MARIO PERIBAÑEZ GONZALEZ

**Prevalência de hipovitaminose D e fatores de risco
associados em pacientes portadores de HIV, HCV e
coinfecção HIV/HCV na cidade de São Paulo**

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

Programa de Ciências em
Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Guimarães
Pessoa

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gonzalez, Mario Peribañez

Prevalência de hipovitaminose D e fatores de risco associados em pacientes portadores de HIV, HCV e co-infecção HIV/HCV na cidade de São Paulo / Mario Peribañez Gonzalez. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Mário Guimarães Pessoa.

Descritores: 1.Vitamina D 2.Resistência à insulina 3.Hepatite C 4.Síndrome da imunodeficiência adquirida 5.HIV 6.*Hepacivirus* 7.Terapia antirretroviral

USP/FM/DBD-366/16

Dedico esta Tese à Sra. Sonia Rosner Silveira, minha avó que, do alto dos seus lúcidos e bem vividos 107 anos, me é muito querida e representa a todos da família.

AGRADECIMENTOS

Sem premeditar uma escolha de datas, me matriculei no doutorado no dia 24 de junho de 2013, muito próximo ao solstício do inverno. E conclui a escrita desta tese exatamente às 12 horas do dia 23 de setembro de 2016, coincidindo com o início da primavera.

Durante os anos do estudo, as estações do ano fizeram parte do meu cronograma e, neste momento, ao ver o potente sol de primavera nutrir o jardim em torno da biblioteca, sinto uma enorme gratidão pela vida e por seus ciclos.

Gratidão aos meus pais, Mario e Inez, por me legarem a capacidade de vencer algumas das lutas que a vida nos impõe e também as que escolhemos ter, como desenvolver uma tese. Sempre fui incentivado por eles a conquistar um lugar ao sol por meio do mérito nos estudos, da honestidade e firmeza de caráter. Fizeram isso, principalmente, com o exemplo e muita alegria. Hoje, a saudade se mistura com a alegria de reconhecê-los em mim.

Gratidão especial à minha irmã, Viviana Peribañez Gonzalez de Araújo e a meu cunhado Dr. Jorge Araújo, por terem cuidado do meu pai nos seus últimos anos, abrindo espaço para que eu me dedicasse à pós-graduação.

Sou grato ao Dimas Nogueira Pessetti, por todo o caminho percorrido juntos. Desejo que o sol brilhe e sempre possamos contar um com o outro nas nossas grandes travessias.

Gratidão especial ao Amigo e Orientador deste estudo, o Dr. Mário Guimarães Pessôa, exemplar pesquisador e companheiro de trabalho. Desejo que esta tese seja uma boa semente plantada e que nossa parceria frutifique.

Além da atuação do Orientador, sem o empenho dos coautores este estudo não teria sido possível, grato ao Dr. Daniel Ferraz de Campos Mazo, Dr. Daniel Paphili Prestes, Profa. Dra. Giselle Burlamaqui Klautau, Dra. Roberta Schiavon Nogueira, Profa. Dra. Maria Cássia Mendes Correia, Marcio Diniz, Prof. Dr. Julio Singer e Prof. Dr. Flair José Carrilho, que, efetivamente, me auxiliaram nesta tese.

Grato aos queridos colegas e amigos do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, incentivadores e colaboradores deste projeto e de muitas outras parcerias ao longo da vida, sinto necessidade de citar algumas pessoas que foram bastante importantes para a realização deste estudo: Dra. Ana Carla de Mello Silva, Dr. Francisco Ivanildo de Oliveira e Dra. Tamara Newmann Lobato de Souza.

Gratidão aos funcionários das instituições envolvidas neste projeto: IIER, CRT-a e HC-FMUSP. Em todos os momentos, pude contar com o empenho, a competência e a boa vontade destes servidores, em especial, da Enfa. Cleide Aparecida Guerra, do setor de coletas do IIER, que me auxiliou de forma bastante significativa. Sinto também uma enorme gratidão pelo apoio recebido na Divisão de Hepatologia e Gastroenterologia da FMUSP, e na Disciplina de Endocrinologia da FMUSP, em especial, pelo Prof. Dr. Luciano Giacaglia e Prof. Dr. Bruno Ferraz.

Ao longo da vida, as bibliotecas foram um refúgio de concentração, aprendizado e produtividade. Desta vez, não foi diferente e graças às ferramentas fornecidas pela Sra. Valéria Vilhena, da biblioteca da FMUSP, a confecção desta tese ficou bem mais fácil.

Sou grato aos meus compadres pela alegre presença dos afilhados: Susana Gonzalez Frozza, Ana Sofia Herdy Francisco Gonzalez, Ana Helena Portela Lindoso e Francisco dos Anjos. Finda a tese, estarei mais presente!

Grato aos amigos queridos que tornam meus dias mais felizes. Em especial, ao Mario Gallo e Marta Nehring, Giselle e Beatriz Kreimer, que compartilham a cachoeira da Bocaina comigo. A gratidão se estende aos meus colegas de faculdade, eternos companheiros e incentivadores, em especial, ao Prof. Dr. Mario Genilhu Bomfim Pereira e ao Dr. Carlos Eduardo Guimarães Gomes, sempre presentes.

Sou grato também a todos os 422 pacientes e voluntários, que, literalmente, doaram o sangue para realizar este trabalho.

E ao grande mistério da vida e seus Mestres, com tudo o que há por descobrir.

*“Luz do sol
Que a folha traga e traduz
Em verde novo
Em folha, em graça, em vida, em força, em luz”.
Caetano Veloso*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Metabolismo e funções fisiológicas da Vitamina D	2
1.2 Efeitos Biológicos da Vitamina D	4
1.2.1 Vitamina D e Metabolismo do Cálcio.....	4
1.2.2 Vitamina D e Sistema Imune:	5
1.3 Definição de hipovitaminose D.....	6
1.4 Fatores que afetam o nível sérico da vitamina D	8
1.5 Influência da vitamina D na fibrose hepática e resposta ao tratamento da hepatite C.....	8
1.6 Vitamina D e HIV	11
1.7 Estudos populacionais no Brasil	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos Primários	17
2.2 Objetivos Secundários	17
3 MÉTODOS.....	20
3.1 Desenho do Estudo	20
3.2 Descrição dos Centros e Pesquisadores:	20
3.3 Cálculo Amostral	21
3.4 Pacientes	22
3.4.1 Critérios de Inclusão.....	23
3.4.2 Critérios de Exclusão	23
3.5 Grupo-controle.....	23
3.6 Coleta de dados	24
3.7 Aspectos Éticos	27
3.8 Análise Estatística	27

4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO.....	38
5.1 Achados descritivos e comparação entre os grupos	38
5.2 Antirretrovirais e deficiência de vitamina D	41
5.3 Resistência à insulina e DVD	44
5.4 Análises dos fatores de risco para DVD nos grupos.....	47
5.5 Limitações do estudo	50
5.6 Conclusões.....	51
5.7 Estudo futuros	51
6 ANEXOS.....	54
6.1 Anexo A - Avaliação de deficiência de Vitamina D em pacientes co-infetados HIV/VHC e monoinfetados para HCV e HIV	54
6.2 Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido IIER INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"	57
6.3 ANEXO C - TCLE HC-FMUSP	61
6.4 Anexo D – Ficha de Coleta de Dados do Grupo Controle	64
6.5 Anexo E – Escala Fitzpatrick de cor de pele	65
7 REFERÊNCIAS	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D	Calcitriol ou Diidroxi-vitamina D
25(OH)D	Calcidiol ou Hidroxi-vitamina D
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
bAt[CCA]	Haplótipo desfavorável do VDR
CBP	<i>cal-binding protein</i>
CD4	Linfócito T portador do receptor CD4
CRT-a	Centro de Referência e Treinamento em HIV/aids
CYP27B	Enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase
CYP27B1-1260	Polimorfismo do gen promotor da 1- α hidroxilase
CYP450	Citocromo P 450
DBP	<i>D binding protein</i>
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMO	Densidade mineral óssea
DVD	Deficiência de vitamina D
EFV	Efavirenz
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FPS	Fator de proteção solar
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> – Vírus da Hepatite B
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> – Vírus da Hepatite C
HCV-RNA	Quantificação da carga viral do vírus da hepatite C por amplificação de ácido ribonucleico
HDL	<i>High density lipoprotein cholesterol</i>

HIV	<i>Human Immunodeficiency vírus</i> – Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV/HCV	<i>Human Immunodeficiency vírus and hepatitis C vírus co-infection</i> – Coinfecção HIV/HCV
HIV-RNA	Quantificação da carga viral do vírus da imunodeficiência humana por amplificação de ácido ribonucleico
HOMA-IR	<i>Homeostase Model Assessment – Insulin resistance</i>
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
IP	Inibidor de protease
ITRAN	Inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN	Inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo
OPG	Osteoprotegerina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTH	Paratormônio
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RI	Resistência à insulina
RVS	resposta virológica sustentada ao tratamento de hepatite C
TARV	Terapia antirretroviral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
Th1	Modulação de resposta linfocítica T- <i>Helper 1</i>
Th2	Modulação de resposta linfocítica T- <i>Helper 2</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UVB	Ultra-violeta B
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VDRE	<i>Vitamin D responsive elements</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Fotólise do 7 dehidrocolesterol em pré-colecalciferol (pré D3) e sua isomerização térmica a colecalciferol¹2
- Figura 2 -** Representação esquemática da produção cutânea de vitamina D, seu metabolismo e regulação da homeostase do cálcio e crescimento celular¹.....4

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Hipovitaminose D: Definição de Insuficiência e Deficiência de Vitamina D	7
Tabela 2 –	Porcentagem de pacientes com deficiência de vitamina D	30
Tabela 3 -	Características gerais da população dos três grupos de acordo com fatores de risco para deficiência de vitamina D	31
Tabela 4 -	Mediana (primeiro e terceiro quartis) dos valores de vitamina D e de HOMA-IR	32
Tabela 5 -	Fatores associados à deficiência de vitamina D em modelo de regressão múltipla na comparação entre os grupos	33
Tabela 6 –	Fatores de risco potencialmente associados com DVD no Grupo-controle	34
Tabela 7 -	Fatores de risco potencialmente associados com DVD no Grupo HCV	34
Tabela 8 -	Fatores de risco potencialmente associados com DVD no Grupo HIV	35
Tabela 9 -	Fatores de risco potencialmente associados com DVD no grupo coinfeção HIV/HCV	36

RESUMO

Gonzalez MP. *Prevalência de hipovitaminose D e fatores de risco associados em pacientes portadores de HIV, HCV e coinfecção HIV/HCV na cidade de São Paulo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução e Objetivos: Hipovitaminose D, definida como nível sérico de 25(OH)D insuficiente é considerada pandêmica em muitas populações ao redor do mundo e está associada a comorbidades em hepatite C, infecção por HIV e coinfecção HIV/HCV. Os objetivos deste estudo são: 1) comparar a prevalência de deficiência de vitamina D (DVD) caracterizada por nível sérico de 25(OH)D <20 ng/mL, entre pacientes monoinfectados pelo HCV, monoinfectados pelo HIV, coinfectados HIV/HCV e participantes do grupo-controle; 2) identificar fatores de risco específicos associados com DVD na população estudada. **Pacientes e Métodos:** Foram coletados dados clínicos e demográficos, 25(OH)D sérica, testes de função hepática e perfil metabólico durante os meses de inverno de 129 pacientes HCV monoinfectados, 118 pacientes HIV monoinfectados e 53 pacientes coinfectados HIV/HCV tratados em centros de referência na cidade de São Paulo, bem como, em 122 indivíduos saudáveis de um grupo-controle formado de pessoas não infectadas por HIV, HCV ou HBV, sem uso de suplementos de vitamina D. **Resultados:** A prevalência de deficiência de vitamina D ajustada por sexo, idade (<50 vs ≥50), cor de pele (branco vs não branco), índice de massa corporal (<25 vs ≥ 25), colesterol total (<200 vs ≥ 200), fração HDL colesterol (<40 vs ≥ 40 em homens <50 vs ≥ 50 em mulheres), triglicérides (<150 vs ≥ 150), glicemia (<110 vs ≥110), uso de efavirenz (sim vs não), uso de tenofovir (sim vs não) e índice HOMA-IR, foi menor no grupo HCV do que no controle e no grupo HIV ($p < 0.001$). Em todos os grupos, a razão de chance de DVD aumenta 1.21 [IC95%(1.01; 1.44) $p = 0.026$] para cada ponto de aumento do índice HOMA. Efavirenz também esteve associado com maior razão de chance de DVD [3.49(IC95% 1.14-10.67) $p = 0.028$]. Análise por regressão logística simples foi aplicada para avaliar fatores de risco associados a DVD dentro de cada grupo. Nesta análise, resultaram com associação significativa o sexo masculino, com uma menor razão de chance para DVD [RC 0,42(IC95% 0,18 – 0,96) $p = 0,04$] no grupo-controle e no grupo HCV [RC 0,42(IC95% 0,2 – 0,88) $p = 0,02$]; ainda no grupo HCV houve associação significativa entre DVD e HOMA-IR elevado [RC 5,59(IC 95% 1,37 – 22,8) $p = 0,02$]; e, no grupo HIV, os indivíduos que apresentaram nadir histórico de CD4 maior que 200 células/mm³ tiveram menos chance de DVD [RC 0,41 (IC95% 0,18 – 0,95) $p = 0,04$]. **Conclusão:** Uma alta prevalência de DVD foi

observada em toda a população estudada, incluindo o grupo-controle, sugerindo que a apresentação de infecção por HIV e/ou HCV por si só não aumenta as chances de DVD. Por outro lado, o incremento do índice HOMA e o uso de efavirenz se destacaram como fatores de risco nesta população. Estes achados ressaltam a importância da associação da deficiência de vitamina D com outras duas condições; a resistência à insulina e o uso de terapia antirretroviral para o HIV, os quais, isoladamente ou em combinação, podem aumentar a incidência de comorbidades como o diabetes do tipo 2.

Descritores: Vitamina D, Resistência à Insulina, Hepatite C, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, HIV, HCV, Terapia Antirretroviral

ABSTRACT

Gonzalez MP. *Prevalence of hypovitaminosis D and associated risk factors in patients with HIV, HCV and HIV/HCV co-infection in the city of São Paulo* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Background and Aims: Hypovitaminosis D, defined as insufficient serum level of 25(OH)D, is considered pandemic in many populations worldwide and is associated with co-morbidities in hepatitis C, HIV and HIV/HCV co-infection. The aim of this study is to 1) compare the prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency (VDD), defined as serum levels of 25(OH)D < 20 ng/mL, among HCV mono-infected, HIV mono-infected, HIV/HCV co-infected patients and control participants and 2) identify specific risk factors associated with VDD in each group. **Patients and Methods:** We collected demographic and clinical data, serum 25-hydroxyvitamin D, liver function parameters and metabolic profiles on 129 HCV mono-infected, 118 HIV mono-infected and 53 HIV/HCV co-infected patients treated at reference centers in São Paulo (Brazil) as well as on 122 volunteer controls, not infected by HIV, HCV, HBV or taking vitamin D supplements. **Results:** VDD prevalence adjusted for sex, age (<50 vs ≥ 50), skin color (white vs not white), body mass index (<25 vs ≥ 25), total cholesterol (<200 vs ≥ 200), HDL cholesterol (<40 vs ≥ 40 in men and <50 vs ≥ 50 in women), triglycerides (<150 vs ≥ 150), glycemia (<110 vs ≥ 110), use of Efavirenz - EFV (yes vs no), use of Tenofovir -TDV (yes vs no) and HOMA-IR was lower in HCV group than control and HIV groups ($p < 0.001$). In all groups, adjusted odds of VDD increases by 1.21 [CI95% (1.01-1.44)] for each unit increase of HOMA-IR. Antiretroviral therapy regimens containing efavirenz were also associated to higher odds of VDD 3.49 [CI95% (1.14-10.67) $p = 0.028$]. Logistic regression was applied to analyze risk factors associated to VDD within each group. In this analysis male sex resulted significantly associated to lower chance of VDD [OR 0,42(CI95% 0,18 – 0,96) $p = 0,04$] in control group and in HCV group [RC 0,42(CI95% 0,2 – 0,88) $p = 0,02$]; still in HCV group, elevated HOMA-IR was significantly associated to VDD [OR 5,59(CI 95% 1,37 – 22,8) $p = 0,02$]; and in HIV group, individuals presenting CD4 nadir higher than 200 cells/mm³ had less chance of VDD [OR 0,41 (IC95% 0,18 – 0,95) $p = 0,04$]. **Conclusion:** High prevalence of VDD was observed across all studied population, including control group, suggesting that being infected with HIV and/or HCV per se does not increase the chance of VDD. Otherwise, VDD was positively associated with HOMA-IR increase for controls and infected patients. It is also associated to use of Efavirenz in HIV/HCV patients. This finding highlights the relevance of vitamin D deficiency association with two other conditions; insulin resistance and

antiretroviral therapy, which isolated or in combination, may contribute to the incidence of comorbidities, as Type 2 diabetes mellitus

Descriptors: Vitamin D, Insulin Resistance, Hepatitis C, Acquired Immunodeficiency Syndrome, HIV, HCV, Antirretroviral Therapy.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo e funções fisiológicas da Vitamina D

A vitamina D é um pré-hormônio que, juntamente com o paratormônio (PTH), atua como importante regulador da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo. É sintetizada por meio da exposição da pele à radiação UVB, mas também pode ser obtida da dieta, em quantidades menores¹.

