado.

QUADRO 1: Descrição dos dados bioquímicos

Albumina	Enzimático calorimétrico automatizado	3,2-4,8 g/dl
Cálcio total	Calorimétrico automatizado	8,6 - 10,2 mg/dl
Cálcio ionizado	Eletrodo íon seletivo	4,6 - 5,3 mg/dl
Creatinina	Calorimétrico cinético	Mulher = 0,5 - 0,9 mg/dl Homem = 0,7 - 1,2 mg/dl
Fosfatase alcalina	Cinético automatizado	Mulher = 35 – 104 U/l Homem = 40 – 129 U/l
Fósforo	Enzimático calorimétrico automatizado	2,7 - 4,5 mg/dl
Glicose	Enzimático calorimétrico automatizado	70 - 100 mg/dl
Proteína C reativa	Nefelometria	< 3,00 mg/dl
Hormônio da paratireóide intacto	Enzimaimunométrica quimiluminescente, Immulite 2000	16 - 87 pg/ml

3.8 Dosagem e classificação da vitamina D

Os níveis de 25 vitamina D foram dosados pelo método Diasorin LIAISON^{TM} (USA) no laboratório CRIESP na cidade de São Paulo. Todas as amostras foram encaminhadas no mesmo momento, refrigeradas (caixas térmicas) em microtubos de *eppendorf*. O ensaio padronizado pelo laboratório CRIESP é baseado no reconhecimento por quimiluminescência das proteínas de ligação da vitamina D.

Este método de determinação quantitativa da 25 hidroxivitamina D é um teste direto, competitivo, baseado no princípio de quimiluminescência. O anticorpo específico anti-vitamina D é utilizado para revestir as partículas magnéticas (fase

sólida) e a vitamina D é ligada a um derivado de isoluminol. A 25 hidroxivitamina D é dissociada da proteína de ligação e compete pelos locais de ligação do anticorpo durante a incubação. O material não ligado é removido com um ciclo de lavagem depois da incubação. Os reagentes iniciadores são então adicionados para induzir uma reação de quimiluminescência. O sinal luminoso é medido por um fotomultiplicador em unidades relativas de luz e é inversamente proporcional a concentração de 25 hidroxivitamina D existente nos calibradores, controles e amostras.

Consideramos, para classificar os níveis de 25 hidroxivitamina D, os estudos recentes e o valor de referência do método utilizados. Desta forma os pontos de corte para categorização de vitamina D nesta pesquisa são:

- 25 vitamina D $\leq$ 15ng/ml - deficiência de vitamina D
- 25 vitamina D < 30 ng/ml – insuficiência de vitamina D
- 25 vitamina D $\geq$ 30 ng/ml – suficiência de vitamina D

3.9 Segunda coleta – análise após verão

Todos os voluntários foram convocados por telefone para realizar uma nova coleta de sangue após o verão de 2007 (março e abril). No dia agendado para a nova coleta de sangue, o voluntário era identificado. Na segunda coleta foram realizados os mesmo procedimentos para coleta de sangue e análise das variáveis bioquímicas.

3.10 Análise estatística

As variáveis contínuas foram testadas quanto à sua distribuição normal através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Nas análises descritivas foram utilizados o teste *t de Student* para as variáveis contínuas de distribuição normal, o teste de *Mann-Whitney* para as variáveis contínuas de distribuição não-gaussiana e os testes de *chi-quadrado* ou *Fisher* para as variáveis categóricas. Nas análises de tercis foram utilizados os testes de *ANOVA* de um caminho para as variáveis contínuas e teste de *chi-quadrado* ou *Fisher* para as variáveis categóricas. Nas análises descritivas de

vitamina D, exploramos a relação da mesma com as diversas outras variáveis de diversas formas: análise de tercis, de acordo com os valores de insuficiência e deficiência de vitamina D e de acordo com o valor de vitamina < ou > 30 ng/mL.

A seguir, exploramos as relações entre a vitamina D e as diversas outras variáveis de duas formas: utilizando vitamina D como variável contínua ou como variável categórica (25(OH)D > ou < 30 ng/ml). Assim, nas análises de vitamina D como variável contínua foram realizados testes de correlação de *Spearman* e *Pearson* (de acordo com a normalidade), modelos de regressão linear univariada e modelos de regressão linear multivariada. Nas análises envolvendo vitamina D como variável categórica dependente, foram construídos modelos de regressão logística univariada e multivariada, assim como modelos de regressão logística tipo *stepwise*.

Testes semelhantes foram realizados no sentido de explorar a relação entre o paratormônio e as diversas variáveis. Assim, o PTH foi utilizado tanto como variável contínua, como categórica (< ou > 87 pg/mL). De forma análoga à realizada para vitamina D, modelos de regressão linear univariada e modelos de regressão linear multivariada foram criados usando PTH como variável dependente. Nas análises envolvendo PTH como variável categórica dependente foram construídos modelos de regressão logística univariada e multivariada, assim como modelos de regressão logística tipo *stepwise*.

Para as comparações entre inverno e verão, realizamos teste *t* pareado ou teste de *Wilcoxon* (para distribuição normal ou não-normal, respectivamente) naqueles indivíduos que realizaram as duas dosagens. A comparação entre os GRUPOS 1, 2 e 3 (determinados em função da variação dos níveis séricos de 25 vitamina D após o verão) foi realizada através de teste de *ANOVA* de um caminho.

Para todos os testes acima descritos, utilizamos modelos bi-caudais com nível de significância de 0.05. O programa de bioestatística utilizado foi o *SPSS for Windows*, versão 13.0 (SPSS, 2004).

4. RESULTADOS

4.1 Primeira análise – após inverno

4.1.1 Características da amostra

Foram estudados 603 voluntários (118 M e 485 F) no período de setembro e outubro de 2006, cujas características demográficas e bioquímicas estão descritas na TABELA 2.

O sexo feminino foi predominante (80,4%) quando comparado com o sexo masculino (19,6%), diferente dos dados do censo demográfico brasileiro elaborado pelo IBGE no ano de 2000 (considerado o mais preciso na caracterização da população brasileira), onde as mulheres representam 50,8% da população.[72] Entre as mulheres, 204 (42,1%) já estavam na menopausa por um tempo médio de 9,89 $\pm$ 9,08 anos.

A maior parte dos indivíduos foi classificada como branco (67,2%) em relação à cor da pele, número superior ao do censo do IBGE de 2000, que revelou 53,7% de brancos. Na nossa amostra, 32,8% eram não brancos, enquanto no IBGE 46,3% se classificaram desta forma (TABELA 2).[72]

Apenas 39,9% dos indivíduos referiram praticar alguma atividade física, sendo que em 90% dos casos esta atividade era aeróbica. Utilizavam filtro solar com freqüência apenas 25,6% dos voluntários. Os locais de aplicação mais citados foram o rosto (57,2%) e os braços (39,5%). A mediana da renda mensal dos voluntários foi de R$ 1.300,00 (R$ 800,00 – R$ 2.000,00).

TABELA 2: Variáveis demográficas e bioquímicas dos voluntários estudados

Variáveis	
Idade (anos)	47,8 (13,4)
Sexo (N, %)	
Mulheres	485 (80,4)
Homens	118 (19,6)
Cor da Pele (N, %)	
Brancos	395 (67,2)
Não brancos	193 (32,8)
Hipertensão arterial sistêmica (N, %)	164 (27,7)
Diabetes mellitus (N, %)	57 (9,6)
Menopausa (N, %)	204 (42,1)
Peso (kg)	68,4 (59,9-79,8)
Indice de Massa Corporal (Kg/m^2)	27,3 (23,4-29,9)
Cálcio (mg/dl)	9,7 (9,3-10,0)
Cálcio iônico (mg/dl)	5,0 (4,9-5,1)
Fósforo (mg/dl)	3,7 (3,3-4,1)
Creatinina (mg/dl)	0,8 (0,7-0,9)
Clearance creatinina (Cockcroft-Gault, $ml/min/1.73m^2$)	98 (83,2-120,4)
Albumina (g/dl)	4,5 (4,3-4,7)
Glicose (mg/dl)	83 (76-92)
Paratormônio (pg/ ml)	63,0 (50-81)
Fosfatase alcalina (U/L)	69 (56-83)
Proteína C reativa (mg/dl)	1,8 (0,8-4,5)
25 vitamina D (ng/ml)	21,4 (16,2-28,7)

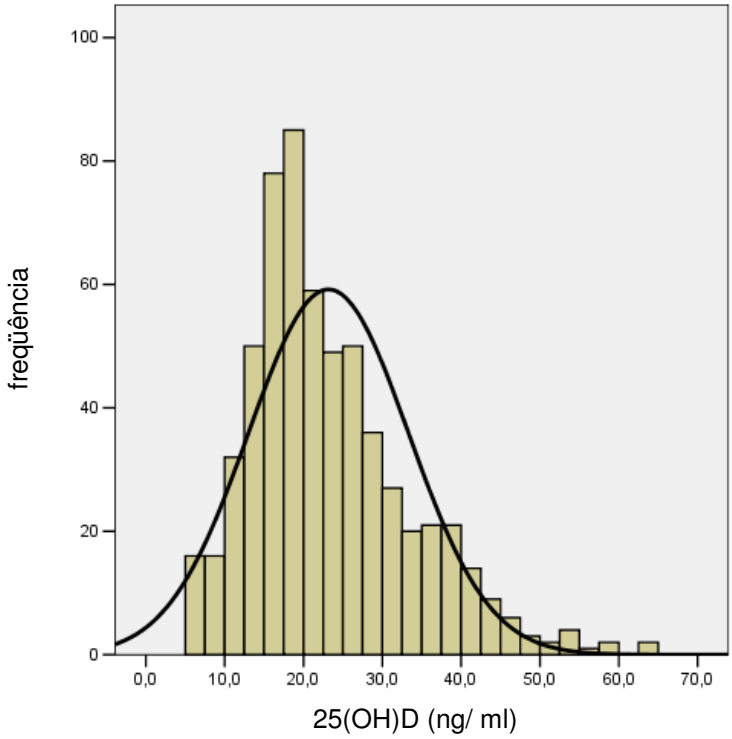
Os valores estão expressos em N e percentual (%) ou média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

Referiram fazer acompanhamento médico para tratamento de hipertensão arterial (HAS) e *diabetes mellitus* (DM) 27,7% e 9,6% da população do estudo, respectivamente. Quando realizamos a comparação da prevalência destas patologias com a população geral brasileira, observamos que estudos mais recentes demonstram uma prevalência de hipertensão arterial de 26% da população geral adulta, variando conforme o estudo e a localidade pesquisada de 22,3 até 44% conforme dados da última diretriz. Os dados do último Censo Nacional de Diabetes já demonstravam uma prevalência média de 7,6% na população urbana brasileira entre 30 e 69 anos, com um adicional de 7,8% nessa mesma faixa etária que apresentava tolerância diminuída à glicose. No estado de São Paulo, o *diabetes mellitus* atinge cerca de 9,6% da população. Portanto, de acordo com estes dados, a prevalência de hipertensão arterial e de *diabetes mellitus* é semelhante entre a população geral e os indivíduos estudados em nossa amostra.[72]

Todas as variáveis numéricas estudadas apresentaram valores medianos dentro da faixa de normalidade, baseadas no ponto de corte específico de cada método de dosagem, com exceção da 25 vitamina D, cuja mediana foi de 21,4 ng/ml (16,2 – 28,7), com valor máximo de 64,3 ng/ml (TABELA 2).

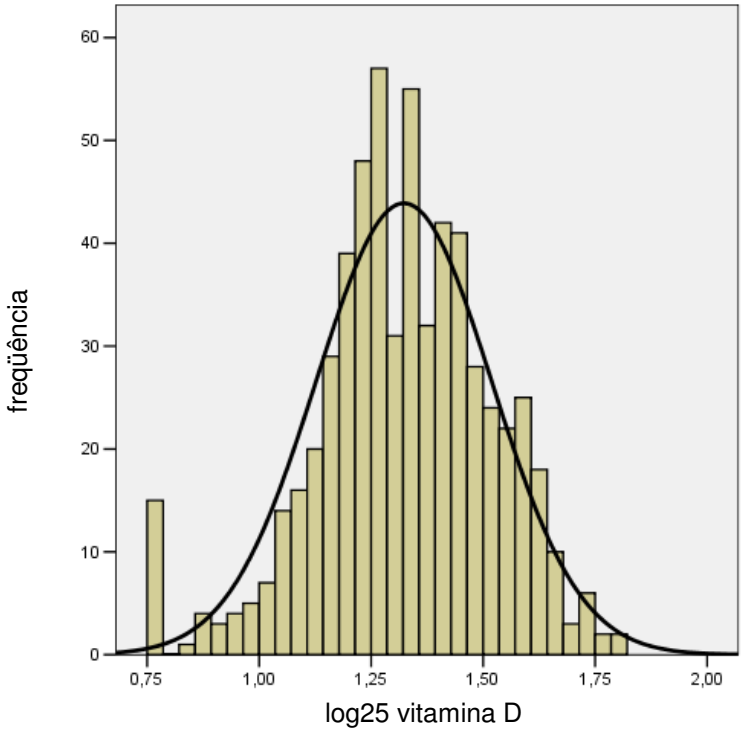
O GRÁFICO 1 mostra a distribuição dos níveis séricos de 25 vitamina D na população estudada. A distribuição dos valores não foi normal, mas a aparência da curva é bem próxima de uma distribuição Gaussiana. O GRÁFICO 2 mostra a distribuição dos valores de 25 vitamina D após transformação logarítmica (25Dlog), com distribuição Gaussiana.

GRÁFICO 1: Distribuição dos valores de 25 vitamina D (ng/ml) na amostra estudada



Média = 23,16 ng/ml
DP = 10,15 ng/ml
N = 603

GRÁFICO 2: Distribuição dos valores de 25Dlog na amostra estudada



Média = 1,323
DP = 0,19573
N = 603

4.1.2 Análise dos fatores preditivos dos níveis séricos de 25 vitamina D

A 25 vitamina D se correlacionou inversamente com o PTH (r = -0,199, *p* = <0,001), o IMC (r = -0,094, *p* = 0,03) e idade (r = -0,107, *p* = 0,009) (GRÁFICOS 3, 4, 5, respectivamente). As correlações dos níveis de 25 vitamina D e glicemia (r = -0,074, *p* = 0,075); fósforo (r = 0,078, *p* = 0,06) ficaram próximas da significância.

GRÁFICO 3: Correlação entre os níveis de 25(OH)D e PTH

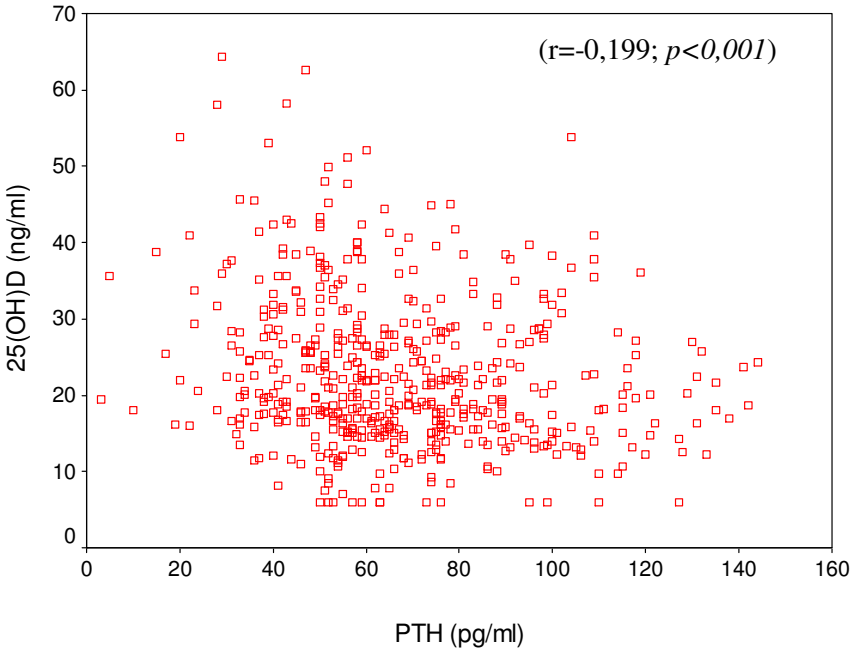


GRÁFICO 4: Correlação entre os níveis de 25(OH)D e IMC

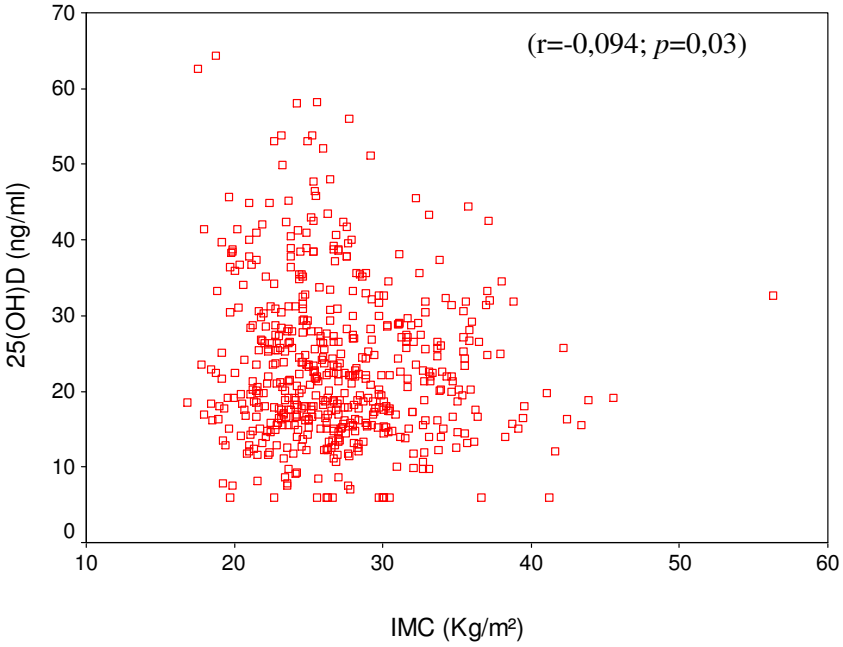
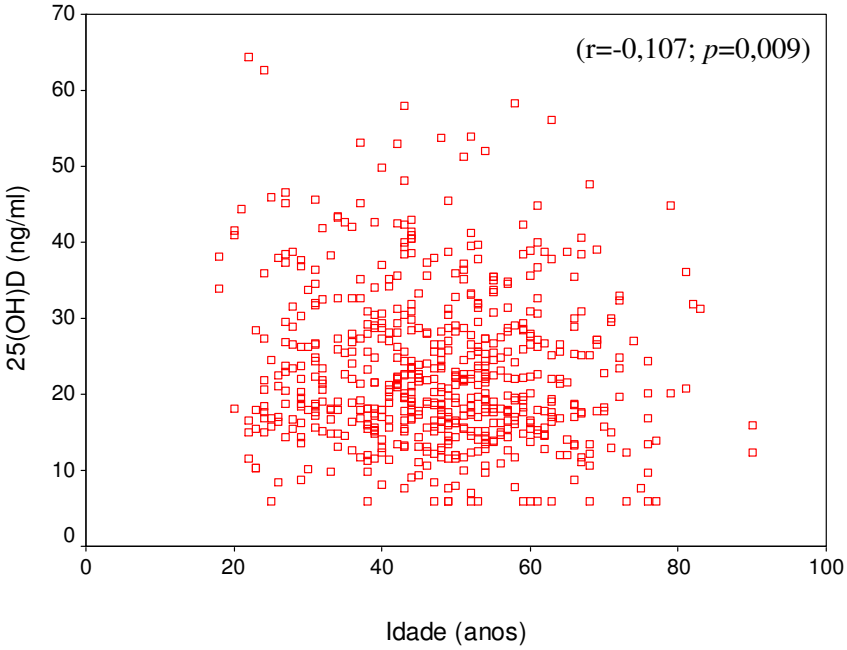


