Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Relação entre tecido adiposo e osso: associações entre
vitamina D, osteocalcina, adipocinas e homeostase da
glicose em crianças e adolescentes**

Kelly Virecoulon Giudici

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutora
em Ciências**

**Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública**

Orientadora: Prof^a Dr^a Lúgia Araújo Martini

São Paulo

2015

Relação entre tecido adiposo e osso: associações entre vitamina D, osteocalcina, adipocinas e homeostase da glicose em crianças e adolescentes

Kelly Virecoulon Giudici

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Dr^a Lúgia Araújo Martini

Versão original

São Paulo

2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

Esta pesquisa contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob os processos 2011/22768-2 (bolsa de Doutorado Direto), 2011/04069-0 (bolsa temporária de Mestrado), 2013/15823-2 (bolsa de estágio de pesquisa no exterior – BEPE) e 2012/11061-8 (projeto de pesquisa da Profª Drª Lígia Araújo Martini).

À minha família.

AGRADECIMENTOS

O meu doutorado é resultado de uma longa trajetória e fruto de muita dedicação, mas também da colaboração de diversas pessoas. Registro aqui meus agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, apoiaram o meu trabalho e contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

Aos meus pais, Regina e Reinaldo, por todo o amor, carinho e suporte, por todos os conselhos e conversas. Por me acalmarem nos momentos de tensão e sempre me incentivarem nas minhas escolhas profissionais e na paixão pela vida acadêmica. Ao meu irmão, Kevin, pela paciência com meus desabafos e pelas inúmeras conversas.

Ao Phillip, meu marido, amigo e companheiro, por compartilhar comigo todos os momentos, alegres ou não, e por todo o amor, apoio e compreensão nas horas mais difíceis. Por entender que este período demandou esforço, tempo e vários fins de semana em frente ao computador.

A toda a minha família, que sempre me incentivou e apoiou. Por compreenderem a minha ausência nos momentos mais complicados do trabalho e a minha dedicação à tese, especialmente em sua fase final.

À Lígia Martini, professora, orientadora, amiga e parceira nesta empreitada. Por ter acreditado no meu potencial e por ter me tornado parte do seu grupo de pesquisa. Por me fazer evoluir, por me acalmar a cada percalço e por contribuir para que eu me tornasse uma pesquisadora melhor. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos, por ter me guiado nesta trajetória, me estimulando a superar as dificuldades, a vencer os desafios constantes do mundo da pesquisa e a dar o meu melhor.

Às alunas da Prof^a Lígia: Natasha França e Lenny de Souza, pela preciosa ajuda com a coleta de dados. Neste quesito, um agradecimento especial à Mariana Lopes, parceira desde o início deste projeto como aluna de iniciação científica e meu braço direito em todo o processo de coleta de dados e confecção do banco de dados. À Bárbara Peters, pela convivência, parceria de trabalho e paciência em ouvir meus desabafos nas diversas etapas deste estudo.

À toda a equipe de alunas e ex-alunas da Prof^a Lígia: Natielen Schuch, Vivian Garcia, Aline Kurihayashi, Simone Faria, Tábata Gadotti, Patrícia Santos, Elena Curatella e Marcela Menah, companheiras de inúmeras reuniões, discussões científicas e momentos de descontração.

À Profª Connie Weaver, pela sua hospitalidade ao me receber na *Purdue University* e pela valiosa oportunidade em trabalhar com a sua equipe. À Profª Berdine Martin, por toda ternura e atenção durante minha estada na *Purdue University*. À Profª Kathleen Hill-Gallant, pela parceria e auxílio na elaboração do artigo fruto do período de doutorado-sanduíche. Aos estatísticos Prof. George McCabe e Profª Linda McCabe, pelo auxílio com as análises de dados. Aos demais co-autores do artigo com dados norte-americanos: Prof. Munro Peacock, Prof. Richard Lewis, Dra. Emma Laing e Dra. Dorothy Hausman, por terem tornado possível a sua elaboração.

Aos colegas da equipe de trabalho da Profª Connie Weaver: Anna, Claire, Lia, Pam, Emily, Alyssa, Steven e Irina, por terem me acolhido tão bem.

Às Profas. Regina Mara Fisberg e Dirce Marchioni, por autorizarem o uso de parte dos dados do estudo ISA-Capital para este estudo, e a todos os envolvidos com a sua coleta. Agradeço também pelo convívio e aprendizado nestes anos de pós-graduação.

À Profª Patrícia Rondó, por permitir o uso das dependências do Centro de Saúde Geraldo Horácio de Paula Souza e de seu laboratório para a coleta de dados e para as análises bioquímicas.

Ao Prof. Márcio Mancini, por autorizar que os pacientes que já haviam passado em triagem na Liga de Obesidade Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP fossem convidados a participar do estudo.

À Profª Patrícia Jaime, orientadora de iniciação científica, pelos ensinamentos e momentos compartilhados durante a graduação, que me fizeram entender o universo da pesquisa e me tornaram capaz de seguir um doutorado direto.

Aos Professores Marcelo Rogero e Mauro Fisberg, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

À Profª Sandra Ferreira Vívoló e suas alunas, pelo convívio e produtivas discussões ao longo das inúmeras sessões de *Journal Club*.

Às amigas desde a graduação: Andréia Santana, Andrea Toledo, Priscila Koritar, Natália Castro, Clarissa Fujiwara, Fernanda Simões, Jaqueline França, Lígia Kobayashi, e às amigas que a pós-graduação me deu: Stella Oliveira, Michelle Castro e Diva Vieira. Obrigada por todo o companheirismo, pelas inúmeras conversas de bandeirão, pelos encontros “nutritivos”, por compartilharem as dificuldades e alegrias da pós-graduação e por se manterem presentes mesmo após cada uma seguir o seu caminho.

Às amigas de longa data, Lara Rodrigues e Renata de Carvalho, por ouvirem todos os desabafos e me darem força e ombro amigo em todos os momentos.

À Dra. Ana Maria da Cruz, pediatra do Centro de Saúde Geraldo Horácio de Paula Souza, pelo incentivo à coleta de dados. Aos funcionários do Laboratório do Centro de Saúde, pela receptividade: Cida, Dalva, Roberto, Milton e, especialmente, à Jucileide Ferreira, Ana Lúcia Moraes, Ana Lúcia Carrijo e Conceição da Silva, pelo auxílio com a coleta de sangue e com o treinamento de técnicas laboratoriais.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação e do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, em especial à Vânia, Alessandra, Diego e Eduardo, por toda a paciência com as dúvidas e por toda a ajuda.

Às Profas. Lúcia Barroso e Mônica Sandoval e às alunas Talita Silva e Mariana Schultz, do Centro de Estatística Aplicada do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo (IME/USP), pelo auxílio com o dimensionamento amostral do estudo.

A todas as crianças e adolescentes participantes do estudo e aos seus pais, por autorizarem a sua participação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro à coleta de dados e pelas bolsas de doutorado direto e de estágio de pesquisa no exterior, que tornaram possíveis a realização deste projeto, o período de doutorado-sanduíche na *Purdue University* e a participação em eventos científicos, experiências estas que contribuíram para a minha formação e para a divulgação deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, que me acolheu em 2006 e desde então vem me proporcionando um novo mundo de oportunidades e caminhos. Ambiente onde aprendi a arte da pesquisa, pela qual me apaixonei e com a qual quero continuar contribuindo ao longo de toda a minha vida profissional.

*“Uma mente que se abre para uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

*“Quanto mais pensava sobre o assunto, tanto
mais claro lhe parecia que, no fundo, saber que não
se sabe também é uma forma de conhecimento.”*

Jostein Gaarder, em O Mundo de Sofia

RESUMO

Giudici, KV. **Relação entre tecido adiposo e osso: associações entre vitamina D, osteocalcina, adipocinas e homeostase da glicose em crianças e adolescentes.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado em Nutrição em Saúde Pública].

Introdução: O tecido adiposo e o osso dialogam entre si e influenciam a homeostase da glicose por meio da ação de seus produtos (leptina, adiponectina e osteocalcina). A insuficiência de vitamina D (VD) pode levar a alterações metabólicas em ambos tecidos.

Objetivos: Investigar as relações entre concentrações séricas de 25 hidroxivitamina D [25(OH)D], osteocalcina, adipocinas, marcadores do metabolismo da glicose e estado nutricional em crianças e adolescentes.

Métodos: Estudo transversal com 198 indivíduos brasileiros (14 a 18 anos) e 318 norte-americanos (8 a 13 anos). Coleta de sangue (após jejum de 12h) foi realizada para mensurar 25(OH)D, paratormônio (PTH), osteocalcina carboxilada (cOC), adiponectina (A), colesterol total, triglicérides, HDL-c, LDL-c e VLDL-c (amostra brasileira); osteocalcina total (tOC) (amostra norte-americana); glicose, insulina, osteocalcina não-carboxilada (ucOC) e leptina (L) (em ambas as amostras). Marcadores do metabolismo da glicose (HOMA-IR, HOMA- β e QUICKI) foram calculados. Nos indivíduos brasileiros, o nível de atividade física foi determinado, e a ingestão alimentar foi mensurada por um Recordatório de 24 horas, repetido em 62,6% da amostra. **Resultados:** População brasileira – Indivíduos com excesso de peso (42,6%) apresentaram menores concentrações de 25(OH)D, adiponectina, cOC, ucOC, HDL-c e QUICKI, e maiores PTH, leptina, LDL-c, VLDL-c, colesterol total, triglicérides, insulina, HOMA-IR e HOMA- β , comparados aos eutróficos ($p < 0,05$). A 25(OH)D se correlacionou positivamente com ucOC ($r = 0,326$; $p < 0,0001$), adiponectina ($r = 0,151$; $p = 0,034$) e HDL-c ($r = 0,323$; $p < 0,0001$), e negativamente com IMC ($r = -0,294$; $p < 0,0001$). A associação entre 25(OH)D e ucOC permaneceu após ajustes para idade, IMC e estação do ano (R^2 parcial = 0,071, $p < 0,0001$), porém ambas não se correlacionaram a marcadores do metabolismo da glicose. Fortes correlações foram observadas, porém, entre leptina e insulina ($r = 0,746$; $p < 0,0001$), HOMA-IR ($r = 0,720$; $p < 0,0001$), HOMA- β ($r = 0,703$; $p < 0,0001$) e QUICKI ($r = -0,749$; $p < 0,0001$). A razão A/L foi menor nos sedentários/insuficientemente ativos (2,2, DP=4,0 vs 5,6, DP=12,3; $p = 0,01$), comparados aos ativos/muito ativos. A 25(OH)D foi positivamente associada à ingestão de VD, após ajustes para sexo, exposição solar e estação do ano (R^2

parcial=0,026; $p=0,02$). População norte-americana – Comparados aos eutróficos, indivíduos com excesso de peso (43,1%) apresentaram maior leptina, insulina, HOMA-IR e HOMA- β , e menor QUICKI ($p<0,0001$ para todos). Concentrações de ucOC se correlacionaram negativamente com leptina ($r= -0,162$; $p=0,04$) e glicose ($r= -0,159$; $p=0,04$), porém somente a associação com leptina foi mantida após ajuste para idade, sexo e porcentagem de massa gorda corporal (R^2 parcial =0,03; $p=0,0275$). Concentrações de leptina se relacionaram com todos os marcadores do metabolismo da glicose, mesmo após ajustes para idade, sexo e porcentagem de massa gorda (insulina: R^2 parcial=0,23; glicose: R^2 parcial=0,04; HOMA-IR: R^2 parcial=0,23; HOMA- β : R^2 parcial=0,09; QUICKI: R^2 parcial=0,23, $p<0,001$ para todos) **Conclusões:** Os resultados confirmam as relações entre excesso de peso, leptina e marcadores do metabolismo da glicose em crianças e adolescentes brasileiros e norte-americanos. Concentrações de 25(OH)D se correlacionaram negativamente ao IMC e leptina e positivamente à ucOC. A relação entre osteocalcina e a homeostase da glicose, contudo, não foi diretamente observada. Estes achados reforçam a importância do combate à obesidade, principalmente durante a infância e adolescência, período marcado por importantes mudanças corporais e fisiológicas.