Durante a exposição solar, fótons ultravioleta (UVB) de 290 a 315 nm penetram na epiderme e derme, onde são absorvidos pelo 7-deidrocolesterol, presente na membrana plasmática das células desses tecidos^{1,2}. A absorção da radiação UVB faz com que o 7-deidrocolesterol abra o seu anel B, formando o pré-colecalciferol (Figura 1). Instável, o pré-colecalciferol rapidamente sofre rearranjos em suas ligações duplas para formar a vitamina D3 (Colecalciferol). Assim que formado, o colecalciferol é ejetado pela membrana plasmática para o espaço extracelular, onde, ligado ao carreador proteico de vitamina D (DBP), entrará no leito capilar da derme.

Figura 1 - Fotólise do 7 deidrocolesterol em pré-colecalciferol (pré D3) e sua isomerização térmica a colecalciferol¹

Existem duas formas de Vitamina D: 1- Colecalciferol (Vitamina D3), que é produzido na pele após exposição solar (acima descrita); 2- Ergocalciferol (Vitamina D2), que apresenta uma cadeia lateral diferente do colecalciferol (i.e., um grupo metil C24 e uma dupla ligação entre C e C), que é produzido industrialmente pela irradiação seguida de purificação do ergosterol extraído de leveduras. Ambas as formas são usadas para enriquecer alimentos e fabricar polivitamínicos¹.

Uma vez produzida, seja na pele ou absorvida da dieta, a Vitamina D é submetida a duas hidroxilações obrigatórias para exercer seus papéis biológicos.

A primeira hidroxilação ocorre no fígado, onde é convertida em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), ou calcidiol¹. Esta forma biológica de vitamina D é a mais estável, e seus níveis séricos refletem o estoque corporal. A 25(OH)D passa para a circulação ligada ao seu carreador proteico (DBP) e alcança os rins, onde a enzima megalina transloca o complexo DBP-25(OH)D para o túbulo renal.

A segunda hidroxilação ocorre, então, na mitocôndria das células tubulares, por meio da enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase (CYP27B), que induz a hidroxilação em C-1 para formar a 1- α ,25-diidroxivitaminaD (1,25(OH)2D).

A 1,25(OH)2D, ou calcitriol, é a forma biológica efetora da vitamina D (Figura 2), e interage com o receptor nuclear de vitamina D (VDR). Este, por sua vez, se unirá com o receptor X do ácido retinoico. O complexo formado é reconhecido por uma sequência de genes, o elemento respondedor da vitamina D (VDRE), que será responsável por desbloquear a informação genética dos efeitos biológicos do calcitriol¹⁻³.

Figura 2 - Representação esquemática da produção cutânea de vitamina D, seu metabolismo e regulação da homeostase do cálcio e crescimento celular¹.

1.2 Efeitos Biológicos da Vitamina D

1.2.1 Vitamina D e Metabolismo do Cálcio

Em nível intestinal, a 1,25(OH)₂D induz a expressão de um canal de cálcio epitelial, a proteína ligadora de cálcio, ou “*cal-binding protein*” (CBP), e uma série de outras proteínas que auxiliam na absorção de cálcio da dieta para a circulação³. A 1,25(OH)₂D também interage com o VDR dos osteoblastos, estimulando a expressão do receptor ativador do ligante do fator de necrose tumoral (RANKL), similar ao paratormônio (PTH)⁴. Assim, a 1,25(OH)₂D mantém a homeostase do cálcio, aumentando a absorção intestinal e a mobilização dos estoques desse íon do esqueleto⁵. O PTH, a hipocalcemia e a hipofosfatemia são os maiores estimuladores da produção renal de 1,25(OH)₂D^{5,6}. Durante períodos como gravidez, lactação e estirão

do crescimento, hormônios como os do crescimento, os esteroides, a prolactina e o fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) desempenham papel fundamental no incremento da produção renal de 1,25(OH)₂D, com a finalidade de satisfazer as crescentes necessidades de cálcio^{4,5}.

O Calcitriol exerce efeito de retroregulação, ou seja, regula sua própria síntese, aumentando a expressão da enzima 24-Hidroxilase, que converte a 25(OH)D em 24,25(OH)₂D, ou ácido calcitroico, metabolicamente inerte. Uma outra forma de regulação do excesso de produção de vitamina D é mediada pela própria luz solar, capaz de transformar o pré-colecalciferol e colecalciferol em fotoisômeros com pouca ou nenhuma atividade biológica. Desta forma, não é reportada intoxicação por excesso de vitamina D após exposição solar prolongada^{2,7}.

Além do intestino grosso e dos osteoblastos, o VDR tem sido também identificado em praticamente todas as células e todos os tecidos do corpo, incluindo cérebro, coração, pele, pâncreas, mama, cólon e células do sistema imunológico^{4,8}, onde a 1,25(OH)₂D auxilia na regulação da maturação e crescimento celular, estimula a secreção de insulina, inibe a produção de renina e modula a função dos linfócitos T e B, e macrófagos^{4,5,9}.

1.2.2 Vitamina D e Sistema Imune

Recentemente, foi identificada a importância da enzima 1- α hidroxilase extrarrenal (CYP27B1) para as funções imunomodulatórias da Vitamina D. Os macrófagos ativados e as células dendríticas expressam a enzima 1- α hidroxilase, que, de forma diferente da enzima renal, não é regulada por sinais homeostáticos do metabolismo do cálcio, mas, primariamente, por estímulos imunes, como interferon gama e agonistas dos “*Toll-Like-Receptors*” (TLR)¹⁰.

Em 2006, foi relatado, pela primeira vez, que a ativação dos TLR em macrófagos humanos aumenta a expressão dos VDR, que ativam a transcrição de DNA dos elementos respondedores à vitamina D (VDRE) alocados na região reguladora dos genes-alvo do calcitriol, resultando na

produção de peptídeos antimicrobianos com ampla ação contra micro-organismos, incluindo vírus, fungos, bactérias e micobactérias. Estes peptídeos são conhecidos como catelicidinas, que desempenham importantes funções na resposta imune inata, conferindo responsividade do sistema imune a níveis circulantes de 25(OH)vitamina D¹¹.

Estes efeitos realçam a relevância em investigar a prevalência da deficiência de vitamina D em indivíduos portadores de doenças virais crônicas, como o HCV e o HIV.

1.3 Definição de hipovitaminose D

A 25(OH)D sérica, o calcidiol, sendo o biomarcador mais estável da vitamina D, e que reflete o estoque corporal, é comumente utilizado para identificar a deficiência desta vitamina¹². A partir da dosagem deste biomarcador, podemos classificar os indivíduos como: deficientes, insuficientes ou suficientes em vitamina D^{13,14}. Os valores do ponto de corte para nível normal de 25(OH)vitamina D discutidos na literatura médica, baseados em estudos populacionais com ênfase na homeostase do cálcio e na saúde óssea, variaram de 20 a 32 ng/mL. Portanto, não há um consenso quanto ao valor de corte para a definição de “suficiência” em vitamina D^{15,16}.

Vários especialistas concordam que, para correção do hiperparatireoidismo secundário, redução do risco de quedas e fraturas, e a máxima absorção de cálcio, o melhor ponto de corte de 25(OH) D seria o de 30 ng/mL (75 nmol/L)^{13,15,17}, sendo a faixa entre 20 e 30 ng/mL melhor caracterizada como insuficiência. No entanto, valores abaixo de 20 ng/mL (50 nmol/L) são os mais aceitos para classificar a deficiência de vitamina D, pois já estariam associados a alterações ósseas consistentes com desmineralização.

Logo, a deficiência de vitamina D (DVD) é, atualmente, definida¹⁸ como níveis abaixo de 20ng/mL. Este é o ponto de corte que utilizaremos para análise neste estudo. Níveis abaixo de 10 ng/mL podem ser considerados como deficiência severa, pois apresentam associação com osteomalácia,

enquanto níveis entre 20 ng/mL e 30 ng/ml são caracterizados como insuficiência (Tabela 1). Estima-se que, pelo menos, 1 bilhão de pessoas no mundo possam apresentar a hipovitaminose D, ou seja, deficiência ou insuficiência. A vitamina D também varia de acordo com sexo, idade e cor de pele¹⁹.

Tabela 1 - Hipovitaminose D: Definição de Insuficiência e Deficiência de Vitamina D

Status de Vitamina D	Valores
Insuficiência	< 30 ng/mL (75 nmol/L)
Deficiência	< 20 ng/mL (50 nmol/L)
Deficiência severa	< 10 ng/mL (25 nmol/L)

Em crianças, a deficiência da Vitamina D afeta a mineralização da matriz óssea de colágeno, levando a retardo no crescimento e deformidades ósseas conhecidas como raquitismo. Em adultos, a deficiência de vitamina D induz ao hiperparatiroidismo secundário, com consequente perda da matriz e desmineralização óssea, aumentando o risco de osteoporose e fraturas. Quando avançada, a mineralização deficiente da matriz óssea resulta em osteomalácia, caracterizada por dor óssea intensa, deformidades ósseas e fraturas patológicas no adulto. A deficiência de vitamina D também provoca fraqueza muscular, o que contribui para o risco de queda.

A deficiência de vitamina D tem também outras consequências na saúde em geral. Existem crescentes evidências correlacionando a deficiência com risco aumentado para doenças autoimunes como diabetes mellitus tipo 1 (DM1), esclerose múltipla e artrite reumatoide, além de maior mortalidade durante choque séptico, associação com hipertensão arterial, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e alguns tipos de neoplasias³.

Em especial, se sabe que indivíduos com DVD têm maiores chances de desenvolver alterações no metabolismo da glicose, como resistência à insulina (RI), síndrome metabólica e diabetes melitus tipo 2 (DM2)²⁰⁻²².

Nos últimos anos, também existe crescente evidência da relação entre deficiência de vitamina D com comorbidades associadas à hepatite C e ao HIV, que serão descritas, respectivamente, nas seções 1.5 e 1.6 desta introdução.

1.4 Fatores que afetam o nível sérico da vitamina D

Idade²³, pigmentação cutânea aumentada²⁴ e obesidade²⁵ estão associados à deficiência de vitamina D. Os níveis de 7-deidrocolesterol da pele sofrem redução progressiva com o passar dos anos²⁶ e, portanto, um indivíduo de 70 anos tem, aproximadamente, 25% da capacidade de produzir colecalciferol, quando comparado a um indivíduo jovem saudável²⁷. Devido a sua capacidade de absorver a radiação UVB, os protetores solares são eficazes em prevenir queimaduras e seus danos associados. Portanto, quando usado de forma apropriada, o protetor com fator de proteção solar (FPS) nível 8 reduz em 95% a capacidade da pele em produzir colecalciferol²⁸.

Por ser lipossolúvel, a vitamina D é armazenada no tecido adiposo. Sendo assim, o colecalciferol produzido na pele, ou absorvido a partir da dieta, é parcialmente estocado no tecido adiposo. Este estoque é usado durante o inverno, quando os raios de sol não são capazes de estimular suficientemente a produção de colecalciferol. No entanto, em indivíduos obesos, o colecalciferol permanece armazenado em camadas profundas do tecido adiposo, o que prejudica a sua biodisponibilidade. Logo, em relação aos não obesos, esses indivíduos são capazes de aumentar em apenas 50% seus níveis de vitamina D quando necessário²⁵.

1.5 Influência da vitamina D na fibrose hepática e resposta ao tratamento da hepatite C

Existem evidências que dão suporte à interação entre a fisiologia da vitamina D, a evolução de fibrose e a resposta ao tratamento na hepatite C.

A maior parte das atividades biológicas do calcitriol é mediada pelo VDR, e os polimorfismos encontrados em seu gene podem ser favoráveis ou desfavoráveis às funções efetoras da vitamina²⁹.

Um estudo recente demonstrou que níveis séricos reduzidos de 25(OH) vitamina D e o haplótipo desfavorável bAt[CCA] do VDR estão associados à rápida progressão de fibrose em pacientes com hepatite C crônica³⁰. Em combinação, ambas as variáveis exercem efeitos aditivos na progressão de fibrose³¹.

Um outro estudo não encontrou significância estatística ao avaliar o possível papel da vitamina D em prever a evolução de fibrose e descompensação hepática. Este estudo utilizou-se de uma coorte de pacientes previamente não respondedores a tratamento para hepatite C, usando um modelo caso-controle (pacientes com progressão de fibrose-pacientes sem progressão, respectivamente) pareado por idade. Os níveis séricos de vitamina D não diferiram entre os pacientes que apresentaram ou não progressão de fibrose³².

Em algumas condições, como nos portadores do genótipo 3 do vírus da hepatite C, o tratamento de hepatite C ainda pode ser baseado em regimes terapêuticos contendo interferon, e alguns estudos identificaram o nível sérico de vitamina D e/ou sua suplementação como fatores preditivos de resposta virológica sustentada (RVS).

Em 2010, Pettá e colaboradores associaram níveis baixos de vitamina D sérica em pacientes portadores de hepatite C crônica genótipo 1 com fibrose avançada e má resposta a tratamento com Peg-Interferon e ribavirina³³. Um estudo mais recente avaliou o papel da suplementação de vitamina D iniciada antes do tratamento, e mantida como adjuvante com Peg-Interferon e ribavirina em pacientes com hepatite C crônica e genótipo 1 ⁽³⁴⁾. Foi encontrada diferença significativa nas taxas de RVS entre o grupo suplementado (86%) e não suplementado (42%). Este estudo demonstrou que a suplementação, e não o nível sérico de vitamina D pré-tratamento, teve influência positiva na RVS.

O mesmo grupo de autores demonstrou em outro estudo, com genótipos 2 e 3, que a RVS do grupo suplementado também foi significativamente maior que a do grupo não suplementado³⁵. Em ambos estudos, os grupos suplementado e placebo foram pareados por idade, sexo, grau de fibrose, HCV-RNA pré-tratamento, mas não pelo polimorfismo IL-28, conhecido fator preditivo de resposta a interferon.

É crescente a ideia de que a vitamina D possa ter um efeito sinérgico ao interferon, ainda não bem esclarecido. Um estudo realizado *in vitro*, utilizando modelo de infecção por HCV quimérico em células de adenoma hepático, demonstrou que a vitamina D pode ter um efeito antiviral direto, sendo este potencializado pela adição de níveis terapêuticos de interferon³⁶. Um estudo mais recente, utilizando metodologia distinta do anterior, também demonstrou o sinergismo entre interferon peguilado e 1,25(OH)₂D em inibir a replicação do HCV *in vitro*³⁷.

Lange e colaboradores identificaram que, além do nível sérico de vitamina D, a taxa de RVS foi influenciada pelo polimorfismo do gene promotor da 1- α hidroxilase (CYP27B1-1260)³⁸. Tal achado contribui para o entendimento de que não só o nível sérico de vitamina D, mas todos os fatores que mediam sua síntese e suas ações biológicas, incluindo a imunomoduladora, estariam interligados e seriam, em conjunto, responsáveis pelos resultados encontrados entre suplementação de vitamina D, progressão de fibrose e RVS.

Sabe-se, também, que a DVD é um dos fatores ambientais que aumenta a chance de desenvolver DM2 em população geral²⁰⁻²². Além disso, a presença da infecção pelo vírus da hepatite C aumenta o risco para desenvolvimento de DM2 em pessoas com risco reconhecido de diabetes^{39,40}. Esta associação entre DVD e risco para diabetes ainda não está descrita em pacientes com hepatite C.

Mesmo com o advento de novas drogas para tratamento da hepatite C, muitos pacientes ainda terão indicação de esquemas contendo interferon, especialmente aqueles com genótipo 3⁴¹. Embora ainda necessitemos esclarecer, por meio de estudos maiores, como a vitamina D influencia na

resposta virológica sustentada, parece racional dosar a vitamina D antes do início do tratamento e oferecer suplementação aos pacientes que estejam apresentando insuficiência.

Seria precoce afirmar que tal medida tem o objetivo de atingir uma melhor taxa de RVS. No entanto, são múltiplos os benefícios gerais à saúde proporcionados pela plenitude de níveis séricos de vitamina D.

Existe também uma associação entre o nível sérico de vitamina D com doenças hepáticas crônicas colestáticas e não colestáticas⁴²⁻⁴⁶. Baixos níveis séricos de 25(OH)D estão relacionados com pior função hepática⁴⁷ e cirrose⁴⁸. Assim, a densidade mineral óssea reduzida em pacientes com doença hepática crônica e cirrose é uma síndrome clínica bem caracterizada, conhecida como osteodistrofia hepática⁴⁹.