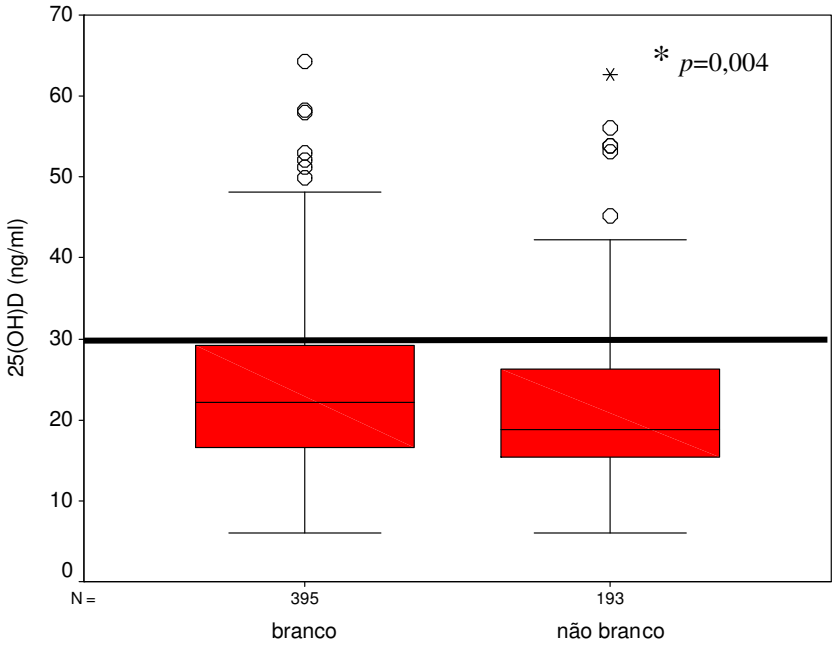
GRÁFICO 5: Correlação entre os níveis de 25(OH) e idade



Não encontramos diferenças significativas entre os valores de 25 vitamina D dos voluntários do sexo masculino quando comparados às voluntárias do sexo feminino [22,3 ng/ ml (16,4 – 30,1) e 21,3 ng/ml (16,0 – 28,4), respectivamente, p = 0,180]. Os valores de 25 vitamina D não foram diferentes entre as mulheres que estavam ou não na menopausa [21,8 ng/ml (15,45-29,0) e 21,4 ng/ml (16,55-28,75), respectivamente, p = 0,44]. Tampouco pudemos verificar diferenças nos níveis séricos de vitamina D entre os voluntários que referiram praticar atividade física e os que não o faziam [21,4 ng/ml (16,6 - 28,7) *vs.* 21,4 ng/ml (15,8 - 28,5), respectivamente, p = 0,367].

Com relação à cor da pele, o grupo de não brancos apresentou média de 25 vitamina D reduzida quando comparada com os brancos [18,8 ng/ml (15,4 - 26,4) e 22,2 ng/ml (16,6 – 29,3), respectivamente, p = 0,004] (GRÁFICO 6).

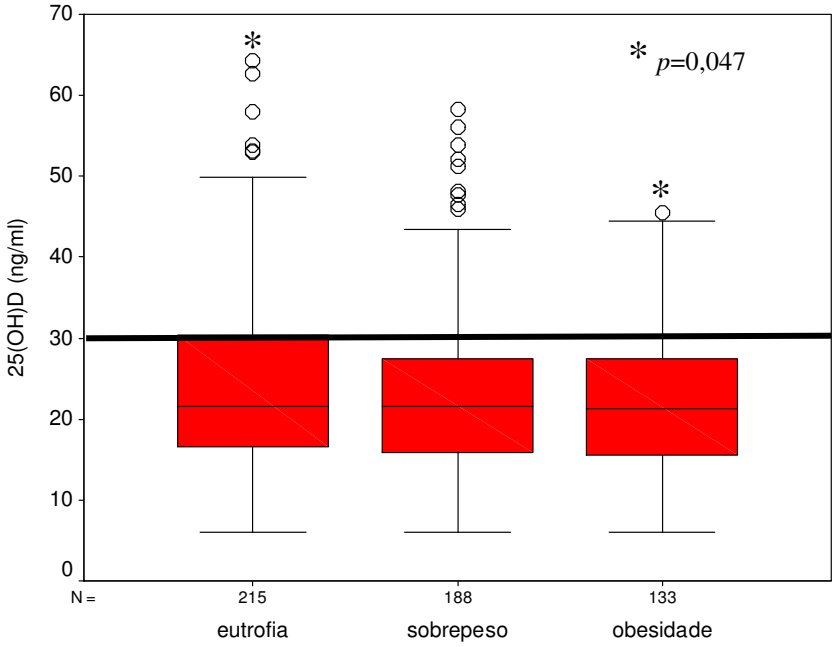
GRÁFICO 6: Níveis de 25(OH)D (ng/ml de acordo com a cor da pele



Quando dividimos os voluntários de acordo com a idade (< ou ≥ 65 anos), não verificamos diferença significativa entre os grupos com relação aos níveis séricos de 25 vitamina D [21,5 ng/ml (16,4-28,55) e 19,25 ng/ml (13,35-29,25),

respectivamente, p = 0,13]. Tampouco encontramos diferenças entre os níveis séricos de 25 vitamina D dos voluntários obesos quando comparados aos não obesos [21,3 ng/ml (15,5-27,45) e 21,5 ng/ml (16,2-29,4), respectivamente, p = 0,13]. Porém, quando comparamos os voluntários eutróficos, portadores de sobrepeso e portadores de obesidade, observamos que os níveis séricos de 25 vitamina D deste último grupo são significativamente menores quando comparados ao primeiro grupo [21,3 ng/ml (15,5-27,4) e 21,5 ng/ml (16,2-30,5), respectivamente, p = 0,047] (GRÁFICO 7). Os valores de 25 vitamina D não foram diferentes entre diabéticos e não-diabéticos [18,8 ng/ml (15,85-26,9) e 21,7 (16,2-28,8), respectivamente, p = 0,12] ou entre hipertensos e não hipertensos [20,15 ng/ml (15,5-27,05) e 21,85 ng/ml (16,45-29,45), respectivamente, p = 0,11].

GRÁFICO 7: Níveis de 25(OH)D (ng/ml) de acordo com IMC (Kg/m²)



Como os níveis séricos de 25 vitamina D apresentavam distribuição não gaussiana, realizamos as análises univariada e multivariada antes e após a conversão para escala logarítmica. Como os resultados foram semelhantes, apresentaremos apenas os valores da análise realizada com os valores sem a conversão para escala logarítmica. A análise univariada mostrou que os valores de 25 vitamina D foram

associados ao PTH, idade e glicemia. Também encontramos uma tendência de associação entre os valores de 25 vitamina D e os níveis séricos de cálcio e creatinina e os valores de IMC (TABELA 3)

TABELA 3: Regressão linear - Análise univariada das variáveis associadas à vitamina D

	beta	**95% IC**		*p*
PTH (pg/ml)	-0,18	-0,02	-0,0008	*<0,0001*
Idade (anos)	-0,0016	-0,002	-0,0004	*0,005*
Glicose (mg/dl)	-0,0007	-0,0013	-0,0001	*0,02*
Cor da pele (branco/não branco)	2,099	0,34	3,85	*0,018*
Ca (mg/dl)	0,07	-0,003	-0,056	*0,08*
Creatinina (mg/ dl)	0,096	-0,01	0,204	*0,08*
IMC (kg/m^2)	-0,068	-0,005	0,0006	*0,11*

Para realização da análise multivariada, consideramos apenas aquelas variáveis que poderiam ser consideradas como preditoras dos níveis de 25 vitamina D, ou seja, idade, glicemia, IMC e cor da pele. A análise multivariada mostrou que a 25 vitamina D foi dependente da idade e da cor da pele, conforme descrito na TABELA 4. Também encontramos uma tendência da glicemia como fator preditor da 25 vitamina D.

TABELA 4: Regressão linear - Análise multivariada das variáveis preditivas da vitamina D

	beta	**95% IC**		***P***
Constante	28,83	22,45	35,21	*<0,001*
Idade (anos)	**-0,07**	**-0,14**	**-0,005**	***0,03***
IMC (kg/m²)	-0,08	-0,25	-0,08	*0,30*
Glicose (mg/dl)	-0,03	-0 ,07	-0,001	*0,05*
Cor da pele (branco/ não branco)	**2,16**	**0,31**	**4,01**	***0,02***

Como o papel da glicemia nas alterações da vitamina D ainda não está bem estabelecido, esta pode ser considerada uma variável preditora ou uma conseqüência. Por este motivo realizamos também a análise multivariada de outra forma, excluindo a glicemia. Desta forma, considerando as alterações na glicemia uma conseqüência, as variáveis preditivas da 25 vitamina D foram a idade e a cor da pele conforme descrito na TABELA 5.

TABELA 5: Regressão linear - Análise multivariada das variáveis preditivas da vitamina D excluindo a glicemia

	beta	95% IC		*P*
Constante	28,15	22,08	34,23	*<0,001*
Idade (anos)	**-0,01**	**-0,167**	**-0,035**	***0,003***
IMC (kg/m²)	-0,137	-0,306	-0,033	*0,11*
Cor da pele (branco/ não branco)	**2,19**	**0,348**	**4,04**	***0,02***

4.1.3 Análise dos fatores associados à hipovitaminose D

Conforme descrito na TABELA 6, a prevalência de hipovitaminose D neste estudo foi aumentada, de acordo com os diferentes pontos de corte sugeridos na literatura.

TABELA 6: Prevalência de hipovitaminose D de acordo com diferentes pontos de corte

	% casos
25 vitamina D < 15 ng/ml	19,3
25 vitamina D < 30 ng/ml	77,4
25 vitamina D < 40 ng/ml	93,2

A TABELA 7 mostra que os voluntários com níveis de 25 vitamina D < 30ng/ml apresentaram maior prevalência de hipertensão arterial sistêmica (30 *vs.* 19,5%, p = 0,01), maior índice de massa corporal [26,6 Kg/m² (23,6 – 30,2) *vs.* 25,3 Kg/m² (22,7 – 28,4), p = 0,02] e níveis mais elevados de paratormônio [65 pg/ml (52,7 – 83,2) *vs.* 52 pg/ml (42 – 73,2), p < 0,0001] quando comparados com voluntários com níveis normais de 25 vitamina D. As variáveis idade (48,3 $\pm$ 13,1 *vs.* 46,0 $\pm$ 14,4 anos, p = 0,08) e fósforo [3,7 mg/dl (3,3 – 4,1) *vs.* 3,8 mg/dl (3,4 – 4,3), p = 0,07] mostraram uma tendência de diferença significativa entre estes voluntários separados de acordo com o ponto de corte de 30 ng/ml.

Também observamos que os voluntários com idade superior a 65 anos apresentaram prevalência semelhante de insuficiência de vitamina D quando

comparados aos voluntários abaixo de 65 anos (77,27% e 78,42%, respectivamente, p = 0,87). Com relação ao IMC, os voluntários com IMC $\geq$ 25Kg/m² apresentaram maior prevalência de insuficiência de vitamina D quando comparados com os voluntários com peso adequado (81,3 *vs.* 74%, p = 0,028). Também encontramos uma tendência de maior prevalência entre os obesos comparados aos não obesos (84,21% *vs*. 75,93%; p = 0,05).

TABELA 7: Características demográficas e bioquímicas dos voluntários com insuficiência de 25 vitamina D

	25 (OH)D < 30 (n=473)	25(OH)D ≥ 30 (n=130)	*p**
Idade (anos)	**48,3 (13,1)**	**46,0 (14,4)**	***0,08***
Sexo (N, % mulheres)	384 (81,2)	101 (77,7)	*0,20*
Cor da pele (N, %)			
Brancos	159 (34,4)	34 (26,9)	*0,13*
Não brancos	303 (65,5)	92 (73)	
Hipertensão arterial sistêmica (N, %)	**139 (30)**	**25 (19,5)**	***0,01***
Diabetes mellitus (N, %)	48 (10,3)	9 (7)	*0,20*
Menopausa (N, % mulheres)	157 (42)	45 (45)	*0,70*
Cálcio total (mg/dl)	9,7 (9,3-10)	9,7 (9,3-10)	*0,86*
Cálcio ionizado (mg/dl)	5,0 (4,9-5,1)	5,0 (4,9-5,1)	*0,52*
Fósforo (mg/dl)	**3,7 (3,3-4,1)**	**3,8 (3,4-4,3)**	***0,07***
Creatinina (mg/dl)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,6-0,9)	*0,1*
Clearance creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)	100,2 (86-116)	99,5 (83,6-116)	*0,51*
Albumina (mg/dl)	4,5 (4,3-4,7)	4,5 (4,3-4,7)	*0,68*
Glicose (mg/dl)	83 (76-92)	81,0 (75-91)	*0,28*
Índice de Massa Corporal (Kg/ m²)	**26,6 (23,6-30,2)**	**25,3 (22,7-28,4)**	***0,02***
Paratormônio (pg/ml)	**65 (52,7-83,2)**	**52,5 (42-73,2)**	***0,0001***
Fosfatase alcalina (U/L)	70 (56-83)	67,5 (54-82)	*0,53*
25 vitamina D (ng/ml)	**18,5 (15-23,4)**	**37,3 (33,1-41,8)**	***<0,001***

Os valores estão expressos em percentual (%), média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

Como descrito na estatística, para análises posteriores consideramos o ponto de corte de 30 ng/ml para categorização da 25 vitamina D. A regressão logística univariada mostrou que as variáveis que se associaram com a insuficiência de vitamina D foram fósforo (β = -0,32, p = 0,01), paratormônio (β = 0,018, p < 0,001) e HAS (β = 0,56, p = 0,02) (TABELA 8). Também encontramos uma tendência para uma associação entre insuficiência de vitamina D e idade e IMC.

TABELA 8: Regressão logística: Análise univariada dos fatores associados à hipovitaminose D

	beta	**95% IC**		***p***
Idade (anos)	0,01	-0,021	0,028	*0,08*
Fósforo (mg/dl)	**-0,32**	**-0,593**	**-0,046**	***0,01***
Hipertensão Arterial (sim/ não)	**0,56**	**0,076**	**1,056**	***0,02***
Índice de Massa Corporal (Kg/ m²)	0,03	-0,045	0,082	*0,07*
Paratormônio (pg/ml)	**0,018**	**0,090**	**0,117**	***<0,001***

A análise logística multivariada revelou que a insuficiência de vitamina D associou-se ao paratormônio (β = 0,014, p = 0,011) e mostrou uma tendência de associação com os níveis de fósforo (β = -0,275, p = 0,082) (TABELA 9).

TABELA 9: Regressão logística: Análise multivariada dos fatores associados à hipovitaminose D

	beta	**95% IC**		***p***
Constante	1,17			*0,273*
Idade	-0,005	-0,027	0,215	*0,63*
Índice de Massa Corporal (Kg/m²)	0,020	-0,032	0,072	*0,43*
Fósforo (mg/dl)	-0,275	-0,44	0,041	*0,082*
Paratormônio (pg/ml)	**0,014**	**0,02**	**0,026**	***0,011***
Hipertensão arterial (sim/ não)	0,375	-0,257	1,00	*0,23*

4.2 Segunda análise – após verão

Após o verão (março e abril de 2007), foram reavaliados 209 voluntários A TABELA 10 mostra que estes 209 voluntários são semelhantes à amostra inicial em relação a todas as variáveis analisadas.

Conforme demonstrado na TABELA 11, podemos observar que, após o verão houve uma elevação nos níveis séricos de 25 vitamina D, cálcio ionizado, creatinina, albumina, glicemia e uma diminuição nos níveis séricos de PTH, cálcio e fosfatase alcalina.