Palavras-chave: vitamina D, osteocalcina, leptina, insulina, obesidade, adolescente.

ABSTRACT

Giudici, KV. **Relationship between fat mass and bone: associations between vitamin D, osteocalcin, adipokines and glucose homeostasis among children and adolescents.** São Paulo; 2015. [Nutrition in Public Health Doctoral Thesis].

Introduction: Bone and adipose tissue interact and influence glucose homeostasis through the action of their products (leptin, adiponectin and osteocalcin). Vitamin D insufficiency can lead to metabolic alterations in both tissues. **Objectives:** To investigate the relationships between serum 25 hydroxivitamin D [25(OH)D], osteocalcin, adipokines, markers of glucose metabolism and nutritional status among children and adolescents. **Methods:** Cross-sectional study with 198 Brazilian (14 to 18 years old) and 318 American (8 to 13 years old) individuals. Blood was collected after 12-hour fasting to measure 25(OH)D, parathyroid hormone (PTH), carboxylated osteocalcin (cOC), adiponectin (A), total cholesterol, triglycerides, HDL-c, LDL-c and VLDL-c (Brazilian sample); total osteocalcin (tOC) (American sample); glucose, insulin, undercarboxylated osteocalcin (ucOC) and leptin (L) (both samples). Markers of glucose metabolism were calculated (HOMA-IR, HOMA- β and QUICKI). Among Brazilian individuals, physical activity level was determined and food intake was assessed by a 24-hour food record, repeated in 62.6% of the sample. **Results:** Brazilian population – Individuals with weight excess (42.6% from the total) presented lower serum 25(OH)D, adiponectin, cOC, ucOC, HDL-c and QUICKI, and higher PTH, leptin, LDL-c, VLDL-c, total cholesterol, triglycerides, insulin, HOMA-IR and HOMA- β , compared to normal weight individuals ($p < 0.05$). Serum 25(OH)D positively correlated with ucOC ($r = 0.326$; $p < 0.0001$), adiponectin ($r = 0.151$; $p = 0.034$) and HDL-c ($r = 0.323$; $p < 0.0001$), and negatively correlated with BMI ($r = -0.294$; $p < 0.0001$). The association between 25(OH)D and ucOC persisted after adjusting for age, BMI and season of the year (partial $R^2 = 0.071$, $p < 0.0001$), but none of them were related to markers of glucose metabolism. Strong correlations were observed between leptin and insulin ($r = 0.746$; $p < 0.0001$), HOMA-IR ($r = 0.720$; $p < 0.0001$), HOMA- β ($r = 0.703$; $p < 0.0001$) and QUICKI ($r = -0.749$; $p < 0.0001$). A/L ratio was lower among sedentary/insufficiently active subjects (2.2, SD=4.0 vs 5.6, SD=12.3; $p = 0.01$), compared to active/very active subjects. Serum 25(OH)D positively associated with vitamin D intake, after adjusting for sex, sun exposure and season of the year in regression analysis (partial $R^2 = 0.026$; $p = 0.02$). American population – Compared to normal weight individuals, those with weight

excess (43.1%) presented higher leptin, insulin, HOMA-IR and HOMA- β , and lower QUICKI ($p < 0.0001$ for all). Serum ucOC negatively correlated with leptin ($r = -0.162$; $p = 0.04$) and glucose ($r = -0.159$; $p = 0.04$), but only the association with leptin persisted after adjusting for age, sex and body fat mass percentage (partial $R^2 = 0.03$; $p = 0.0275$). Leptin concentrations were related with all markers of glucose metabolism, even after adjusting for age, sex and fat mass (insulin: partial $R^2 = 0.23$; glucose: partial $R^2 = 0.04$; HOMA-IR: partial $R^2 = 0.23$; HOMA- β : partial $R^2 = 0.09$; partial QUICKI: $R^2 = 0.23$, $p < 0.001$ for all). **Conclusions:** Results confirm the relationship between weight excess, leptin and markers of glucose metabolism among Brazilian and American children and adolescents. Serum 25(OH)D negatively correlated with BMI and leptin and positively correlated with ucOC. However, the relationship between osteocalcin and glucose homeostasis was not directly observed. Findings reinforce the importance of fighting obesity, especially during childhood and adolescence, ages in which important physiological alterations and body changes occur.

Descriptors: vitamin D, osteocalcin, leptin, insulin, obesity, adolescent.

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1. O EXCESSO DE PESO E O METABOLISMO DA GLICOSE NA INFÂNCIA E NA ADOLESCÊNCIA.....	28
1.1.1. Prevalências de Excesso de Peso e Obesidade no Brasil e no Mundo.....	28
1.1.2. Particularidades do Metabolismo da Glicose na Infância e na Adolescência.....	29
1.2. REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE DA GLICOSE A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE O TECIDO ÓSSEO E O TECIDO ADIPOSEO.....	30
1.2.1. O Tecido Ósseo.....	30
1.2.2. A Osteocalcina e a Homeostase da Glicose.....	31
1.2.3. A Leptina na Relação entre o Tecido Ósseo e a Homeostase da Glicose.....	32
1.3. INFLUÊNCIA DA VITAMINA D NA RELAÇÃO ENTRE O OSSO, O TECIDO ADIPOSEO E O METABOLISMO DA GLICOSE.....	34
1.3.1. Vitamina D e Alterações Metabólicas.....	34
1.3.2. O <i>Status</i> de Vitamina D e a Obesidade.....	38
1.4. JUSTIFICATIVA.....	40
1.5. HIPÓTESES.....	41
2. OBJETIVOS.....	42
2.1. OBJETIVO GERAL.....	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3. MÉTODOS.....	43
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	43
4.2. LOCAL E POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	43
4.2.1. População Brasileira.....	43
4.2.2. População Norte-Americana.....	43
4.3. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE E FORMAÇÃO DA AMOSTRA.....	44
4.3.1. Critérios de Não-Inclusão.....	44
4.3.2. Formação das Amostras Populacionais.....	44
4.4. ASPECTOS ÉTICOS.....	46
4.5. VARIÁVEIS DE ESTUDO E INSTRUMENTOS DE MEDIDA.....	47
4.5.1. Variáveis Sociodemográficas.....	47
4.5.2. Variáveis Antropométricas e seus Métodos de Mensuração.....	47
4.5.2.1. População Brasileira.....	47

4.5.2.2. População Norte-Americana.....	48
4.5.3. Variáveis Bioquímicas e seus Métodos de Mensuração.....	48
4.5.3.1. População Brasileira.....	49
4.5.3.2. População Norte-Americana.....	52
4.5.4. Prática de Atividade Física.....	52
4.5.5. Exposição Solar.....	52
4.5.6. Ingestão Alimentar.....	53
4.5.7. Resumo das Variáveis do Estudo.....	54
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. ARTIGO 1 – <i>Vitamin D status and glucose metabolism in youth</i>	59
5.2. ARTIGO 2 – <i>Relationships between bone and fat: associations between vitamin D, osteocalcin, adipokines and markers of glucose metabolism among adolescents</i>	78
5.3. ARTIGO 3 – <i>Osteocalcin, leptin and energy metabolism in American children</i>	102
5.4. ARTIGO 4 – <i>Lifestyle factors and dietary vitamin D intake: relationships with vitamin D status and adipokines among adolescents</i>	123
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	146
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
ANEXOS.....	167
ANEXO 1. Autorização de Uso da Figura Extraída de WOLF (2008).....	168
ANEXO 2. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP/USP.....	170
ANEXO 3. Carta de Aprovação da Diretoria do Centro de Saúde para Coleta de Dados.....	172
ANEXO 4. Carta de Aprovação para Uso dos Dados do Estudo ISA.....	173
ANEXO 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	174
ANEXO 6. Questionário Sócio-Demográfico.....	176
ANEXO 7. Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ).....	182
ANEXO 8. Questionário de Exposição Solar.....	186
ANEXO 9. Recordatório Alimentar de 24 Horas / Formulário Antropométrico.....	187
ANEXO 10. Comprovante de Submissão do Artigo 2.....	188
ANEXO 11. Comprovante de Submissão do Artigo 3.....	189
CURRÍCULO LATTES.....	190
Kelly Virecoulon Giudici.....	190
Prof ^a Dr ^a Lúgia Araújo Martini.....	191

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.	Mecanismo de ação proposto para a interação entre o osso, o tecido adiposo e o metabolismo da glicose. Figura extraída de WOLF (2008) (uso autorizado).....	34
------------------	---	----

MÉTODOS

Figura 2.	Fluxograma de seleção dos participantes do estudo brasileiro. São Paulo, 2015.....	45
Figura 3.	Fluxograma de seleção dos participantes do estudo norte-americano. São Paulo, 2015.....	46
Tabela 1.	Valores de referência para <i>status</i> de vitamina D utilizados no estudo. São Paulo, 2015.....	51
Tabela 2.	Resumo das variáveis do estudo. São Paulo, 2015.....	55

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1

Table 1.	Included studies: study design, country, population, sex, age and sample size.....	77
-----------------	--	----

ARTIGO 2

Table 1.	Anthropometric and biochemical characterization of adolescents according to sex and nutritional status.....	96
Table 2.	Pearson's correlation coefficients between markers of glucose metabolism and 25 hydroxyvitamin D, osteocalcin and adipokines among adolescents.....	97
Figure 1.	Linear regression analyses of 25 hydroxyvitamin D with (A) carboxylated osteocalcin, (B) undercarboxylated osteocalcin, (C) adiponectin, (D) leptin, (E) HDL-cholesterol, (F) total cholesterol, (G) parathyroid hormone and (H) waist circumference adjusted for body mass index and age among adolescents.....	98
Figure 2.	Linear regression analysis of undercarboxylated osteocalcin and adiponectin adjusted for body mass index and age among adolescents.....	100

Figure 3.	Boxplots with mean values for (A) HOMA-IR, (B) HOMA- β , (C) insulin and (D) QUICKI according to leptin quartiles among adolescents. P-values for differences between first quartile (Q1) and fourth quartile (Q4). HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment Estimate of Insulin Resistance; HOMA- β : Homeostasis Model Assessment Estimate of β -Cell Function; QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index.....	101
------------------	--	-----

ARTIGO 3

Table 1.	Anthropometric and biochemical characterization of the population according to sex and race.....	119
Table 2.	Analysis of Pearson's correlation and partial correlation of osteocalcin with biochemical and anthropometric variables.....	120
Figure 1.	Regression analyses between undercarboxylated osteocalcin and (A) glucose and (B) leptin adjusted for age, sex and fat mass percentage among American children. N.S. = not significant.....	121
Figure 2.	Regression analyses between leptin and (A) serum insulin, (B) HOMA-IR, (C) HOMA- β , (D) QUICKI and (E) serum glucose adjusted for age, sex and fat mass percentage among American children.....	122