1.6 Vitamina D e HIV

Como descrito acima no item 1.2, a vitamina D desempenha inúmeras funções, notadamente relacionadas ao metabolismo cálcico, destacando-se a associação de sua deficiência com osteopenia e osteoporose. Nos últimos anos, foram publicados diversos relatos sobre a crescente prevalência destas comorbidades em populações portadoras de HIV⁵⁰⁻⁵². Possíveis explicações para esta alta prevalência incluem anormalidades na regeneração óssea causadas pelo próprio vírus ou induzidas por citocinas, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e alterações no ligante do fator nuclear kappa B (RANKL) e do sistema osteoprotegerina (OPG), resultando em mineralização óssea reduzida⁵³.

Pacientes com HIV podem apresentar com maior frequência fatores de risco para DVD, tais como exposição solar reduzida, baixa ingestão alimentar, má absorção, armazenamento inadequado da vitamina no tecido adiposo, ativação anormal da vitamina D provocada por comprometimento das funções hepáticas e/ou renais e acidose láctica⁵⁴⁻⁵⁷. E, notadamente, a interferência dos antirretrovirais e outras drogas no metabolismo da vitamina D^{58,59}.

In vitro, o metabolismo de vitamina D pode ser influenciado por inibidores de protease (IPs) e inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN), os quais, respectivamente, inibem ou induzem enzimas do citocromo P450 (CYP450). Outras drogas frequentemente utilizadas em portadores de HIV, como anticonvulsivantes e tuberculostáticos, também podem levar a níveis reduzidos de vitamina D com subsequente queda da densidade mineral óssea, seja por induzir seja por inibir o CYP450⁶⁰⁻⁶².

Até o momento, a associação *in vivo* mais bem estabelecida é entre o uso de inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN), mais especificamente, efavirenz, e baixos níveis de vitamina D^{63,64}. Esta droga afeta o metabolismo da vitamina D por induzir a enzima 24-hidroxilase, a enzima que hidroliza a forma ativa de vitamina D em sua forma inativa (ácido calcitroico). Com relação aos IPs, estudos *in vivo* falharam em demonstrar associação entre o uso destas drogas e DVD.

Outra droga frequentemente associada a anormalidades ósseas é o tenofovir disoproxil fumarato (TDF), um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo (ITRAN). A princípio, o TDF apresenta efeito deletério ao túbulo proximal renal, o que, por sua vez, prejudica a segunda etapa de hidroxilação da 25(OH)D, reduzindo os níveis de 1,25(OH)2D, e, por consequência, causando menor absorção intestinal de cálcio e hiperparatireoidismo secundário⁶⁵.

Além disso, baixos níveis de 1,25(OH)2D e polimorfismos do VDR foram associados com baixa contagem de células CD4, estado pró-inflamatório e progressão para AIDS⁶⁶⁻⁶⁹. Neste cenário, é fundamental destacarmos, novamente, o papel que a vitamina D exerce em relação ao sistema imunológico. O calcitriol suprime a ativação das células T e de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular^{70,71}, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , INF- γ , Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 12 (IL-12), e alterando o perfil da resposta das células T ativadas de T-Helper 1(Th1) para resposta T-Helper 2 (Th2)⁷²⁻⁷⁴. Assim, uma vez que a infecção pelo HIV se caracteriza como um estado inflamatório crônico, caracterizado por uma resposta Th1 símile, é possível que a combinação

entre a infecção pelo HIV e a produção local insuficiente de 1,25(OH)₂D atuem de maneira sinérgica, contribuindo para a ação e produção de citocinas pró-inflamatórias, com consequente disfunção de resposta imunológica⁷².

A associação entre DVD e DM2 já foi demonstrada tanto na população geral²⁰⁻²² quanto em indivíduos infectados pelo HIV⁷⁵, e a associação entre DVD e resistência à insulina (RI) foi, recentemente, descrita em uma coorte de mulheres não diabéticas infectadas pelo HIV⁷⁶.

Tendo em vista o crescente conhecimento da relação entre DVD e riscos potenciais à saúde em indivíduos infectados pelo HIV, alguns estudos populacionais foram realizados para avaliar os níveis séricos de vitamina D. Em uma análise de base de dados do “*Study to Understand the Natural History of HIV and AIDS in the Era of Effective Therapy (SUN)*”, 70,3% dos adultos infectados pelo HIV, não recebendo suplemento de vitamina D, tinham níveis insuficientes de 25(OH)D (<30ng/mL)⁷⁷. Este estudo também comparou a prevalência encontrada nos pacientes portadores de HIV com os 79,1% encontrados na população geral dos Estados Unidos por meio do “*US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2003-2006)*”, e encontrou uma prevalência de insuficiência significativamente maior nos pacientes da população geral, ajustando para sexo, etnia e idade.

Viard e colaboradores, em seu estudo que avaliou a associação entre os baixos níveis séricos de 25(OH)D em pacientes infectados pelo HIV e progressão de doença por um período médio de cinco anos de seguimento⁵⁸, mostraram uma forte associação entre eventos associados a aids e mortalidade por todas as causas nos indivíduos com níveis séricos de 25(OH)D <12ng/mL, mesmo após ajuste para um grande número de variáveis, incluindo estações do ano, origem étnica e geográfica, contagem de CD4 e carga viral. Desse modo, tais resultados indicam que a deficiência de vitamina D pode ser um importante cofator na progressão da doença pelo HIV, até mesmo em um cenário de uso eficiente e abrangente de terapia antirretroviral (TARV)⁵⁸.

Um estudo realizado na Holanda, avaliando o nível sérico de vitamina D em pessoas com HIV, encontrou prevalência de deficiência de vitamina D em 19% dos pacientes brancos, 33% nos de origem mediterrânea, 44% nos asiáticos e 62% em negros. Neste estudo, os pacientes negros apresentaram um risco significativamente maior de desenvolver deficiência de vitamina D quando comparados aos outros grupos⁷⁸, demonstrando que a cor de pele pode ser um fator de risco associado à DVD.

Aparentemente, a deficiência de vitamina D não incide com maior frequência na população portadora de HIV do que na população geral. No entanto, pacientes soropositivos para HIV podem apresentar fatores de risco específicos para desenvolvimento da DVD, tais como a cor de pele e o uso de medicações, além de apresentar maior incidência de comorbidades associadas, tais como diabetes e osteoporose. Portanto, existe uma necessidade em caracterizar o *status* de vitamina D nesta população e explorar possíveis fatores de risco associados.

1.7 Estudos populacionais no Brasil

Em estudos recentes conduzidos no Brasil, os autores observaram níveis séricos médios muito baixos de 25(OH)D em idosos após os meses de inverno, bem como, insuficiência em indivíduos mais jovens e saudáveis⁷⁹⁻⁸¹. No entanto, no nosso país, ainda existe uma paucidade de dados em relação à deficiência de vitamina D em pacientes com HIV e/ou HCV. Um estudo recente em população portadora de HIV acompanhada ambulatorialmente⁸² observou que 83,4% dos pacientes apresentavam vitamina D insuficiente (<30 ng/mL). Contudo, dados em população portadora de hepatite C ainda são escassos.

Com o objetivo de preencher esta lacuna, consideramos realizar este estudo observacional, transversal, para avaliar a prevalência de DVD examinando fatores de risco potencialmente associados.

Cabe lembrar que a deficiência de vitamina D pode ser corrigida com suplementação adequada ou exposição à luz solar, sendo possível, desta forma, estabelecer futuras estratégias para melhorar a evolução e resposta ao tratamento, tanto da hepatite C quanto da infecção por HIV nestes pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Primários

- Caracterizar a prevalência de deficiência da vitamina D (25 [OH] vitamina D < 20 ng/mL) em três grupos distintos atendidos em nossos ambulatorios:
 - 1) entre pacientes com hepatite C crônica sem infecção pelo HIV,
 - 2) em pacientes portadores de HIV sem infecção por HCV,
 - 3) coinfectados HIV/HCV.
- Comparar níveis séricos de vitamina D destes 3 grupos entre si e com Grupo-controle, para avaliar se a deficiência de vitamina D incide mais severamente em algum destes grupos do que na população geral.

2.2 Objetivos Secundários

- Descrever fatores associados que influenciem os níveis séricos de vitamina D na população dos grupos de indivíduos infectados por HIV e/ou HCV e no grupo-controle, tais como sexo, cor de pele, perfil metabólico, incluindo colesterol total e frações, triglicérides, glicemia e HOMA-IR,
- Em pacientes portadores de HIV, avaliar a associação de DVD com uso de Terapia antirretroviral (TARV), contagem de CD4 (recente e nadir histórico) e histórico de doença definidora de aids de acordo com a classificação do *Centers for Diseases Control* (CDC).

- Em pacientes portadores do vírus da hepatite C, avaliar a associação do genótipo do HCV, grau de fibrose, cirróticos classificação Child-Pugh A *versus* não cirróticos e níveis séricos de vitamina D, tanto em pacientes HCV monoinfectados quanto coinfectados HIV/HCV.

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo transversal, analisando os níveis séricos de 25(OH) vitamina D em três grupos:

- 1) Em monoinfectados pelo HCV;
- 2) Em pacientes portadores de HIV, com uso de TARV;
- 3) Em coinfectados HIV/HCV.

E grupo-controle com população não portadora de infecção por HIV, HCV ou HBV, sem uso de suplementos de vitamina D, não portadores de doenças hepáticas ou intestinais crônicas, ou em uso de medicações que pudessem influenciar o metabolismo de vitamina D.

Os grupos 1, 2 e 3 seguidos ambulatorialmente nos centros de referência para tratamento de hepatite C e HIV na cidade de São Paulo, citados a seguir.

3.2 Descrição dos Centros e Pesquisadores

- 1- *Instituto de Infectologia Emílio Ribas- SP, Ambulatório de Hepatites, Secretaria de Estado da Saúde. Pesquisador Principal: Dr. Mario P. Gonzalez. E Ambulatório HIV/Aids. Pesquisadora: Dra. Giselle Burlamaqui Klautau*
- 2- *Divisão de e Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Pesquisador: Prof. Dr. Mario Guimarães Pessoa.*

- 3- *Casa da AIDS*. Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Pesquisadora: *Profa. Dra. Maria Cássia J Mendes-Correa*.
- 4- *CRT-a*. Centro de Referência e Treinamento em HIV/aids. Pesquisadora: *Dra. Roberta Schiavon Nogueira*

3.3 Cálculo Amostral

Utilizamos para cálculo amostral estudos populacionais que relatavam a deficiência de vitamina D (<20 ng/ml) em:

- 1- Populações soropositivas para HIV⁸³⁻⁸⁵;
- 2- Em portadores de HCV não cirróticos^{35,46,86}; e
- 3- Em população geral^{87,88}.

Há poucos relatos na literatura descrevendo a prevalência de deficiência de vitamina D em pacientes coinfectados HIV/HCV, geralmente como subgrupo dos estudos populacionais de HIV soropositivos. Estes estudos não demonstraram significância estatística nos níveis séricos de vitamina D entre pacientes com HIV e coinfectados HIV/HCV⁷⁹⁻⁸¹. Portanto, para fins de cálculo amostral, a prevalência de deficiência de 25(OH) Vitamina D entre pacientes coinfectados HIV/HCV foi considerada semelhante a pacientes portadores de HIV sem infecção HCV.

Na população com hepatite C crônica, as prevalências de 25(OH) vitamina D < 20 ng/ml também variaram entre 50 e 70% nas diferentes populações estudadas^{84,86}, sendo a doença hepática avançada o maior fator preditivo de deficiência⁸⁶.

A prevalência de deficiência relatada na população geral variou muito entre as populações estudadas, sendo relatadas no Brasil entre 60 e 77%^{83,84}. E como pacientes com insuficiência hepática não fazem parte da amostra, é possível esperar que a prevalência de deficiência de vitamina D seja

semelhante entre pacientes com HCV monoinfecção, sem descompensação hepática e grupo-controle.

Utilizamos, portanto, para o cálculo amostral, dois valores de prevalência de deficiência de vitamina D: 85% para os grupos monoinfecção HIV e coinfecção HIV/HCV, e 70% para o grupo monoinfecção HCV, semelhante ao encontrado em estudos em população geral. O tamanho amostral encontrado foi de 115 indivíduos para cada um dos três grupos estudados e também para o grupo-controle.

Utilizou-se o programa POWER (versão 1.3; 1985) para o cálculo amostral para comparação de duas proporções. O cálculo foi realizado para o desfecho deste estudo: DEFICIÊNCIA (25 (OH) Vitamina D < 20 ng/ml).

Portanto, para a realização do presente estudo, serão avaliados, no mínimo, 115 pacientes em cada grupo, assim como o grupo-controle, pois este número engloba o número amostral (n) para o desfecho Deficiência (25(OH)D < 20ng/mL).

3.4 Pacientes

A participação voluntária nesta pesquisa, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo B), foi oferecida a todos os pacientes com hepatite C crônica, monoinfectados pelo HCV, mono infectados pelo HIV e coinfectados HIV/HCV, em seguimento nos centros descritos acima. Eles foram avaliados para níveis séricos de 25 (OH) vitamina D, função hepática, CD4 e HIV-RNA, medicações em uso, dados demográficos e histórico de evolução registrados nos prontuários médicos (vide abaixo o item 3.6- Coleta de Dados).

3.4.1 Critérios de Inclusão

- Todos os pacientes seguidos nestes ambulatorios, portadores crônicos de HCV, com confirmação prévia por PCR, com ou sem coinfeção por HIV;
- Pacientes monoinfectados por HIV com confirmação prévia por Elisa e/ou HIV-RNA, em uso ou não de TARV;
- Idades acima de 18 anos;
- Ambos os gêneros;
- Capazes de ler, entender e assinar o TCLE (Anexo B).

3.4.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes sem hepatite C crônica confirmada por PCR;
- Pacientes em tratamento para HCV com esquemas contendo interferon peguilado;
- Pacientes com coinfeção por HBV;
- Pacientes em uso de suplementos de vitamina D;
- Pacientes com doença hepática avançada (Classificação Child B ou C);
- Portadores de outras doenças hepáticas crônicas, que não hepatite C;
- Pacientes portadores de HIV em vigência de infecção oportunista;
- Pacientes diabéticos;
- Pacientes que não preencham os critérios de inclusão.

3.5 Grupo-controle

O Grupo-controle foi composto por indivíduos voluntários, capazes de ler, entender e assinar o TCLE (específico para o grupo-controle – Anexo C),

maiores de 18 anos, de ambos os gêneros, qualquer IMC e etnia, não portadores de HIV, HBV ou HCV. Sem uso de suplementos de vitamina D.

Sem uso regular de anticonvulsivantes ou hipoglicemiantes orais.

Não portadores de doença inflamatória intestinal em atividade.

Não portadores de neoplasias ou doenças autoimunes. Não portadores de qualquer outra doença hepática crônica.

Os indivíduos para formação de grupo-controle foram recrutados entre:

- Funcionários, Médicos, Corpo de Enfermagem e Médicos Residentes do IIER, do HC-FMUSP e do CRT-a;
- Cônjuges e familiares dos pacientes;
- Indivíduos que compareceram a trabalho assistencial voluntário, realizado pelo Investigador Principal do estudo, que consiste em palestras a comunidades sobre *“Hábitos Saudáveis e Prevenção de Doenças”*. Após a palestra, foi feito convite à participação na pesquisa.

Os interessados foram orientados a encontrar o Investigador no IIER, onde foram matriculados, adequadamente avaliados, aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e submetidos à coleta de dados e de amostra de sangue (Vide abaixo o Item “Coleta de Dados”).

Foi marcado retorno com o Investigador Principal, em horário extra de agendamento, para entrega de resultados. Neste retorno, os pacientes receberam orientações sobre seus resultados e alta.

Os pacientes que porventura recebessem diagnóstico de HIV, HBV ou HCV seriam encaminhados para os respectivos ambulatórios de referência.

3.6 Coleta de dados

Durante a consulta médica, a participação na pesquisa foi oferecida e assinado o TCLE (Anexo B).

Todos os dados demográficos e o histórico do acompanhamento clínico foram colhidos durante as consultas a partir das anotações de prontuário em uma ficha específica desenvolvida para esta pesquisa (Anexo A).

Dados faltantes foram recuperados por revisão de prontuário em bases de dados dos centros e/ou prontuários médicos nos Arquivos das Instituições envolvidas.

As amostras de sangue foram coletadas durante os invernos (21 de junho a 30 de setembro) de 2011 e 2012, com os pacientes em jejum de 12 horas, nos seguintes locais:

- 1) setor de coletas do Instituto de Infectologia Emílio Ribas;
- 2) setor de coletas do Prédio dos Ambulatórios do HC-FMUSP;
- 3) setor de coletas da Casa da AIDS; e
- 4) setor de coletas do CRT-a.

Foram colhidas amostras de sangue para dosagem de 25(OH) vitamina D, colesterol total e frações, triglicérides, glicemia de jejum, insulinemia de jejum, ALT/AST. Bilirrubina total e frações, albumina sérica, e Atividade de Protrombina com INR.