TABELA 10: Comparação das variáveis demográficas e bioquímicas após o inverno entre os voluntários na primeira e segunda coleta de dados

Variáveis	Inverno N = 603	Inverno N = 209	*p*
Idade (anos)	47,8 (13,4)	47,4 (11,5)	*0,915*
Sexo (N, %)			
Mulheres	485 (80,4)	178 (85,2)	*0,15*
Homens	118 (19,6)	31 (14,8)	
Etnia (N, %)			
Brancos	395 (67,2)	139 (67,5)	*1,0*
Não brancos	193 (32,8)	67 (32,5)	
Hipertensão arterial sistêmica (N, %)	164 (27,7)	57 (27,5)	*1,0*
Diabetes mellitus (N, %)	57 (9,6)	11 (5,3)	*0,35*
Menopausa (N, %)	204 (42,1)	84 (46,4)	*0,25*
Indice de Massa Corporal (Kg/m^2)	27,3 (23,4-29,9)	26,6 (23,8-30,2)	*0,625*
Cálcio (mg/dl)	9,7 (9,3 - 10,0)	9,5 (9,2 – 9,9)	*0,838*
Cálcio iônico (mg/dl)	5,0 (4,9 - 5,1)	5,0 (4,9 - 5,1)	*0,257*
Fósforo (mg/dl)	3,7 (3,3 - 4,1)	3,7 (3,3 - 4,1)	*0,950*
Creatinina (mg/dl)	0,8 (0,7 - 0,9)	0,76 (0,7 - 0,9)	*0,786*
Albumina (g/dl)	4,5 (4,3 - 4,7)	4,5 (4,3 - 4,6)	*0,788*
Glicose (mg/dl)	83,0 (76 - 92)	85,0 (77,5 - 91)	*0,157*
Paratormônio (pg/ ml)	63,0 (50 - 81)	64,0 (51,5 - 83)	*0,891*
Fosfatase alcalina (U/L)	69 (56-83)	69,5 (54 – 82)	*0,841*
Proteína C reativa (mg/dl)	1,8 (0,8-4,5)	1,86 (0,84 - 4,4)	*0,925*
25 vitamina D (ng/ml)	21,4 (16,2-28,7)	22,0 (16,6-28,8)	*0,125*

Os valores estão expressos em N e percentual (%) ou média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

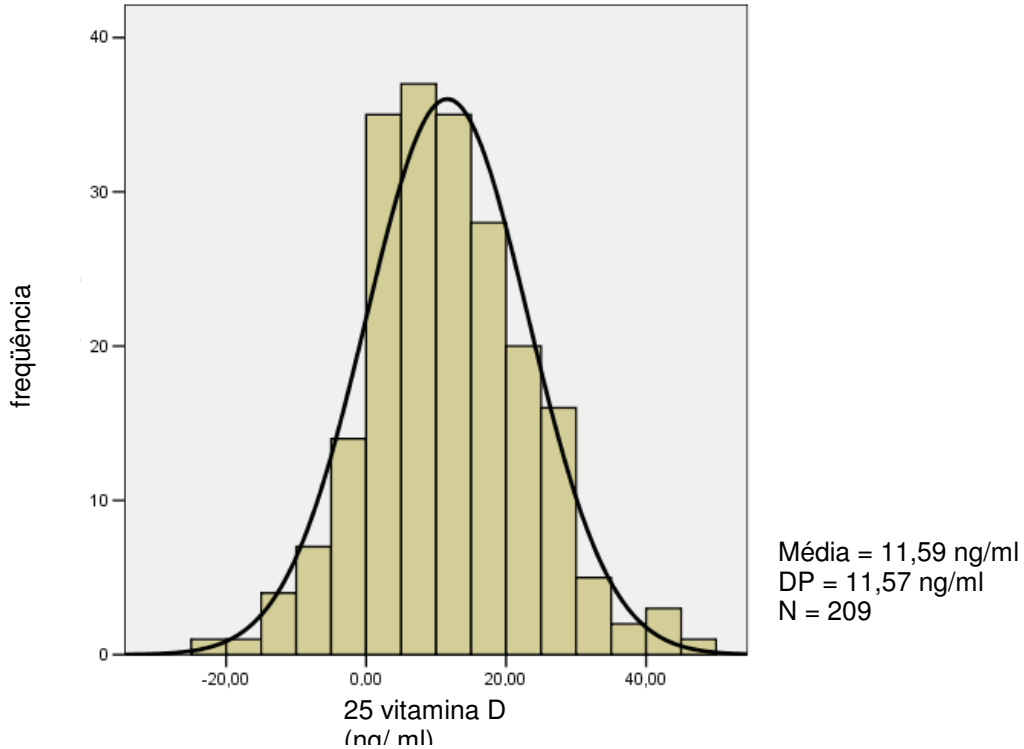
TABELA 11: Média das variáveis bioquímicas pesquisadas após o inverno e verão

	Inverno	Verão	*p*
N	209	209	
Idade (anos)	47,4 ± 11,50	47,4 ± 11,50	
Cálcio total (mg/dl)	**9,5 ± 0,54**	**9,1 ± 0,38**	***<0.001***
Calcio ionizado (mg/dl)	**5,0 (4,9 – 5,1)**	**5,2 (5,0 – 5,3)**	***<0.001***
Fósforo (mg/dl)	3,7 (3,3 – 4,1)	3,7 (3,4 – 4,1)	*0.43*
Creatinina (mg/dl)	**0,76 ± 0,17**	**0,81 ± 0,14**	***<0.001***
Albumina (mg/dl)	4,5 (4,3 – 4,6)	4,5 (4,3 – 4,7)	*0.04*
Glicemia (mg/dl)	**85,0 (77,5 – 91,0)**	**87,0 (82,0 – 93,2)**	***<0,001***
PTH (pg/ml)	**64,0 (51,5 – 83,5)**	**48,0 (35,0 – 61,0)**	***<0.0001***
Fosfatase alcalina (U/l)	**70,4 ± 19,8**	**68,2 ± 20,1**	***0.002***
25 vitamina D (ng/mL)	**22,0 (16,6 – 28,8)**	**34,0 (26,1 – 43,5)**	***<0.001***
Proteína C reativa (mg/dl)	1,86 (0,84 – 4,37)	1,79 (0,86 – 3,90)	*0,84*

Os valores estão expressos em média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

O GRÁFICO 8 mostra a distribuição do incremento de 25 vitamina D após o verão nos 209 voluntários estudados. Como podemos observar, houve um incremento médio de 11,6 ± 11,6 ng/ml nos níveis séricos de 25 vitamina D.

GRÁFICO 8: Distribuição do incremento de 25 vitamina D após o verão na amostra estudada



A TABELA 12 mostra a modificação na prevalência de deficiência de vitamina D após o verão para todos os pontos de corte adotados.

TABELA 12: Prevalência de hipovitaminose D de acordo com diferentes pontos de corte

	Inverno N=209 (N / %)	Verão N=209 (N / %)	*p*
25 vitamina D < 15 ng/ml	**29 / 13,8**	**8 / 3,8**	***0,0004***
25 vitamina D < 30 ng/ml	**160 / 76,5**	**78 / 37,3**	***< 0,0001***
25 vitamina D < 40 ng/ml	**193 / 92,3**	**133 / 63,6**	***< 0,0001***

Para tentar identificar os fatores de risco que poderiam estar associados a um menor incremento dos níveis séricos de vitamina D, realizamos inicialmente a comparação nesta amostra dos indivíduos que tinham 25 vitamina D < 30 ng/ml após o verão com aqueles que apresentavam 25 vitamina D ≥ 30 ng/ml, conforme descrito na TABELA 13. Podemos observar que os voluntários que apresentam níveis de 25 vitamina D < 30 ng/ml são mais idosos e com um maior percentual de mulheres na menopausa. Estes indivíduos também têm uma tendência a apresentar níveis mais elevados de fosfatase alcalina. Não encontramos diferenças significativas nos níveis de PTH entre os dois grupos.

TABELA 13: Características demográficas e bioquímicas dos voluntários com insuficiência de 25 vitamina D após o verão

	25(OH)D < 30 (n = 79)	25(OH)D ≥ 30 (n = 130)	*p**
Idade (anos)	**50,5 (11,5)**	**45,5 (11,0)**	***0,002***
Sexo (N, % mulheres)	69 (87,3)	109 (83,8)	*0,49*
Cor da pele (N, %)			
Brancos	54 (68,3)	93 (73,2)	*0,45*
Não brancos	25 (31,7)	34 (26,8)	
Hipertensão arterial sistêmica (N, %)	26 (45,6)	31 (54,4)	*0,174*
Diabetes mellitus (N, %)	6 (54,5)	5 (45,5)	*0,25*
Menopausa (N, % mulheres)	**40 (56,3)**	**44 (40,0)**	***0,031***
Cálcio total (mg/dl)	9,1 (8,8-9,3)	9,1 (8,8-9,3)	*0,39*
Cálcio ionizado (mg/dl)	5,2 (5,0-5,3)	5,2 (5,0-5,3)	*0,57*
Fósforo (mg/dl)	3,7 (3,4-4,1)	3,7 (3,4-4,1)	*0,51*
Creatinina (mg/dl)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,7-0,9)	*0,41*
Clearance creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)	100,2 (86-116)	99,5 (83,6-116)	*0,32*
Albumina (mg/dl)	4,5 (4,4-4,7)	4,5 (4,3-4,7)	*0,92*
Glicose (mg/dl)	89,0 (84,0-95,0)	86,0 (81,0-92,5)	*0,59*
Índice de Massa Corporal (Kg/ m²)	27,0 (24,0-31,3)	25,8 (23,7-29,8)	*0,12*
Paratormônio (pg/ml)	52,5 (36,0-67,7)	47,0 (33,2-59,5)	*0,39*
Fosfatase alcalina (U/L)	**73 (56-82)**	**65,0 (52-78,5)**	***0,06***
25 vitamina D (ng/ml)	**23,7 (18,9-28,2)**	**42,0 (35,5-49,1)**	***<0,001***

Os valores estão expressos em percentual (%), média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

Posteriormente, categorizamos os voluntários em 4 grupos, a partir da comparação dos níveis séricos de 25 vitamina D entre inverno e verão:

-GRUPO 1: indivíduos com níveis de 25 vitamina D sempre < 30 ng/ml, independente da estação do ano (n = 72)
-GRUPO 2: indivíduos com níveis de vitamina D < 30 ng/ml após o inverno e ≥ 30 ng/ml após o verão (n = 88)
-GRUPO 3: indivíduos com níveis de 25 vitamina D sempre ≥ 30 ng/ml, independente da estação do ano (n = 43)
-GRUPO 4: indivíduos com níveis de vitamina D ≥ 30 ng/ml após o inverno e < 30 ng/ml após o verão (n = 4).

Como o número de voluntários no GRUPO 4 foi muito pequeno, eles não foram considerados nesta análise. No entanto, vale ressaltar que, dos 47 indivíduos que apresentavam 25 vitamina D ≥ 30 ng/ml após o inverno, somente 6 (12,7%) tiveram decréscimo desta variável após o verão.

Na TABELA 14 estão descritas as variáveis demográficas e bioquímicas de acordo com os grupos descritos acima. As variáveis bioquímicas referem-se ao período do inverno, com exceção da 25 vitamina D, que tem representados seus valores de inverno, verão e incremento.

Conforme pode ser observado na TABELA 14, nota-se que os voluntários com níveis persistentemente normais de 25 vitamina D são mais jovens, com níveis mais elevados de fósforo sérico. Curiosamente a variação de vitamina D neste grupo é menor do que a apresentada pelo GRUPO 2, sugerindo um comportamento bifásico nesta variável.

TABELA 14: Variáveis demográficas e bioquímicas após inverno de acordo com a variação de vitamina D

	GRUPO 1 (n = 72)	GRUPO 2 (n= 88)	GRUPO 3 (n = 43)
25 vitamina D (ng/ml) Inverno	**17,8 ± 5,8***	**21,0 ± 4,6***	**39,0 ± 7,0***
25 vitamina D (ng/ml) Verão	**22,3 ± 5,5***	**40,7 ± 8,0***	**49,3 ± 12,5***
Variação 25 vitamina D (ng/ml)	**4,5 ± 5,6***	**19,7 ± 9,1***	**10,3 ± 11,6***
Sexo (H / M)	7/65	12/86	7/36
Cor da pele (N / %)			
Branco	50 (69,4)	61 (71,8)	32 (74,4)
Não branco	22 (30,6)	24 (28,2)	11 (25,6)
Hipertensão arterial (+ / -)	25/47	25/61	6/37
Diabetes mellitus (+ / -)	6/66	4/82	1/42
Obesidade (+ / -)	18/54	20/66	5/38
Menopausa (+ / -)	**37/29**	**29/46º**	**16/20**
Idade(anos)	**51,0 (11,2)***	**45,9 (9,8)***	**44,8 (13,2)***
Índice de Massa Corporal (kg/m²)	28,0 (4,9)	27,2 (4,8)	26,4 (4,8)
Cálcio total (mg/dl)	9,5 (0,5)	9,5 (0,6)	9,5 (0,5)
Cálcio iônico (mg/dl)	5,0 (0,2)	5,0 (0,2)	5,0 (0,2)
Fósforo (mg/dl)	**3,7 (0,6)**	**3,6 (0,6)***	**4,04 (1,0)***
Creatinina (mg/dl)	0,8 (0,1)	0,8 (0,1)	0,8 (0,2)
Albumina (g/dl)	4,4 (0,3)	4,4 (0,3)	4,4 (0,3)
Glicose (mg/dl)	86,9 (13,8)	90,2 (29,4)	84,3 (11,6)
Fosfatase Alcalina (U/L)	**74,8 (21,5)#**	**69,2 (18,8)#**	**66,7 (19,2)#**
Paratormônio (pg/ml)	70,0 (22,5)	**68,3 (25,2**	63,1 (26,5)

Os valores estão expressos em N ou média (DP).* P<0,05 vs. outros grupos; # P=0,08 *vs*. outros grupos; ºP = 0,11 *vs*. grupo 1

Finalmente, realizamos uma nova análise, procurando identificar na população que apresentava níveis de 25 vitamina D < 30 ng/ml no inverno quais seriam os fatores preditivos da normalização deste parâmetro após o verão. A regressão logística univariada mostrou que a idade e a menopausa entre as mulheres foram negativamente associadas à normalização da vitamina D (TABELA 15).

TABELA 15: Regressão logística: Análise univariada dos fatores preditivos da normalização após o verão

	beta	**95% IC**		***p***
Idade (anos)	**-0,046**	**-0,079**	**-0,014**	***0,004***
Menopausa (sim/não)	**-0,70**	**-1,391**	**-0,018**	***0,039***

Para a realização da análise multivariada excluímos os voluntários do sexo masculino (n = 19), pois não tínhamos como avaliar a andropausa. Conforme descrito na TABELA 16, a normalização dos níveis séricos de vitamina D foi dependente da idade.

TABELA 16: Regressão logística: Análise multivariada dos fatores preditivos da normalização dos níveis séricos de vitamina D após o verão

	beta	**95% IC**		***p***
Constante	2,58			*0,01*
Idade (anos)	**-0,049**	**-0,095**	**-0,031**	***0,03***
Menopausa (sim/não)	-0,068	-0,967	0,830	*0,87*

Posteriormente, para confirmar a importância da menopausa após o verão, realizamos uma nova análise comparando os níveis de 25 vitamina D entre homens e mulheres menopausadas, pareados por faixa etária. Os níveis de 25 vitamina D entre os dois gêneros não foi diferente significativamente [21,8 ng/ml (15,3-29,0) e 21,3 ng/ml (16,0-27,9) respectivamente, p = 0,70). Podemos considerar então, que a menopausa é um fator associado à maior idade entre as mulheres e não ao incremento dos níveis séricos de 25 vitamina D após o verão

4.3 Paratormônio

4.3.1 Análise dos fatores preditores dos níveis séricos de paratormônio

Após o inverno, o valor mediano de PTH foi de 63,0 pg/ml (50 - 81) (TABELA 2). Considerando os níveis séricos de PTH como variável contínua, foram verificadas na amostra correlações positivas entre PTH e IMC (r = 0,199; p = 0,01), fosfatase alcalina (r = 0,096; p = 0,031) e idade (r = 0,236; p < 0,001) (GRÁFICOS 9,10,11). A correlação de PTH e fósforo foi negativa (r=-0,199; p < 0,0001) (GRÁFICO 12), assim como com a 25 vitamina D (r = -0,199, p = <0,001) (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 9: Correlação entre os níveis de PTH e IMC