ARTIGO 4

Table 1.	Characterization of the studied sample according to physical activity level.....	143
Table 2.	Sun exposure habits and physical activity level according to sex among Brazilian adolescents.....	144
Figure 1.	Linear regression analysis of vitamin D intake and serum 25 hydroxyvitamin D adjusted for sex, sun exposure and season of the year among adolescents.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25 dihidroxivitamina D / <i>1α,25 dihydroxyvitamin D</i> / calcitriol
24,25(OH) ₂ D ₃	24,25 dihidroxivitamina D / <i>24,25 dihydroxyvitamin D</i>
25(OH)D	25 hidroxivitamina D / <i>25 hydroxyvitamin D</i> / calcidiol
μ g	Micrograma / <i>microgram</i>
χ^2	Qui-quadrado / <i>chi-square</i>
°C	Graus Celsius / <i>degrees Celsius</i>
A	Adenina / <i>adenine</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
A/L	Razão adiponectina / leptina / <i>Adiponectin / leptin ratio</i>
ATP	Adenosina trifosfato / <i>adenosine triphosphate</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
C	Citosina / <i>cytosine</i>
CC	Circunferência de cintura
C/EBP α	Proteína α intensificadora de ligação a CCAAT / <i>CCAAT enhancer binding protein α</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / <i>National Counsel of Technological and Scientific Development</i>
cm	Centímetro / <i>centimeter</i>
cOC	Osteocalcina carboxilada / <i>carboxylated osteocalcin</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQ	Circunferência de quadril
CS	Centro de Saúde Escola Geraldo Horácio de Paula Souza
DBP	Proteína ligadora da vitamina D / <i>Vitamin D binding protein</i>
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
DIfE	<i>German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke</i>
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 / <i>type 2 diabetes mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>deoxyribonucleic acid</i>
DOI	<i>Digital object identifier</i>
DP	Desvio-padrão
DXA	Densitometria óssea / <i>dual-energy x-ray absorptiometry</i>
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético / <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESP	<i>Osteotesticular phosphatase gene</i>
ESP–/–	Genótipo homozigoto para ausência da expressão do gene <i>ESP</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo / <i>São Paulo Research Foundation</i>
FM	Faculdade de Medicina / <i>School of Medicine</i>
FSP	Faculdade de Saúde Pública / <i>School of Public Health</i>
g	Grama / <i>gram</i>
G	Guanina / <i>guanine</i>
GH	Hormônio do crescimento / <i>growth hormone</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica / <i>hypertension</i>
HC	Hospital das Clínicas
HC	<i>Hip circumference</i>
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade / <i>high density lipoprotein cholesterol</i>
HOMA- β	Índice de estimativa da função de células β -pancreáticas / <i>Homeostasis model assessment estimate for β cell function</i>
HOMA-IR	Índice de estimativa de resistência à insulina / <i>Homeostasis model assessment estimate for insulin resistance</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IA	<i>Insufficiently active</i>
ICV	Intracerebroventricular
IMC	Índice de massa corporal
InsR	Receptor de insulina / <i>insulin receptor</i>
<i>InsR</i>	Gene do receptor de insulina / <i>insulin receptor gene</i>
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
IPAQ	Questionário Internacional de Atividade Física / <i>International Physical Activity Questionnaire</i>
ISA	Inquérito de Saúde do Município de São Paulo / <i>Health Survey – São Paulo</i>
IU	<i>International unit</i>
IU	<i>Indiana University</i>
kcal	Quilocaloria / <i>kilocalorie</i>
kg	Quilograma / <i>kilogram</i>
L	Litro / <i>liter</i>
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade / <i>low density lipoprotein cholesterol</i>
LEPR	Receptor da leptina / <i>leptin receptor</i>

LEPR	Gene do receptor da leptina / <i>leptin receptor gene</i>
LILACS	Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde / <i>Latin American and Caribbean Health Sciences Literature</i>
LOI	Liga de Obesidade Infantil
m	Metro / <i>meter</i>
m ²	Metro ao quadrado / <i>square meter</i>
M	Média / <i>mean</i>
mL	Mililitro / <i>milliliter</i>
mm	Milímetro / <i>millimeter</i>
MPM	<i>Multiple Pass Method</i>
MSM	<i>Multiple Source Method</i>
mU	Miliunidades / <i>milliunits</i>
NDSR	<i>Nutrition Data System for Research</i>
NEPA	Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação
NFκB	Fator nuclear kappa B / <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	Nanograma / <i>nanogram</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Study</i>
nmol	Nanomol
NS	<i>Not significant</i>
ob/ob	Genótipo homozigoto para ausência da expressão do gene da leptina
OC	Osteocalcina / <i>osteocalcin</i>
OC	Gene da osteocalcina / <i>osteocalcin gene</i>
OC ^{-/-}	Genótipo homozigoto para ausência da expressão do gene da osteocalcina
OC ^{+/-}	Genótipo heterozigoto para a expressão parcial do gene da osteocalcina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OST-PTP	<i>Osteotesticular protein tyrosine phosphatase</i>
PAL	<i>Physical activity level</i>
pg	Picograma / <i>picogram</i>
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR-γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ / <i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTH	Paratormônio / <i>parathyroid hormone</i>
PTP-1B	<i>Protein tyrosine phosphatase 1B</i>
PU	<i>Purdue University</i>

QUICKI	Índice de estimativa da sensibilidade à insulina / <i>Quantitative insulin sensitivity check index</i>
r	Coeficiente de correlação de Pearson
R ²	Coeficiente de regressão
R24h	Recordatório Alimentar de 24 horas / <i>24-hour food recall</i>
Rβ2	Receptor adrenérgico do tipo beta 2
RANK	Receptor ativador de NFκB / <i>receptor activator of NFκB</i>
RANKL	Ligante do receptor ativador de NFκB / <i>receptor activator of the NFκB ligand</i>
RIA	Radioimunoensaio / <i>radioimmunoassay</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro / <i>Messenger ribonucleic acid</i>
rpm	Rotações por minuto / <i>revolutions per minute</i>
rs	<i>Reference single nucleotide polymorphism identification number</i>
RXR	Receptor X do ácido retinoico / <i>retinoid X receptor</i>
SAS	<i>Statistical Analysis Software</i>
SciELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único / <i>single nucleotide polymorphism</i>
SP	São Paulo
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T	Timina / <i>thymine</i>
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TC	<i>Total cholesterol</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNFα	Fator de necrose tumoral alpha / <i>tumor necrosis factor alpha</i>
tOC	Osteocalcina total / <i>total osteocalcin</i>
ucOC	Osteocalcina não-carboxilada / <i>undercarboxylated osteocalcin</i>
UGA	<i>University of Georgia</i>
UI	Unidade internacional
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USA	<i>United States of America</i>
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos / <i>United States Department of Agriculture</i>

USDHHS	<i>United States Department of Health and Human Services</i>
USP	Universidade de São Paulo / <i>University of São Paulo</i>
UV	Ultravioleta
VA	<i>Very active</i>
VDR	Receptor da vitamina D / <i>vitamin D receptor</i>
VDR	Gene do receptor da vitamina D / <i>vitamin D receptor gene</i>
VDRE	Elemento de resposta à vitamina D / <i>vitamin D response element</i>
VLDL-c	Lipoproteína de muito baixa densidade / <i>very low density lipoprotein cholesterol</i>
WBISI	Índice de sensibilidade à insulina corporal / <i>whole body insulin sensitivity index</i>
WC	<i>Waist circumference</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese é apresentada no formato de artigos científicos, de acordo com a deliberação da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) em sua sessão 9ª/2008 de 05/06/2008, respeitando as normas de apresentação de teses defendidas na FSP e publicadas no Guia de Apresentação de Teses da FSP/USP. Foram analisadas duas amostras populacionais distintas, sendo uma delas composta por adolescentes brasileiros, e a outra por crianças e adolescentes norte-americanos, fruto do período de estágio de pesquisa no exterior (“doutorado-sanduíche”) realizado junto ao *Nutrition Science Department* da *College of Health and Human Sciences* da *Purdue University*, localizada em *West Lafayette*, Indiana, Estados Unidos, sob a supervisão da Profª Drª Connie M. Weaver.

Este documento está organizado segundo as seções: **(1) Introdução** – contempla uma revisão da literatura acerca do assunto. São abordados nesta seção: O excesso de peso e o metabolismo da glicose na infância e na adolescência; Regulação da homeostase da glicose a partir da interação entre o tecido ósseo e o tecido adiposo; Influência da vitamina D na relação entre o osso, o tecido adiposo e o metabolismo da glicose; Justificativa e Hipóteses do estudo; **(2) Objetivos** do estudo; **(3) Métodos** – apresenta um detalhamento rigoroso dos procedimentos empregados na coleta, tratamento e análise de dados; **(4) Resultados e Discussão** – são estruturados em quatro manuscritos, sendo um artigo de revisão da literatura e três artigos originais, os quais contêm todos os produtos das análises estatísticas e suas respectivas discussões, comparando-os aos achados da literatura. Tais artigos são apresentados no idioma original de publicação nos respectivos periódicos científicos aos quais foram ou serão submetidos (inglês); **(5) Considerações finais** – apresenta a síntese das principais contribuições do estudo para o meio científico e para o campo da Saúde Pública; **(6) Referências bibliográficas** consultadas para a elaboração do estudo; **Anexos** – questionários utilizados para a coleta de dados e demais documentos de interesse; Primeira página do **Currículo Lattes** da autora e de sua orientadora.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O EXCESSO DE PESO E O METABOLISMO DA GLICOSE NA INFÂNCIA E NA ADOLESCÊNCIA

1.1.1. Prevalências de Excesso de Peso e Obesidade no Brasil e no Mundo

A infância e a adolescência correspondem a ciclos da vida nos quais profundas modificações no crescimento e maturação do ser humano ocorrem, dentre elas variações de diferentes magnitudes e velocidades nas proporções corporais, na massa óssea e na relação entre tecido adiposo e muscular (TRAVERS *et al.*, 1995). Tais períodos são caracterizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) por durar até os 9 anos (infância), e dos 10 aos 19 anos (adolescência) (WHO, 1995). A correlação entre sobrepeso de pais e filhos é forte, e decorre do compartilhamento de fatores hereditários, ambientais ou de uma interação de ambos (FONSECA *et al.*, 1998). Deste modo, reflexo do que é observado na população geral, a prevalência de sobrepeso e obesidade vem crescendo também entre as crianças e os adolescentes (NG *et al.*, 2014). Tal condição sabidamente aumenta a probabilidade de que o indivíduo se torne um adulto obeso (MALINA e BOUCHARD, 1991), sujeito a toda a gama de alterações metabólicas para a qual a obesidade é fator de risco (LOBSTEIN *et al.*, 2004).

Uma compilação de estudos mostrou que a proporção de indivíduos adultos com excesso de peso (sobrepeso ou obesidade) no mundo cresceu de 28,8% em 1980 para 36,9% em 2013 em homens, e de 29,8% para 38,0% em mulheres. A prevalência de excesso de peso em crianças e adolescentes de países desenvolvidos variou de 16,9% (meninos) e 16,2% (meninas) em 1980 para 23,8% (meninos) e 22,6% (meninas) em 2013. Em relação à população jovem de países em desenvolvimento também foi observado aumento, tendo a proporção de crianças e adolescentes com excesso de peso evoluído de 8,1% (meninos) e 8,4% (meninas) em 1980 para 12,9% (meninos) e 13,4% (meninas) em 2013 (NG *et al.*, 2014).