As análises foram realizadas no Laboratório Central do Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo.

A 25(OH)D foi dosada por meio do ensaio LIAISON® 25 OH Vitamin D, um imunoensaio quimioluminescente competitivo (CLIA) direto para a determinação quantitativa da 25-OH vitamina D total no soro ou plasma.

Dos prontuários, foram colhidos os seguintes dados:

A - Relacionados ao histórico de HIV:

- Incidência prévia de Infecções Oportunistas;
- Nadir histórico de CD4;
- CD4 mais recente;

- HIV-RNA mais recente;
- Classificação CDC;
- Terapia Antirretroviral em uso;
- Medicamentos concomitantes.

B - Relacionados ao HCV:

- Genótipo;
- Carga viral de HCV (mais recente);
- Grau de fibrose hepática pela classificação metavir, com até 3 anos desde sua coleta, o mais recente no caso de haver duas ou mais biópsias;
- Classificação Child-Pugh no caso de serem pacientes cirróticos, sendo incluídos no estudo apenas os pacientes classificados como Child-Pugh A;

C - Dados demográficos:

- Sexo;
- Idade;
- Cor de pele de acordo com a Escala de Fototipos de Fitzpatrick⁸⁹ Anexo E, posteriormente categorizada para análise estatística entre duas categorias: brancos (Fitzpatrick I a III) e não brancos (Fitzpatrick IV a VI).

D - Dados Antropométricos:

- Peso e estatura para cálculo de índice de massa corporal.

E - Grupo-controle:

- Foram colhidos os mesmos dados demográficos utilizados para os 3 grupos de estudo (Vide Item anterior) e anotados em ficha específica (Anexo D);
- Foram coletadas amostras de sangue para dosagem de 25 (OH) vitamina D, sorologias para HIV, HBV (HBsAg) e HCV, colesterol total e frações, triglicérides e glicemia de jejum.

3.7 Aspectos Éticos

O recrutamento de pacientes e coleta de dados só foi iniciado após a aprovação deste estudo nos respectivos comitês de ética em pesquisa das instituições em que foi desenvolvido. Os pesquisadores se comprometeram em aplicar o TCLE (Anexos B e C) em todos os sujeitos desta pesquisa e assinar o termo de confidencialidade.

3.8 Análise Estatística

Os dados amostrais foram descritos usando quartis (25%, mediana, 75%) para a deficiência de vitamina D e porcentagens para as variáveis restantes. Comparações entre os grupos para Vitamina D foram realizadas por meio do teste Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Tukey Não Paramétrico⁹⁰. As suposições de Normalidade e Homogeneidade de variâncias foram avaliadas pelos testes de Anderson-Darling e Levene, respectivamente^{91,92}. Os grupos do estudo foram comparados com respeito a parâmetros demográficos, antropométricos e laboratoriais pelo teste de Fisher ou Qui-Quadrado. Comparações múltiplas baseadas no teste de Fisher foram ajustadas pelo procedimento de Holm⁹³.

A prevalência de DVD foi comparada nos três grupos e controle por meio de regressão logística controlando por sexo, idade (<50 vs ≥ 50), cor de pele (branco vs não branco), índice de massa corporal (<25 vs ≥ 25), colesterol total (<200 vs ≥ 200), colesterol HDL (<40 vs ≥ 40 em homens e <50 vs ≥ 50 em mulheres), triglicérides (<150 vs ≥150), glicemia (<110 vs ≥ 110), uso de efavirenz (sim vs não), uso de tenofovir (sim vs não) e HOMA-IR (< 2.7 vs. ≥ 2.7)⁹⁴.

Identificação de fatores de risco específicos para a prevalência de deficiência de vitamina D nos grupos também foi avaliada por regressão logística simples. Razões de chance de DVD acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança 95% foram calculadas. Em particular, foram considerados como fatores de risco adicional para sujeitos em ambos os grupos infectados pelo HCV, genótipo do HCV, presença de cirrose CHILD-PUGH A *versus* ausência de cirrose, níveis de HCV-RNA quantitativo, grau de fibrose de acordo com a classificação METAVIR, e presença de esteatose. O nadir histórico de CD4, histórico de doença definidora de AIDS, níveis atuais de CD4, níveis séricos de HIV-RNA quantitativo, uso de Efavirenz (EFV) foram considerados como fatores de risco adicional nos grupos infectados pelo HIV. Para a análise intragrupos, o índice HOMA-IR foi tratado como uma variável categórica, escolhendo o valor de corte maior que 5 para definição de HOMA-IR elevado.

O pacote R de *software* estatístico, versão 3.12⁹⁵; foi usado para conduzir a análise.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Os resultados em análise descritiva da hipovitaminose D na população estudada estão expostos na Tabela 2. A porcentagem de pacientes com deficiência de vitamina D (<20ng/mL) foi de 41,9% no grupo HCV, 59,3% no grupo HIV, 43,4% no grupo HIV/HCV e 73,8% no grupo-controle. A mediana dos níveis séricos de vitamina D foi 23 ng/mL no grupo HCV, 18 ng/mL no grupo HIV, 22 ng/mL no grupo HIV/HCV e 17 ng/mL no grupo-controle. Nota-se que o desvio interquartis foi menor no grupo-controle, indicando uma distribuição mais homogênea dos resultados da análise da 25(OH)vitamina D sérica neste grupo.

Tabela 2 – Porcentagem de pacientes com deficiência de vitamina D

Grupo	N	Vit D < 20	Vit D 20-29	Vit D ≥30	Mediana	IQ.D
HCV	129	41,90%	35,60%	22,50%	23	13
HIV	118	59,30%	29,60%	11,10%	18	12
HIV/HCV	53	43,40%	30,20%	26,40%	22	15
Controle	122	73,80%	25,40%	0,80%	17	8,75

Descrevemos em porcentagens as características de risco para deficiência de vitamina D dos sujeitos de cada grupo do estudo, assim como os valores-p correspondentes às suas comparações para as variáveis sob investigação, e as apresentamos na Tabela 3.

Foi observado que os grupos eram bastante distintos entre si, em relação a características como sexo, idade, cor de pele, IMC, uso de antivirais e perfil metabólico. Portanto, não seria adequada a comparação da prevalência de DVD entre os grupos sem ajustar para fatores que podem influenciar os níveis séricos de vitamina D.

Tabela 3 - Características gerais da população dos três grupos de acordo com fatores de risco para deficiência de vitamina D

	Controle %(n)	HCV %(n)	HIV %(n)	HIV/HCV %(n)	valor p
Sexo Feminino	62,3(76)	60,5(78)	35,6(42)*	45,3(24)	< 0,001
Cor de pele Branca	54,9(67)	70,9(88)*	60(60)	49(25)Δ	0,017
Idade ≥ 50	36,7(44)	58,9(76)*	23,7(28)	20,7(11)Δ	< 0,001
IMC ≥ 25	59,8(73)	66,4(81)	39,4(39)*	41,7(20)Δ	< 0,001
Colesterol ≥ 200	46,3(56)	12,8(16)*	42,1(40)	21,1(11)*	< 0,001
HDL Alto §	77,7(94)	67,9(76)	49,5(46)*	60,8(28)	< 0,001
Glicemia ≥ 110	10(12)	15,9(19)	4,3(4) Δ	8,2(4)	0,044
Triglicérides ≥ 150	22,3(27)	10,3(12)*	42,5(40)*	42,9(21)*Δ	< 0,001

* É diferente do grupo-controle com valor de $p < 0.05$

Δ É diferente do grupo HCV com valor de $p < 0.05$

§ ≥ 40 em homens e ≥ 50 em mulheres

O grupo HIV/HCV teve uma maior frequência de indivíduos de pele não branca, uma maior frequência de indivíduos com menos de 50 anos e uma porcentagem mais baixa de indivíduos considerados em sobrepeso em comparação ao grupo HCV. O grupo-controle diferiu dos grupos HCV e HIV/HCV em comparação aos níveis séricos de triglicérides e colesterol total (mais indivíduos apresentando níveis acima de 150 mg/dL e 200 mg/dL, respectivamente). O grupo HCV também foi significativamente diferente do controle em relação à cor de pele, com mais indivíduos de pele branca no grupo HCV e mais indivíduos maiores que 50 anos. Em comparação ao controle, o grupo HIV era significativamente mais jovem, com menos indivíduos do sexo feminino e menos indivíduos com sobrepeso. Os indivíduos do grupo HIV também apresentavam HDL significativamente mais baixo que o controle.

Os quartis medianos, primeiro e terceiro para os níveis de vitamina D estão expostos na Tabela 4. Na mesma tabela, está indicada a mediana observada de índice HOMA nos três grupos e controle. Não houve diferenças entre os grupos HIV/HCV e HCV em relação à mediana dos níveis de vitamina D. O grupo-controle teve mediana de vitamina D significativamente menor que os dois grupos infectados por HCV ($p < 0.001$). O grupo HIV apresentou mediana de vitamina D significativamente menor que HCV, mas não diferente

de HIV/HCV ou controle. A mediana do índice HOMA-IR apresentou tendência a ser maior no grupo HCV do que no grupo-controle ($p=0.075$).

Tabela 4 - Mediana (primeiro e terceiro quartis) dos valores de vitamina D e de HOMA-IR

	Controle	HCV	HIV	HIV/HCV	valor p
VITAMINA D	17 (12,25 - 21)	23 (16 - 29)*	18 (13 - 25) Δ	22 (16 - 31)*	< 0,001
HOMA	1,73 (1,03 - 3,13)	2,54 (1,35 - 3,96)	1,74 (1,01 - 3,12)	2,27 (1,23 - 3,29)	0,075

*É diferente do grupo-controle com valor de $p < 0.05$

Δ É diferente do grupo HCV com valor de $p < 0.05$

Os resultados do modelo de regressão logística sugerem que a prevalência ajustada de DVD para os grupos de pacientes com HCV e coinfeção HIV/HCV é igual, porém diferentes da prevalência ajustada de DVD no grupo-controle ($p<0,001$).

As razões de chance para deficiência de vitamina D, considerando as variáveis significativas (ajustadas pelas não significativas), estão expostas na Tabela 5.

Ao tratar o índice HOMA-IR como uma variável contínua, observamos que, a cada incremento de um dígito, a razão de chance de apresentar deficiência de vitamina D aumenta significativamente [$p=0.038$ RC:1.21 (IC95% 1.01-1.44)].

O uso de efavirenz também esteve significativamente associado à DVD [$p=0.028$ RC:3.49 (IC95% 1.14-10.67)].

Também nesta regressão múltipla, pertencer ao grupo HCV apresentava razão de chance significativamente menor de DVD [$p<0.001$ RC: 0.26 (IC95% 0.12-0.57)].

Sexo feminino apresentou tendência à maior razão de chance para DVD [$p=0.07$ RC: 1,75 (IC 95% 0,95 - 3,21)].

E o uso de tenofovir apresentou tendência para uma menor razão de chance de DVD [$p=0.067$ RC: 0,36 (IC 95% 0,12 - 1,08)].

Tabela 5 - Fatores associados à deficiência de vitamina D em modelo de regressão múltipla na comparação entre os grupos

Variável	RC (IC 95%)	valor p
Sexo Feminino	1,75 (0,95 - 3,21)	0,07
Cor de Pele: Branca	1,32 (0,73 - 2,38)	0,356
Idade ≥ 50	1,62 (0,86 - 3,03)	0,133
IMC ≥ 25	1,02 (0,56 - 1,87)	0,946
Colesterol ≥ 200	1,21 (0,62 - 2,35)	0,575
Colesterol HDL Alto §	1,35 (0,69 - 2,63)	0,373
Triglicérides ≥ 150	1,99 (0,86 - 4,63)	0,113
Glicemia ≥ 110	0,66 (0,21 - 2,07)	0,478
Uso de Efavirenz	3,49 (1,14 - 10,67)	0,028
Uso de Tenofovir	0,36 (0,12 - 1,08)	0,067
Incremento de HOMA	1,21 (1,01 - 1,44)	0,038
Grupo HIV/HCV	0,57 (0,17 - 1,91)	0,358
Grupo HIV	0,59 (0,19 - 1,87)	0,366
Grupo HCV	0,26 (0,12 - 0,57)	0,001

§ HDL > 40 em homens e > 50 em mulheres.

Para realizar a análise estatística dos fatores de risco associados à deficiência de vitamina D dentro de cada grupo estudado, aplicamos modelos de regressão logística simples de acordo com os fatores de risco mais importantes para cada uma dessas populações.

Abaixo, seguem as tabelas referentes ao Grupo-controle (Tabela 6), Grupo HCV (Tabela 7), Grupo HIV (Tabela 8), Grupo Coinfecção HIV/HCV (Tabela 9).

No grupo-controle, houve uma associação significativa do sexo masculino com uma menor razão de chance para DVD [$p=0.04$ RC: 0,42 (IC 95% 0,18 – 0,96)]. Houve tendência à maior chance de DVD em indivíduos não brancos [$p=0.07$ RC: 2,2 (IC 95% 0,94 – 5,17)], e tendência à maior chance de DVD em indivíduos com IMC > 25 [$p=0.08$ RC: 2,05 (IC 95% 0,91 – 4,65)]. As outras variáveis analisadas (idade, colesterol, glicemia, triglicérides e HOMA-IR elevado) não foram significativas [Tabela 6].

Tabela 6 – Fatores de risco potencialmente associados com DVD no Grupo-controle

Fator de Risco	Razão de Chance	IC 95%	P valor
Sexo masculino	0,42	0,18 - 0,96	0,04
Cor não branca	2,2	0,94 – 5,17	0,07
Idade > 50	1,69	0,68 – 4,21	0,25
IMC > 25	2,05	0,91 – 4,65	0,08
Colesterol ≥ 200	1,63	0,71 – 3,73	0,25
Glicemia ≥ 110	0,97	0,24 – 3,89	0,96
Triglicérides ≥ 150	1,04	0,39 – 2,74	0,95
HOMA-IR elevado	2,2	0,46 – 10,51	0,32

No grupo HCV, houve associação significativa entre uma menor chance de DVD e o sexo masculino [p=0.02 RC: 0,42 (IC 95% 0,2 – 0,88)]. Houve associação significativa entre DVD e índice HOMA-IR elevado [p=0.02 RC: 5,59 (IC 95% 1,37 – 22,8)]. Houve uma tendência para maior chance de DVD em indivíduos não brancos [p=0.07 RC: 2,08 (IC 95% 0,95 – 4,57)]. Os outros fatores de risco pesquisados, tais como genótipo, presença de cirrose, presença de esteatose, idade, IMC, níveis séricos de colesterol, triglicérides e glicemia não apresentaram razão de chance significativa para DVD [Tabela 7].

Tabela 7 - Fatores de risco potencialmente associados com DVD no Grupo HCV

Fator de Risco	Razão de Chance	IC 95%	P valor
Sexo masculino	0,42	0,2 – 0,88	0,02
Cor não branca	2,08	0,95-4,57	0,07
Genótipo 3 vs. 1	0,52	0,18 – 1,46	0,21
Presença de cirrose	1,47	0,68 – 3,16	0,33
Presença de esteatose	1,24	0,43 – 3,63	0,69
Idade > 50	1,49	0,73 – 3,04	0,28
IMC > 25	1,41	0,66 – 3,02	0,37
Colesterol ≥ 200	1,9	0,66 – 5,48	0,24
Glicemia ≥ 110	1,99	0,72 – 5,46	0,18
Triglicérides ≥ 150	2,24	0,67 – 7,53	0,19
HOMA-IR elevado	5,59	1,37 – 22,8	0,02

No grupo HIV, os indivíduos que apresentaram nadir histórico de CD4 maior que 200 células/mm³ tiveram menos chance de DVD [$p=0.04$ RC: 0,41 (IC 95% 0,18 – 0,95)].

Houve tendência à menor chance de DVD também em indivíduos de cor não branca [$p=0.06$ RC: 0,45 (IC 95% 0,2 - 1,03)] e em indivíduos usando tenofovir [$p=0.06$ RC: 0,47 (IC 95% 0,22 - 1,03)].

E apresentaram tendência à maior chance de DVD os indivíduos com histórico de doença definidora de aids [$p=0.05$ RC: 2,16 (IC 95% 1 – 4,67)] e aqueles com valores elevados de triglicérides séricos [$p=0.07$ RC: 2,27 (IC 95% 0,95 – 5,46)]. Outras variáveis analisadas não resultaram significativas. (Tabela 8).