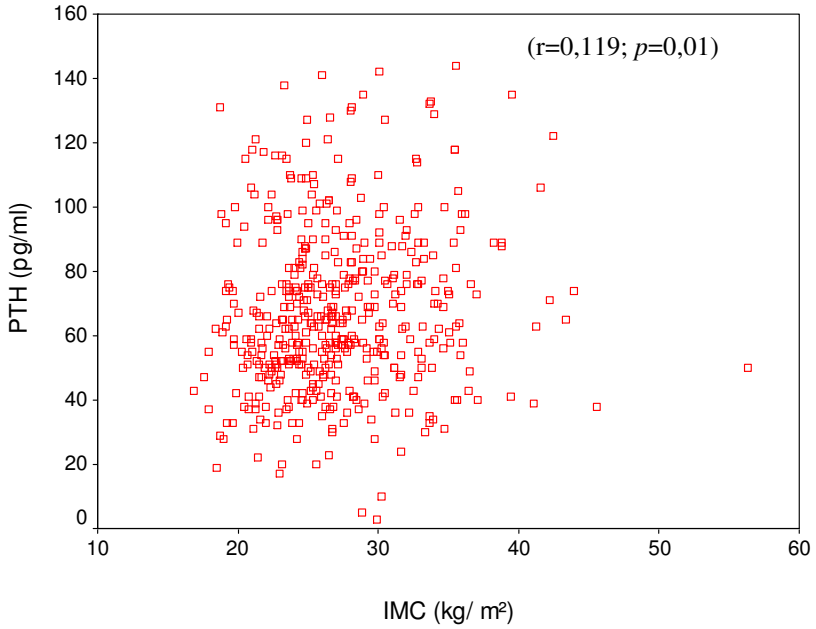


GRÁFICO 10 Correlação entre os níveis de PTH e FA

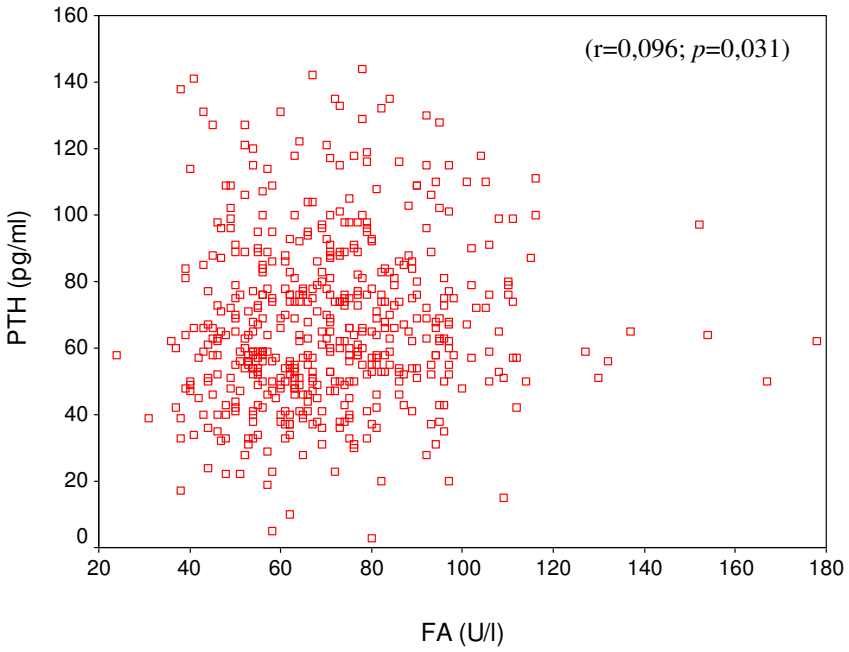


GRÁFICO 11 Correlação entre os níveis de PTH e idade

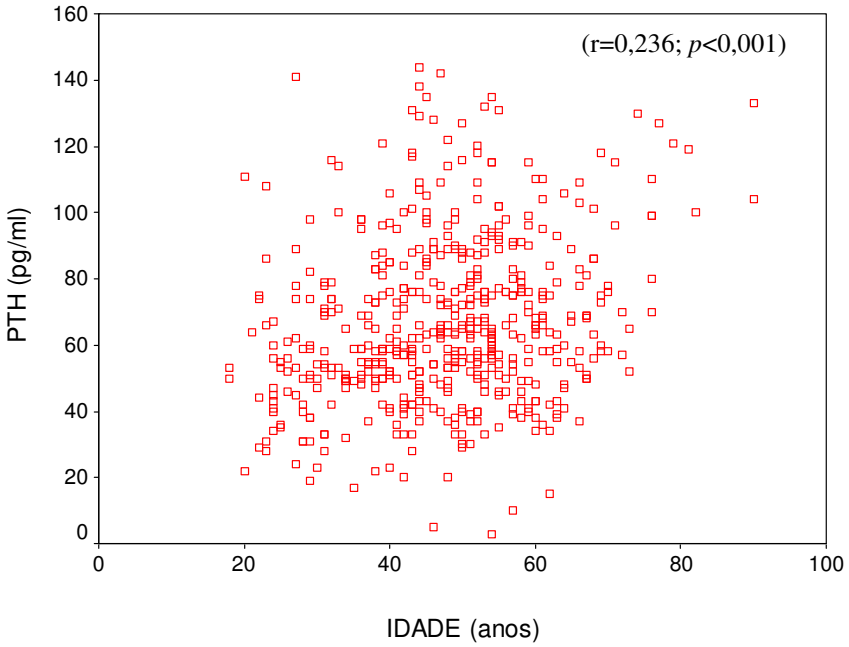
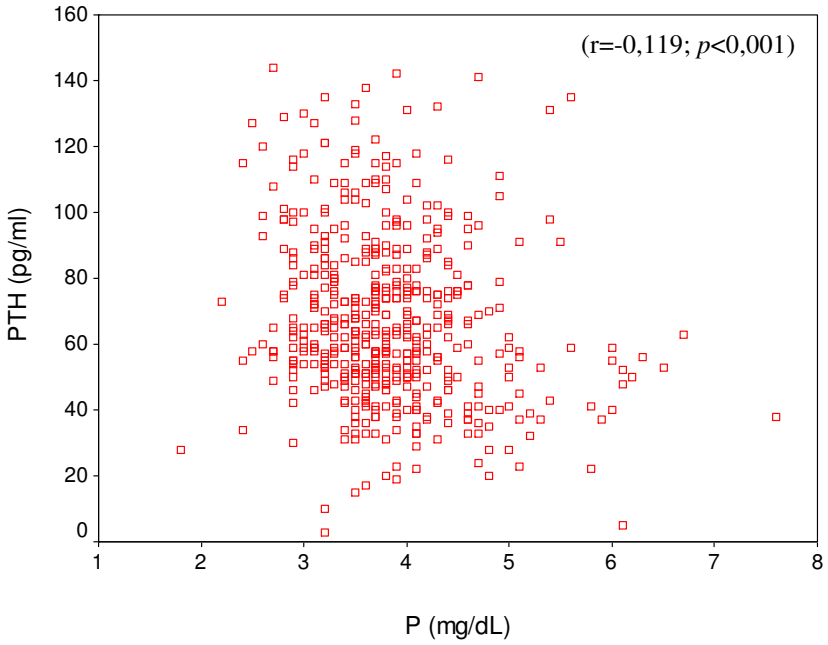


GRÁFICO 12 Correlação entre os níveis de PTH e fósforo



Como os níveis séricos de PTH apresentavam distribuição não gaussiana, realizamos as análises univariada e multivariada antes e após a conversão para escala logarítmica. Como os resultados foram semelhantes, apresentaremos apenas os valores da análise realizada com os valores sem a conversão para escala logarítmica. A análise univariada mostrou que as variáveis associadas aos níveis de PTH foram idade, IMC e níveis séricos de 25 vitamina D, conforme descrito na TABELA 17.

TABELA 17: Regressão linear - Análise univariada das variáveis associadas ao paratormônio

	beta	95% IC		*p*
Idade (anos)	**0,20**	**0,24**	**0,59**	***<0,001***
P (mg/dl)	**-6,86**	**-9,77**	**-3,95**	***< 0,001***
Índice de Massa Corporal (Kg/m²)	**0,58**	**0,14**	**1,01**	***0,009***
25 vitamina D (ng/ml)	**-0,15**	**-0,63**	**-0,18**	***0,0004***

Para realização da análise multivariada, consideramos apenas aquelas variáveis que poderiam ser consideradas como preditoras dos níveis de PTH, ou seja, idade, IMC e 25 vitamina D. As variáveis preditoras dos níveis de PTH, após aplicação do teste de análise multivariada, foram idade e os níveis de 25 vitamina D, conforme descrito na TABELA 18.

TABELA 18: Regressão linear - Análise multivariada das variáveis preditoras do Paratormônio

	beta	**95% IC**		***p***
Constante	50,67	35,79	65,54	*<0,0001*
Idade (anos)	**0,407**	**0,229**	**0,584**	***<0,0001***
Índice de Massa Corporal (Kg/m²)	0,304	-0,128	0,77	*0,167*
25 vitamina D (ng/ml)	**-0,469**	**-0,688**	**-0,249**	***<0,0001***

4.3.2 Análise dos fatores associados ao hiperparatiroidismo secundário

Considerando PTH como variável categórica, os voluntários com níveis séricos de PTH acima de 87 pg/ml apresentaram diferença significativa quando comparados com os voluntários com níveis iguais ou abaixo de 87 pg/ml para idade, prevalência de hipertensão, prevalência de menopausa entre as mulheres, níveis de fósforo, creatinina e *clearance* de creatinina. Também encontramos uma tendência de diferença significativa entre os voluntários com níveis de PTH abaixo ou acima de 87 pg/ml para prevalência de não brancos, IMC e 25 vitamina D (TABELA 19).

TABELA 19: Características demográficas e bioquímicas dos voluntários de acordo com níveis de PTH (pg/ml)

	PTH ≤ 87 (n=426)	PTH > 87 (n=109)	*p**
Idade (anos)	**46,2 (12,6)**	**51,8 (13,4)**	***<0,001***
Sexo (N, % mulheres)	344 (80,7)	85 (78,0)	*0,50*
Etnia (N, %)			
Brancos	**293 (70,3)**	**65 (60,7)**	***0,06***
Não brancos	**124 (29,7)**	**42 (39,3)**	
Hipertensão arterial sistêmica (N, %)	**104 (24,8)**	**37 (34,6)**	***0,04***
Diabetes mellitus (N, %)	41 (9,7)	8 (7,4)	*0,57*
Menopausa (N, % mulheres)	**129 (38,3)**	**43 (51,2)**	***0,03***
Cálcio total (mg/dl)	9,7 (9,3-10)	9,6 (9,2-10)	*0,64*
Cálcio ionizado (mg/dl)	5,0 (4,9-5,1)	5,0 (4,9-5,1)	*0,89*
Fósforo (mg/dl)	**3,8 (3,4-4,2)**	**3,6 (3,2-4,0)**	***0,01***
Creatinina (mg/dl)	**0,76 (0,68-0,87)**	**0,81 (0,73-0,91)**	***0,01***
***Clearance* creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)**	**100,9 (88-116)**	**94,4 (81,5-109)**	***0,002***
Albumina (mg/dl)	4,5 (4,3-4,6)	4,5 (4,3-4,7)	*0,88*
Glicose (mg/dl)	82 (75-90,5)	84 (75-93)	*0,53*
Índice de Massa Corporal (Kg/ m^2)	**26,2 (23,5-29,7)**	**26,7 (23,4-31,9)**	***0,06***
Paratormônio (pg/ml)	**57 (47-69)**	**100 (93-115)**	***<0,001***
Fosfatase alcalina (U/L)	67 (55-82,7)	72 (56-83)	*0,88*
25 vitamina D (ng/ml)	**21,3 (16,4-28,2)**	**19,3 (14,1-27,1)**	***0,06***

Os valores estão expressos em percentual (%), média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

Na análise de regressão logística univariada, o hiperparatiroidismo secundário se mostrou associado à da idade, aos níveis séricos de fósforo, ao clearance de creatinina, a hipertensão arterial sistêmica e a menopausa. Também encontramos tendência de associação entre o hiperparatiroidismo secundário e os níveis séricos de 25 vitamina D (TABELA 20).

TABELA 20: Regressão logística - Análise univariada das variáveis associadas ao hiperparatiroidismo secundário

	beta	95% IC		*p*
25 vitamina D (ng/ml)	**-0,021**	**-0,043**	**0,016**	***0,063***
Fósforo (mg/dl)	**-0,40**	**-0,734**	**-0,069**	***0,015***
Idade (anos)	**0,034**	**0,017**	**0,052**	***<0,001***
***Clearance* creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)**	**-0,015**	**-0,025**	**-0,050**	***0,002***
Hipertensão arterial (sim/não)	**0,474**	**0,08**	**0,94**	***0,042***
Cor da pele (branco/ não branco)	-0,423	-0,873	0,027	*0,60*
Menopausa (sim/não)	**0,525**	**0,035**	**1,01**	***0,032***
Índice de Massa Corporal (Kg/m²)	**0,038**	**-0,04**	**0,08**	***0,068***

Para análise de regressão logística multivariada foi retirada a variável "menopausa", pois o modelo com a mesma levaria à exclusão de todos os voluntários do sexo masculino, reduzindo a amostra e dificultando a análise. Em nossas análises após o verão, podemos observar que as associações de menopausa estão relacionadas com a maior idade entre as mulheres. Desta forma, na análise de regressão logística multivariada, o hiperparatiroidismo secundário se mostrou associado ao *clearance* de creatinina. Houve também uma tendência de associação entre o hiperparatiroidismo secundário e os níveis séricos de fósforo e de 25 vitamina D e ao índice de massa corporal (TABELA 21).

TABELA 21: Regressão logística - Análise multivariada das variáveis associadas ao hiperparatiroidismo secundário

	beta	95% IC		*p*
Índice de Massa Corporal (Kg/m²)	0,065	0,017	0,113	*0,07*
Fósforo (mg/dl)	-0,344	-0,7	0,012	*0,053*
25 vitamina D (ng/ml)	-0,024	-0,05	0,02	*0,07*
***Clearance* creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)**	**-0,20**	**-0,032**	**-0,008**	***<0,001***

4.4 Associação 25 vitamina D e PTH

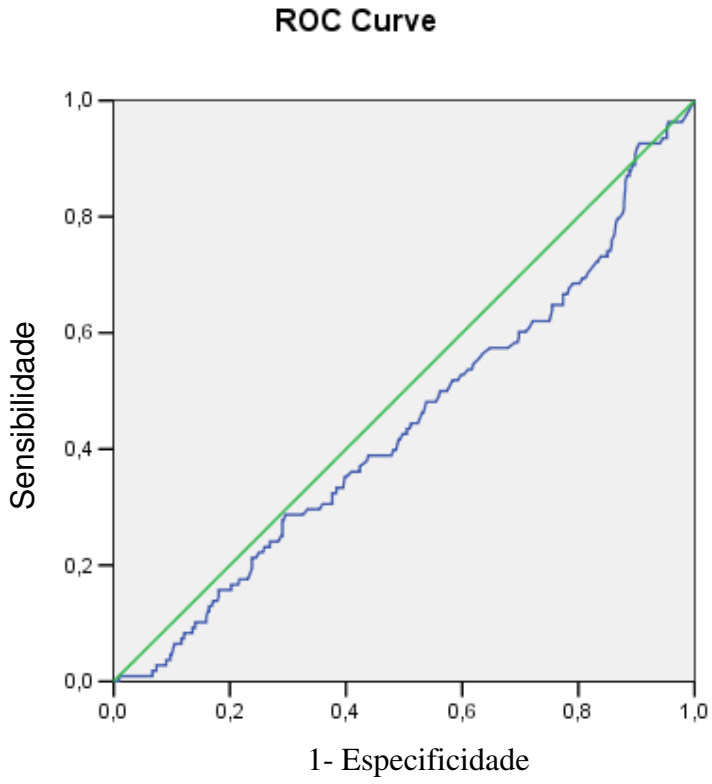
Procurando explorar um pouco mais a relação entre níveis séricos de 25 vitamina D e presença de hiperparatireoidismo, avaliamos a prevalência de hiperparatireoidismo diante de diferentes valores de 25 vitamina D. Nota-se que o grupo com 25 vitamina D < 30 ng/ml apresentou tendência a maior prevalência de HPTS quando comparado ao grupo com vitamina D dentro da normalidade. (21,3% *vs.* 17%; p = 0,092). Quando considerado ponto de corte de 40 ng/ml, verificamos prevalência de HPTS de 21,3% (quando vitamina D reduzida) e 6,5% (quando vitamina D normal) (p = 0,027) (TABELA 22).

TABELA 22: Prevalência de hiperparatiroidismo secundário entre os voluntários pesquisados de acordo com 25 vitamina D

	%	*P*
25 vitamina D		
≤ 30 ng/mL	21,3	*0.092*
> 30 ng/mL	17,0	
25 vitamina D		
≤ 40 ng/mL	**21,3**	***0.027***
> 40 ng/mL	**6,5**	

Porém, quando tentamos estabelecer uma curva ROC entre níveis de 25 vitamina D e presença de hiperparatireodismo, notamos que a área sob a curva não é satisfatória, provavelmente porque há outras variáveis que também contribuem para a elevação do PTH. (GRÁFICO 13).

GRÁFICO 13: Curva ROC entre os níveis séricos de 25 vitamina D e a presença de hiperparatiroidismo secundário



Porém, os efeitos da 25 vitamina D nos níveis séricos de PTH devem ser relevantem, pois notamos que, após o verão, quando ocorreu uma elevação significativa dos níveis de 25 vitamina D na maior parte dos voluntários, também pudemos observar uma queda significativa nos níveis séricos de PTH. (TABELA 13). Também pudemos observar uma queda significativa na prevalência de hiperparatireoisdimo após o verão, conforme demonstrado na TABELA 23.

TABELA 23: Prevalência de hiperparatiroidismo secundário entre os voluntários pesquisados no inverno e verão

	%	*P*
Inverno	**20,8**	
Verão	**4,9**	***<0.0001***

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários estudos clínicos e experimentais mostraram que níveis adequados de 25 vitamina D, metabólito que representa o *status* nutricional de vitamina D, são essenciais não somente para o metabolismo mineral, mas também para outros sistemas, entre eles os sistemas cardiovascular e imunológico.[29,48] As conseqüências de saúde pública da deficiência de vitamina D são incalculáveis. Porém, em diversas regiões no mundo foi verificada uma elevada prevalência de hipovitaminose D e a informação sobre os níveis de vitamina D na maioria dos países ensolarados é negligenciada.[18]

No Brasil, os dados sobre os níveis de vitamina D são escassos, descritos somente em pequenos grupos de indivíduos considerados de risco, como crianças, adolescentes e idosos.[67,68,69] Desta forma, nosso estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de hipovitaminose D (tanto deficiência quanto insuficiência) em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira e seus efeitos no organismo. Selecionamos uma amostra de voluntários na cidade de São Paulo, o maior centro econômico do país, localizado a 23°34 ’S, com clima subtropical.

Para identificar a relevância da variação sazonal nesta região brasileira iniciamos nosso estudo após o inverno. Baseados em sua meia vida plasmática, outros estudos já descreveram que os níveis de 25 vitamina D podem significar uma exposição solar prévia. [18] Com base nesta informação optamos por realizar nossa coleta de dados nos meses seguintes ao inverno (setembro/ outubro) e verão (março e abril).

No primeiro período da pesquisa (após inverno), encontramos uma prevalência aumentada de insuficiência (77,4%) e deficiência (19,3%) de vitamina D. Considerando que os níveis de 25 vitamina D são influenciados pela exposição solar, e que o Brasil é um país ensolarado, este é um dado inesperado.

A prevalência de hipovitaminose D pode variar entre diferentes estudos encontrados na literatura dependendo da idade da população, presença ou não de doenças crônicas, da latitude da região, da exposição individual à radiação UV, da

estação do ano em que os dados foram coletados e principalmente, de acordo com o critério utilizado para determinar a insuficiência ou deficiência de vitamina D (QUADRO 2). Estima-se que atualmente um bilhão de pessoas em todo o mundo apresente deficiência ou insuficiência de vitamina D.[49]

Dados mundiais, mesmo em diferentes latitudes, mostram prevalências de hipovitaminose D semelhantes aos nossos achados. Porém, é interessante salientar que a maior parte destes estudos que mostraram prevalência aumentada de hipovitaminose D foi realizada em regiões com maior latitude em comparação a São Paulo. O estudo NHANES (2000-2004)[73,74], baseado nos dados de mais de 20.000 americanos, mostrou uma prevalência de hipovitaminose D aumentada significantemente (72%), considerando ponto de corte de 32ng/ml. Em uma região fria, Tseng *et al.*[75] verificaram níveis muito reduzidos de 25 vitamina D e prevalência elevada de sua insuficiência (61%) em sua amostra de homens afro-americanos na região na Filadélfia. Neste caso os autores encontraram também uma grande variabilidade entre as estações.