Estima-se que atualmente a prevalência mundial de obesidade em adultos seja de 10,7% (homens) e 15,2% (mulheres), sendo maior em países ocidentais como os Estados Unidos (32,6% e 34,7%, respectivamente) (WHO, 2015). No Brasil, entre 1975 e 2009, as prevalências de obesidade em crianças de 5 a 9 anos saltaram de 2,9% para 16,6% em meninos, e de 1,8% para 11,8% em meninas. Dentre os adolescentes, no mesmo período,

foi observada uma transição de 0,4% para 5,9% dentre o sexo masculino, e de 0,7% para 4,0% dentre o sexo feminino. Dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009 revelaram que 33,5% das crianças de 5 a 9 anos apresentavam excesso de peso, enquanto 14,3% estavam na faixa de obesidade. Dentre os adolescentes, 20,5% apresentam excesso de peso e 4,9%, obesidade (BRASIL, 2010).

Tal aumento nas prevalências de sobrepeso e obesidade entre as parcelas mais jovens da população contribuem também para que doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) antes diagnosticadas somente em adultos e idosos atualmente acometam também crianças e adolescentes: trata-se de alterações no perfil lipídico (dislipidemias), no metabolismo da glicose (*diabetes mellitus*) e na função pulmonar; problemas posturais e distúrbios psicológicos como baixa autoestima, depressão e/ou transtornos do comportamento alimentar (LOBSTEIN *et al.*, 2004). Tais doenças, associadas, fazem dos jovens um público relativamente recente para o diagnóstico de síndrome metabólica, cuja prevalência em estudos a respeito varia de 4% a 30% (BUENO *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2007).

1.1.2. Particularidades do Metabolismo da Glicose na Infância e na Adolescência

O excesso de adiposidade é um forte determinante para alterações na secreção e na sensibilidade à insulina, especialmente segundo a sua distribuição no corpo: o tecido adiposo visceral, assim como a gordura intramiocelular, relaciona-se a um maior risco para o desenvolvimento de resistência à insulina em crianças e adolescentes obesos (WEISS *et al.*, 2003). FAZELI FARSANI *et al.* (2013), em uma revisão sistemática com 37 estudos de base populacional com crianças e adolescentes, identificaram taxas de incidência de *diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2) variando de 0 a 330 por cada 100.000 indivíduos/ano, enquanto prevalências para essa doença variaram de 0 a 5.300 a cada 100.000 indivíduos, sendo os maiores índices observados entre os norte-americanos.

Elevada glicemia de jejum e intolerância à glicose são indícios de anormalidades no metabolismo da glicose que podem levar ao desenvolvimento do DM2. Embora este mecanismo seja válido tanto para crianças e adolescentes quanto para adultos, alguns estudos mostram que a desregulação no metabolismo da glicose pode avançar mais rapidamente nos mais jovens, possivelmente devido a fatores relacionados ao desenvolvimento corporal. Apesar de diversos outros fatores de risco independentes (como etnia e genética) e da resistência à insulina puberal transiente, no caso dos

adolescentes (a qual parece ser um fenômeno natural necessário para o crescimento e maturação, e que é naturalmente revertido com o tempo), sugere-se que os jovens tenham menor capacidade das células β -pancreáticas em compensar a resistência à insulina, por meio do aumento da sua secreção (GORAN *et al.*, 2003). Uma possível explicação para este fato seriam as grandes quantidades circulantes de hormônio do crescimento (*growth hormone* – GH) nesta faixa etária, uma vez que a terapia com este hormônio em adolescentes não-deficientes em GH foi associada à deterioração na ação insulínica (ADA, 2000; HANNON *et al.*, 2007).

Ademais, o sedentarismo ou a pouca prática de atividade física, juntamente a hábitos alimentares inadequados – comportamentos estes observados com frequência em populações do mundo todo – também devem ser considerados contribuintes para o estado de intolerância à glicose. Em contrapartida, a prática regular de atividade física pode reduzir o risco para desenvolvimento de DM2 por meio de melhora na resistência periférica à insulina, melhora do condicionamento cardiovascular e pelo favorecimento da perda de peso corporal e redução da quantidade de gordura visceral (DUNCAN *et al.*, 2003; GIANNINI e CAPRIO, 2013).

Assim, a soma de elementos que afetam uma criança ou adolescente com predisposição genética para a resistência à insulina, exposta a fatores de risco ambientais e à carga adicional da resistência à insulina puberal transiente, pode contribuir para a evolução de um estado de compensação hiperinsulinêmico (capaz de manter a tolerância à glicose) para um quadro de inadequada secreção insulínica e intolerância à glicose que, mantido além da puberdade, pode resultar no desenvolvimento do DM2 (ADA, 2000).

1.2. REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE DA GLICOSE A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE O TECIDO ÓSSEO E O TECIDO ADIPOSO

1.2.1. O Tecido Ósseo

Embora o crescimento dimensional dos ossos cesse na idade adulta, o tecido ósseo encontra-se em constante renovação por um processo metabólico descrito como remodelamento ósseo, o qual consiste em um equilíbrio entre reabsorção e formação óssea (MATKOVIC *et al.*, 1994; IOM, 1997). Tais atividades são realizadas por tipos celulares distintos, sendo a formação óssea realizada pelos osteoblastos, e a reabsorção exercida pelos osteoclastos (TEITELBAUM, 2000). Estima-se que, a cada momento,

cerca de 5% das superfícies ósseas estejam em processo de remodelação (IOM, 1997), e que, como resultado desta atividade, a maior parte do esqueleto de um adulto se renova a cada década (USDHHS, 2004). O fato de que a formação e a reabsorção do tecido ósseo ocorrem simultaneamente em diferentes locais sugere que a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos esteja sob controle endócrino (WOLF, 2008).

Nas últimas décadas, houve um considerável aumento de interesse nas pesquisas a respeito do papel do tecido ósseo como um órgão endócrino e de sua interação com outros tecidos, dentre eles o tecido adiposo. Se antes o esqueleto era tido como um tecido inerte, de função majoritariamente de sustentação, o fato de que tanto osteoblastos quanto adipócitos são originários de células-tronco mesenquimais e a observação de que distúrbios no metabolismo da glicose e dos lipídios (como *diabetes mellitus* e síndrome de *Cushing*) alteram o tecido ósseo serviram de suporte para a investigação da existência de suas funções extra-estruturais e de sua relação com outros tecidos (KAWAI *et al.*, 2009).

1.2.2. A Osteocalcina e a Homeostase da Glicose

A osteocalcina (OC), uma proteína óssea secretada por osteoblastos e identificada pela primeira vez na década de 1970 por dois grupos de pesquisa independentes (HAUSCHKA *et al.*, 1975; PRICE *et al.*, 1976), mostrou-se chave na interação do tecido ósseo com o tecido adiposo e a homeostase da glicose. A osteocalcina circulante é encontrada em frações carboxiladas (cOC) e não-carboxiladas (ucOC). Sua carboxilação é dependente de vitamina K (WOLF, 2008), e enquanto a fração carboxilada possui maior afinidade pela hidroxiapatita (composto mineral insolúvel formado principalmente por cálcio e fosfato, que forma a estrutura óssea) e está possivelmente relacionada à regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos (NEVE *et al.*, 2013), a fração não-carboxilada apresenta efeitos extra-ósseos, sendo capaz de promover a expressão de adiponectina, uma adipocina capaz de estimular o uso da glicose e a oxidação de ácidos graxos em células musculares e de aumentar a sensibilidade à insulina no fígado e em outros tecidos (DÍEZ e IGLESIAS, 2003), além de estimular a proliferação de células β -pancreáticas e aumentar a secreção de insulina (LEE *et al.*, 2007; FERRON *et al.*, 2008).

LEE *et al.* (2007) observaram que, mesmo sem demonstrar qualquer alteração óssea, camundongos que não expressavam o gene para osteocalcina (OC^{-/-}) eram

obesos, hiperglicêmicos, hipoinsulinêmicos, e apresentavam reduzida sensibilidade à insulina e menor gasto energético em relação aos animais controle. Da mesma forma, osteoblastos isolados destes animais (*OC*^{-/-}) foram incapazes de exercer os efeitos supracitados sobre adipócitos e células β -pancreáticas (LEE *et al.*, 2007). Reciprocamente, a infusão de osteocalcina em camundongos *wild-type* promoveu um aumento nas concentrações sanguíneas dessa proteína e melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (FERRON *et al.*, 2008). Outras evidências mostraram ainda que camundongos tratados com injeções intermitentes de osteocalcina apresentaram um aumento na quantidade de mitocôndrias no músculo esquelético, maior gasto energético e proteção contra obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica. Ademais, quadros de esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica foram completamente revertidos em camundongos tratados com osteocalcina diariamente (FERRON *et al.*, 2012).

Estudos experimentais mostraram que o controle da reação de carboxilação da osteocalcina envolve também o produto da expressão do gene *ESP*, chamado *osteotesticular protein tyrosine phosphatase* (OST-PTP) (LEE *et al.*, 2007; FERRON *et al.*, 2010). Observou-se que animais que não expressam este gene (*ESP*^{-/-}) apresentaram cerca de 15% menos osteocalcina ligada à hidroxiapatita, maior sensibilidade à insulina e resistência à obesidade, fenótipo oposto ao de animais que não expressam o gene da osteocalcina (*OC*^{-/-}). Entretanto, ao se deletar um alelo do gene da osteocalcina em animais com este genótipo (*ESP*^{-/-}, *OC*^{+/-}), promoveu-se redução nas quantidades de osteocalcina total (tOC) (e, por consequência, também de sua fração não-carboxilada), observando-se um fenótipo normal. Ademais, camundongos que super-expressam o *ESP* em osteoblastos apresentaram fenótipo idêntico àqueles *OC*^{-/-}, com menor proliferação das células β -pancreáticas, hipoinsulinemia pós-prandial e menores concentrações séricas de adiponectina (LEE *et al.*, 2007).

1.2.3. A Leptina na Relação entre o Tecido Ósseo e a Homeostase da Glicose

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo, identificado pela primeira vez em 1994 (ZHANG *et al.*, 1994), e desde então conhecido por seus efeitos no controle da saciedade, na termogênese e na regulação do peso corporal (FLIER, 1998). Embora no início considerada um hormônio anti-obesogênico devido a experimentos que demonstraram que camundongos deficientes em seu gene (*ob/ob*) eram obesos, e que este fenótipo podia ser corrigido com a administração de leptina

(HALAAS *et al.*, 1995; PELLYMOUNTER *et al.*, 1995), estudos constataram que o ganho de peso corporal não é satisfatoriamente controlado por esta adipocina, uma vez que a resistência à leptina afeta a vasta maioria de animais e indivíduos com excesso de peso, os quais tornam-se insensíveis à hiperleptinemia (FLIER, 1998; PARK e AHIMA, 2015). Outras potentes ações metabólicas desta adipocina, entretanto, foram descobertas. Verificou-se que a leptina é também capaz, por meio de regulação do sistema nervoso central (SNC), de interagir com o tecido ósseo, impactando a formação óssea e a homeostase da glicose (DUCY *et al.*, 2000; CONFAVREUX *et al.*, 2009). Secretada em demasia por pessoas com excesso de peso ou obesidade, a leptina inibe a formação óssea e favorece a reabsorção óssea, agindo inicialmente no hipotálamo e dando início a uma cascata de reações metabólicas (DUCY *et al.*, 2000).