Tabela 8 - Fatores de risco potencialmente associados com DVD no Grupo HIV

Fator de risco	Razão de chance	IC95%	P valor
Sexo masculino	1,34	0,62- 2-88	0,45
Cor de pele não branca	0,45	0,2 – 1,03	0,06
Doença definidora de AIDS	2,16	1 – 4,67	0,05
Uso de efavirenz	1,03	0,47- 2,22	0,95
Uso de tenofovir	0,47	0,22 – 1,03	0,06
Idade	1,86	0,74 – 4,69	0,19
IMC > 25	1,14	0,5 – 2,61	0,75
Colesterol ≥ 200	1,34	0,57 – 3,1	0,5
Glicemia ≥ 110	2	0,2 - 20	0,55
Triglicérides ≥ 150	2,27	0,95 – 5,46	0,07
HOMA-IR elevado	0,59	0,11 – 3,29	0,55
Nadir de CD4 > 200	0,41	0,18 – 0,95	0,04

No grupo HCV/HIV, os indivíduos com IMC maior que 25 apresentaram menores chances de DVD [$p=0.01$ RC: 0,19 (IC 95% 0,05 – 0,71)].

Os indivíduos que usavam efavirenz apresentaram tendência à maior chance de DVD [$p=0.08$ RC: 2,88 (IC 95% 0,89 – 9,37)] (RC 2,88 IC 95% 0,89 – 9,37 $p = 0,08$), assim como os pacientes com HOMA-IR elevado também apresentaram tendência à maior chance de DVD [$p=0.05$ RC: 5,7 (IC 95%

0,97 – 33,6)]. As demais variáveis analisadas não apresentaram associação significativa com razão de chance para DVD, vide Tabela 9.

Tabela 9 - Fatores de risco potencialmente associados com DVD no grupo coinfeção HIV/HCV

Fator de Risco	Razão de Chance	IC 95%	P valor
Sexo masculino	0,61	0,2 – 1,83	0,38
Cor de pele não branca	1,52	0,5 – 4,68	0,46
Genótipo 3 vs. 1	1,78	0,25 – 12,44	0,56
Presença de cirrose	2,14	0,49 – 9,32	0,31
Presença de esteatose	1,67	0,24 – 11,58	0,60
Doença definidora de aids	1,17	0,37 – 3,64	0,79
Uso de efavirenz	2,88	0,89 – 9,37	0,08
Uso de tenofovir	0,92	0,3 – 2,78	0,88
Idade > 50	2,29	0,56 – 9,35	0,25
IMC > 25	0,19	0,05 – 0,71	0,01
Colesterol ≥ 200	0,43	0,1 – 1,87	0,26
Glicemia ≥ 110	1,5	0,19 – 11,6	0,7
Triglicérides ≥ 150	1,34	0,42 – 4,26	0,62
HOMA-IR elevado	5,7	0,97 – 33,6	0,054
Nadir de CD4 > 200	0,93	0,25 – 3,47	0,92

5 DISCUSSÃO

5.1 Achados descritivos e comparação entre os grupos

Dadas as disseminações pandêmicas da deficiência de vitamina D, do vírus da hepatite C, do vírus da imunodeficiência humana e da resistência à insulina, o peso de suas interações consiste em considerável agravo à saúde pública. Todos estes distúrbios, tanto isolados quanto em combinação, já foram demonstrados como fatores de risco aumentado para o desenvolvimento de comorbidades, como o diabetes do tipo 2.

Portanto, avaliar a prevalência da deficiência de vitamina D e abordar a sua possível associação com resistência à insulina e a outros fatores de risco em pacientes portadores do HCV e/ou HIV são, além de bastante relevantes, os principais objetivos deste estudo, também motivado pela falta de informação na literatura a respeito deste assunto, especialmente em populações portadoras de HCV vivendo em latitude tropical.

Apresentamos, aqui, dados com pacientes brasileiros, vivendo em uma grande área metropolitana, cujas amostras de sangue foram colhidas durante o período do inverno. Observamos uma alta prevalência de deficiência de vitamina D, tanto nos grupos do estudo quanto no grupo-controle. Não existem dados publicados reportando a deficiência de vitamina D em populações com HCV ou coinfeção HIV/HCV no Brasil. Este é o primeiro estudo a reportar tais dados.

Um dos objetivos principais do estudo era entender se a infecção por um dos vírus, ou pelos dois em coinfeção, seria um fator de risco para o desenvolvimento de deficiência de vitamina D.

Surpreendentemente, a análise descritiva revelou porcentagem de pacientes com deficiência de vitamina D ($<20\text{ng/mL}$) mais alta no grupo-controle (73,8%) do que nos grupos com HIV, HIV/HCV e HCV (59,3%, 43,4%

e 41,9% respectivamente), com mediana dos níveis séricos de vitamina D também mais baixa no grupo-controle.

No entanto, por se tratar de um estudo observacional, com grupos não pareados *a priori* para uma série de características demográficas, antropométricas e metabólicas que poderiam influenciar os níveis séricos de vitamina D, não seria adequado comparar a prevalência de DVD entre os grupos sem ajustar estas variáveis por regressão logística múltipla.

As características entre os grupos são tão distintas, que é possível formar uma imagem geral de cada um deles. O grupo HCV tinha mais indivíduos com cor de pele branca, do sexo feminino, com sobrepeso e era o mais idoso dos grupos. O controle assemelhava-se ao HCV apresentando a maioria dos indivíduos com cor de pele branca, sexo feminino e com sobrepeso. Ambos diferiam dos grupos HIV e HIV/HCV, que apresentavam mais indivíduos masculinos, com IMC mais baixo e no caso do HIV/HCV, de maioria não branca. Em parte, esta diferença entre os grupos pode ser explicada pelas características epidemiológicas das pandemias de HCV e HIV no Brasil^{96,97}.

Mesmo ajustando a análise estatística com um modelo de regressão logística múltipla, o grupo-controle apresentou deficiência de vitamina D semelhante ao grupo HIV, e significativamente maior que o grupo HCV e HIV/HCV.

A hipótese inicial, baseada nos resultados de outros estudos populacionais, inclusive alguns que orientaram nosso cálculo amostral^{84,86}, era que a prevalência de DVD fosse semelhante entre população portadora de HCV e população geral.

Em relação a esta alta prevalência de DVD encontrada em nosso grupo-controle, estudos realizados no Brasil demonstraram uma ampla variação de resultados, dependendo das características demográficas e de estilo de vida das populações estudadas, bem como, da sazonalidade de coleta das amostras^{80,81,98}. Ao revisar alguns destes estudos que utilizaram ponto de corte < 20 ng/mL para definição de deficiência, a máxima frequência descrita

de DVD foi de 71% em pacientes idosos institucionalizados⁹⁸ e a menor foi de 19% em pacientes idosos com atividade física ao ar livre⁷⁹.

Importante ressalva em relação ao grupo-controle do nosso estudo, é não considera-lo representativo da população geral, pois foi predominantemente formado por mulheres (62%), em grande parte trabalhadoras da saúde e com 60% dos indivíduos apresentando IMC > 25.

Os nossos critérios principais para formar o grupo-controle foram excluir pessoas portadoras de HIV, HCV e/ou HBV, ou em uso de suplementos de vitamina D, ou com doenças crônicas, ou em uso de medicações que pudessem influenciar o metabolismo de vitamina D.

Talvez esta maior prevalência de DVD no grupo-controle esteja associada a fatores de risco não controlados neste estudo, tais como o estilo de vida, com um inventário das horas de exposição solar, ou mesmo o estudo dos polimorfismos genéticos associados ao metabolismo de vitamina D. De qualquer forma, podemos entender, com base nestes resultados, que a presença da infecção por HIV e/ou HCV, por si só, não representou risco maior de DVD.

Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo com mais de seiscentos indivíduos portadores de HIV nos EUA, que comparou os níveis séricos de vitamina D destes pacientes a uma coorte de população geral (NHANES). Este estudo também mostrou prevalências altas de DVD em ambos os grupos, mas significativamente maior na população geral⁹⁹. A população do estudo NHANES era representativa da população civil, não institucionalizada dos EUA¹⁰⁰.

Este dado corrobora com a ideia de que ser portador do vírus HIV não indica maior prevalência de DVD que a população geral. E que tanto a população geral quanto as pessoas infectadas por HIV e/ou HCV podem apresentar outros fatores de risco específicos associados à DVD.

A escolha de um modelo de regressão logística múltipla serviu para, além de comparar a prevalência de DVD entre os grupos, buscar, dentre as variáveis analisadas, algumas características demográficas, metabólicas e farmacológicas possivelmente associadas à maior chance de apresentar

deficiência de vitamina D.

Neste modelo, controlando por todas as variáveis acima citadas, as características significativamente associadas com chances de deficiência de vitamina D foram o uso de efavirenz e aumento do índice HOMA-IR, com prevalência 21% maior a cada incremento de 1 dígito do HOMA-IR. O sexo feminino apresentou razão de chance aumentada para DVD, embora apenas como uma tendência estatística.

O uso de tenofovir apresentou tendência à menor chance de DVD. Outras características associadas à deficiência de vitamina D, como idade e índice de massa corporal, não resultaram significativas neste estudo.

5.2 Antirretrovirais e deficiência de vitamina D

Com relação ao uso de efavirenz e sua associação com maior chance de DVD aqui encontrada, já se sabe que esta droga afeta o metabolismo da vitamina D por induzir a enzima 24-hidroxilase, que hidrolisa a forma ativa de vitamina D em sua forma inativa (ácido calcitroico). O seu uso tem sido consistentemente associado a DVD¹⁰¹.

Em um estudo de coorte prospectivo, realizado em cinco centros na França¹⁰², a insuficiência de vitamina D foi observada em 86.7% dos 2994 pacientes com HIV. Na população em uso de TARV (n=2660), efavirenz foi a única droga significativamente associada com deficiência.

Em outro estudo, uma análise retrospectiva de 2044 pacientes portadores de HIV¹⁰³, a vitamina D resultou <30 ng/ml em 89.2% e <10 ng/ml em 32.4%. Os valores medianos foram 13.8 ng/ml. A contagem de CD4 <200/ml, estágios avançados de doença e uso de efavirenz foram independentemente associados com deficiência severa de vitamina D (<10 ng/ml).

Em um estudo tailandês publicado recentemente¹⁰⁴, incluindo 673 adultos portadores de HIV vivendo em região de latitude tropical, foi reportada prevalência de insuficiência e deficiência de vitamina D de 40.6% e 29.9%,

respectivamente. Em análise multivariada, gênero feminino, idade maior que 37 anos e uso de efavirenz, foram independentemente associados à hipovitaminose D. De forma semelhante ao nosso, este estudo ressalta que, mesmo em regiões tropicais, com luz solar abundante, a hipovitaminose D é altamente prevalente e o efavirenz se destaca como potencial fator de risco nesta população.

Em pacientes que iniciaram TARV contendo efavirenz¹⁰⁵, a vitamina D foi dosada imediatamente antes do início e nas semanas 4, 16 e 48 após o início da TARV. As prevalências observadas foram 27% antes da TARV, aumentando para 76%, 79%, e 43% nas semanas 4, 16, 48, respectivamente.

O uso de efavirenz também está associado com alteração na densidade mineral óssea, como demonstra um estudo envolvendo 444 pacientes¹⁰⁶.

Por outro lado, um estudo realizado no Brasil¹⁰⁷ demonstrou que a suplementação de vitamina D3 foi efetiva em repletar níveis de 25(OH)D. Além disto, o uso de efavirenz esteve positivamente associado com níveis adequados de 25(OH)D pós-repleção.

As evidências da associação de efavirenz com hipovitaminose D são robustas na grande maioria dos estudos realizados. Neste sentido, ao demonstrar a alta prevalência da DVD em nosso meio e sua associação com uso de efavirenz, nosso estudo corrobora com os achados de literatura e contribui para ressaltar os riscos associados ao seu uso.

Cabe ressaltar que o efavirenz faz parte da primeira linha de tratamento definida pelo protocolo brasileiro de diretrizes clínicas e terapêuticas para manejo do HIV, sendo oferecido para a maioria dos pacientes vivendo com HIV/aids no Brasil⁹⁶.

Por ser a repleção de vitamina D eficiente em pessoas utilizando efavirenz, é recomendável dosar os níveis séricos e suplementar esses pacientes, se necessário, a fim de prevenir a osteoporose.

Já o uso de tenofovir apresentou tendência à associação inversa com chance de DVD em nosso estudo. Isto parece paradoxal, pois o tenofovir disoproxil fumarato (TDF) tem sido associado a alterações ósseas em HIV⁶⁵. No entanto, a associação da exposição ao TDF com níveis mais altos de

25(OH)D é biologicamente explicável, porque o TDF causa dano tubular proximal, induzindo disfunção renal. E, tendo em vista que a conversão de 25(OH)D para 1,25(OH)₂D ocorre no túbulo proximal por intermédio da enzima 1- α hidroxilase, esta etapa de hidroxilação pode ser afetada, causando acúmulo de 25(OH)D e mascarando níveis baixos de 1,25(OH)₂D¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

A hiperfosfatúria, secundária à disfunção tubular, pode alterar a interação entre rim, osso e hormônios regulatórios do metabolismo cálcico (PTH e calcitriol), levando a uma progressiva perda óssea, em maneira similar que a osteomalácia observada na síndrome de Fanconi, mas menos intensa¹¹¹. Esta osteomalácia secundária ao metabolismo de fosfato alterado explica a melhora parcial observada com a suplementação de vitamina D, a associação com a fostatase alcalina alterada e os benefícios em termos de densidade mineral óssea após a descontinuação do TDF.

A relação entre uso de TDF e níveis séricos de vitamina D permanece controversa. Um estudo publicado em 2010⁸³ observou níveis significativamente altos de 1,25(OH)₂D com uso de TDF, mas nenhuma associação com níveis de 25(OH)D.

Em compensação, em um estudo longitudinal incluindo 160 indivíduos portadores de HIV¹¹², o uso de TDF (*versus* não uso de TDF) esteve associado a uma baixa densidade mineral óssea da bacia. Essa diferença foi ainda mais acentuada nos pacientes sem deficiência de vitamina D (≥ 20 ng/mL). Em pacientes apresentando deficiência de vitamina D (< 20 ng/mL), a baixa densidade mineral óssea esteve presente em todos os participantes, com ou sem uso de TDF. Este estudo sugere que, em pacientes usando TDF, a lesão óssea pode acontecer mesmo com níveis normais de 25(OH)D.

Nosso estudo demonstrou tendência à associação inversa entre uso de TDF e deficiência de vitamina D. Ou seja, pacientes usando tenofovir teriam menos chance de apresentar níveis baixos de 25(OH)D. No entanto, a associação entre uso de TDF, níveis séricos de vitamina D e alterações do metabolismo ósseo permanecem controversas. Desta forma, ainda se faz necessário realizar estudos longitudinais a partir da introdução do tenofovir, avaliando a densidade mineral óssea, dosando em conjunto o PTH, a

1,25(OH)D, além da 25(OH)D e outros marcadores de metabolismo ósseo, para avaliar a associação entre DVD, uso de tenofovir e elucidar os mecanismos que contribuem para as alterações ósseas no paciente em uso de TARV.

5.3 Resistência à insulina e DVD

A associação significativa da prevalência de DVD, observada em todos os grupos, com o aumento do índice HOMA-IR, sugere que a resistência à insulina está associada à deficiência de vitamina D. Isto já foi descrito em outras populações, incluindo portadores de HIV^{113,114}, mas este é o primeiro estudo a demonstrar esta mesma associação entre DVD e resistência à insulina numa população portadora de HCV ou coinfeção HIV/HCV.

O índice HOMA-IR é aplicado para aferição do grau de resistência à insulina na prática clínica. O cálculo do HOMA-IR, do Inglês, *homeostatic model assessment*, é feito com base nas dosagens de insulina e glicose de jejum. Esse índice apresenta boa correlação com os exames considerados padrão-ouro para tal finalidade, como o *clamp* hiperinsulinêmico⁹⁴. Notamos que a mediana dos valores de índice HOMA-IR tendeu a ser maior nos grupos portadores de HCV do que nos grupos HIV e controle.

Analisamos a associação de deficiência de vitamina D com o índice HOMA-IR via modelos de regressão logística múltipla, ajustando por grau de fibrose nos grupos HCV e coinfeção HIV/HCV, para identificar se DVD e RI poderiam estar associadas apenas com a infecção pelo vírus da hepatite C e não com o grau de fibrose, pois a associação entre DVD ou RI com estados clínicos relacionados à cirrose avançada, em pacientes com hepatite C, já foi demonstrada⁴⁹. Portanto, excluímos pacientes com doença hepática avançada (Child-Pugh B or C) da nossa amostragem e estratificamos a fibrose em F0-2 e F3-F4. Esta análise resultou não significativa para a associação entre DVD e RI ajustada por grau de fibrose.

Portanto, a tendência encontrada entre DVD e RI nos grupos com hepatite C não parece estar associada ao grau de fibrose hepática, mas indica que talvez haja algum mecanismo de interação entre a DVD e o metabolismo glicêmico.

Já se sabe que a infecção pelo HCV é um fator preditivo de diabetes mellitus. O HCV induz vários mecanismos intracelulares complexos que levam à inflamação, resistência à insulina, à esteatose, à fibrose, à apoptose, à expressão gênica alterada e ao carcinoma hepatocelular. O aumento do estresse oxidativo parece ser o fator desencadeante da patogênese da resistência à insulina na presença do HCV. Atualmente, o HCV é considerado como um fator causal de síndrome metabólica, em vez de ser identificado apenas como infecção viral.¹¹⁵.