Nossos dados se mostram mais alarmantes, pois se equiparam com os resultados da pesquisa de Kull Jr *et al.*[76] realizada na Estônia, região com alta latitude (59°N). Os autores encontraram após o inverno, em uma amostra semelhante à nossa, que 73% dos 367 voluntários eram insuficientes em vitamina D. O valor médio de vitamina D nesta pesquisa foi de 17,5 $\pm$ 6,0 ng/ml após o inverno e 23,7 $\pm$ 7,2 ng/ml após o verão. Da mesma forma, na Grã-Bretanha (latitude entre 49°N e 59°N), Hipponen & Power[77] verificaram em pesquisa com 7437 voluntários brancos britânicos, uma prevalência alarmante de hipovitaminose D durante o inverno e primavera (25 vitamina D < 30 ng/ ml = 87,1%). Surpreendentemente, na Dinamarca (56°N), Bogh *et al.*[78] descrevem uma prevalência de 67% de insuficiência e 18% de deficiência de vitamina D, percentuais reduzidos em comparação aos nossos achados.

QUADRO 2: *Status* de 25 vitamina D em estudos populacionais com adultos (> 15 anos) em ordem de latitude

Localização	Latitude	Método	N	Vitamina D (ng/ml)		Deficiência % < 10ng/ml		Insuficiência % < 25ng/ml	
				Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
São Paulo[68]	**23S**	**RIA Nichols**	**250**	**20,9**	**18,5**	**13,3**	**18**	**33,3**	**66**
São Paulo[79]	**23S**	**RIA Nichols**	**127**	**31,2**		**ND**	**ND**	**ND**	**ND**
Beirute[38]	33N	RIA Incstar	316	ND	9,7	ND	72,8	ND	ND
Nova Zelândia[80]	35-47S	RIA Diasorin	2946	26,8	17,6	0-10		48	
Japão[81]	35N	RIA Diasorin	197	31,6	15,2	ND	ND	1	87
US[73]	25-47N	RIA Diasorin	18462	25-36	24-32	1-3	1-5	8-34	13-40
Itália[58]	40N	Ria Diasorin	90	33,6	17,2	2*	18*	4	70
Switzerland[82]	46-47N	CPB Amersham	3276	ND	20**	ND	6	ND	34-95
França[83]	43-51N	RIA Incstar	1569	ND	24,4	ND	14*	ND	75♦
Alemanha[76]	49N	RIA Incstar	415	27-28	16-18	~5	30-40	ND	ND
Bélgica[84]	50N	ChL Diasorin	126	ND	19,2	ND	ND	ND	34#
Finlândia[85]	60N	RIA Incstar	328	ND	18,4	ND	26-28	ND	56-86♦

* nível de 15 ng/ml considerado para deficiência; ** dados de outubro a junho; ♦ específico ponto de corte para insuficiência (baseado na curva de PTH); # nível de 15ng/ml foi considerado para insuficiência

Enfatizando que o Brasil apresenta uma latitude reduzida em comparação a estes países, os dados de São Paulo se tornam mais preocupantes. Para tentar explicar este achado inesperado no Brasil, podemos considerar algumas hipóteses como a latitude, os hábitos culturais, a ingestão alimentar, a fortificação dos alimentos, uso de filtro solar, o estilo de vida em São Paulo, a poluição ou a maior prevalência de mulheres na amostra.

Webb *at al.*[13] denotam que em regiões com latitude acima de 40° (norte ou sul) a fotoconversão da 7-dehidrocolesterol em pré vitamina D não ocorre durante o inverno, e que acima deste ângulo de 40°, a síntese cutânea pode ficar prejudicada também no verão. Considerando a latitude, São Paulo apresenta uma localização privilegiada por estar localizado a 23°34'S, com clima subtropical. Sendo assim, não acreditamos que a latitude seja a explicação para nossos achados. Em recente publicação com dados brasileiros, Maeda *et al.*[79], avaliaram os níveis de vitamina D em adultos jovens (24,7 $\pm$ 2,7 anos) também na cidade de São Paulo. O valor médio de 25 vitamina D foi de 31,8 $\pm$ 13,2 ng/ml, valor maior do que encontrado em nossa pesquisa. Na cidade de Beirute, no Líbano, região com luz solar considerada adequada para síntese cutânea de vitamina D (33°52'N) após o inverno foi verificada também uma inesperada prevalência de deficiência de vitamina D (72,8%), sendo que o valor médio de 25(OH) foi de 9,7 $\pm$ 7,1 ng/ml.[38] Considerando os hábitos culturais desta população, é importante ressaltar a grande quantidade de roupas que cobrem todo o corpo utilizado, principalmente pelas mulheres, o que pode justificar esta redução nos níveis de 25 vitamina D. Confirmando esta hipótese, a prevalência de deficiência de vitamina D foi muito maior entre as mulheres do que entre os homens (83,9% *vs.* 48,5%). Comparando estes dados com o Brasil, não podemos relacionar a hipovitaminose D a hábitos culturais no nosso estudo, pois a maior parte de nossa população não utiliza roupas que cubram o corpo por completo.

Em nossa pesquisa, não analisamos a ingestão de vitamina D. Esta é uma grande limitação no Brasil, pois a maioria das tabelas para cálculo de dietas não apresenta as quantidades de vitamina D nos alimentos. Outro fator é que no Brasil não há fortificação alimentar obrigatória dos alimentos e quando os alimentos são fortificados não há um controle da quantidade acrescida. Desta forma, as quantidades

normalmente encontradas são muito reduzidas e não podem ser consideradas. Dados de uma pesquisa recente nos Estados Unidos com relação à ingestão alimentar revelaram que, não somente as crianças, mas também os adultos apresentaram uma ingestão de vitamina D muito abaixo da recomendada.[86]

Após a suspensão da fortificação alimentar previamente descrita na Introdução, somente alguns países continuam aplicando esta prática. A importância da fortificação e suplementação alimentar pode ser observada na Europa, onde estudos populacionais concluem que, inversamente ao esperado, indivíduos que residem ao sul apresentam níveis de vitamina D reduzidos quando comparados aos indivíduos que residem ao norte, provavelmente em função ao uso de suplementos e alimentos fortificados.[18,79] Indivíduos que utilizavam suplementos contendo vitamina D ou óleo de peixe apresentaram níveis elevados de vitamina D quando comparados aos indivíduos que faziam uso freqüente de alimentos fortificados. Normalmente, a ineficácia da fortificação alimentar é baseada na falta de controle na quantidade adicionada de vitamina D aos alimentos. Este é um problema mundial, sendo que muitos dos alimentos descritos como fortificados com vitamina D apresentam quantidades muito reduzidas da vitamina. No entanto, nos Estados Unidos, único país onde há uma quantidade significativa de alimentos fortificados, a prevalência de hipovitaminose D é reduzida quando comparada com outros estudos em algumas regiões, mesmo com maior latitude.[87]

Em trabalho que avaliou a ingestão alimentar de vitamina D em adolescentes no Brasil, Peters *et al.*[69] descrevem que somente 14,9% de seu grupo de estudo consumia a quantidade recomendada de vitamina D ao dia, sendo que a ingestão média encontrada foi de 140 (120-156) IU/ dia. Considerando estes achados, mesmo não tendo avaliado a ingestão alimentar de vitamina D nesta pesquisa, podemos supor que a baixa ingestão pode estar associada à prevalência de hipovitaminose D encontrada em nossa amostra.

A utilização de filtro solar leva à redução dos níveis de 25 vitamina D por bloquear a síntese cutânea.[18] Entretanto, em nossa pesquisa, de uma forma inesperada, o uso de proteção solar foi associado a maior concentração de vitamina D (dados não mostrados). Este dado é semelhante aos dados de Hypponen & Power[77], que sugerem que o uso de protetor solar pode, em parte, refletir maior exposição

solar. Ou seja, os voluntários que utilizam freqüentemente fator de proteção solar são aqueles mais expostos.

Considerando a qualidade de vida em São Paulo, devemos lembrar que este é um centro urbano, onde as pessoas não costumam se expor ao sol freqüentemente e na maioria dos casos, trabalham em ambientes fechados. Somando a baixa ingestão de vitamina D e a poluição, mesmo em um país ensolarado, os indivíduos que residem em São Paulo podem apresentar risco aumentado de hipovitaminose D.

Em nossa pesquisa, não encontramos associação entre os níveis de 25 vitamina D e prática de atividade física. Diferentemente, Tseng *et al.*[75] encontraram associação entre a pratica de atividade física e níveis de 25 vitamina D, o que poderia ser justificado pela maior exposição solar durante atividades ao ar livre. Como em São Paulo muitos dos praticantes de atividade física o fazem em ambientes fechados, nas academias, não encontramos esta associação.

Com relação ao clima, Hipponen & Power[77] relatam ainda que ao norte de Londres (52°N) não ocorre síntese cutânea de vitamina D em dezembro e janeiro e durante o resto do ano a presença de nuvens no céu pode bloquear esta síntese em até 99%. Em São Paulo, a presença de nuvens não é um agravante para exposição solar. Entretanto, a qualidade do ar com alto grau de poluição pode interferir na síntese cutânea de vitamina D.[79] A associação entre poluição e hipovitaminose D é evidenciada principalmente nas crianças. Buka *et al.*[88] descrevem que a quantidade de radiação solar ultravioleta que alcança a Terra é inversamente relacionada com o nível de poluição no ar. Em sua pesquisa, os mesmos autores verificaram que crianças que residem em locais com níveis elevados de poluição apresentam risco elevado de desenvolver raquitismo em comparação a crianças que residem em locais com taxa de poluição reduzida.

Uma outra possibilidade para explicar a alta prevalência de hipovitaminose D seria o maior percentual de mulheres em nossa amostra. De fato, algumas pesquisas sugerem diferenças entre os gêneros quanto aos níveis de 25 vitamina D, hormônios calciotrópicos e marcadores do metabolismo ósseo.[87] Porém, não verificamos diferença significativa nos níveis de 25 vitamina D entre homens e mulheres. Já

Carnevale *et al.*[58] investigaram longitudinalmente as variações sazonais nos níveis de vitamina D concomitantemente com as alterações de PTH e marcadores de reabsorção óssea em homens e mulheres saudáveis e verificaram níveis elevados de vitamina D em homens quando comparados com mulheres, no inverno e no verão. Entretanto, a elevação nos níveis de 25 vitamina D após o verão foi maior entre as mulheres. Gannagé-Yared *et al.*[38] também encontraram diferença significativa nos níveis de 25 vitamina D entre homens e mulheres residentes em uma região urbana. A diferença entre os sexos pode ser justificada pelo maior tempo de exposição solar dos homens, pelas diferenças relacionadas ao andrógeno (maior quantidade de receptores de vitamina D nos homens, maior quantidade de precursor na pele e melhor 25 hidroxilação hepática em homens) e pelo número de gestações entre as mulheres. Acreditamos que, em qualquer caso, as diferenças entre os gêneros para os níveis de vitamina D podem levar a conseqüências severas entre as mulheres.

Uma outra explicação para esta diferença entre os gêneros é que as mulheres se protegem mais dos raios solares, utilizando filtro solar mais comumente do que os homens.[58] As mulheres também apresentam maior percentual de gordura. Entretanto, após correção estatística para este fator, a diferença entre os gêneros ainda ocorre em outros estudos.[87] Bolland *et al.*[87] verificaram em sua pesquisa menor prevalência de insuficiência de vitamina D em homens em comparação as mulheres, mesmo após os ajustes para os fatores de interferência. Para os homens e mulheres, os maiores determinantes dos níveis de 25 vitamina D foram os meses de coleta de sangue, percentual de gordura corporal e nível de atividade física. Para mulheres, e não para homens, a idade se mostrou um preditor independente dos níveis de 25 vitamina D. Em nossa pesquisa a idade se mostrou significante nos dois gêneros.

Considerando a correlação inversa entre PTH e 25 vitamina D, os níveis elevados de 25 vitamina D em homens podem explicar o menor aumento de PTH neste sexo. Este fenômeno pode induzir a conseqüências relevantes se for sustentado durante a vida. Carnevale *et al.*[58] denotam uma prevalência aumentada (27%) de hipovitaminose D entre as mulheres menopausadas. Do total de mulheres estudadas em nossa pesquisa 42,1% relatou estar menopausada. Entre estas mulheres, 42% apresentaram níveis de 25 vitamina D < 30ng/ml. Na nossa amostra, não encontramos diferença nos níveis de vitamina D em comparação a mulheres não

menopausadas. Entretanto, as mulheres menopausadas apresentaram maior prevalência de hiperparatiroidismo secundário.

Concluindo, com relação às possíveis causas da alta prevalência de hipovitaminose D em nossa amostra, acreditamos que ela deve estar associada à baixa ingestão, à baixa exposição solar e à poluição do ar em São Paulo, embora não tivéssemos como comprovar estas hipóteses em nossa análise. Por outro lado, pudemos confirmar que a idade, o IMC e a cor da pele são fatores que podem interferir nos níveis séricos de 25 vitamina D.

Com relação à idade, em nossa pesquisa encontramos correlação negativa entre os níveis de 25 vitamina D e a idade dos voluntários. Em análise de regressão linear univariada e multivariada, a idade foi confirmada como um fator biológico determinante para os níveis de 25 vitamina D.

A principal explicação para este dado é de que os idosos apresentam quantidades reduzidas do precursor da vitamina D (7-dehidrocolesterol) na pele, resultando em uma menor síntese cutânea. Este grupo também apresenta alterações metabólicas e hormonais relacionadas à idade e não se expõem frequentemente a luz solar. As principais alterações hormonais neste caso estão associadas à diminuição de níveis de fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) ou de estrogênio, em ambos os gêneros.[58]

Em nossa amostra, a idade média também foi mais elevada nos grupos com insuficiência e deficiência (ANEXO D) de vitamina D quando comparados aos voluntários com níveis adequados. Porém, é importante ressaltar que a média de idade de nossa amostra foi de 47,8 (13,8) anos, sendo que 11,9% dos voluntários estavam na faixa etária abaixo de 30 anos. Este dado é relevante, pois se considerarmos que 77,4% da amostra apresentam níveis de 25 vitamina D abaixo de 30 ng/ml e que a idade média é de apenas 47,8 anos, contamos com uma boa parte de indivíduos jovens com hipovitaminose D. De fato, mesmo entre os voluntários com menos de 30 anos, o valor médio de vitamina D foi de 21,8 ng/ml. Desta forma, podemos considerar que, pelo menos em um período do ano, após o inverno, o problema não é restrito à população considerada de risco (crianças, adolescentes e idosos).

Geralmente, a hipovitaminose D é mais freqüente em idosos, principalmente naqueles institucionalizados que, independente da estação climática, têm exposição solar baixa ou quase nula.[89] No entanto, é importante ressaltar que nenhum dos nossos voluntários encontrava-se institucionalizado e que todos apresentavam condições de saúde estáveis no momento da pesquisa, podendo constituir um grupo de idosos "saudáveis".

É interessante que, após o verão, a alteração sazonal de vitamina D foi verificada em todas as faixas etárias, sendo que voluntários com níveis persistentemente normais de 25 vitamina D são mais jovens, com níveis mais elevados de fósforo sérico. Este dado reforça a importância da idade na determinação dos níveis séricos da 25 vitamina D.

Considerando a obesidade como outro fator de risco para hipovitaminose D, em nossa amostra o valor mediano de IMC foi de 27,3 kg/m², o que caracteriza uma população com sobrepeso. Também encontramos uma correlação inversa entre o IMC e os níveis séricos de 25 vitamina D, ou seja, quanto maior o IMC, menor será o nível de 25 vitamina D, confirmando em parte a teoria de Bolland *et al.*[90], na qual os dois maiores determinantes biológicos da concentração de 25 vitamina D são a exposição aos raios UVB e a gordura corporal .

A vitamina D, uma substância lipossolúvel, pode ser "estocada" no tecido de gordura, sendo que o colecalciferol produzido na pele ou adquirido através da alimentação é parcialmente "seqüestrado" pela gordura corporal antes de ser transportado para o fígado para sua primeira hidroxilação. Este estoque de colecalciferol é utilizado durante o inverno, quando o sol é incapaz de produzir esta substância. Desta forma, indivíduos obesos apresentam 50% de redução na capacidade de elevar seu nível de vitamina D quando comparados com voluntários eutróficos.[49,90] O primeiro estudo que analisou a influência da variação sazonal e da gordura corporal nos níveis de vitamina D foi o de Bolland *et al.*[90] Os autores relatam que, entre os voluntários obesos, que apresentam menor pico de 25 vitamina D após o verão, foi observada uma menor variação sazonal. Este resultado confirma a hipóteses de que os adipócitos são um "reservatório" dos metabólitos de vitamina D

Em nosso estudo, o IMC foi maior entre os voluntários com insuficiência de vitamina D. De acordo com a classificação do IMC, os níveis de 25 vitamina D

foram maiores entre voluntários eutróficos em comparação com voluntários obesos. Baseado na explicação fisiológica acima, nosso estudo confirma os achados anteriores e ressalta o valor preditivo do IMC na hipovitaminose D. Outros estudos também mostraram uma forte associação entre os níveis de 25 vitamina D e obesidade.[49,90,91]

Além das explicações biológicas que fazem da obesidade um fator de risco para hipovitaminose D, podemos considerar que os indivíduos obesos normalmente não praticam atividade física e, portanto não se expõem ao sol. Estes também utilizam roupas que cobrem mais o corpo e, em sua grande maioria se alimentam de produtos industrializados, aumentando o risco de desenvolver hipovitaminose D.