Estudos com animais que receberam uma infusão intracerebroventricular (ICV) de leptina observaram que a expressão hipotalâmica de seu receptor (LEPR) promove a liberação de noradrenalina (também chamada norepinefrina) pelas células da medula adrenal, o que por sua vez ativa os receptores adrenérgicos do tipo $\beta 2$ ($R\beta 2$) em osteoblastos. Esta ativação diminui a atividade destas células, levando a um consequente aumento na perda de massa óssea (DUCY *et al.*, 2000; TAKEDA *et al.*, 2002; ELEFTERIOU *et al.*, 2004, 2005; PATEL e ELEFTERIOU, 2007; BONNET *et al.*, 2008; TAKEDA e KARSENTY, 2008). Resultados semelhantes foram observados em animais tratados com agonistas de $R\beta 2$ (ELEFTERIOU *et al.*, 2005; BONNET *et al.*, 2008; TAKEDA e KARSENTY, 2008), o que reforça a importância da estimulação adrenérgica neste processo. Por meio de estimulação hipotalâmica, a leptina também induz um aumento das reações de carboxilação da osteocalcina, por meio da expressão do gene *ESP* nos osteoblastos (HINOI *et al.*, 2008), diminuindo assim a biodisponibilidade extra-óssea desta proteína. Menores concentrações de osteocalcina não-carboxilada, por sua vez, resultam na redução da expressão de adiponectina, prejudicando a homeostase da glicose.

Embora evidências *in vitro* e modelos experimentais com animais mostrem a existência deste elegante mecanismo endócrino conectando o tecido adiposo e o osso, resumido na **Figura 1**, deve-se destacar que o *ESP* não é expresso em humanos. Entretanto, já foi observado que uma proteína encontrada em humanos, chamada *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP-1B) apresenta efeitos análogos à OST-PTP, proteína transcrita pelo gene *ESP* em animais (FERRON *et al.*, 2010). Ademais, correlações inversas entre a concentração sérica de osteocalcina e a glicemia foram observadas em

humanos: em idosos norte-americanos, as concentrações de osteocalcina total foram inversamente associadas às concentrações de glicose e insulina de jejum. Ademais, um acompanhamento destes indivíduos por três anos mostrou que maiores concentrações de tOC foram associadas a um menor aumento na glicemia de jejum (PITTAS *et al.*, 2009). ZHOU *et al.* (2009) observaram associações inversas entre as concentrações séricas de osteocalcina total e de glicose em indivíduos chineses, sendo as concentrações de tOC menores dentre aqueles com DM2, após ajustes para idade, sexo e IMC. Resultados similares foram observados em estudos com adultos e idosos japoneses com DM2 (KANAZAWA *et al.*, 2009) e com idosos suecos com e sem DM2 (KINDBLOM *et al.*, 2009).

Figura 1. Mecanismo de ação proposto para a interação entre o osso, o tecido adiposo e o metabolismo da glicose. Figura extraída de WOLF (2008) (uso autorizado – **Anexo 1**).

1.3. INFLUÊNCIA DA VITAMINA D NA RELAÇÃO ENTRE O OSSO, O TECIDO ADIPOSE E O METABOLISMO DA GLICOSE

1.3.1. Vitamina D e Alterações Metabólicas

A vitamina D é obtida por meio da ingestão alimentar (vitaminas D₂ – ergocalciferol e D₃ – colecalciferol) e por produção endógena na pele (vitamina D₃) a

partir da exposição à luz solar. Estimulada pela radiação ultravioleta (UV), a molécula de 7-deidrocolesterol é convertida a pré-vitamina D₃ pela ação da enzima 7-deidrocolesterol redutase no tecido cutâneo, sendo imediatamente convertida a vitamina D₃ por um processo dependente de calor. Esta vitamina é então transportada conectada à proteína ligadora de vitamina D (*vitamin D binding protein* – DBP) e passa por duas sucessivas hidroxilações para se tornar ativa: primeiramente no fígado, onde a ação da enzima 25 hidroxilase a converte em 25 hidroxivitamina D [25(OH)D, o metabólito mais abundante na circulação] e posteriormente nos rins, onde é convertida a 1 α ,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D₃, ou calcitriol, sua forma ativa], pela ação da enzima 1 α -hidroxilase, podendo ainda ser convertida a 24,25 dihidroxivitamina D [24,25(OH)₂D₃, um metabólito inativo] pela enzima 24-hidroxilase (HOLICK, 2007).

A 1,25(OH)₂D₃ é um hormônio fundamental para a homeostase do cálcio, favorecendo sua absorção intestinal e sua retenção renal. Nas células, a 1,25(OH)₂D₃ liga-se à porção hidrofóbica de seu receptor nuclear (VDR) formando um complexo heterodimerizado com o receptor X do ácido retinoico (RXR) (SUTTON e MACDONALD, 2003). Este complexo se acopla a sequências específicas de nucleotídeos no DNA, conhecidas como elementos de resposta à vitamina D (VDRE), modulando positiva ou negativamente a transcrição de diversos genes, dentre eles os genes da leptina (negativamente) (KANEKO *et al.*, 2015) e da osteocalcina (positivamente) (WOLF, 1996; CARVALLO *et al.*, 2008).

No gene da osteocalcina, o VDRE localizado na região promotora distal leva à ativação de diversos mecanismos que aumentam a sua transcrição, como a reorganização da cromatina, a facilitação de interações entre os domínios regulatórios proximais e distais, e o recrutamento de moléculas co-ativadoras (NEVE *et al.*, 2013). Ademais, foi demonstrado em osteoblastos clonados que a vitamina D atua também na regulação da expressão gênica da osteocalcina em um nível pós-transcricional, estabilizando seu RNAm (MOSAVIN e MELLON, 1996). Reciprocamente, as concentrações séricas de 25(OH)D e de tOC se correlacionaram positivamente em um estudo com crianças e adolescentes obesos (GARANTY-BOGACKA *et al.*, 2013) e, em adultos obesos, ambas se correlacionaram positivamente à porcentagem de massa magra (FORNARI *et al.*, 2015).

SUKUMAR *et al.* (2015) demonstraram que um aumento nas concentrações de 25(OH)D após suplementação de vitamina D, associado à perda de peso por restrição calórica, em um grupo de mulheres com sobrepeso ou obesidade influenciaram as

concentrações de osteocalcina total. Por outro lado, a suplementação de vitamina D não teve efeito sobre as concentrações de osteocalcina em estudo com crianças e adolescentes de 8 a 14 anos (RAJAKUMAR *et al.*, 2015). Ressalta-se, também, que a influência da vitamina D sobre a secreção de osteocalcina possa variar de acordo com polimorfismos para o gene do VDR, conforme demonstrado em estudo *in vitro* com osteoblastos humanos estimulados com calcitriol (NAVES *et al.*, 2003).

Diversos órgãos e tecidos além do osso – dentre eles fígado, pâncreas, cérebro, pulmão, mamas, pele, tecido adiposo e músculos – expressam o gene para VDR (HOLICK, 2007), razão pela qual, além das anormalidades ósseas, a deficiência de vitamina D está associada a uma série de alterações metabólicas (KIM *et al.*, 2010). Uma vez identificada a presença do VDR no pâncreas, o papel da vitamina D na homeostase da glicose tornou-se alvo de investigação. Estudos *in vitro* mostraram que a vitamina D é capaz de regular positivamente a transcrição do gene do receptor de insulina (*InsR*) e de melhorar o transporte de glicose estimulado por insulina (MAESTRO *et al.*, 2000, 2002).

Em contrapartida, outras evidências sugerem mecanismos pelo qual a insuficiência e a deficiência de vitamina D possam contribuir para a resistência à insulina: distúrbios no eixo cálcio-paratormônio (PTH) causado por menores quantidades circulantes de 25(OH)D podem favorecer condições de hipocalcemia, que por sua vez é capaz de reduzir a secreção de insulina após estímulo por glicose (BEAULIEU *et al.*, 1993). Paralelamente, maiores concentrações de PTH reduzem a sensibilidade à insulina e a captação de glicose em adipócitos (CHANG *et al.*, 2009) e em células musculares (BACZYNSKI *et al.*, 1985).

Em indivíduos não-diabéticos, as concentrações de 25(OH)D foram positivamente associadas à adiponectina e inversamente associadas a parâmetros de resistência à insulina (LIU *et al.*, 2009). Um outro estudo mostrou que concentrações de 25(OH)D foram inversamente correlacionadas com resistência a insulina, triglicérides e glicemia de jejum em homens norte-americanos (PINELLI *et al.*, 2010). Dados de 5.867 adolescentes de 12 a 19 anos dos três ciclos do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) (2001–2002, 2003–2004, e 2005–2006) mostraram uma associação inversa entre concentrações séricas de 25(OH)D e os valores de HOMA-IR, todavia a associação com glicemia de jejum não foi observada (GANJI *et al.*, 2011).

Embora a adiposidade seja um importante determinante tanto para o inadequado *status* de vitamina D como para anormalidades na homeostase da glicose, a relação entre

estes parâmetros manteve-se estatisticamente significativo em diversos estudos, mesmo após as análises terem sido ajustadas para medidas de adiposidade (DELVIN *et al.*, 2010; JOHNSON *et al.*, 2010; GARANTY-BOGACKA *et al.*, 2011; KELLY *et al.*, 2011; PARIKH *et al.*, 2012). Apesar destes achados, os resultados acerca da relação entre o *status* de vitamina D e a homeostase da glicose mostram-se inconsistentes na literatura. POOMTHAVORN *et al.* (2012) não encontraram associações entre as concentrações séricas de 25(OH)D e HOMA-IR, índice de sensibilidade à insulina corporal (*whole body insulin sensitivity index* – WBISI), insulina de jejum ou glicemia de jejum em adolescentes obesos, similarmente a outros estudos (FERRAREZI *et al.*, 2012; ERDÖNMEZ *et al.*, 2011).

Estudos que avaliaram os efeitos da suplementação de vitamina D no metabolismo da glicose em jovens são escassos. ASHRAF *et al.* (2011), após avaliar a relação entre 25(OH)D e componentes da síndrome metabólica em adolescentes obesos, suplementou um subgrupo de 14 meninas deficientes em vitamina D. Após a intervenção, observou-se apenas uma tendência para melhora na glicemia de jejum. BELENCHIA *et al.* (2013), por sua vez, suplementaram 35 adolescentes obesos deficientes em vitamina D com 4.000 UI/dia de colecalciferol (vitamina D₃) ou placebo durante 6 meses. O grupo que recebeu a suplementação (n = 18) apresentou aumento nas concentrações de 25(OH)D, e menores insulina de jejum e HOMA-IR, sugerindo que a correção de concentrações inadequadas de 25(OH)D possa ser importante para o tratamento da obesidade e de sua associada resistência à insulina.

Diretamente relacionadas à quantidade de tecido adiposo, as concentrações de leptina também sofrem regulação da vitamina D. Demonstrou-se, *in vitro*, que a 1,25(OH)₂D₃ atua como um potente inibidor da secreção de leptina em cultura de adipócitos humanos (MENENDEZ *et al.*, 2001). KANEKO *et al.* (2015) recentemente identificaram VDREs no gene da leptina em camundongos, e concluíram que a 1,25(OH)₂D₃ reprime dramaticamente a expressão deste gene em cultura de adipócitos 3T3-L1 destes animais, tendo a sua administração reduzido os níveis de RNAm do gene da leptina em pelo menos 84%. Tais achados ilustram uma das formas de interação entre a vitamina D e o tecido adiposo. Entretanto, outros múltiplos meios de interação já identificados contribuem para melhor elucidar esta conexão, permitindo compreender a forte associação negativa entre o excesso de peso e o *status* de vitamina D, mais explorada a seguir.

1.3.2. O *Status* de Vitamina D e a Obesidade

A insuficiência e a deficiência de vitamina D são condições frequentemente observadas em populações ao redor do mundo, inclusive entre crianças e adolescentes (HOLICK, 2007). FORD *et al.* (2011), em estudo com adolescentes norte-americanos, observaram que 48,3% eram insuficientes em vitamina D, enquanto outros 31,5% foram classificados em estado de deficiência. No Brasil, PETERS *et al.* (2009) reportaram uma prevalência de 62% de insuficiência de vitamina D entre adolescentes. Estudos de diversos países com crianças e adolescentes identificaram, porém, que a deficiência de vitamina D varia de 11,2% (POOMTHAVORN *et al.*, 2012) a 100% (AL-MUSHARAF *et al.*, 2012).