Mais recentemente, Bugianesi e colaboradores revisaram vários estudos que descrevem mecanismos de associação entre o HCV e resistência à insulina¹¹⁶, confirmando que infecção pelo HCV por si só pode causar um desequilíbrio na homeostase da glicose por meio de diversos mecanismos diretos e indiretos, como inflamação crônica, levando à resistência à insulina, tanto hepática quanto extra-hepática.

Além disto, um dos fatores ambientais possivelmente envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina é a deficiência de vitamina D^{12-14, 117,118}. Van Belle e colaboradores¹¹⁹ discutiram os mecanismos moleculares pelos quais a vitamina D poderia influenciar o metabolismo da glicose, enfatizando o papel na inflamação crônica de baixo grau, com diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos ativados¹²⁰.

Portanto, podemos formular a hipótese de que a DVD se soma ao desequilíbrio do metabolismo hepático da glicose, induzido pelo vírus da hepatite C, para aumentar a intensidade da inflamação e agravar a resistência insulínica.

Um estudo recente comparou o nível sérico de vitamina D e incidência de DM2 em duas populações gerais nos EUA, com mais de 4000 indivíduos cada uma, a coorte NHANES e uma coorte recebendo suplementação de vitamina D, a GrassrootsHealth (GRH)¹²¹.

A mediana de concentração de 25(OH)D foi significativamente maior na coorte GRH (41ng/ml), suplementada com vitamina D. Enquanto na coorte NHANES, não suplementada, foi de 22 ng/ml. A incidência anual da taxa de incidência de DM2 foi 3 vezes maior na coorte não suplementada do que na suplementada, indicando que a deficiência de vitamina D está associada a uma maior incidência de diabetes, assim como sua suplementação pode prevenir esta incidência.

Se, por um lado, a suplementação de vitamina D para diminuir a incidência de diabetes do tipo 2 ainda permanece em debate ⁽¹²²⁾, por outro, já existem evidências suficientes do caráter pandêmico da DVD e seu papel no desenvolvimento do diabetes do tipo 2.

O nosso estudo demonstrou, em uma população brasileira, a associação de resistência à insulina com deficiência de vitamina D, ajustada para todas as variáveis supracitadas, incluindo ser portador ou não de HIV e/ou HCV.

A partir destes achados, pode ser interessante incluir na rotina de acompanhamento às pessoas com HCV e/ou HIV, a pesquisa de resistência à insulina e deficiência de vitamina D.

Em caso desta pesquisa resultar positiva, sugere-se suplementação adequada de vitamina D, acompanhada de orientações no estilo de vida, estimulando os pacientes à prática de exercícios físicos ao ar livre, com o objetivo de exposição moderada à luz solar, perda de peso e redução da resistência à insulina. A luz do sol é elemento essencial para todas as formas de vida na Terra. Seu papel biológico em seres humanos, notadamente o metabolismo do cálcio, proporcionou a formação do esqueleto na escala evolutiva (1). E por se tratar de uma medida simples, que não envolve custos, cabe ao profissional de saúde orientar os pacientes sobre uma adequada exposição à luz do sol.

5.4 Análises dos fatores de risco para DVD nos grupos

Para analisar fatores de risco potenciais associados a DVD dentro de cada grupo, preferimos utilizar modelos de regressão logística simples, pois o número de indivíduos em cada grupo, incluindo tantas variáveis avaliadas em cada uma dessas populações, não comportaria uma análise por regressão logística múltipla.

Para a análise intragrupos, o índice HOMA-IR foi tratado como uma variável categórica, escolhendo o valor de corte maior que 5 para definição de HOMA-IR elevado porque entende-se que, a partir deste valor, todos os pacientes, independente do percentil de IMC, apresentam resistência à insulina¹²³.

A associação significativa entre o sexo masculino e DVD, encontrada no grupo-controle, não tem sido consistentemente demonstrada em estudos de população geral. No entanto, as mulheres, em especial as mulheres pós-menopausa, têm maior risco de desenvolver osteoporose. Esta tendência encontrada pode refletir características não pesquisadas neste estudo, como possíveis diferenças entre os hábitos de exposição solar entre homens e mulheres.

Ainda no grupo-controle, as tendências encontradas para maior chance de DVD em indivíduos com cor de pele não branca e IMC compatível com sobrepeso estão alinhadas com as associações já descritas em literatura para a população geral.

No grupo HCV, a associação significativa entre menor chance de DVD e sexo masculino foi semelhante à encontrada no grupo-controle. Embora não seja relatada de forma frequente na literatura, isso pode refletir hábitos diferentes em relação à exposição solar entre homens e mulheres.

No presente estudo, está sendo relatada pela primeira vez a associação entre maior chance de DVD e índice HOMA-IR elevado em pacientes com hepatite C. Esta associação é, possivelmente, o principal achado deste estudo. Havendo-se excluído da amostra os pacientes com hepatopatia avançada, entendemos que a associação não seja ocasionada por

insuficiência hepática, enfatizando a associação do vírus com fatores ambientais modificáveis (DVD) na indução de resistência à insulina.

Os outros fatores de risco pesquisados, tais como genótipo, presença de cirrose, presença de esteatose, idade, IMC, níveis séricos de colesterol, triglicérides e glicose não apresentaram razão de chance significativa para DVD.

No entanto, mesmo que todos os pacientes analisados tivessem o registro sobre a presença ou não de cirrose, as biópsias não foram realizadas ao mesmo tempo que a coleta de sangue, além de terem sido analisadas por patologistas diferentes, o que não permite uma acurácia deste dado. O dado esteatose foi encontrado em menos da metade dos prontuários dos pacientes com hepatite C, não sendo possível, portanto, uma conclusão definitiva sobre a associação de DVD e esteatose. Talvez essas associações pudessem ser demonstradas aumentando o número amostral da população estudada e avaliando os graus de fibrose e esteatose por métodos não invasivos, realizados em concomitância com a coleta de vitamina D sérica e dos outros dados laboratoriais.

Aqueles indivíduos do grupo HIV que, em algum momento do seu histórico clínico, apresentaram grau de imunossupressão compatível com o diagnóstico de aids, tiveram maior chance de apresentar deficiência de vitamina D. Embora nem todos os estudos que tenham avaliado o nadir de CD4 tenham conseguido demonstrar esta associação, este é um achado que já foi relatado antes¹⁰³.

E, no mesmo sentido do encontrado na análise geral, os indivíduos em uso de tenofovir apresentaram, no grupo HIV, uma tendência à menor chance de DVD. Tal achado na análise intragrupo reforça a mesma associação inversa encontrada nos relatos de literatura discutidos acima. Reforça, também, a necessidade de investigar a ocorrência de lesão óssea em vigência de níveis séricos normais de vitamina D nos pacientes que usam tenofovir.

Ainda no grupo HIV, os indivíduos com histórico de doença definidora de aids demonstraram tendência à maior chance de DVD. Este é um dado já descrito em literatura¹⁰³, e, da mesma maneira que o nadir de contagem de

células CD4 contribui com a ideia de que, quando os pacientes atingem graus avançados de imunossupressão, podem apresentar maior prevalência de DVD. Desta forma, é possível correlacionar esta deficiência com a gravidade de doença por um mecanismo ainda não elucidado. Um importante estudo de coorte⁸⁵ demonstrou que pacientes com menor nível sérico de 25(OH)D apresentam maior risco de morrer em um intervalo de cinco anos.

Seria interessante desenhar um estudo para esclarecer por que pessoas com nadir de CD4 menor que 200 células têm níveis mais baixos de vitamina D, mesmo após a reconstituição imunológica.

Para o grupo HIV/HCV, ajustaram-se como fatores de risco todas as variáveis avaliadas no estudo. Contudo, apenas os indivíduos com IMC maior que 25 apresentaram menores chances de DVD. Este achado contraria a lógica de que pacientes com sobrepeso têm mais chances de DVD. No entanto, o paciente com HIV pode apresentar significativas alterações metabólicas, tais como a dislipidemia, ocorrendo mesmo com o IMC baixo. Precisaríamos de uma amostra maior para ajustar o IMC a outras variáveis em regressão múltipla e, desta maneira, discernir se a associação se deve a outras causas que não o IMC.

Os indivíduos que usavam efavirenz apresentaram tendência à maior chance de DVD, dado que corrobora o encontrado na análise geral do estudo e, também, diversos relatos de literatura já publicados¹⁰²⁻¹⁰⁴. No grupo coinfeção HIV/HCV, assim como no grupo HCV e na análise geral da população do estudo, houve tendência de maior chance de DVD nos pacientes com HOMA-IR elevado. Portanto, nos coinfectados, também é possível que os mecanismos de associação entre DVD e resistência à insulina sejam os mesmos que nos monoinfectados por HCV.

Talvez o número reduzido de indivíduos neste grupo HIV/HCV tenha prejudicado a análise das variáveis investigadas. Portanto, os dados no grupo HIV/HCV devem ser analisados com cautela, devendo-se aumentar o número da amostra para confirmar os resultados.

5.5 Limitações do estudo

Este estudo transversal, observacional, descreve a associação entre DVD e resistência insulínica, e DVD e uso de efavirenz. No entanto, não foi desenhado para demonstrar os mecanismos pelos quais a vitamina D influencia no metabolismo da glicose, nem no metabolismo ósseo.

Procurou-se ajustar as principais variáveis que poderiam influenciar os níveis séricos de vitamina D já descritos para a população não institucionalizada, vivendo na região metropolitana de São Paulo, tais como cor de pele, sexo, idade, índice de massa corporal, sendo as amostras de sangue obtidas apenas nos meses do inverno, para evitar a variação sazonal dos níveis séricos de vitamina D^{80,81,87}. No entanto, não controlamos para atividade física, hábitos de exposição solar e dieta, entendendo que, sendo as amostras colhidas apenas no inverno e sem um grupo de intervenção para atividade física, estas características seriam homogêneas para a população do estudo. Além disto, alimentos ricos em vitamina D (tais como cogumelos, salmão e alimentos fortificados) não fazem parte da dieta padrão dos brasileiros e, portanto, não aplicamos um questionário para avaliação de dieta. Além das características demográficas, geográficas e clínicas citadas acima, para as quais procuramos ajustar nossa análise, os polimorfismos no gene da CYP27B1, que codifica a 1 α -hidroxilase, já mostraram forte correlação com variações nas concentrações da 25(OH)D. Certos polimorfismos podem ser mais eficientes na ligação, ativação e metabolismo da vitamina D, e, então, interferir em seus níveis circulantes. Polimorfismos genéticos são grandes contribuintes na heterogeneidade das manifestações clínicas da hipovitaminose D, especialmente entre os grupos raciais^{124,125}. No entanto, este estudo não contemplou a análise de polimorfismos e não classificou a etnia dos indivíduos, pois a população brasileira é altamente miscigenada. Preferimos utilizar a classificação de fototipo cutâneo (escala de Fitzpatrick), porque se trata de uma classificação objetiva para um dado importante em relação ao metabolismo de vitamina D, que é a cor de pele e sua reação à exposição solar.

Contudo, mesmo com as limitações do estudo, podemos afirmar que ser infectado por HCV e/ou HIV não aumenta a chance de prevalência de DVD.

5.6 Conclusões

Este estudo confirma numa população brasileira o mesmo caráter pandêmico da DVD, ressaltando que ser portador de infecção por HIV e/ou HCV não indica que o indivíduo tenha mais chances de apresentar DVD.

Nesta população, os fatores de risco que estiveram positivamente associados à deficiência de vitamina D foram a presença de resistência à insulina e o uso de efavirenz.

Portanto, existe a necessidade de diagnosticar e tratar a deficiência de vitamina D, especialmente em indivíduos com resistência à insulina, independentemente de serem portadores de HIV e/ou HCV, por apresentarem maior risco de desenvolver diabetes.

Os pacientes em uso de efavirenz merecem especial atenção em relação à DVD, pelo risco de alterações ósseas. No entanto, com relação ao uso do tenofovir, mais estudos são necessários para avaliar a possibilidade de pacientes manterem níveis séricos normais de 25(OH)D e, mesmo assim, evoluírem com alterações na densidade mineral óssea.

5.7 Estudo futuros

Este estudo aponta algumas direções em termos de linha de pesquisa.

Uma delas é estudar as interações medicamentosas, função renal e desmineralização óssea no paciente com HIV, realizando estudos prospectivos.

Outra linha de pesquisa é estudar a suplementação de vitamina D em população com HIV e/ou HCV, e incidência de comorbidades, tais como osteoporose e DM2.

Uma linha mais elaborada de pesquisa seria estudar a associação da deficiência de vitamina D com marcadores inflamatórios, polimorfismos genéticos do metabolismo de vitamina D, evolução de doença e comorbidades (resistência à insulina e osteoporose) em pacientes com HIV e/ou HCV, bem como comparar grupos suplementados *versus* não suplementados.

Seria interessante revelar porque pessoas com nadir de CD4 menor que 200 células têm níveis mais baixos de vitamina D, mesmo após a reconstituição imunológica. E procurar responder à questão sobre a extensão da associação da vitamina D com o sistema imunológico, em especial, nos pacientes infectados pelo HIV.

6 ANEXOS

6.1 Anexo A - Avaliação de deficiência de Vitamina D em pacientes co-infetados HIV/VHC e monoinfetados para HCV e HIV

1-Nome do Centro

1-IIER-HCV() 2-IIER-HIV() 3-AMCA() 4-GASTRO() 5- CRT-a ()

Identificação e Dados Demográficos:

2-Número Id. Na pesquisa: _____

3-Registro: _____

4-Nome : _____

Etiqueta

5-Idade: _____ anos 6-Gênero: 1()M 2()F

7-Cor de Pele, classificação Fitzpatrick: 1() fototipo 1,2 ou 3 2() fototipos 4, 5 ou 6

Índices Antropométricos:

8-Peso : _____ Kg 9--Estatura: _____ cm 10-Índice de Massa corporal:

11- O paciente toma algum **suplemento de vitamina D?** 0 ()Não 1 ()Sim

12-Colesterol total:

13-Fração HDL:

14-Fração LDL:

15-Glicemia de Jejum:

16-Triglicérides:

17-Insulina:

18- HOMA-IR:

19- PTH(OPCIONAL):

20- 25(OH)Vitamina D:

21- Data dos exames: / /

22-GRUPO DO PACIENTE:

1 () HCV MONOINFECÇÃO 2() HIV MONOINFECÇÃO 3 () HIV-HCV COINFECÇÃO

DADOS DOS PACIENTES COM HIV:

23-Menor CD4 histórico:

24-CD4 Atual:

25- %

26-HIV-RNA atual:

27-Já teve doença definidora de **AIDS**: 0 ()Não 1 ()Sim

28- CDC: 1() A 2() B 3() C 4() 1 5() 2 6() 3 **29- Uso de ARV:** 0() Não 1() Sim

30-Tempo de uso de TARV: (em meses) **31-Tempo de uso do esquema atual** (meses):

Esquema TARV atual:

32-ITRAN:

1() AZT 2() 3TC 3() ddI 4() TDF 5() ABC 6() d4T 7() FTC

33-ITRNN: 8() EFV 9() NVP 10() ETR

34-IP:

10() SQV 11() RVR 12() IDV 13() ATV 14() ATV+R 15() LOP+R 16() FOS 17() DAR

35-Inib CCR5: 18() Maraviroc **36-Inib. Fusão:** 19() T20 **37-Inib: Integrase:** 20() Raltegravir

DADOS DO PACIENTES COM HCV :

38-Genótipo:

39-Imunofenótipo IL28 (OPCIONAL): 1() CC 2() CT 3() TT

40-O paciente é cirrótico? 0() Não 1() Sim **41- Varizes de Esôfago?** 0() Não 1() Sim

42-Hipertensão porta ao USG? 0() Não 1() Sim

43-Caso cirrótico, classificação de Child_Pugh:

1() A 2() B 3() C

44-Já foi submetido a Tratamento com Peg IFN + RBV? 0() Não 1() Sim

45-HCV-RNA Valor_____ Unidade_____ Log:_____ PCR() Nasba() **46-**
Data____/____/____

47-ALT recente _____ valor de ref _____ **48-Bilirrubina Total** _____

49-Albumina _____ **50-INR** _____ **51 - Data:** ____/____/____

52-Tem biópsia hepática 0() não 1() sim:

53- Data da mais recente ____/____/____ **Nº da Biópsia** _____

Metavir : 54-Fibrose: F () 55-Atividade : A ()
56-Tem Esteatose: 1()Não 2()Sim Descrever graduação: _____”
57- Tem Siderose: Sim () Não () Descrever graduação “ _____”

6.2 Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido IIER INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DE SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP
CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406 – comitedeetica-iiier@ig.com.br

Anexo B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Número do Protocolo:

Título: Prevalência de hipovitaminose D entre pacientes coinfectados HIV/HCV, comparada a pacientes mono infectados para HCV e mono infectados por HIV em centros de referência para tratamento de hepatites e aids na cidade de São Paulo/Brasil

Nome da Instituição: INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS

Endereço: AV. DR. ARNALDO, 165

Nome do Paciente: (Primeiro nome) (Sobrenome)

Paciente Hospitalar / Clínico

Número de Identificação:

Endereço:

Telefone: ()

A você que está fazendo tratamento para hepatite C ou HIV, é importante saber que dados científicos publicados recentemente correlacionam a falta de vitamina D com progressão mais rápida da hepatite C e com má resposta ao tratamento. E nas pessoas com HIV, há uma possível correlação de baixa vitamina D com uso de antivirais e problemas cardiovasculares. A vitamina D é muito importante também para regular o estoque de cálcio no organismo, ajudando a fixar cálcio nos ossos.