Na nossa análise, os voluntários não brancos apresentaram níveis reduzidos de 25 vitamina D quando comparados com os brancos e a cor da pele foi um dos fatores preditores dos níveis séricos de 25 vitamina D. Estudos populacionais relacionados à vitamina D mostram que indivíduos não brancos ou negros apresentam níveis de vitamina D reduzidos quando comparados com brancos.[18,80,83,87]

No Brasil, há uma grande miscigenação com relação à etnia. Esta miscigenação é um fator que limita a determinação da etnia de cada indivíduo. Em nossa amostra optamos por separar os voluntários entre brancos e não brancos, pois, para síntese cutânea de vitamina D, o que deve ser considerado é a presença de melanina (pigmentação) na pele, ou seja, o resultado do fenótipo de cada indivíduo e não o seu genótipo.

Para ajudar a explicar o papel da cor da pele, estudos com gêmeos mostram a importância da hereditariedade na determinação nos níveis de vitamina D sendo que, 65% de variabilidade nos níveis de $1,25(OH)_2D$ é geneticamente determinada. O tipo de pele (ou cor da pele) é importante, pois a melanina presente na pele compete pelos fótons UVB com o 7-dehidrocolesterol que é o substrato para produção de vitamina D.[92] Entre americanos, Nesby-O'Dell *et al.*[65] verificaram que os voluntários brancos não apresentavam níveis de 25 vitamina D maiores quando comparados com mexicanos e estes, por sua vez, apresentavam níveis elevados quando comparados com negros. Porém, quando a latitude é muito alta, não há possibilidade de síntese cutânea e a cor da pele deixa de ser importante. Em uma sub-amostra de 28

voluntários estudados em região fria (Dinamarca), com baixa exposição solar, não foi verificada relação entre os níveis de 25 vitamina D e pigmentação da pele.[85]

Para descrever a capacidade de absorver e sintetizar vitamina D entre brancos e negros, Matsuoka *et. al.*[93] administraram 50.000UI de vitamina D_2 em jovens das duas etnias e, posteriormente, mensuraram os níveis de 25 vitamina D. Para brancos e negros o pico de resposta (observado 10 horas após a dose) decresce na mesma linha de regressão, o que sugere que as características de metabolização são similares entre os dois grupos. Em outra análise interessante, Rockell *et al.*[80] mostraram que apenas a cor da pele facultativa (obtida através da exposição solar, aferida pela cor da pele no antebraço) é determinante na produção de vitamina D e sugerem que o tipo de pele constitutivo (natural) não apresenta importância significativa neste aspecto.

Adicionalmente, Brazerol *et. al.*[94] definiram e compararam a capacidade de síntese cutânea da vitamina D em voluntários brancos e negros após exposição solar 2 vezes por semana durante 6 meses. Os voluntários negros apresentaram inicialmente níveis reduzidos de vitamina D quando comparados com os brancos, mas sua elevação em resposta à exposição solar foi semelhante. Estes estudos sugerem que brancos e negros apresentam similar capacidade de absorver e sintetizar vitamina D e que realmente a diferença entre as duas etnias se dá pela síntese cutânea pela presença de melanina na pele. Em nossa amostra, após o verão, não encontramos diferença significativa nos níveis de vitamina D entre os voluntários brancos e não brancos.

Com relação aos resultados que confirmaram a associação entre glicemia, *diabetes mellitus* e hipovitaminose D, baseando-se nas explicações fisiológicas, podemos pensar nesta associação com uma relação de causa ou de efeito. A relação de causa se baseia no fato de diabéticos apresentarem uma maior perda protéica e consequentemente redução na proteína de ligação da vitamina D. Esta redução pode levar a níveis de 25 vitamina D reduzidos. Por outro lado, em uma associação de efeito, sabemos que, quando convertida em $1,25(OH)_2D$, a vitamina D não só melhora a sensibilidade periférica à insulina como também estimula a secreção deste hormônio pelo pâncreas.[18] Ford *et al.*[95] relatam que a concentração circulante de vitamina D pode estar inversamente relacionada à maior prevalência de diabetes,

concentração de glicose e resistência à ação da insulina. Na nossa amostra, não encontramos diferenças significativas entre os níveis séricos de vitamina D dos voluntários diabéticos quando comparados com os voluntários que não apresentavam a doença. No entanto, pudemos observar que a glicemia foi uma das variáveis associadas aos níveis de 25 vitamina D, ou seja, mesmo dentro da faixa de normalidade de glicemia, quanto maiores os valores de vitamina D, menor a glicemia.

A glicemia é uma variável determinante na descrição da síndrome metabólica, pois reflete principalmente a resistência periférica a ação da insulina. Após múltiplos ajustes, Ford *et al.*[95] descrevem que o risco para síndrome metabólica reduz progressivamente de acordo com maior quintil de 25 vitamina D. A associação entre 25 vitamina D e síndrome metabólica não é diferente entre homens e mulheres ou entre os três maiores grupos raciais e étnicos estudados por estes autores.

Alguns estudos relacionam os níveis de 25 vitamina D com os níveis de PCR, um marcador inflamatório relacionado à doença cardiovascular.[37,41] Em nossa amostra, não encontramos qualquer associação entre eles. Porém, devemos lembrar que a PCR é um marcador muito sensível, mas pouco específico.[43,44] Provavelmente, para podermos demonstrar esta associação necessitaríamos de um número muito maior de voluntários.

Embora os níveis de vitamina D estejam relacionados ao metabolismo mineral, as evidências atuais sugerem associação entre redução nos níveis de vitamina D e aumento nas alterações do sistema cardiovascular, sendo que alguns mecanismos podem explicar esta relação que é considerada uma conseqüência na redução nos níveis de vitamina D.

Entre os voluntários com insuficiência de vitamina D verificamos uma prevalência aumentada de HAS. Alguns estudos descrevem que esta relação está relacionada ao fato de que receptores de vitamina D podem ser encontrados nas células da musculatura lisa vascular, no endotélio e nos cardiomiócitos.[43] Segundo Wang *et al.*[43], estudos com camundongos *knockout* confirmam que a ausência de receptores de vitamina D culmina em estímulo do sistema renina-angiotensina-aldosterona com aumento significativo na pressão arterial e hipertrofia ventricular.

Este dado pode esclarecer o fato de encontrarmos maior prevalência de HAS entre os voluntários com insuficiência de vitamina D e hiperparatiroidismo secundário em nossa amostra.

Lembrando que a ação clássica da vitamina D é regular o metabolismo mineral, especialmente cálcio, fósforo e paratormônio, os resultados encontrados em nossa pesquisa mostram claramente a importância que a 25 vitamina D exerce sobre estes três componentes. Em sua forma ativa (calcitrol), a vitamina D é fundamental para absorção de cálcio intestinal e integridade esquelética. A produção de $1,25(OH)_2D$ é dependente da quantidade presente no sangue de seu substrato, a 25 vitamina D.[18,33] Em nossa amostra, verificamos uma tendência na redução nos níveis séricos de cálcio total quando consideramos 25 vitamina D < 15 ng/ml, ou seja, provavelmente voluntários com deficiência de vitamina D apresentam redução nos níveis de cálcio total por não fornecer substrato suficiente para síntese de vitamina D em sua forma ativa e estimular a absorção de cálcio (ANEXO D). Porém, fica mais uma vez demonstrado que os níveis séricos de cálcio não devem ser usados como marcadores do *status* de vitamina D, pois somente indivíduos com hipovitaminose severa apresentaram níveis mais baixos de cálcio e ainda assim, dentro da faixa de referência.

Mesmo dentro dos valores de normalidade, os níveis séricos de fósforo foram maiores no grupo com 25 vitamina D $\geq$ 30 ng/ml. Este dado é importante, pois em adultos com adequada função renal os níveis de fósforo estão diretamente relacionados com a ingestão alimentar. O fósforo é um mineral fundamental ao organismo humano, pois participa de quase todos os processos metabólicos, formação e manutenção dos ossos e dentes, componente de todos os tecidos e órgãos, é parte do código genético de todas as células vitais para o metabolismo dos carboidratos, proteínas, gorduras e complexo B. A deficiência de fósforo pode causar deficiências imunológicas, raquitismo, osteoporose, disfunções hepáticas. A absorção de fósforo intestinal, assim como a de cálcio, também é dependente dos níveis de $1,25(OH)_2D$ e pode estar prejudicada, resultando em hipofosfatemia, em indivíduos que apresentem hipovitaminose D e níveis elevados de PTH.[96] Este dado foi evidenciado em nossa pesquisa de acordo com o teste de regressão logística

(univariada e multivariada) que mostrou a insuficiência de vitamina D associada à redução nos níveis de fósforo sérico.

Após o verão, quando foi estudada uma amostra representativa dos voluntários estudados após o inverno, verificamos uma variação sazonal nos níveis de vitamina D entre os voluntários na cidade de São Paulo, confirmando assim que há uma associação significativa entre os parâmetros de exposição solar e níveis séricos de vitamina D. Os níveis de 25 vitamina D se elevam na maior parte dos voluntários estudados e esta elevação resulta em um impacto significativo nos níveis de cálcio, fosfatase alcalina e PTH. É importante ressaltar que, mesmo considerando o incremento nos níveis de 25 vitamina D neste momento, a prevalência de insuficiência de vitamina D encontrada ainda é elevada (37,8%) quando nos referimos a um pais ensolarado como o Brasil. Todas as variáveis bioquímicas, exceto o fósforo, apresentaram diferenças significativas entre inverno e verão.

Também em uma região subtropical, Bolland *et al.*[90] descrevem em sua pesquisa após o verão uma prevalência de hipovitaminose semelhante aos nossos dados (28-58%). Estes dados estão de acordo com diversos outros estudos e confirmam a importância dos raios solares (UVB) na promoção e manutenção do estoque de vitamina D. De forma geral, adultos jovens apresentam flutuações sazonais nos níveis de 25 vitamina D, com níveis reduzidos após o inverno e aumentados após o verão.[42,90]. Em nossa pesquisa, verificamos que os voluntários mais idosos são aqueles que apresentam menor incremento nos níveis de 25 vitamina D após o verão, diferentemente dos indivíduos mais jovens, o que os confirma como grupo de risco para hipovitaminose D.

Uma das causas que deve ser considerada para alta prevalência de insuficiência de vitamina D em diversas regiões é que a população está, cada vez mais, evitando a exposição solar, principalmente em horários em que a síntese cutânea é considerada efetiva (entre 10 e 16 horas). Em nossa análise, não conseguimos identificar se os nossos voluntários idosos também apresentavam menos tempo de exposição solar do que os voluntários mais jovens, o que ajudaria a explicar tanto a alta prevalência de hipovitaminose D nesta população como a sua dificuldade em elevar os níveis séricos de 25 vitamina D após o verão. De qualquer

forma, conforme dito anteriormente, sabe-se que indivíduos idosos têm produção diminuída de vitamina D mesmo após a exposição solar.

Mesmo sendo considerados grupos clássicos de risco para hipovitaminose D, os obesos, hipertensos, diabéticos e as mulheres apresentaram aumento significativo nos níveis de vitamina D após o verão, em comparação ao inverno, tendo a mesma taxa de incremento nos níveis séricos de 25 vitamina D do que seus grupos controle, ou seja, os não-obesos, os normotensos, os não-diabéticos e os homens, respectivamente.

Como descrito anteriormente, com a redução dos níveis de 25 vitamina D após o inverno encontramos uma maior prevalência de hiperparatiroidismo secundário, quadro que é atenuado após o verão (20,9 *vs*. 4,9%, $p < 0,001$). A grande questão, baseada na variação sazonal e no fator de risco associado ao PTH, é qual a importância biológica desta variabilidade nos níveis de PTH e 25 vitamina D durante o ano e quais as conseqüências que isto pode acarretar ao longo da vida de um indivíduo. Assim, teríamos duas hipóteses. Na primeira, a variação nos níveis de 25 vitamina D durante o ano seria algo dentro da normalidade (considerando que durante o inverno muitos indivíduos permaneceriam com níveis de 25 vitamina D abaixo do recomendado), com a resposta esperada do PTH, ou seja, durante o inverno 15% das pessoas teriam elevação dos níveis de PTH, sem que isto tivesse qualquer repercussão, mesmo cronicamente. A segunda hipótese é que esta elevação compensatória do PTH, mesmo que apenas durante uma parte do ano, teria sérias conseqüências em longo prazo, com maior risco para osteoporose, doença cardiovascular e outras complicações. Infelizmente, são poucos os relatos na literatura que buscaram avaliar os efeitos tardios da variação de 25 vitamina D e PTH sobre massa óssea, fraturas ou mortalidade. Um estudo realizado na Austrália[97] mostrou que mulheres idosas que apresentam níveis reduzidos de 25 vitamina D durante o inverno apresentam maior risco de quedas e de fraturas. Este estudo, embora observacional e não randomizado, corrobora a segunda hipótese.

O paratormônio pode ser considerado um regulador do metabolismo mineral que age diretamente na homeostase do cálcio, fósforo, vitamina D e remodelação óssea.[98] Como esperado, verificamos uma correlação inversa entre os níveis de 25

vitamina D e PTH. O PTH mostrou uma forte dependência dos níveis de vitamina D, em todas as análises estatísticas realizadas. Outros estudos já mostraram esta correlação, sendo que o aumento nos níveis de PTH pode ser considerado um dos marcadores de insuficiência ou suficiência de vitamina D.[51]

Os voluntários com insuficiência e deficiência de vitamina D apresentaram níveis elevados de PTH significativamente, quando comparados com os voluntários sem estas alterações. Também verificamos maior nível de PTH entre os voluntários no menor tercil de vitamina D quando comparados com os voluntários no maior tercil de vitamina D (ANEXO E). A relação entre vitamina D e PTH foi evidenciada também nas regressões lineares e logísticas, mostrando que o PTH se associa significativamente a 25 vitamina D e a insuficiência de vitamina D. Outros trabalhos também demonstraram esta associação entre PTH e 25 vitamina D.[58]

Também encontramos correlação positiva entre os níveis de PTH e idade, independente dos níveis séricos de 25 vitamina D. Portanto, indivíduos idosos, que normalmente já possuem outros fatores de risco para doença cardiovascular, podem ter este risco ainda aumentado pela maior probabilidade de apresentarem hipovitaminose D e hiperparatireoidismo. Além disto, no nosso estudo, os voluntários com HPTS apresentaram pior função renal, além de tendência a maior IMC e menor 25 vitamina D. Portanto, variações da função renal, mesmo que discretas também podem levar a elevações no PTH. Por outro lado, a associação entre PTH e IMC necessita de melhor compreensão para podermos estabelecer qualquer relação de causa-efeito.

Alterações nos níveis de PTH podem representar risco aumentado de doenças cardiovasculares, morbidade e mortalidade, independente dos outros fatores de risco pré-estabelecidos e outros fatores associados ao metabolismo mineral.[40,42] Esta afirmação parece ser valida até mesmo para pequenas elevações de PTH, mesmo com valores dentro da faixa considerada de normalidade.[98] Este é um dado importante, pois consideramos, para determinar o hiperparatiroidismo, níveis de PTH acima de 87 pg/ml, conforme recomendado pelo fabricante deste ensaio. Se classificássemos o maior quartil da faixa de normalidade também como não adequado, teríamos não

20,9%, mas 45,8% de nossa amostra com níveis considerados como de maior risco cardiovascular.

Diversos mecanismos podem explicar a relação entre PTH e mortalidade devido a complicações cardiovasculares. Em idosos, estudos recentes sugerem que o PTH pode ser considerado um preditor independente não somente de quedas, mas também de maior mortalidade.[99] O PTH está diretamente relacionado à aterogênese via calcificação e remodelação vascular. Posteriormente, o PTH parece igualmente ter efeitos no miocárdio, através da indução de hipertrofia ventricular, calcificação cardíaca e fibrose. Este hormônio também está relacionado a marcadores inflamatórios, disfunção renal e patologia cardíaca.[98] Hagstrom *et al*.[98] sugerem que o nível sérico de PTH é um retrato prognóstico mesmo na ausência de evidências clínicas de hiperparatiroidismo primário ou secundário. Interessantemente, os autores referem que níveis elevados de PTH contribuem em cerca de 20% no risco atribuído a população para mortalidade cardiovascular.

A associação entre deficiência de vitamina D e HPTS também já foi descrita em outros estudos. O que difere entre os autores é o ponto a partir do qual os níveis de PTH começam a se elevar.[38] De qualquer maneira, sabe-se que as flutuações sazonais nos níveis de 25 vitamina D e PTH podem acarretam em flutuações anuais na densidade mineral óssea em adultos jovens saudáveis. Em mulheres idosas saudáveis, alterações sazonais similares resultam em flutuações na densidade óssea e maior chance de fraturas.[14,70]

O ponto de corte dos níveis de 25 vitamina D é importante na caracterização da relação com o PTH. Os níveis de vitamina D a partir dos quais os níveis de PTH começam a aumentar são menores, aparentemente, entre jovens quando comparados com idosos.[14] O ponte de corte de 25 vitamina D considerado para determinar o HPTS não pôde ser obtido, em nossa análise, através de uma curva ROC, pois não há um ponto com significante sensibilidade e especificidade, provavelmente pelo fato do PTH ser influenciado também por outras variáveis.

Por outro lado, se optarmos por simplesmente determinar os níveis de 25 vitamina D onde teríamos a menor prevalência de HPTS, devemos escolher níveis acima de 40 ng/ml. De acordo com nossos resultados, a prevalência de HPTS cai drasticamente quando utilizamos como ponto de corte 30 ou 40 ng/ml (de 17,0% para

6,5%, respectivamente). Desta forma, considerando que a vitamina D pode ser fundamental para diversos sistemas do organismo, é possível que a manutenção dos níveis de 25 vitamina D acima de 40 ng/ml seja mais seguro para prevenção e promoção da saúde.

6. CONCLUSÃO

Concluindo, em nossa amostra, verificamos uma alta prevalência de insuficiência de vitamina D e de hiperparatiroidismo secundário em voluntários saudáveis em uma região brasileira específica (cidade de São Paulo) após o inverno. Há uma redução desta prevalência após o verão. Cientes da importância desta pesquisa e agregando aos resultados de outras pesquisas nacionais, os órgãos responsáveis pela saúde da população devem desenvolver políticas públicas para promoção da saúde, estimulando algumas formas de tratamento, medicamentoso ou não, iniciando pelos grupos de risco (idosos, não brancos e obesos). Da mesma forma, é importante que se estabeleça o papel da poluição na conversão cutânea de vitamina D na cidade de São Paulo, através da realização de um estudo específico para este fim. Certamente, todas estas políticas terão um efeito positivo não apenas sobre os custos da saúde, como também na qualidade de vida da população brasileira.