O excesso de peso relaciona-se intimamente com o *status* de vitamina D (HYPPÖNEN e POWER, 2006; WOOD, 2008; FOSS, 2009; VIMALESWARAN *et al.*, 2013), sendo a obesidade sabidamente um fator de risco para reduzidas concentrações circulantes desta vitamina. Nas últimas décadas, associações inversas entre concentrações séricas de 25(OH)D e medidas de adiposidade corporal (IMC, circunferência de cintura, porcentagem de massa gorda e de gordura visceral) foram observadas entre diversas etnias ao redor do mundo (HYPPÖNEN e POWER, 2006; EARTHMAN *et al.*, 2012; VIMALESWARAN *et al.*, 2013), inclusive entre crianças e adolescentes (SMOTKIN-TANGORRA *et al.*, 2007; RAJAKUMAR *et al.*, 2008; ALEMZADEH *et al.*, 2008). Ademais, estudos confirmaram que baixas concentrações de 25(OH)D associam-se também ao risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica, distúrbio que inclui a obesidade (MARTINI e WOOD, 2006; KAYANIYIL *et al.*, 2014).

Uma avaliação de 21 coortes formadas por 42.024 adultos revelou que cada 1 kg/m² de IMC foi associado à redução de 1,15% nas concentrações de 25(OH)D (VIMALESWARAN *et al.*, 2013). Parte desta relação inversa explica-se pelo perfil lipossolúvel da molécula de 25(OH)D, que permite que adipócitos facilmente retenham esta vitamina em seu citossol, sequestrando-a da circulação e, assim, dificultando a sua ação em outros tecidos (WORTSMAN *et al.*, 2000).

Um estudo de WORTSMAN *et al.* (2000) demonstrou que indivíduos obesos e não-obesos expostos à mesma quantidade de radiação UVB apresentaram diferentes aumentos nas concentrações de vitamina D₃ 24 horas após a exposição, tendo sido o incremento 57% menor nos obesos. Tal diferença foi observada mesmo com estes

grupos apresentando quantidades semelhantes de 7-deidrocolesterol – molécula precursora da vitamina D₃ – e com porcentagens similares de conversão da pré-vitamina D₃ em vitamina D₃, o que demonstra que a obesidade não afeta a capacidade do tecido cutâneo em sintetizar vitamina D₃, todavia parece alterar a liberação dessa vitamina da pele para a circulação, pelo excesso de tecido adiposo subcutâneo. Apesar da conhecida associação negativa entre as concentrações séricas de 25(OH)D e a quantidade de tecido adiposo subcutâneo (o qual responde pela maior parte da adiposidade corporal), observa-se que a 25(OH)D relaciona-se de maneira ainda mais forte com o tecido adiposo visceral (CHENG *et al.*, 2010). Indivíduos obesos, contudo, costumam apresentar ambos os tipos em excesso.

Contribuem também para as baixas concentrações de 25(OH)D fatores comportamentais comumente associados aos indivíduos obesos, a exemplo da baixa ingestão de alimentos naturalmente fonte de vitamina D, o sedentarismo, a pouca prática de atividades físicas ao ar livre e a consequente reduzida exposição à luz do sol (KULL *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2015). Acredita-se, porém, que tais fatores tenham menor impacto na relação entre a deficiência de vitamina D e medidas de adiposidade, uma vez que essa associação inversa permanece mesmo quando fatores comportamentais como prática de atividade física e ingestão de alimentos fonte de vitamina D são utilizados como variáveis de ajuste (CHENG *et al.*, 2010).

Sugere-se ainda que a deficiência de vitamina D seja capaz de promover a adiposidade, sendo não somente consequência da obesidade, mas também contribuindo para a sua causa. Um dos múltiplos mecanismos envolvidos neste caso seria a elevação do PTH induzida pela baixa concentração de 25(OH)D, o que por sua vez estimularia a enzima fosfolipase C- β e promoveria um influxo de cálcio nos adipócitos, favorecendo a lipogênese (MCCARTY e THOMAS, 2003). Outras evidências sugerem que a 1,25(OH)₂D₃ module negativamente a adipogênese por meio de seu receptor nuclear (VDR) através da inibição da expressão de componentes moleculares críticos para a adipogênese – como o receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPAR- γ) e a proteína α intensificadora de ligação a CCAAT (C/EBP α) – além da redução na atividade de transativação no pré-adipócito, e de uma posterior competição entre o VDR e o PPAR- γ para uma limitada quantidade de RXR, um parceiro de ligação heterodimérica comum a ambos receptores nucleares (WOOD, 2008). Deste modo, compreende-se como a deficiência de vitamina D poderia levar à diferenciação excessiva de pré-adipócitos em adipócitos (CHENG *et al.*, 2010).

Uma outra hipótese, ainda pouco explorada na literatura, sugere que a associação entre a obesidade e a deficiência de vitamina D envolva a mitocôndria, organela celular chave para a produção de energia. Um estudo com adultos deficientes em vitamina D observou que a fosforilação oxidativa mitocondrial (que leva à produção de ATP) no músculo esquelético, após realização de exercícios físicos moderados, foi aumentada por terapia de suplementação com colecalciferol. Ademais, em todos os indivíduos estudados, foi observada melhora nos sintomas de miopatia e fadiga muscular com a suplementação (SINHA *et al.*, 2013). Um possível mecanismo para tais achados envolve o influxo de cálcio entre o citossol e a mitocôndria, influenciado pela vitamina D, no qual a deficiência de vitamina D levaria a um menor aporte de cálcio e consequente menor fosforilação oxidativa mitocondrial. Tal mecanismo, envolvido diretamente na homeostase energética corporal, contribuiria para explicar a relação entre a deficiência de vitamina D, a disfunção muscular e o maior risco para a obesidade (BOUILLON *et al.*, 2014).

Por fim, polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) do gene do VDR foram também associados à obesidade. YE *et al.* (2001) demonstraram, em estudo com adultos e idosos com DM2, que a presença do genótipo homozigoto ancestral TT em relação ao polimorfismo *TaqI* (rs 731236; T/C), ou do genótipo homozigoto mutante GG do polimorfismo *BsmI* (rs 1544410; A/G) associaram-se a um acréscimo de aproximadamente 4 kg/m² no IMC, ou de 9 kg no peso corporal, e à prevalência de obesidade cerca de 30% maior. Outro estudo realizado com adultos identificou que a presença de cada alelo de risco T do polimorfismo *TaqI* contribuiu para um aumento de 3 kg/m² no IMC (VASILOPOULOS *et al.*, 2013).

Deste modo, observa-se que múltiplas vias metabólicas corroboram o diálogo entre os tecidos ósseo e adiposo, mediado pela vitamina D. O controle da expressão gênica de proteínas que alicerçam tais reações (como a osteocalcina e a leptina) exercido pela vitamina D, somado à ação direta desta vitamina no controle da homeostase da glicose, ilustram uma complexa rede metabólica cujas descobertas crescem progressivamente.

1.4. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a interação entre tecido adiposo e osso e seu efeito na homeostase da glicose são melhor compreendidos entre adultos e idosos, embora mesmo dentre estas

faixas etárias os achados sejam por vezes discrepantes ou insuficientes para o seu completo entendimento. Por se tratar de uma faixa etária mais restrita e alvo de alterações metabólicas intensas, frutos do processo natural de crescimento e desenvolvimento, crianças e adolescentes são um grupo populacional de mais difícil investigação, embora alvo de especial interesse – dado que configuram um grupo crucial para o qual ações preventivas deveriam ser direcionadas, de modo a retardar e/ou prevenir o desenvolvimento de DCNT durante a fase de desenvolvimento corporal e nos outros estágios da vida.

Estudos avaliando ambos os tipos de osteocalcina (especialmente a sua fração não-carboxilada) na interação com o tecido adiposo e o metabolismo da glicose, assim como sua relação com a vitamina D, em crianças e adolescentes, ainda são escassos na literatura. Adicionalmente, é importante caracterizar fatores que inter-relacionam a inadequação de vitamina D com alterações metabólicas em adolescentes.

1.5. HIPÓTESES

O presente estudo apresenta a hipótese de que o tecido ósseo e o tecido adiposo interagem por meio de seus produtos – osteocalcina (principalmente sua fração não-carboxilada), leptina e adiponectina – e do *status* de vitamina D, influenciando também o metabolismo da glicose. Assim, especula-se que as concentrações séricas de osteocalcina, adipocinas e 25(OH)D, e de suas relações com o estado nutricional e com hábitos como exposição solar, ingestão alimentar e prática de atividade física possam ser importantes marcadores para a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolvimento de DCNT, e que tal identificação possa ocorrer já durante a infância e a adolescência, permitindo intervenções no estilo de vida que previnam ou revertam condições desfavoráveis de saúde.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as relações entre o tecido ósseo, o tecido adiposo e a homeostase da glicose em crianças e adolescentes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as relações entre as concentrações séricas de 25 hidroxivitamina D, osteocalcina, adipocinas e indicadores do metabolismo da glicose em adolescentes brasileiros.
- Identificar associações entre osteocalcina, leptina e indicadores do metabolismo da glicose em crianças e adolescentes norte-americanos.
- Investigar a relação entre hábitos de exposição solar, prática de atividade física, ingestão de cálcio e de vitamina D com concentrações séricas de 25 hidroxivitamina D, osteocalcina e a razão adiponectina/leptina em adolescentes brasileiros.

3. MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foram estudadas duas amostras populacionais distintas, uma delas composta por adolescentes brasileiros e a outra por crianças e adolescentes norte-americanos. Trata-se de estudos observacionais, transversais, de caráter exploratório-descritivo.

3.2. LOCAL E POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.2.1. População Brasileira

O estudo cujos resultados são apresentados e discutidos nos artigos 2 e 4 foi realizado com 198 adolescentes de ambos os sexos com idade entre 14 e 18 anos (no momento da coleta de sangue), parte deles participantes do estudo Inquérito de Saúde do Município de São Paulo (ISA-Capital) 2008/2009, estudo multicêntrico, transversal e de base populacional que conta também com a participação de adultos e idosos. A amostra foi complementada em 2012/2013 com adolescentes pacientes do ambulatório do Centro de Saúde Escola Geraldo Horácio de Paula Souza (CS) da Faculdade de Saúde Pública (FSP) da Universidade de São Paulo (USP) e com adolescentes que já haviam passado em triagem na Liga de Obesidade Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LOI – HC/FMUSP), convidados a participar do estudo pessoalmente ou por telefone. Os dados foram coletados no município de São Paulo, SP.

3.2.2. População Norte-Americana

O estudo cujos resultados são apresentados e discutidos no artigo 3 foi realizado com 318 crianças e adolescentes norte-americanos de ambos os sexos com idade entre 8 e 13 anos, participantes do estudo GAPI (fruto de uma parceria entre as seguintes universidades: *University of Georgia* [UGA], *Purdue University* [PU] e *Indiana University* [IU]), um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com suplementação de vitamina D controlado por placebo. Os dados provenientes deste estudo utilizados nesta tese referem-se somente a medidas de dados de base (*baseline*). Os dados foram

coletados nos municípios de Athens (Georgia, EUA), West Lafayette (Indiana, EUA) e Indianapolis (Indiana, EUA).