Agora você está sendo convidado a participar desta pesquisa, que avalia os níveis de vitamina D (25(OH)vitamina D) no sangue.

Esta pesquisa está sendo conduzida pelo Dr. MARIO GONZALEZ, no Hospital EMÍLIO RIBAS. E ele irá explicar a você porque esta pesquisa é importante e como você poderá participar dela.

Esta é uma pesquisa de cunho científico, sem patrocínio, para avaliar a presença da baixa vitamina D no soro dos pacientes com HIV e/ou Hepatite C acompanhados neste hospital. Além de saber qual é a proporção de pacientes que tem vitamina D baixa, queremos também correlacionar com possíveis fatores, como etnia, peso, colesterol alto, uso de remédios, histórico de doenças e presença ou não de cirrose. Antes de decidir se você quer participar, é importante que você leia e entenda este Termo. Depois que todas suas dúvidas forem

esclarecidas com o médico que conversar com você sobre este estudo, e você decidir participar, você deverá assinar este documento, que é um termo de consentimento, mas só para esta pesquisa.

Se você decidir não participar, o tratamento que você está recebendo ou receberá no futuro não será alterado de qualquer forma.

Caso você aceite, você será um entre aproximadamente 450 pacientes portadores de HIV e /ou HCV que terão a vitamina D dosada no sangue para avaliação.

Informações sobre sua participação

Este é um estudo de prevalência, com revisão de prontuários. Caso você decida participar deste estudo você será considerado sujeito de pesquisa, que é como são chamados os participantes de uma pesquisa clínica, e dessa forma você estará autorizando que seja coletada uma amostra de sangue para análise de vitamina D e dados do seu prontuário relevantes para a pesquisa sejam coletados numa ficha pelo seu médico e armazenados em um banco de dados no computador, para posterior avaliação estatística.

Objetivo da pesquisa

Como já explicado anteriormente, a finalidade desta pesquisa é avaliar a porcentagem de pacientes com vitamina D baixa no sangue em pessoas com hepatite C e/ou HIV, em diferentes ambulatorios que tratam hepatites e aids na Cidade de São Paulo. Queremos entender também se a falta de vitamina D está associada à idade, etnia, gênero, obesidade, colesterol alto, estágio da doença (aids e /ou hepatite) e se incide mais severamente em pessoas que tem as duas infecções(HIV e HCV).

Descrição do estudo

Esta pesquisa foi aprovada pelo **Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas**, que é uma comissão formada por diversos profissionais e representantes da comunidade que analisaram a ética do estudo (se é confiável) e segurança.

Esta pesquisa não afeta o tratamento que o seu médico indicou para você, pois vai apenas observar os níveis atuais de vitamina D no seu sangue.

Os resultados de todos os exames que você normalmente faz no seu acompanhamento serão utilizados para esta pesquisa.

Riscos e desconfortos

A coleta de amostra de sangue para vitamina D será realizada junto com a coleta dos seus exames de rotina. Não há riscos em participar desta pesquisa, pois se trata apenas de coleta de amostra de sangue e dados do seu prontuário.

Benefícios

As informações obtidas desta pesquisa podem ajudar os médicos a tratar melhor a hepatite crônica C e HIV no futuro, sugerindo a suplementação de vitamina D.

Participação do paciente.

Você é livre para decidir pela participação ou não neste estudo a qualquer momento. Caso você não concorde em participar deste estudo ou decidir se retirar do estudo a qualquer momento, ou se sua participação for interrompida por qualquer razão, não haverá nenhum tipo de penalidade aos cuidados médicos ou aos outros tratamentos; você não perderá qualquer benefício a que tenha direito.

Os motivos de sua saída da pesquisa serão documentados, caso você permita.

Compromisso de confidencialidade

Seus dados, durante sua participação neste estudo, serão mantidos confidencialmente, ou seja, seu nome nunca será usado em nenhum relatório deste estudo. Durante o estudo você será identificado apenas pelas suas iniciais e por um número.

O médico do estudo solicita sua autorização para que seus registros médicos, relativos ao estudo, possam ser consultados pela equipe de pesquisa e se necessário por agências de saúde, como a ANVISA. Isto é importante para se ter certeza que tudo está sendo feito de acordo com o protocolo do estudo e para que a boa qualidade dos resultados desta pesquisa seja assegurada.

O médico do estudo e sua equipe garantem o cumprimento da legislação brasileira sobre a confidencialidade de seus dados.

Obtenção de Informação Adicional

Você poderá fazer perguntas a respeito do estudo.

Se você tiver mais perguntas a fazer sobre o estudo ou sobre seus direitos como paciente, chame o Dr. MARIO GONZALEZ no **telefone (11) 38961311**.

Endereço : Av. Dr. Arnaldo, 165. Hospital-Dia

Email: mpgonzalez@terra.com.br

Se você tiver perguntas a fazer sobre seus direitos como paciente nesse estudo, você também poderá entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa no telefone (11) 38961406 ou no endereço Av. Dr. Arnaldo, 165. Secretaria do CEP.

ATENÇÃO, ASSINATURAS NO VERSO**ASSINATURAS**

Eu li as informações acima e entendi o objetivo do estudo. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as perguntas foram respondidas.

Ao assinar este documento eu dou meu consentimento para ser um participante deste projeto.

Eu assinei e datei duas vias deste documento e recebi uma das vias assinada e datada

Ao assinar esse documento não estou desistindo de meus direitos legais.

NOME DO PACIENTE: _____

ASSINATURA: _____

DATA: ____/____/____

(Deve ser assinado e datado pessoalmente pelo sujeito de pesquisa, em escrita manual).

Impressão Datiloscópica do sujeito de pesquisa (se aplicável)

Eu, abaixo assinado, expliquei todos os detalhes relevantes deste projeto para o paciente e lhe forneci uma via assinada e datada deste documento.

INVESTIGADOR: _____

ASSINATURA: _____

DATA: ____/____/____

TESTEMUNHA: _____ (*)

ASSINATURA: _____

*A assinatura da testemunha só é necessária se o sujeito de pesquisa for incapaz de ler e/ou fornecer consentimento por escrito.

DATA: ____/____/____

6.3 ANEXO C - TCLE HC-FMUSP

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO-CONTROLE
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Prevalência de hipovitaminose D entre pacientes coinfectados HIV/HCV, comparada a pacientes mono infectados para HCV e mono infectados por HIV em centros de referência para tratamento de hepatites e aids na cidade de São Paulo/Brasil
PESQUISADOR: Maria Cássia Mendes Correa
CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente . INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 54114
UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO X ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 05 de Julho a 30 de Setembro de 2012

Você está sendo convidado(a) a participar como Voluntário(a) do “Grupo-controle” desta pesquisa, que avalia os níveis de vitamina D no sangue.

O Grupo-controle é composto por pessoas saudáveis. E serve para comparar os resultados dos exames de sangue entre pessoas saudáveis e pessoas dos grupos estudados, que são portadoras de HIV e HCV.

Portanto, para que seus exames possam servir de comparação, teremos de excluir a possibilidade de você ter HIV e/ou HCV. E junto com a amostra de sangue para dosagem de vitamina D, também colheremos sorologias para HBV, HCV e HIV.

A vitamina D é muito importante para regular o estoque de cálcio no organismo, ajudando a fixar cálcio nos ossos e recentemente tem sido descoberto um papel de modulação imunológica.

Objetivo da pesquisa

A finalidade desta pesquisa é avaliar a porcentagem de vitamina D baixa no sangue de pessoas com hepatite C e/ou HIV, em diferentes ambulatorios que tratam hepatites e aids na Cidade de São Paulo. Queremos entender também se a falta de vitamina D está associada à idade, etnia, gênero, obesidade, colesterol alto, estágio da doença (aids e /ou hepatite) e se incide mais severamente em pessoas que tem as duas infecções (HIV e HCV) ou na população saudável, da qual você faz parte.

Esta pesquisa está sendo conduzida pelo Dra. Maria Cássia Mendes Correa, no Depto. De Moléstias Infecciosas do HC . E ela irá explicar a você porque esta pesquisa é importante e como você poderá participar dela.

Informações sobre sua participação

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, que é uma comissão formada por diversos profissionais e representantes da comunidade que analisaram a ética do estudo (se é confiável) e sua segurança.

Antes de decidir se você quer participar, é importante que você leia e entenda este Termo. Depois que todas suas dúvidas forem esclarecidas com o médico que conversar com você sobre este estudo, e você decidir participar, você deverá assinar este documento, que é um termo de consentimento, mas só para esta pesquisa.

Caso você decida participar deste estudo você será considerado sujeito de pesquisa, que é como são chamados os participantes de uma pesquisa clínica. E dessa forma você estará autorizando que seja coletada uma amostra de sangue para análise de vitamina D e que dados relevantes (como peso, altura, cor da pele) sejam coletados numa ficha pelo seu médico e armazenados em um banco de dados no computador, para posterior avaliação estatística.

Riscos e desconfortos

A coleta de amostra de sangue para vitamina D será realizada junto com a coleta dos exames para sorologia de HIV, HCV e HBV, além de colesterol, glicemia e triglicérides. Não há riscos em participar desta pesquisa, pois se trata apenas de coleta de amostra de sangue, com um mínimo desconforto relacionado à coleta da amostra sanguínea.

Benefícios

As informações obtidas nesta pesquisa podem ajudar os médicos a tratar melhor a hepatite C crônica e HIV no futuro, sugerindo a suplementação de vitamina D. Você será informado do resultado dos seus exames a caso você tenha vitamina D baixa, ou qualquer outro exame alterado, terá a orientação necessária.

Participação do paciente

Você é livre para decidir pela participação ou não neste estudo a qualquer momento. Caso você não concorde em participar deste estudo ou decidir se retirar do estudo a qualquer momento, ou se sua participação for interrompida por qualquer razão, não haverá nenhum tipo de penalidade; você não perderá qualquer benefício a que tenha direito. Os motivos de sua saída da pesquisa serão documentados, caso você permita.

Compromisso de confidencialidade

Seus dados serão mantidos confidencialmente, ou seja, seu nome nunca será usado em nenhum relatório deste estudo. Durante o estudo você será identificado apenas pelas suas iniciais e por um número. O médico do estudo solicita sua autorização para que seus registros médicos, relativos ao estudo, possam ser consultados pela equipe de pesquisa e se necessário por agências de saúde, como a ANVISA. Isto é importante para se ter certeza que tudo está sendo feito de acordo com o protocolo do estudo e para que a boa qualidade dos resultados desta pesquisa seja assegurada.

O médico do estudo e sua equipe garantem o cumprimento da legislação brasileira sobre a confidencialidade de seus dados.

Declaração do Paciente

Eu discuti com o Dr. Mario Pessoa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinaturas:

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

6.4 Anexo D – Ficha de Coleta de Dados do Grupo Controle

Avaliação de deficiência de Vitamina D - GRUPO-CONTROLE

1-Origem do Paciente

1-Funcionário() 2-Médico() 3-Residente () 4-Enfermagem()

5- Parente de paciente () 6- Comunidade ()

Identificação e dados gerais:

2-Número Id. Na pesquisa: _____

3-Registro: _____

4-Nome : _____

Etiqueta

5-Idade: _____ anos

6-Gênero: 1()M 2()F

7-Cor de Pele, classificação Fitzpatrick: 1() fototipo 1,2 ou 3 2() fototipos 4, 5 ou 6

8-Peso : _____ Kg

9--Estatura: _____ cm

10- Índice de Massa corporal:

11- Circunferência Abdominal _____ cm

12- PA:

13- O paciente toma algum **suplemento de vitamina D**? 0 () Não 1 () Sim

14- Colesterol total: 15-Fração HDL: 16-Fração LDL:

17- Glicemia de Jejum: 18- Triglicérides: 19-Insulina: 20- HOMA-

IR:

21- PTH(OPCIONAL): 22- 25(OH)Vitamina D:

23- Critérios Síndrome metabólica? 0 () Não 1() Sim

24- Possui sorologia positiva para HIV/HBV e/ou HCV? 0 () Não 1() Sim

25- Possui alguma outra patologia que diminua Vitamina D? 0 () Não 1() Sim

26- Usa alguma medicação que diminua Vitamina D? 0 () Não 1() Sim

27- Data dos exames: / /

6.5 - Anexo E – Escala Fitzpatrick de cor de pele

FOTOTIPO	QUEIMADURA VS BRONZEAMENTO	COR DE PELE NÃO EXPOSTA AO SOL
1	Sempre queima, não bronzeia	Branco Marfim
2	Queima fácil, bronzeia minimamente, com dificuldade	Branco
3	Queima moderadamente, Bronzeia moderada e uniformemente	Branco
4	Queima minimamente, Bronzeia fácil e moderadamente	Bege-Oliva, ligeiramente bronzeado
5	Raramente queima, Bronzeia profundamente	Marrom-claro, ou bronzeado
6	Nunca queima, bronzeia profundamente	Marrom-escuro, ou negro

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

1. Holick MF. The influence of vitamin D on bone health across the life cycle. *J Nutr.* 2005;135(11):2726S-7S.
2. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem.* 2003;88(2):296-307.
3. MF H. Phylogenetic and evolutionary aspects of vitamin D from phytoplankton to humans. In: Pang PKT SM, editor. *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications*. Orlando: Academic Press; 1989. p. 7-43.
4. 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.
5. Holick MF. The photobiology of vitamin D and its consequences for humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;453:1-1.
6. Portale AA, Booth BE, Halloran BP, Morris RC, Jr. Effect of dietary phosphorus on circulating concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D and immunoreactive parathyroid hormone in children with moderate renal insufficiency. *J Clin Invest.* 1984;73(6):1580-9.
7. Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. Regulation of cutaneous previtamin D3 photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science.* 1981;211(4482):590-3.
8. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science.* 1979;206(4423):1188-90.
9. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 2001;15(14):2579-85.
10. Bar-Shavit Z, Noff D, Edelstein S, Meyer M, Shibolet S, Goldman R. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the regulation of macrophage function. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(6):673-6.
11. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770-3.

12. Scott MG, Gronowski AM, Reid IR, Holick MF, Thadhani R, Phinney K. Vitamin D: the more we know, the less we know. *Clin Chem*. 2015;61(3):462-5.
13. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(7):1911-30.
14. Maeda SS, Borba VZ, Camargo MB, Silva DM, Borges JL, Bandeira F, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(5):411-33.
15. Norman AW, Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235(9):1034-45.
16. Heaney RP, Holick MF. Why the IOM recommendations for vitamin D are deficient. *J Bone Miner Res*. 2011;26(3):455-7.
17. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int*. 2005;16(7):713-6.
18. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.
19. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
20. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2017-29.
21. Forouhi NG, Luan J, Cooper A, Boucher BJ, Wareham NJ. Baseline serum 25-hydroxy vitamin d is predictive of future glycemic status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. *Diabetes*. 2008;57(10):2619-25.
22. Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes*. 2008;57(2):298-305.
23. Salamone LM, Dallal GE, Zantos D, Makrauer F, Dawson-Hughes B. Contributions of vitamin D intake and seasonal sunlight exposure to plasma 25-hydroxyvitamin D concentration in elderly women. *Am J Clin Nutr*. 1994;59(1):80-6.

24. Kyriakidou-Himonas M, Aloia JF, Yeh JK. Vitamin D supplementation in postmenopausal black women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(11):3988-90.
25. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(3):690-3.
26. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest.* 1985;76(4):1536-8.
27. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet.* 1989;2(8671):1104-5.
28. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(6):1165-8.
29. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004;338(2):143-56.
30. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Frei P, et al. The vitamin D receptor gene bAt (CCA) haplotype impairs the response to pegylated-interferon/ribavirin-based therapy in chronic hepatitis C patients. *Antivir Ther.* 2012;17(3):541-7.
31. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Eloranta JJ, et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic vitamin D receptor (NR 111) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver Int.* 2012;32(4):635-43.
32. Terrier B, Carrat F, Geri G, Pol S, Piroth L, Halfon P, et al. Low 25-OH vitamin D serum levels correlate with severe fibrosis in HIV-HCV co-infected patients with chronic hepatitis. *J Hepatol.* 2011;55(4):756-61.
33. Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2010;51(4):1158-67.
34. Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, Zeina AR, Assy N. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naïve patients. *World J Gastroenterol.* 2011;17(47):5184-90.
35. Nimer A, Mouch A. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naïve patients. *World J Gastroenterol.* 2012;18(8):800-5.

36. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, et al. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology*. 2011;54(5):1570-9.
37. Gutierrez JA, Jones KA, Flores R, Singhanian A, Woelk CH, Schooley RT, et al. Vitamin D Metabolites Inhibit Hepatitis C Virus and Modulate Cellular Gene Expression. *J Virol Antivir Res*. 2014;3(3).
38. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol*. 2011;54(5):887-93.
39. Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, et al. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology*. 2003;38(1):50-6.
40. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med*. 2000;133(8):592-9.
41. Buti M, Llaneras J, Riveiro-Barciela M, Esteban R. Therapy for hepatitis C genotype 3: moving forward. *J Viral Hepat*. 2015;22(9):683-90.
42. Klein GL, Soriano H, Shulman RJ, Levy M, Jones G, Langman CB. Hepatic osteodystrophy in chronic cholestasis: evidence for a multifactorial etiology. *Pediatr Transplant*. 2002;6(2):136-40.
43. Schiefke I, Fach A, Wiedmann M, Aretin AV, Schenker E, Borte G, et al. Reduced bone mineral density and altered bone turnover markers in patients with non-cirrhotic chronic hepatitis B or C infection. *World J Gastroenterol*. 2005;11(12):1843-7.
44. Duarte MP, Farias ML, Coelho HS, Mendonça LM, Stabnov LM, do Carmo d Oliveira M, et al. Calcium-parathyroid hormone-vitamin D axis and metabolic bone disease in chronic viral liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(9):1022-7.
45. Chen CC, Wang SS, Jeng FS, Lee SD. Metabolic bone disease of liver cirrhosis: is it parallel to the clinical severity of cirrhosis? *J Gastroenterol Hepatol*. 1996;11(5):417-21.
46. Fisher L, Fisher A. Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(4):513-20.

47. Monegal A, Navasa M, Guañabens N, Peris P, Pons F, Martinez de Osaba MJ, et al. Osteoporosis and bone mineral metabolism disorders in cirrhotic patients referred for orthotopic liver transplantation. *Calcif Tissue Int.* 1997;60(2):148-54.
48. Hofmann WP, Kronenberger B, Bojunga J, Stamm B, Herrmann E, Bücke A, et al. Prospective study of bone mineral density and metabolism in patients with chronic hepatitis C during pegylated interferon alpha and ribavirin therapy. *J Viral Hepat.* 2008;15(11):790-6.
49. Gatta A, Verardo A, Di Pascoli M, Giannini S, Bolognesi M. Hepatic osteodystrophy. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2014;11(3):185-91.
50. Rodriguez M, Daniels B, Gunawardene S, Robbins GK. High frequency of vitamin D deficiency in ambulatory HIV-Positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009;25(1):9-14.
51. Moore AL, Vashisht A, Sabin CA, Mocroft A, Madge S, Phillips AN, et al. Reduced bone mineral density in HIV-positive individuals. *AIDS.* 2001;15(13):1731-3.
52. Teichmann J, Stephan E, Lange U, Discher T, Friese G, Lohmeyer J, et al. Osteopenia in HIV-infected women prior to highly active antiretroviral therapy. *J Infect.* 2003;46(4):221-7.
53. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050-5.
54. Arnsten JH, Freeman R, Howard AA, Floris-Moore M, Santoro N, Schoenbaum EE. HIV infection and bone mineral density in middle-aged women. *Clin Infect Dis.* 2006;42(7):1014-20.
55. Dolan SE, Carpenter S, Grinspoon S. Effects of weight, body composition, and testosterone on bone mineral density in HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(2):161-7.
56. Carr A, Miller J, Eisman JA, Cooper DA. Osteopenia in HIV-infected men: association with asymptomatic lactic acidemia and lower weight pre-antiretroviral therapy. *AIDS.* 2001;15(6):703-9.
57. Brown TT. Report from Boston: the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Reduced bone mineral density in HIV-infected patients. *Hopkins HIV Rep.* 2005;17(3):12-4, 6.
58. Viard JP, Souberbielle JC, Kirk O, Reekie J, Knysz B, Losso M, et al. Vitamin D and clinical disease progression in HIV infection: results from the EuroSIDA study. *AIDS.* 25(10):1305-15.

59. Cozzolino M, Vidal M, Arcidiacono MV, Tebas P, Yarasheski KE, Dusso AS. HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. *AIDS*. 2003;17(4):513-20.
60. Brodie MJ, Boobis AR, Dollery CT, Hillyard CJ, Brown DJ, MacIntyre I, et al. Rifampicin and vitamin D metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 1980;27(6):810-4.
61. Brodie MJ, Boobis AR, Hillyard CJ, Abeyasekera G, Stevenson JC, MacIntyre I, et al. Effect of rifampicin and isoniazid on vitamin D metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 1982;32(4):525-30.
62. Valsamis HA, Arora SK, Labban B, McFarlane SI. Antiepileptic drugs and bone metabolism. *Nutr Metab (Lond)*. 2006;3:36.
63. Welz T, Childs K, Ibrahim F, Poulton M, Taylor CB, Moniz CF, et al. Efavirenz is associated with severe vitamin D deficiency and increased alkaline phosphatase. *AIDS*. 24(12):1923-8.
64. Brown TT, McComsey GA. Association between initiation of antiretroviral therapy with efavirenz and decreases in 25-hydroxyvitamin D. *Antivir Ther*. 15(3):425-9.
65. Rosenvinge MM, Gedela K, Copas AJ, Wilkinson A, Sheehy CA, Bano G, et al. Tenofovir-linked hyperparathyroidism is independently associated with the presence of vitamin D deficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 54(5):496-9.
66. Haug C, Müller F, Aukrust P, Frøland SS. Subnormal serum concentration of 1,25-vitamin D in human immunodeficiency virus infection: correlation with degree of immune deficiency and survival. *J Infect Dis*. 1994;169(4):889-93.
67. Haug CJ, Aukrust P, Haug E, Mørkrid L, Müller F, Frøland SS. Severe deficiency of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human immunodeficiency virus infection: association with immunological hyperactivity and only minor changes in calcium homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(11):3832-8.
68. Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90(1-5):199-207.
69. Teichmann J, Stephan E, Discher T, Lange U, Federlin K, Stracke H, et al. Changes in calciotropic hormones and biochemical markers of bone metabolism in patients with human immunodeficiency virus infection. *Metabolism*. 2000;49(9):1134-9.

70. Mathieu C, Gysemans C, Giuliatti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(7):1247-57.
71. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev*. 2005;26(5):662-87.
72. Lake JE, Adams JS. Vitamin D in HIV-Infected Patients. *Curr HIV/AIDS Rep*. 8(3):133-41.
73. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr*. 1995;125(6 Suppl):1704S-8S.
74. Rausch-Fan X, Leutmezer F, Willheim M, Spittler A, Bohle B, Ebner C, et al. Regulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells and allergen-specific th cell clones by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128(1):33-41.
75. Szep Z, Guaraldi G, Shah SS, Lo Re V, Ratcliffe SJ, Orlando G, et al. Vitamin D deficiency is associated with type 2 diabetes mellitus in HIV infection. *AIDS*. 2011;25(4):525-9.
76. Adeyemi OM, Livak B, Orsi J, Glesby MJ, Villacres MC, Weber KM, et al. Vitamin D and insulin resistance in non-diabetic women's interagency HIV study participants. *AIDS Patient Care STDS*. 2013;27(6):320-5.
77. Dao CN, Patel P, Overton ET, Rhame F, Pals SL, Johnson C, et al. Low vitamin D among HIV-infected adults: prevalence of and risk factors for low vitamin D Levels in a cohort of HIV-infected adults and comparison to prevalence among adults in the US general population. *Clin Infect Dis*. 52(3):396-405.
78. Van Den Bout-Van Den Beukel CJ, Fievez L, Michels M, Sweep FC, Hermus AR, Bosch ME, et al. Vitamin D deficiency among HIV type 1-infected individuals in the Netherlands: effects of antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24(11):1375-82.
79. Maeda SS, Kunii IS, Hayashi LF, Lazaretti-Castro M. Increases in summer serum 25-hydroxyvitamin D (25OHD) concentrations in elderly subjects in São Paulo, Brazil vary with age, gender and ethnicity. *BMC Endocr Disord*. 2010;10:12.
80. Maeda SS, Saraiva GL, Kunii IS, Hayashi LF, Cendoroglo MS, Ramos LR, et al. Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of São Paulo, Brazil: the São Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). *BMC Endocr Disord*. 2013;13:14.

81. Maeda SS, Saraiva GL, Hayashi LF, Cendoroglo MS, Ramos LR, Corrêa MeP, et al. Seasonal variation in the serum 25-hydroxyvitamin D levels of young and elderly active and inactive adults in São Paulo, Brazil: The São Paulo Vitamin D Evaluation Study (SPADES). *Dermatoendocrinol.* 2013;5(1):211-7.
82. Sales SH, Matta SM, da Matta S, da Silva DC, Assone TA, Fonseca LA, et al. High frequency of deficient consumption and low blood levels of 25-hydroxyvitamin D in HIV-1-infected adults from São Paulo city, Brazil. *Sci Rep.* 2015;5:12990.
83. Mueller NJ, Fux CA, Ledergerber B, Elzi L, Schmid P, Dang T, et al. High prevalence of severe vitamin D deficiency in combined antiretroviral therapy-naïve and successfully treated Swiss HIV patients. *Aids.* 2010;24(8):1127-34.
84. Milazzo L, Mazzali C, Bestetti G, Longhi E, Foschi A, Viola A, et al. Liver-related factors associated with low vitamin D levels in HIV and HIV/HCV coinfecting patients and comparison to general population. *Curr HIV Res.* 2011;9(3):186-93.
85. Viard JP, Souberbielle JC, Kirk O, Reekie J, Knysz B, Losso M, et al. Vitamin D and clinical disease progression in HIV infection: results from the EuroSIDA study. *Aids.* 2011;25(10):1305-15.
86. Arteh J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci.* 2010;55(9):2624-8.
87. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araújo LM, Vieira JG, Maeda SS, et al. [Prevalence of vitamin D deficiency, insufficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly inpatients and living in the community of the city of São Paulo, Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(3):437-42.
88. Peters BS, dos Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. *Ann Nutr Metab.* 2009;54(1):15-21.
89. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.* 1988;124(6):869-71.
90. Frömke C, Hothorn LA, Kropf S. Nonparametric relevance-shifted multiple testing procedures for the analysis of high-dimensional multivariate data with small sample sizes. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:54.
91. Anderson TW, Darling DA. Asymptotic theory of certain "goodness of fit" criteria based on stochastic processes. *The annals of mathematical statistics.* 1952;23(2):193-212.

92. Levene H. Robust tests for equality of variances. In: Press SU, editor. *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*: I. Olkin et al; 1960. p. 278-92.
93. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1979;6(2):65-70.
94. Geloneze B, Vasques AC, Stabe CF, Pareja JC, Rosado LE, Queiroz EC, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):281-7.
95. Team R-C. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>: R Foundation for Statistical Computing.
96. Saúde Md. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos* Brasília; 2015. Available from: [<http://www.aids.gov.br/pcdt>]
97. MdS, Departamento de DST AeHV. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções*. 2016.
98. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Vieira JG, Maeda SS, et al. [Prevalence of vitamin D deficiency, insufficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly inpatients and living in the community of the city of Sao Paulo, Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(3):437-42.
99. Dao CN, Patel P, Overton ET, Rhame F, Pals SL, Johnson C, et al. Low vitamin D among HIV-infected adults: prevalence of and risk factors for low vitamin D Levels in a cohort of HIV-infected adults and comparison to prevalence among adults in the US general population. *Clin Infect Dis*. 2011;52(3):396-405.
100. Centers for Diseases Control PC, National Center for Health Statistics (NCHS). *National Health and Nutrition Examination Survey*: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention 2005-2006 [available at http://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about_nhanes.htm].
101. Escota GV, Cross S, Powderly WG. Vitamin D and calcium abnormalities in the HIV-infected population. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2014;43(3):743-67.
102. Allavena C, Delpierre C, Cuzin L, Rey D, Viget N, Bernard J, et al. High frequency of vitamin D deficiency in HIV-infected patients: effects of HIV-related factors and antiretroviral drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(9):2222-30.

103. Theodorou M, Sersté T, Van Gossum M, Dewit S. Factors associated with vitamin D deficiency in a population of 2044 HIV-infected patients. *Clin Nutr.* 2014;33(2):274-9.
104. Avihingsanon A, Kerr SJ, Ramautarsing RA, Praditpornsilpa K, Sophonphan J, Ubolyam S, et al. The Association of Gender, Age, Efavirenz Use, and Hypovitaminosis D Among HIV-Infected Adults Living in the Tropics. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2016;32(4):317-24.
105. Nylén H, Habtewold A, Makonnen E, Yimer G, Bertilsson L, Burhenne J, et al. Prevalence and risk factors for efavirenz-based antiretroviral treatment-associated severe vitamin D deficiency: A prospective cohort study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(34):e4631.
106. Dave JA, Cohen K, Micklesfield LK, Maartens G, Levitt NS. Antiretroviral Therapy, Especially Efavirenz, Is Associated with Low Bone Mineral Density in HIV-Infected South Africans. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144286.
107. Coelho L, Cardoso SW, Luz PM, Hoffman RM, Mendonça L, Veloso VG, et al. Vitamin D3 supplementation in HIV infection: effectiveness and associations with antiretroviral therapy. *Nutr J.* 2015;14:81.
108. Horberg M, Tang B, Towner W, Silverberg M, Bersoff-Matcha S, Hurley L, et al. Impact of tenofovir on renal function in HIV-infected, antiretroviral-naïve patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;53(1):62-9.
109. Peyrière H, Reynes J, Rouanet I, Daniel N, de Boever CM, Mauboussin JM, et al. Renal tubular dysfunction associated with tenofovir therapy: report of 7 cases. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;35(3):269-73.
110. Woodward CL, Hall AM, Williams IG, Madge S, Copas A, Nair D, et al. Tenofovir-associated renal and bone toxicity. *HIV Med.* 2009;10(8):482-7.
111. Casado JL. Renal and Bone Toxicity with the Use of Tenofovir: Understanding at the End. *AIDS Rev.* 2016;18(2):59-68.
112. Klassen KM, Kimlin MG, Fairley CK, Emery S, Anderson PH, Ebeling PR, et al. Associations between vitamin D metabolites, antiretroviral therapy and bone mineral density in people with HIV. *Osteoporos Int.* 2016;27(5):1737-45.
113. Miñambres I, Sánchez-Hernández J, Sánchez-Quesada JL, Rodríguez J, de Leiva A, Pérez A. The association of hypovitaminosis d with the metabolic syndrome is independent of the degree of obesity. *ISRN Endocrinol.* 2012;2012:691803.

114. Kang JH, Kim SS, Moon SS, Kim WJ, Bae MJ, Choi BG, et al. Adiposity in the Relationship between Serum Vitamin D Level and Insulin Resistance in Middle-Aged and Elderly Korean Adults: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013;28(2):96-102.
115. Sheikh MY, Choi J, Qadri I, Friedman JE, Sanyal AJ. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology*. 2008;47(6):2127-33.
116. Bugianesi E, Salamone F, Negro F. The interaction of metabolic factors with HCV infection: does it matter? *J Hepatol*. 2012;56 Suppl 1:S56-65.
117. Lim S, Kim MJ, Choi SH, Shin CS, Park KS, Jang HC, et al. Association of vitamin D deficiency with incidence of type 2 diabetes in high-risk Asian subjects. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(3):524-30.
118. Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 2013;346:f1169.
119. Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: the odd couple. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(11):561-8.
120. Baeke F, Gysemans C, Korf H, Mathieu C. Vitamin D insufficiency: implications for the immune system. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(9):1597-606.
121. McDonnell SL, Baggerly LL, French CB, Heaney RP, Gorham ED, Holick MF, et al. Incidence rate of type 2 diabetes is >50% lower in GrassrootsHealth cohort with median serum 25-hydroxyvitamin D of 41ng/ml than in NHANES cohort with median of 22ng/ml. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015.
122. Mathieu C. Vitamin D and diabetes: Where do we stand? *Diabetes Res Clin Pract*. 2015;108(2):201-9.
123. Ghiringhello MT, Vieira JG, Tachibana TT, Ferrer C, Maciel RM, Amioka PH, et al. Distribution of HOMA-IR in Brazilian subjects with different body mass indexes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(3):573-4.
124. Lai JK, Lucas RM, Clements MS, Harrison SL, Banks E. Assessing vitamin D status: pitfalls for the unwary. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1062-71.
125. Powe CE, Karumanchi SA, Thadhani R. Vitamin D-binding protein and vitamin D in blacks and whites. *N Engl J Med*. 2014;370(9):880-1.