7. ANEXOS

Anexo A- Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (registro do projeto n°. 0660.0.015.000-06)

Andamento do projeto - CAAE - 0660.0.015.000-06

Título do Projeto de Pesquisa
Determinação de níveis séricos de vitamina D em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	14/08/2006 09:28:20	13/11/2006 14:38:12		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	03/08/2006 10:20:34	Folha de Rosto	FR103091	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	14/08/2006 09:28:20	Folha de Rosto	0660.0.015.000-06	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	13/11/2006 14:38:12	Folha de Rosto	777/06	CEP

Anexo B- Comitê de ética em pesquisa com seres humanos- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (registro do projeto n° 777/06)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24.08.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **777/06** , intitulado: **"Determinação de níveis séricos de vitamina D em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira"** apresentado pelo **Departamento de Clínica Médica,** inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Rosa Maria Affonso Moyses**
Pesquisador(a) Executante: **Marianna Durante Unger**

CAPPesq, 24 deAgosto de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05403 010 – São Paulo – SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 – e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
tms

Anexo C- Protocolo da pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA
PROTOCOLO DE PESQUISA - VITAMINA D

Identificação

NOME:_____DATA1:___/___/___ DATA2:___/___/___
DATA COLETA 1:____/____/____ DATA COLETA 2: ___/___/___
DATA NAS.:_____/_____/_____ IDADE:_____FONE:_____
SEXO: M □ F □ UNIDADE USP:_____RAMAL:_____
ENDEREÇO:_____
BAIRRO:_____CEP.:_____-_____CIDADE:_____
TELEFONES:_____/_____E-MAIL:_____

História Clínica

ANTECEDENTES HAS □ DM □ IRC □ OBESIDADE □ DLP □
HEPATOPATIAS □ OSTEOPOROSE □ CA□ OUTROS □
_____

MEDICAMENTOS:
_____
_____

SE MULHER, ESTÁ NA MENOPAUSA? SIM □ NÃO □
HÁ QUANTO TEMPO?_____
ETNIA: BRANCO □ AMARELO □ OUTROS □
ATIVIDADE OCUPACIONAL: _____
RENDA MENSAL:_____
MEIO DE TRANSPORTE: _____
COSTUMA APLICAR FILTRO SOLAR DIARIAMENTE: SIM □ NÃO □
FATOR DE PROTEÇÃO NÚMERO?_____

LOCAL:_____
PRATICA ALGUMA ATIVIDADE FÍSICA: SIM □ NÃO □
SE SIM, QUAL?_____
POR QUANTO TEMPO?_____
COM QUE FREQUÊNCIA?_____

Antropometria

	1 avaliação	2 avaliação
Peso (kg)		
Altura (cm)		
Índice de massa corporal (Kg/m^2)		

Bioquímica

Exames	1 avaliação	2 avaliação
Cálcio total (mg/dL)		
Cálcio iônico (mg/dL)		
Fósforo (mg/dL)		
Creatinina (mg/dL)		
Albumina (g/dL)		
Glicose (mg/dL)		
PTH (pg/ mL)		
Fosfatase alcalina (U/L)		
25(OH)D (ng/mL)		
1,25(OH)$_2$D (pg/ mL)		

ANEXO D: Características demográficas e bioquímicas dos voluntários com deficiência de 25 vitamina D

	25(OH)D < 15 (n=118)	25(OH)D ≥ 15 (n=485)	*p**
Idade (anos)	**50,7 (14,1)**	**47,1 (13,2)**	***0,01***
Sexo (N, % mulheres)	95 (80,5)	390 (80,4)	*1,00*
Cor da pele (N, %)			
Brancos	78 (67,8)	348 (73,6)	*0,24*
Não brancos	37 (32,2)	125 (26,4)	
Hipertensão arterial sistêmica (N, %)	36 (31,3)	128 (26,8)	*0,35*
Diabetes mellitus (N, %)	12 (10,4)	45 (9,4)	*0,70*
Menopausa (N,% mulheres)	46 (50)	156 (40,8)	*0,10*
Cálcio total (mg/dl)	**9,6 (9,2-10)**	**9,7 (9,3-10)**	***0,07***
Cálcio ionizado (mg/dl)	5,0 (4,9-5,1)	5,0 (4,9-5,1)	*0,7*
Fósforo (mg/dl)	3,7 (3,2-4,1)	3,7 (3,3-4,1)	*0,51*
Creatinina (mg/dl)	0,7 (0,7-0,8)	0,8 (0,7-0,9)	*0,52*
***Clearance* creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)**	**95,5 (81-116)**	**101,4 (85-116)**	***0,06***
Albumina (mg/dl)	4,5 (4,2-4,7)	4,5 (4,3-4,6)	*0,9*
Glicose (mg/dl)	83 (75-94)	83 (76-91)	*0,73*
Índice de Massa Corporal (Kg/ m²)	26,7 (23,3-30)	26,1 (23,5-30)	*0,96*
Paratormônio (pg/ml)	**69 (55-93)**	**60 (48-79)**	***0,0004***
Fosfatase alcalina (U/L)	71 (56-91,5)	69 (56-81,5)	*0,24*
25 vitamina D (ng/ml)	**12,2 (9,7-13,8)**	**23,5 (18,6-31)**	***<0,001***

Os valores estão expressos em percentual (%), média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

ANEXO E: Variáveis de estudo de acordo com tercil de 25 vitamina D (ng/ml)

	Tercil 1 <17,7 (n=202)	Tercil 2 17,7-25,6 (n=196)	Tercil 3 >25,6 (n=205)	*p**
Idade (anos)	49,4 (13,8)	47,3 (12,5)	46,8 (13,8)	*0,12*
Sexo (N, % mulheres)	166 (82,2)	161 (82,1)	158 (77,1)	*0,20*
Cor da pele (N, %)				
Não brancos	**67 (34)**	**51 (26,7)**	**44 (22)**	***0,07***
Hipertensão arterial (N, %)	63 (32,1)	48 (24,9)	53 (26,1)	*0,20*
Diabetes mellitus (N, %)	24 (12,2)	18 (9,3)	15 (7,4)	*0,10*
Menopausa (N, % mulheres)	72 (44,7)	59 (37,8)	71 (45,2)	*0,90*
Cálcio total (mg/dl)	9,6 (9,3-10)	9,7 (9,3-10)	9,7 (9,3-10)	*0,5*
Cálcio ionizado (mg/dl)	5,0 (4,9-5,1)	5,0 (4,9-5,1)	5,0 (4,9-5,1)	*0,72*
Fósforo (mg/dl)	3,7 (3,3-4,1)	3,7 (3,3-4,1)	3,8 (3,4-4,2)	*0,28*
Creatinina (mg/dl)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,7-0,8)	0,8 (0,7-0,9)	*0,12*
Clearance creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)	98,9 (83-118)	103 (90-112)	98,2 (83-116)	*0,74*
Albumina (mg/dl)	4,4 (4,3-4,7)	4,5 (4,3-4,6)	4,5 (4,3-4,7)	*0,53*
Glicose (mg/dl)	83 (75-92)	84 (76-92,5)	82 (76-91)	*0,55*
Índice de Massa Corporal (Kg/ m²)	26,7 (23,6-30)	26,1 (23,4-30)	25,7 (23,1-30)	*0,72*
Paratormônio (pg/ml)	**66 (55-88,5)**	**63 (50-80)**	**58 (45-76)**	***0,001***
Fosfatase alcalina (U/L)	71 (56-87,2)	70,5 (56-81)	68 (55-82)	*0,8*
25 vitamina D (ng/ml)	**14,4 (11,7-16)**	**21,3 (19-22,9)**	**32,6 (28,4-39)**	***<0,001***

Os valores estão expressos em percentual (%), média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

ANEXO F: Variáveis de estudo de acordo com tercil de PTH (pg/mL)

	Tercil 1 <55 (n=182)	Tercil 2 55-75 (n=173)	Tercil 3 >75 (n=180)	*p**
Idade (anos)	**43,2 (12,6)**	**47,8 (12,7)**	**51,2 (12,7)**	***<0,001***
Sexo (N, % mulheres)	147 (80,7)	141 (81,5)	141 (78,3)	*0,73*
Etnia (N, %)				
Não brancos	52 (29,2)	50 (29,6)	64 (36,1)	*0,28*
Hipertensão arterial (N, %)	**37 (20,7)**	**44 (25,8)**	**60 (33,7)**	***0,019***
Diabetes mellitus (N, %)	18 (10,0)	13 (7,6)	18 (10,1)	*0,65*
Menopausa (N, % mulheres)	**48 (33,6)**	**58 (41,7)**	**66 (47,5)**	***0,05***
Cálcio total (mg/dl)	9,7 (9,3-10)	9,6 (9,3-10)	9,6 (9,2-10,1)	*0,6*
Cálcio ionizado (mg/dl)	5,0 (4,9-5,1)	5,0 (4,9-5,1)	5,0 (4,9-5,1)	*0,7*
Fósforo (mg/dl)	**3,9 (3,5-4,4)**	**3,7 (3,3-4,1)**	**3,7 (3,2-4,1)**	***<0,001***
Creatinina (mg/dl)	**0,7 (0,7-0,9)**	**0,7 (0,7-0,8)**	**0,8 (0,7-0,9)**	***0,08***
***Clearance* creatinina (Cockcroft-Gault, ml/min/1.73m^2)**	**101,3 (89-117)**	**103,5 (86-115)**	**98,0 (83-113)**	***0,05***
Albumina (mg/dl)	4,4 (4,3-4,6)	4,4 (4,3-4,6)	4,5 (4,3-4,7)	*0,26*
Glicose (mg/dl)	83 (73-90)	83 (77-92)	84 (75-92)	*0,61*
Índice de Massa Corporal (Kg/ m^2)	**25,3 (22,6-29,5)**	**26,6 (23,6-29,5)**	**27,1 (24,5-31)**	***0,03***
Paratormônio (pg/ml)	**44 (37-50)**	**63 (58-68)**	**91 (81-105)**	***<0,001***
Fosfatase alcalina (U/L)	**63,5 (54-79)**	**71 (55-84)**	**71 (57-85)**	***0,05***
25 vitamina D (ng/ml)	**23,8 (17,7-32,7)**	**20 (15,2-26,5)**	**18,8 (15,1-27)**	***<0,001***

Os valores estão expressos em percentual (%), média (DP) para as variáveis com distribuição gaussiana e mediana (percentis 25-75) para as variáveis com distribuição não gaussiana

Anexo G- Pôster apresentado - ASN Renal Week, 2007, San Francisco.

HYPOVITAMINOSIS D IN NORMAL BRAZILIAN ADULTS AFTER WINTER: AN UNEXPECTED FINDING

UNGER, Marianna D.[1], CUPPARI, Lilian[3], MAGALHÃES, Maria Claudia T.[2], dos REIS, Luciene M.[1], JORGETTI, Vanda[1], MOYSES, Rosa Maria A.[1].
[1]Nefrology, University of Sao Paulo; [2]University Hospital- University of Sao Paulo; [3]Nefrology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Action in bone metabolism
Action in chronic illnesses

25(OH)D_3- storage form
1,25$(OH)_2D_3$- active form

VITAMIN D

Sources: Solar exposition, feeding and supplements

Vitamin D deficiency (25(OH)D_3 (< 30ng/ mL) is frequently under diagnosed, specifically in countries where solar radiation is abundant

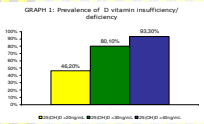
AIM:

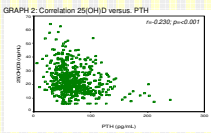
To evaluate the status of vitamin D and the relationship of circulating 25(OH)D with serum parameters of mineral metabolism in a cohort of healthy volunteers, immediately after winter

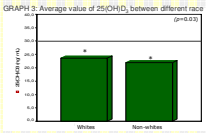
METHODS:

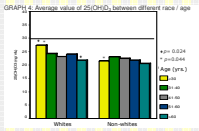
- Cohort study, Sao Paulo, Brazil with 639 healthy volunteers (151 M/488 F)
- 35% non-white race
- Age = 48,4+13,6 yrs (range, 18-90 yrs)
- Query (personal data and life style)
- Anthropometric measures (weight, height and body mass index-IMC)
- Fasting serum samples were drawn for calcium (Ca), ionized calcium (Cai), creatinine (Cr),
- phosphorus (P), parathyroid hormone (PTH) and 25(OH)D
- Vitamin D insufficieny= 25(OH)D3 < 30 ng/mL
- Secondary hyperparathyroidism (SHPT)= PTH > 87 ng/mL

RESULTS:









Variable associated with vitamin insufficiency D

	Insufficient	Replete	p
Continuous variable			
Age (yrs.)	48,9	46,3	*0.041*
P (mg/ dL)	3,75	3,93	*0.057*
Crea (mg/ dL)	0,88	0,82	*0.077*
PTH (pg/ mL)	72,56	58,81	*<0.001*
IMC (kg/m²)	27,3	26,3	*0.024*
Categorical variable			
IMC (>25kg/m²)	62,8%	51,8%	*0.04*
HAS (yes)	31,8%	21,8%	*0.036*
Race (non-white)	36,4%	28,8%	*0.117*

Logistic Regression – vitamin D

Parameter	Estimate	SE	OR	CI 95%	p
IMC (Kg/m²)	0.45	0.21	1.57	1.04-2.37	*0.031*

Logistic Regression - PTH

Parameter	Estimate	SE	OR	CI 95%	p
Cr (mg/ dL)	1.96	0.87	7.11	1.28-39.5	*0.024*
Male (sexo)	0.03	0.01	1.03	1.01-1.05	*0.003*
25(OH)D (ng/ mL)	-0.03	0.01	0.96	0.93-0.99	*0.011*

Variable associated with SHPT

	Normal	SHPT	p
Continuous variable			
Age (yrs.)	46,6	53,0	*<0.001*
IMC (kg/m²)	26,9	28,1	*0.035*
P (mg/ dL)	3,87	3,62	*<0.001*
Crea (mg/ dL)	0,79	0,87	*<0.001*
Fosfatase alcalina (UI/L)	70,5	74,5	*0.092*
Clearance crea. (ml/ min)	118,3	107,3	*0.003*
25(OH)D (ng/ mL)	23,4	20,4	*0.002*
Categorical variable			
HAS (sim)	25,8%	39%	*0.006*
Menopausa (yes)	38,1%	52,7%	*0.013*
Ca (low)	2,4%	4,1%	*0.012*
P (low)	2,6%	6,2%	*0.014*

Prevalence of SHPT in accordance with 25(OH)D3

	%	p
25(OH)D		
< 30 ng/mL	23,9	*0.092*
> 30 ng/mL	16,2	
25(OH)D		
< 40 ng/mL	23,4	*0.027*
> 40 ng/mL	6,3	

CONCLUSION:

An unexpected elevated prevalence of vitamin D insufficiency associated with high PTH levels was found in this cohort of healthy subjects living in a a sunny subtropical area. Thus, the notion that the solar radiation would be sufficient to prevent hypovitaminosis D in such region has to be reviewed in order to avoid the skeletal and nonskeletal consequences of elevated serum PTH levels.

FAPESP PROJECT nº0655405-1

Anexo H- Publicação – Boletim Fapesp, 21 out. 2009.

Carência tropical

21/10/2009

Por Alex Sander Alcântara

Agência FAPESP – Ao investigar a carência de vitamina D em moradores da cidade de São Paulo, uma pesquisa realizada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em parceria com o Hospital Universitário, verificou que 77,4% dos analisados apresentavam o problema.

Participaram 603 voluntários (118 homens e 485 mulheres) no estudo cujo objetivo foi estabelecer quais fatores estão associados à hipovitaminose D no organismo. A média registrada da vitamina foi de 21,4 ng/ml, bem abaixo da recomendada, que é de 30 ng/ml. A análise foi feita no fim do inverno, após um período em que a exposição à luz solar é menor.

Meses depois, no fim do verão, retornaram para coleta de sangue 219 voluntários, dos quais 39 homens e 180 mulheres. Apesar da maior exposição à luz solar, e da consequente sintetização da vitamina no organismo, a pesquisa identificou a deficiência da vitamina D em 39,6% dos analisados.

Apesar da redução, segundo Rosa Maria Affonso Moysés, médica e pesquisadora do Hospital das Clínicas da FMUSP e coordenadora do estudo, o número ainda foi muito elevado, considerando a latitude em que São Paulo se encontra e a comparação com cidades do hemisfério Norte.

"Estamos em uma área subtropical e, por conta disso, imaginávamos que a exposição solar fosse suficiente para que não houvesse um número tão elevado de hipovitaminose", disse.

O estudo, intitulado "Determinação de níveis séricos de vitamina D em uma amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira", teve apoio da FAPESP na modalidade Auxílio à Pesquisa – Regular e foi concluído este ano. Rosa coordena outros três projetos na mesma modalidade, iniciados em 2008 e 2009.

A seleção dos voluntários incluiu pacientes de rotina do Hospital das Clínicas, funcionários da USP que realizam o exame médico anual e estudantes com idades entre 18 a 30 anos.

"Os critérios de inclusão foram extremamente rígidos. Os pacientes não podiam ter doença renal ou cardíaca. O máximo que poderiam ter era diabetes e hipertensão controladas, ou seja, tratavam-se de pessoas estáveis do ponto de vista clínico", disse à **Agência FAPESP**.

O estudo apontou condições associadas à maior prevalência de hipovitaminose D, como idade, presença de hipertensão arterial, maior índice de massa corporal e cor de pele negra. "Também chamou a atenção que quanto mais idoso maior a prevalência. Mas, mesmo entre os jovens, até 30 anos, o índice foi muito elevado", disse.

Pouco sol

Outro estudo, feito na Faculdade de Saúde Pública da USP, verificou a insuficiência da vitamina D entre os jovens. O trabalho foi feito por Bárbara Santarosa Emo Peters e orientado pela professora Lígia Araújo Martini, com apoio da FAPESP na modalidade Bolsa de Doutorado.