3.3. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE E FORMAÇÃO DA AMOSTRA

3.3.1. Critérios de Não-Inclusão

Para ambas as amostras populacionais, não foram incluídos indivíduos com distúrbios de crescimento ou DCNT além da obesidade (como *diabetes mellitus* ou hipertensão arterial sistêmica), nem aqueles em uso de medicamentos que afetam o metabolismo da glicose, o metabolismo ósseo e/ou a ingestão alimentar. Também não foram incluídas gestantes ou lactantes.

Adolescentes brasileiros em uso de suplementos nutricionais não foram incluídos no estudo. Crianças e adolescentes norte-americanos em uso de suplementos nutricionais somente foram considerados elegíveis após descontinuarem o seu uso por um período mínimo de 4 semanas. Todas as adolescentes da amostra brasileira afirmaram já terem passado pela menarca. Em contrapartida, meninas norte-americanas após a menarca não foram incluídas no estudo.

3.3.2. Formação das Amostras Populacionais

O processo de formação da amostra brasileira do estudo é detalhada na **Figura 2**. Do total de 437 adolescentes que atendiam aos critérios de elegibilidade, 241 concordaram em participar do estudo, contudo somente 198 compareceram ao dia agendado e tiveram a amostra de sangue coletada, mesmo após tentativas de reagendamento.

Figura 2. Fluxograma de seleção dos participantes do estudo brasileiro. São Paulo, 2015.

A **Figura 3** apresenta o processo de formação da amostra populacional norte-americana. Do total de 441 crianças e adolescentes que atendiam aos critérios de elegibilidade, 323 concordaram em participar do estudo GAPI. Para o presente estudo, 5 indivíduos foram excluídos devido à grande quantidade de dados faltantes para as variáveis de interesse, totalizando uma amostra com 318 indivíduos.

Figura 3. Fluxograma de seleção dos participantes do estudo norte-americano. São Paulo, 2015.

3.4. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo com dados brasileiros foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) segundo o protocolo nº 2307/2011 (**Anexo 2**), e a coleta de dados foi autorizada pela diretoria do Centro de Saúde Escola Geraldo Horácio de Paula Souza (**Anexo 3**). O uso de parte dos dados do estudo ISA-Capital foi autorizado pela pesquisadora responsável (**Anexo 4**). O estudo GAPI, com a população norte-americana, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de cada uma das universidades envolvidas (*University of Georgia, Purdue University e Indiana University*).

Todos os participantes (ou seus responsáveis legais, no caso daqueles menores de 18 anos), ao serem convidados a integrar o estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 5**), após serem informados dos propósitos da pesquisa.

3.5. VARIÁVEIS DE ESTUDO E INSTRUMENTOS DE MEDIDA

3.5.1. Variáveis Sociodemográficas

Dados sociodemográficos e de estado de saúde (presença de doenças ou agravos) foram obtidos por questionários padronizados (**Anexo 6**), aplicados por entrevistadores previamente treinados, assim como os demais questionários mencionados a seguir.

3.5.2. Variáveis Antropométricas e seus Métodos de Mensuração

3.5.2.1. População Brasileira

Realizou-se avaliação antropométrica, com aferição de estatura, peso, circunferência da cintura e circunferência do quadril dos adolescentes brasileiros. As medidas foram realizadas em duplicata por equipe previamente treinada, tendo sido utilizados os seus valores médios.

Estatura e peso foram aferidos segundo as técnicas preconizadas pela OMS (WHO, 1995). A medida do peso corporal foi realizada com os indivíduos descalços e vestindo roupas leves. Os adolescentes foram orientados a retirarem objetos dos bolsos e a manterem-se em posição vertical com as mãos paralelas ao corpo, o olhar no horizonte e os pés totalmente inseridos na plataforma do instrumento e posicionados paralelamente. Utilizou-se balança digital (Filizola®) com capacidade para 150,0 kg e precisão de 0,1 kg.

A estatura foi aferida com uso de estadiômetro (Seca bodymeter 208®) com capacidade máxima de 2,0 m e acurácia de 1 mm. A leitura foi realizada depois de posicionar o indivíduo verticalmente, com os pés paralelos e juntos, encostando pelo menos três entre os cinco pontos corporais – cabeça, ombros, quadris, panturrilhas e calcanhares – no estadiômetro, e com a cabeça posicionada segundo o Plano Horizontal de Frankfurt (posição em que o ponto mais baixo da margem orbitária e o ponto mais baixo da margem do meato auditivo formam uma reta imaginária paralela ao chão) (WHO, 1995).

As circunferências da cintura (CC) e do quadril (CQ) foram medidas com fita métrica flexível e inextensível com capacidade de mensuração máxima de 150,0 cm e acurácia de 1 mm. A circunferência da cintura foi aferida com a fita métrica posicionada

sobre o ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca do indivíduo em posição vertical, tendo sido feita a leitura no momento da expiração. Para medir a circunferência do quadril, posicionou-se a fita métrica na região de maior perímetro entre a cintura e a coxa do indivíduo, mantido em posição vertical, com os pés unidos paralelamente e trajando roupas não-volumosas (WHO, 2008). A circunferência do quadril foi aferida somente nos indivíduos da coleta complementar (n = 69).

O Índice de Massa Corporal (IMC) dos adolescentes foi determinado segundo a equação:

$$IMC = \frac{Peso\ (kg)}{Estatura\ (m) \times Estatura\ (m)}$$

(KEYS *et al.*, 1972).

O estado nutricional dos participantes foi determinado segundo os critérios das curvas de IMC-para-idade da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006), nas quais valores de IMC inferiores ao percentil 3 (equivalente ao escore $Z < -2$) indicam desnutrição, valores iguais ou superiores ao percentil 3 até o percentil 85 (equivalente aos escores Z entre -2 e 1) caracterizam estado de eutrofia, valores entre os percentis 85 e 97 (equivalente aos escores Z entre 1 e 2) caracterizam sobrepeso e valores maiores ou iguais ao percentil 97 (equivalente ao escore $Z \geq 2$) classificam estado de obesidade.

3.5.2.2. População Norte-Americana

Foram aferidos estatura e peso com medidas em duplicata, tendo sido utilizados os seus valores médios. IMC e percentis de IMC-para-idade foram calculados, e o estado nutricional foi determinado. Tais medidas foram realizadas segundo os mesmos métodos acima descritos (WHO, 1995).

Avaliou-se o percentual de massa gorda por densitometria óssea (*dual-energy x-ray absorptiometry* – DXA) (*Delphi-A*, Hologic Inc [UGA]; *Lunar iDXA*, GE Medical Instruments [PU]; e *Hologic Discovery-W* [IU]). O mesmo técnico em cada campo de coleta conduziu os exames e realizou as análises utilizando *softwares* e protocolos específicos para cada instrumento.

3.5.3. Variáveis Bioquímicas e seus Métodos de Mensuração

3.5.3.1. População Brasileira

Foi realizada coleta de sangue venoso periférico após jejum de 12 horas para determinação das concentrações séricas de 25(OH)D, PTH, cOC, ucOC, leptina, adiponectina, colesterol total, triglicérides, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, glicose e insulina, com posterior determinação dos índices de estimativa de resistência à insulina (*Homeostasis Model Assessment Estimate for Insulin Resistance* – HOMA-IR), de estimativa da função das células β -pancreáticas (*Homeostasis Model Assessment Estimate for β -Cell Function* – HOMA- β) e de estimativa da sensibilidade à insulina (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* – QUICKI).

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue venoso por profissionais especializados, com uso de materiais descartáveis. Acondicionou-se aproximadamente 16 mL de sangue em tubos de coleta do tipo seco com capacidade para 10 mL cada, enquanto 4 mL foram acondicionados em tubo de coleta com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (substância anticoagulante), com capacidade para 4 mL. Após a coleta, o material em tubo seco foi centrifugado a 3600 rpm durante 15 minutos, e alíquotas de soro foram armazenadas em *ependorfs* com capacidade máxima de 1,5 mL. Com o soro fresco, foram realizadas as análises das concentrações de glicose, colesterol total, HDL-c e triglicérides. As demais alíquotas, assim como os tubos de sangue com EDTA, foram armazenados em *freezer* a -20°C, e posteriormente a -80°C, para as análises remanescentes.

As concentrações séricas de glicose, colesterol total, HDL-c e triglicérides foram realizadas por método enzimático colorimétrico em espectrofotômetro (*Quibasa*, Brasil). Tais medidas, para os participantes da coleta complementar, foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Escola Geraldo Horácio de Paula Souza da FSP/USP. As demais análises foram realizadas em laboratórios particulares especializados. Os valores para LDL-c e VLDL-c foram calculados conforme as equações abaixo.

$$[VLDL-c \text{ (mg/dL)}] = \frac{[Triglicérides \text{ (mg/dL)}]}{5} ,$$

$$[LDL-c \text{ (mg/dL)}] = [Colesterol total \text{ (mg/dL)}] - [HDL-c \text{ (mg/dL)}] - [VLDL-c \text{ (mg/dL)}]$$

(FRIEDEWALD *et al.*, 1972).

A concentração sérica de 25(OH)D (*Immunodiagnostik AG*, Alemanha) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As concentrações séricas para osteocalcina carboxilada (*IBL-America, Minneapolis, MN, EUA*), osteocalcina não-carboxilada (*Cusabio, China*), leptina (*Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EUA*), adiponectina (*Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EUA*) e PTH (*IBL-America, Minneapolis, MN, EUA*) foram determinados por *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). A insulina foi mensurada por quimioluminescência (*Beckman Coulter, Brea, CA, EUA*).

A osteocalcina – principalmente sua fração não-carboxilada – ainda é um metabólito cujo processo de mensuração é desafiador. Suas concentrações descritas na literatura são de difícil comparação, uma vez que o intervalo de valores obtidos varia consideravelmente de acordo com o tipo de ensaio empregado, e até mesmo quando o mesmo método de análise é utilizado, possivelmente devido ao fato de alguns reagentes apresentarem a capacidade de detectar fragmentos de outros tamanhos, superestimando a concentração desta proteína (GUNDBERG *et al.*, 1998). O primeiro estudo a medir separadamente as concentrações de osteocalcina total (por ELISA, *Elecsys, Roche diagnostic Ltd.*, Suíça) e de suas frações (por imunoensaio enzimático, *Takara Bio Inc.*, Japão) encontrou valores medianos de 0,53 ng/mL para cOC, 1,14 ng/mL para ucOC e 8,80 ng/mL para tOC em um grupo de adultos com DM2, tendo sido as concentrações de tOC inesperadamente muito superiores à soma das concentrações de suas frações carboxilada e não-carboxilada (ALFADDA *et al.*, 2013). Em crianças e adolescentes holandeses de 3 a 18 anos, VAN SUMMEREN *et al.* (2007) encontraram concentrações médias de ucOC de 31,3 ng/mL (determinada por ELISA, *Takara Bio Inc.*, Japão), enquanto estudo de POLLOCK *et al.* (2011) com jovens norte-americanos de 7 a 11 anos com sobrepeso observou concentrações médias de ucOC de 5,6 ng/mL dentre os indivíduos normoglicêmicos e de 7,8 ng/mL naqueles com pré-diabetes (mensurada por radioimunoensaio – RIA e por ensaio de ligação à hidroxipatita, *Calbiochem hydroxyapatite* e *Sigma Chemical*). Ressalta-se, portanto, que a comparação das concentrações de osteocalcina entre estudos seja considerada com cautela.