O estudo avaliou a quantidade de vitamina D em 136 adolescentes em Indaiatuba, interior de São Paulo, e constatou que 62% tinham insuficiência da vitamina.

Cerca de 90% da absorção da vitamina D se dá pela exposição à luz solar, com o restante sendo resultado da alimentação. Segundo o estudo, nenhum dos jovens que participou da pesquisa ingeria a quantidade recomendada de vitamina D. Alimentos como salmão, sardinha, leite e derivados (somente os integrais) possuem a vitamina.

Por meio das entrevistas com os participantes, Bárbara percebeu que muitos não tomavam café da manhã para poder dormir um pouco mais antes de ir à escola. Quem tomava café da manhã todo dia ingeria quase o dobro de vitamina D do que quem não tomava. Os adolescentes que praticavam esportes ao ar livre também apresentaram maiores níveis da vitamina.

O estudo de Bárbara foi premiado no 8º Congresso Iberoamericano de Osteologia e Metabolismo Mineral e ganhou o Young Investigator Award do The American Society for Bone and Mineral Research.

Problemas renais

Rosa Moysés lembra que portadores de doença renal apresentam prevalência alta de deficiência da vitamina D. Na nefrologia existe até mesmo uma área específica que estuda o metabolismo mineral nos indivíduos com problemas renais.

"Por conta disso, resolvemos ampliar o estudo para pessoas consideradas saudáveis e observamos que a deficiência entre os portadores de doença renal já não é muito diferente da observada na população em geral", disse.

Outro resultado importante é que os voluntários com hipovitaminose apresentavam maiores níveis de paratormônio, hormônio responsável pela regulação dos níveis de cálcio no organismo.

De acordo com a nefrologista, o alto índice desse hormônio é uma resposta à diminuição dos níveis de vitamina D. Todas as vezes que os níveis de cálcio caem há maior secreção de paratormônio.

"Os efeitos dessa elevação a longo prazo não são totalmente conhecidos, mas pode haver um risco maior de desenvolvimento de osteoporose e de doenças cardiovasculares. Esses achados estão previamente associados ao que chamamos de hiperparatireoidismo secundário", apontou.

Reposição

Diversos estudos recentes têm associado a deficiência da vitamina D a riscos de doenças, como **hipertensão**, **gripe** ou **cardiovasculares**.

Uma das pesquisas, apresentada em setembro na 63ª Conferência de Pesquisa em Pressão Alta da Associação Norte-Americana do Coração, apontou que mulheres em pré-menopausa com insuficiência da vitamina em 1993 apresentaram risco três vezes maior de desenvolver hipertensão arterial sistólica 15 anos depois, em comparação com aquelas que tinham níveis normais.

Por conta disso Rosa lembra que em alguns países, como Noruega, Finlândia, Dinamarca e Suécia, a reposição da vitamina D se tornou comum. "Se fizermos um estudo comparativo, certamente não vamos encontrar uma hipovitaminose tão alta quanto a nossa nesses países, porque já é parte da cultura deles usarem alimentos ricos em vitamina D ou suplementos", disse.

A pesquisadora conta que os dados da pesquisa estão sendo concluídos para publicação em revista. Diante dos resultados obtidos, o Departamento de Clínica Médica da FMUSP pretende fazer um estudo mais amplo, acompanhando os voluntários por um período maior e envolvendo outras áreas médicas para estudar os vários aspectos da deficiência da vitamina D.

- "Os resultados serão encaminhados para órgãos públicos para avaliação e eventual desenvolvimento de políticas públicas de suplementação ou fortificação alimentar com vitamina D, principalmente nas populações de risco, como idosos, obesos, não brancos e hipertensos", adiantou Rosa.

8. REFERÊNCIAS

1. Hickey L, Gordon CM. Vitamin D deficiency: new perspectives on an old disease. *Curr Apin Endocrinol Diabetes.* 2004;11:18-25.

2. Raiten DJ, Picciano MF. Vitamin D and health in the 21st century: bone and beyond. Executive summary. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(Suppl 8):1673-77.

3. Mellanby E. An experimental investigation on rickets. *Lancet*. 1919;1:407-12.

4. Windaus A, Linsert O. Vitamin D1. *Ann Chem.* 1928;465:48.

5. Hess AF, Unger LJ, Pappenheimer AM. Experimental rickets en rats: the prevention of rickets in rats by exposure to sunlight. *J Biol Chem.* 1922; (50):77-83.

6. Steenbock H. The induction of growth-prompting and calcifying properties in a ration by exposure to light. *Science.*1924;60:224-5.

7. Holick MF. Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:1502-8.

8. Cuppari L. *Suplementação de fósforo em pacientes com insuficiência renal crônica leve e moderada com diagnóstico sugestivo ou comprovado de doença óssea adinâmica* [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1998.

9. Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. Regulation of cutaneous previtamin D3 photosynthesis en man, skin pigment is not an essential regulator. *Science*. 1981;211:590-93.

10. Matsuoka LY, Ide L, Wostsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64:1165-68.

11. Holick MF. Photobiology of vitamin D. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW. *Vitamin D.* San Diego: Academic Press; 1997. San Diego.

12. Bell A. Evidence for alteration of the vitamin D endocrine system in Blacks. *J Pediat.* 1985;76:470-73.

13. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: Exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:373-78.

14. Barger-Lux MJ, Heaney RP. Effects of average summer sun exposure on serum 25-hydroxyvitamin D and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):4952-56.

15. Holick MF. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 2002;9:87-98.

16. Sato Y, Metoki N, Iwamoto J, Satoh K. Amelioration of osteoporosis and hypovitaminosis D by sunlight exposure in stroke patients. *Neurology*. 2003; 61(3):338-42.

17. Magnoni D, Cukier C, Oliveira PA. *Nutrição na terceira idade*. São Paulo: Sarvier; 2005. São Paulo

18. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.

19. Looker AC. Body fat and exercise modulate vitamin D status? *Nutr Rev*. 2007;65(Suppl 8):124-6.

20. Li J, Byrne ME, Chang E. 1,25 dihidroxivitamin D hydroxylase in adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;112:122-26.

21. Worstman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:690-93.

22. McKenna MJ. Differences in vitamin D status between countries in young adults and in the elderly. *Am J Med.* 1992*;*93:69-77.

23. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Phys- Renal.* 2005;289:8-28.

24. Jones, G. Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 alfa hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1alha, 25-hihydroxyvitamin D3. *Semin Dial.* 2007*;* 20(Suppl 4):316-24.

25. Haddad P, Gascon-Barrê M, Brault G, Plourde V. Influence of calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D3 supplementation on the hepatic microsomal and in vivo metabolism of vitamin D3 in vitaminD-depleded rats. *J Clin Invest.* 1985; 78:1529-37.

26. Horst RL, Reinhardt TA. Vitamin D metabolism. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW. *Vitamin D.* San Diego: Academic Press; 1997. San Diego.

27. Sergesten, U. 25-hydroxyvitamin D31-alfahydroxylase expression in normal and phatological parathyroid glands. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2002; 87(6):2967-72.

28. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med.* 1989;320(15):980-91.

29. Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr.* 2005;135(Suppl 11):2739-48.

30. Schiavi, SC. FGF23: The making of a hormone. *Endocr Ren Sciences*. 2005; KI-0128.

31. DeLuca HF, Krisinger J, Darwish H. The vitamin D system. *Kidney Int.* 1990; 38(Suppl 29):2-8.

32. Teixeira OS, Riella MC. Metabolismo do cálcio, fósforo e vitamina D na Insuficiência Renal Crônica. In: Riella, MC; Martins C. *Nutrição e o Rim.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Rio de Janeiro.

33. Audran M. The physiology and pathophysiology of vitamin D. *Mayo Clin Proc.* 1985;60:851-66.

34. Silver J, Russel J, Sherwood LM. Regulation by vitamin D metabolites os messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolate bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82:4270-73.

35. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, Graves KL, Moe SM. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2005;45(Suppl 6):1026-33.

36. Giovannucci, E. The epidemiology of vitamin D cancer incidence and mortality: A Review (United States). *Can Caus Control.* 2005;16:83-95.

37. Grant WB. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Bio Mol Biology*. 2006; 92(1):65-79.

38. Gannagé-Yared MH, Chemli R, Yaacoub N, Halaby G. Hypovitaminosis D in a sunny country: relation to lifestyle and bone markers. *J Bone Miner Res.* 2000;15(9):1856-62.

39. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health*. 2006;96(2):252-61.

40. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 2003;88(2):327-31.

41. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Lui SQ, Cão LP. 1,25dihidroxyvitamin D is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002;110(2):229-38.

42. Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Korfer R, Stehle P. Low vitamin D status: a contribuinting factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(1):105-12.

43. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostinho RB, Wolf M, Vasan RS. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2008; 117(4):503-11.

44. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B. The effects of calcium and vitamin D suplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care*. 2007;30(4):980-86.

45. Hypponen E, Laara E, Reunanen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet.* 2001;358(9292):1500-03.

46. Hsieh Jc, Sisk JM, Jurutka PW, Haussler CA, Slater SA, Haussler MR, Thompson CC. Physical and functional interaction between the vitamin D

receptor and hairless corepressor, two proteins requered for hair cycling. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38665-74.

47. Boland R. Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocrinol. 1986;*7(4): 434-48.

48. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr. 2004*;79(3):362-71.

49. Holick MF. Vitamin D: a D-lightful health perspective. *Nutrition Rev. 2008*;66(Suppl 2):182-94.

50. Holick MF. Too little vitamin D in postmenopausal women: why should we care? *Am J Clin Nutr. 2002*;76:3-4.

51. Holick MF. The parathyroid hormone D-lema. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3499-500.

52. Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B, Pols HA, Holick MF. An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D meansurements. *Osteoporosis.* 1999;9(5):394-97.

53. Kudlacek S, Schneider B, Peterlik M, Leb G, Klaushofer K, Weber K, Woloszczuk W, Willvonseder R. Assessment of vitamin D and calcium status in healthy adult Austrians. *European J Clin Invetigation.* 2003;33(4):281-82.

54. Oversen L, Andersen R, Jakobsen J. Geografical differences in vitamin D status, with particular reference to Europe countries. *Proc Nutr Soc. 2003;*62(Suppl 4):813-21.

55. Jacobus CH, Holick MF, Shao Q, Chen TC, Holm IA, Kolodny JM, Fuleihan GE, Seely EW. Hypervitaminoses D associated with drinking milk. *N Engl J Méd.* 1992;326(18):1173-77.

56. Vieth, R, Chan PC, MacFarlane, GD. Efficacy and safety of vitamin D3 intake exceeding the lowest observed adverse effect level. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(6):282-84.

57. Binkley N, Krueger D, Cowgill C. Assay variation confound hypovitaminose D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2004*;*89:3152-57.

58. Carnevale V, Modoni S, Pileri M, Di Giorgio A, Chiodini I, Minisola S, Vieth R, Scillitani A. Longitudinal evaliation of vitamin D status in health subjects from southern Italy: seasonal and gender differences. *Osteoporosis.* 2001;12:1026-30.

59. Holick MF. The influence of vitamin D on bone health across the life cycle. *J Nutr.* 2005*;*135(Suppl 11):2726-27.

60. Compson JE. Vitamin D deficiency: time for action. *BMJ*. 1998;317:1466-67.

61. Vieth R. Why the optimal requirement for Vitamin D_3 is probably much higher than what is officially recommended for adults. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90(1-5):575-9.

62. Lips P. Relative value of 25 vitamina D and 1,25(OH)2D Measurements. *J Bone Miner Res*. 2007;22(Suppl 11):1668-71.

63. van der Vilen RPJ, Lowik MR, van den Berg H, de Groot LC, Haller J, Moreiras O, van Staveren WA. Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe. *Lancet.* 1995*;*346(8969):207-10.

64. Romagnoli E, Caravella P, Scarnecchia L, Martinez P, Minisola S. Hypovitaminosis D in na Italian population of health subjects and hospitalized patients. *Br J Nutr*. 1999;81(2):133-37.

65. Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC, Allen C, Doughertly C, Gunter EW, Bowman BA. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(1):187-92.

66. Taha, SA; Dost SM; Sedrani SH. 25-Hydroxyvitamin D and total calcium: extraordinarity low plasma concentrations in Saudi mothers and theis neonates. *Pediatr Res*. 1984;18:739-41.

67. Linhares ER, Jones DA, Round JM, et al: Effect of nutrition on vitamin D status: studies on healthy and poorly nourished Brazilian children. *Am J Clin Nutr*. 1984;39(4):625-30.

68. Saraiva GL, Lazaretti-Castro M, Cendoroglo MS *et al*. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25 hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of São Paulo ($23^0$34'S), Brazil. *Osteop Int*. 2005;16(12):1649-54.

69. Peters BSE, Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. *Ann Nutr Metab*. 2009;54:15-21.

70. Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(Suppl):1706-09.

71. World Health Organization (on-line). BMI classification [citado em set 2009]. Disponível em: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.

72. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica- IBGE (on-line). Censo demográfico 2000: Característica da população e dos domicílios: Resultados do universo [citado em set 2009]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/default.shtm

73. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyon NR. Serum 25-hydroxyvitamin D status in adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone*. 2002;30:771-77.

74. National Center for Heath Statistics, Centers for disease control and prevention. National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. Ducumentation, codebook, and frequencies. Laboratory component: vitamin D. Survey years 2003-2004. [citado em Set 2007]. Disponível em: http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_03_04/106vid_c.pdf.

75. Tseng M, Giri V, Bruner DW, Giovannucci E. Prevalence and correlates of vitamin D status in African American men. *BMC Public Health*. 2009;9:191.

76. Kull Jr M, Kallikorm R, Tamm Anu, Lember M. Seasonal variance of 25-(OH) vitamin D in the general population of Estonia, a Northern European country. *BMC Pub Health*. 2009;9:22.

77. Hypponen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:860-8.

78. Bogh MKB, Schmedes AV, Philipsen PA, Thieden E, Wulf HC. Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. *J Invest Dermatol*. 2009;[epub ehead of print].

79. Maeda SS, Kunii IS, Hayashi L, Lazaretti-Castro M. The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the cuty of São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(12):1653-59.

80. Rockel JEP, Skeaff CM, Williams SM, Green TJ. Associatian between quantitative measures of skin colour and plasma 25-hydroxyvitamin D. *Osteopo Int*. 2008;19:1639-42.

81. Ono Y, Suzuki A, Kotake M, Zhang X, Nishiwaki-Yasuda K, Ishiwata Y, Imamura S, Negata M, Takamoto S, Itoh M. Seasonal changes of serum 25-hydroxyvitamin Dand intact parathyroid hormona levels in a normal Japanese population. *Bone Miner Metab*. 2005;23:147-51.

82. Burnard B, Sloutskis D, Gianoli F, Cornuz J, Rickenbach M, Paccaud F, Burckhardt P. Serum 25-hydroxyvitamin D: distribution and determinants in the Swiss populations. *Am J Clin Nutr*. 1992;56:537-42.

83. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int*. 1997;7(5):439-43.

84. MacFarlane GD, Sackrison JL Jr, Body JJ, Ersfeld DL, Fenske JS, Miller AB. Hypovitaminosis D in a normal, apparently healthy urban European population. J *Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90:621-22.

85. Lamberg-Allardt CJ, Outila TA, Karkkainen MU, Rita HJ, Valsta LM. Vitamin D deficiency and bone health in healthy adults in Finland: could this be a concern in other parts of Europe? *J Bone Miner Res*. 2001;16:2066-73.

86. Moore C, Murphy MM, Keast DR, Holick MF. Vitamin D intake in the United States. *J Am Diet Assoc*. 2004;104:980-83.

87. Bolland MJ, Grey AB, Ames RW, Mason BH, Horne AM, Gamble GD, Reid IR. Determinants of vitamin D status in older men living in a subtropical climate. *Osteoporos Int*. 2006;17:1742-48.

88. Buka I, Koranteng MB, Osorio-Vargas AR. The effects of air pollution on the heath of children. *Paediatr Child Health*. 2006; 11(8): 513-16.

89. Portela MLP, Mónico A, Barahona A, Dupraz H, Gonzales-Chaves MS, Zeni SN. Comparative 25-OH-vitamin D level in institutionalized womwn older than 65 years from two cities in Spain and Argentina having a similar solar radiation index. *Nutrition*. 2009;[epub ehead of print].

90. Bolland MJ, Grey AB, Ames RW, Mason BH, Horne AM, Gamble GD, Reis IR. The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:959-64.

91. Yetley EA. Assessing the vitamin D status of the US population. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(Suppl):558-64.

92. Glass D, Lens M, Swaminathan R, Spector TD, Bataille V. Pigmentation and vitamin D metabolism in caucasians: low vitamin D serum levels in fair skin types in the UK. *PLoS One*. 2009;4:64-77.

93. Matsuoka LY, Worstman J, Chen TC, Holick MF. Compensation for the interracial variance in the cutaneous synthesis of vitamin D. *J Lab Clin Med*. 1995;126:452-7.

94. Brazerol WF, McPhee AJ, Mimouni F, Specker BL, Tsang RC. Serial ultraviolet B exposure and serum 25 hydroxyvitamin D response in young adult American blacks and whites: no racial differences. *J Am Coll Nutr*. 1988;7:111-8.

95. Ford, ES, Ajani UA, McGuire LC, Lui S. Concentration of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diab Care*. 2005;28(5):1228-30.

96. Foley RN. Phosphate levels and cardiovascular disease in the general population. Clin *J Am Soc Nephrol*. 2009;4:1136-39.

97. Pasco JA, Henry MJ, Kotowicz MA, Sanders KM, Seeman E, Pasco JR, Schneider HG, Nicholson GC. Seasonal periodicity of serum vitamin D and parathyroid hormone, bone resorption, and fractures: the Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 2004;19(5):752-58.

98. Hagstrom E, Hellman P, Larsson TE, Ingelsson E, Berglund L, Sundstrõm J, Melhus H, Held C, Lind L, Michaelsson K, Arnlov J. Plasma paratyroid hormone and risk of cardiovascular mortality in the community. *Circulation*. 2009;119(21):2765-71.

99. Chatfield SM, Brand C, Ebeling PR, Russell. Vitamin D deficiency in general medical inpatients in summer and winter. *Int Med J*. 2007;37:377-82.