Outro metabólito que exige atenção quando utilizado para fins comparativos é a 25(OH)D, neste caso devido a diferenças de categorização. O *status* da vitamina D é

atualmente classificado por diferentes intervalos de referência baseados nas concentrações de 25(OH)D, sem que haja consenso na literatura sobre sua preconização. Nesta tese, a classificação dos indivíduos foi determinada de acordo com valores de referência atualmente utilizados pelo *Endocrine Clinical Practice Guidelines Committee on Vitamin D for the Endocrine Society* (HOLICK *et al.*, 2011), conforme a **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores de referência para o *status* de vitamina D utilizados no estudo. São Paulo, 2015.

	Concentrações séricas de 25 hidroxivitamina D	
	ng/mL	nmol/L
<i>Status</i> de vitamina D		
Deficiente	< 20	< 50
Insuficiente	20 a 30	50 a 75
Suficiente	> 30	> 75

Fonte: HOLICK *et al.* (2011). Conversão: nmol/L = ng/mL x 2,5

Os índices HOMA-IR, HOMA- β e QUICKI foram calculados de acordo com as equações a seguir:

$$HOMA-IR = \frac{[glicose\ de\ jejum\ (mg/dL)] \times [insulina\ de\ jejum\ (mUI/L)]}{405},$$

$$HOMA-\beta = \frac{360 \times [insulina\ de\ jejum\ (mUI/L)]}{[glicose\ de\ jejum\ (mg/dL)] - 63}$$

(MATTHEWS *et al.*, 1985).

$$QUICKI = \frac{1}{(\log\ insulina\ de\ jejum + \log\ glicose\ de\ jejum)}$$

(KATZ *et al.*, 2000).

3.5.3.2. População Norte-Americana

Foi realizada coleta de sangue venoso periférico após jejum de 12 horas para determinação das concentrações séricas de tOC, ucOC, leptina, glicose e insulina. O soro foi armazenado em temperaturas inferiores a -70°C até o momento da análise, tendo sido cada analito mensurado em um mesmo laboratório para todos os participantes.

As concentrações séricas de tOC (*MicroVue™, Quidel Corp.*, San Diego, CA, EUA) e de ucOC (*Takara Bio Inc.*, Japão) foram medidas por ELISA. Leptina e insulina foram mensuradas por RIA (*EMD Milipore*, Billerica, MA, EUA). A concentração de glicose foi determinada por método enzimático modificado por microtitulação (*Wako Chemicals USA*, Richmond, VA, EUA). Os índices HOMA-IR, HOMA- β e QUICKI foram determinados segundo as equações previamente descritas.

3.5.4. Prática de Atividade Física

O nível de atividade física dos adolescentes brasileiros foi calculado a partir do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) (CRAIG *et al.*, 2003) (**Anexo 7**). Os indivíduos foram classificados dentre as opções: sedentário, insuficientemente ativo, ativo e muito ativo.

3.5.5. Exposição Solar

Dados sobre hábitos de exposição solar dos indivíduos da amostra brasileira foram obtidos por questionário adaptado de SZKLO *et al.* (2007) (**Anexo 8**), que avalia o hábito de se expor à luz solar por períodos superiores a 30 minutos, o uso de chapéu ou outro tipo de proteção para a cabeça quando exposto à luz solar, o uso de protetores solares e a preferência pela sombra quando em ambientes ensolarados. Indivíduos da coleta complementar também responderam um questionário adicional, proposto por HANWELL *et al.* (2010) (**Anexo 8**). Trata-se de um recordatório semanal sobre hábitos de exposição solar, que gera uma pontuação de acordo com o tempo de exposição à luz solar reportada pelo indivíduo em cada um dos sete dias anteriores à entrevista (<5 minutos, 5 a 30 minutos ou > 30 minutos) e às partes do corpo expostas ao sol (mãos e face; mãos, face e braços; mãos, face e pernas; traje de banho).

3.5.6. Ingestão Alimentar

A ingestão alimentar dos adolescentes brasileiros foi avaliada por meio de um Recordatório Alimentar de 24 horas (R24h) (**Anexo 9**), repetido em dias não-consecutivos, com intervalo maior que uma semana, em 62,6% (n = 124) da população. Tal medida repetida permite a correção da variabilidade intrapessoal da dieta (HOFFMANN *et al.*, 2002). As entrevistas foram realizadas pessoalmente ou por telefone. A coleta de informações sobre a dieta realizada por telefone mostrou-se um formato válido e comumente utilizado em estudos sobre a ingestão alimentar (WILLET, 1998). Além de todos os benefícios de um R24h realizado pessoalmente, a coleta via telefone conta ainda com vantagens adicionais, uma vez que não torna necessário o transporte do entrevistador (e/ou do entrevistado) para o local da entrevista e, por não ser realizado com horário previamente marcado, acresce um “elemento surpresa” que contribui para que o entrevistado não altere seus hábitos alimentares em virtude de saber quando irá reportá-lo em uma entrevista. Este fator é especialmente relevante quando medidas repetidas são realizadas para a obtenção de mais de um dia alimentar do indivíduo (BUZZARD *et al.*, 1996).

Para responder ao R24h, os participantes deveriam relatar ao entrevistador tudo que comeram e beberam no dia anterior à entrevista, desde o momento em que acordaram até a hora em que foram dormir. Para facilitar a obtenção de respostas detalhadas, utilizou-se o método de coleta de informações dietéticas *Multiple Pass Method* (MPM), desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture – USDA*) (MOSHFEHGH *et al.*, 2008), cuja finalidade é, por meio de cinco etapas (listagem rápida dos alimentos ingeridos, revisão da listagem rápida para listagem de alimentos comumente esquecidos, definição dos horários e nomeação das refeições, ciclo de detalhamento e revisão geral), criar um processo padronizado que guie o entrevistado no relato de sua ingestão alimentar.

O relato das quantidades, feito em medidas caseiras (com o auxílio do entrevistador para a adequada mensuração das porções consumidas), foi posteriormente transformado em medidas de peso e volume, com o auxílio de guias de transformação e padronização de medidas caseiras e receitas (FISBERG e VILLAR, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2004). Os alimentos foram então inseridos individualmente no software *Nutrition Data System for Research* (NDSR) (*Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, EUA*), versão 2007, para serem convertidos em nutrientes

e energia. A escolha deste programa para cálculo dos inquéritos alimentares se deu por sua base de dados incluir valores atualizados de vitamina D, validados pelo USDA.

Visando minimizar erros de estimativa de ingestão de cálcio, micronutriente cujas quantidades nos alimentos variam entre os países por conta da política de fortificação, foi realizada análise de consistência da sua ingestão, por meio da comparação dos valores do NDSR (que utiliza dados da tabela norte-americana) com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (TACO/UNICAMP) (NEPA, 2011). Foram ajustados os valores individuais de ingestão deste nutriente para alimentos cuja diferença entre as tabelas de composição de alimentos fosse maior do que 20% (FISBERG e MARCHIONI, 2012).

Em estudos que avaliam a ingestão alimentar é comum a exclusão de recordatórios alimentares cujo valor energético exceda 4.000 kcal ou que seja inferior à 500 kcal, visando minimizar erros por superrelato ou subrelato da ingestão do indivíduo (WILLET, 1998). Na amostra do presente estudo não foram realizadas exclusões, uma vez que as ingestões alimentares convertidas em energia variaram entre 1.052 kcal (mínimo) e 3.414 kcal (máximo).

3.5.7. Resumo das Variáveis do Estudo

O quadro a seguir apresenta um resumo das variáveis empregadas no estudo. Por se tratar de duas amostras populacionais distintas, não foi possível mensurar todas as variáveis de interesse para ambas as populações.

Tabela 2. Resumo das variáveis do estudo. São Paulo, 2015.

	População brasileira		População norte-americana
	Inquérito de Saúde (ISA-Capital)	Coleta complementar	
Sociodemográficas	Sexo Idade	Sexo Idade	Sexo Idade Cor da pele
Antropométricas	Peso Estatura IMC Circunferência de cintura	Peso Estatura IMC Circunferência de cintura Circunferência de quadril	Peso Estatura IMC % massa gorda
Bioquímicas	25 hidroxivitamina D PTH Osteocalcina carboxilada Osteocalcina não-carboxilada Leptina Adiponectina Colesterol total HDL-c LDL-c VLDL-c Triglicérides	25 hidroxivitamina D PTH Osteocalcina carboxilada Osteocalcina não-carboxilada Leptina Adiponectina Colesterol total HDL-c LDL-c VLDL-c Triglicérides Insulina Glicose	Osteocalcina total Osteocalcina não-carboxilada Leptina Insulina Glicose
Marcadores do metabolismo da glicose	—	HOMA-IR HOMA- β QUICKI	HOMA-IR HOMA- β QUICKI
Atividade física	Nível de atividade física	Nível de atividade física	
Exposição solar	Exposição usual por >30 minutos Uso de protetor solar Uso de chapéu ou similar Escolha pela sombra quando em ambiente ensolarado	Exposição usual por >30 minutos Uso de protetor solar Uso de chapéu ou similar Escolha pela sombra quando em ambiente ensolarado Score de exposição solar total Score relativo ao tempo de exposição Score relativo à quantidade de pele exposta	
Ingestão alimentar	Energia Cálcio Vitamina D	Energia Cálcio Vitamina D	

IMC, Índice de massa corporal; PTH, Paratormônio; HOMA-IR, *Homeostasis model assessment estimate for insulin resistance*; HOMA- β , *Homeostasis model assessment estimate for β -cell function*; QUICKI, *Quantitative insulin sensitivity check index*.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a caracterização da amostra estudada realizou-se a análise descritiva das variáveis, por meio de medidas de tendência central (média) e dispersão (desvio-padrão), além de frequências relativas (%). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificação da aderência das variáveis à distribuição normal, e transformação logarítmica foi empregada para as variáveis que não apresentavam distribuição normal.

O teste t-Student foi utilizado para comparação de duas médias para as variáveis quantitativas, enquanto comparações de mais de duas médias foram feitas por meio do teste de Tukey. Relações entre as variáveis quantitativas foram testadas pelo teste de correlação de Pearson. Proporções (entre variáveis categóricas) foram comparadas pelo teste Qui-quadrado (χ^2) de Pearson. Análises de regressão linear múltipla foram utilizadas para avaliar associações entre as variáveis do estudo. No estudo com adolescentes brasileiros, utilizaram-se as concentrações séricas de 25(OH)D e de ucOC como variáveis independentes nos modelos de regressão em um dos artigos. Idade, IMC e estação do ano em que a coleta de sangue foi realizada foram utilizados como variáveis de ajuste. No outro artigo, a concentração sérica de 25(OH)D foi testada como independente, e sexo, estação do ano em que a coleta de sangue foi realizada e o hábito de se expor ao sol por mais de 30 minutos foram usados como variáveis de ajuste. No estudo com a amostra populacional norte-americana, as concentrações séricas de ucOC e de leptina foram testadas como variáveis independentes. Idade, sexo e percentual de massa gorda foram utilizados como variáveis de ajuste.

A ingestão de nutrientes foi padronizada segundo a quantidade consumida a cada 1.000 kcal da dieta, de modo a controlar o possível efeito do valor energético total da dieta. Os nutrientes avaliados (vitamina D e cálcio) e o valor energético da dieta tiveram suas variabilidades intrapessoais ajustadas pelo programa *Multiple Source Method* (MSM), um *software online* desenvolvido pelo Departamento de Epidemiologia do *German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke* (DIfE) que, por meio de uma técnica de modelagem estatística, utiliza o R24h (dentre outros tipos de inquérito alimentar), para estimar a ingestão habitual a partir de medidas repetidas deste instrumento em uma subamostra (HARTTIG *et al.*, 2011).

A inadequação da ingestão de cálcio e vitamina D foi determinada pelo método do *Estimated Average Requirement* (EAR) como ponto de corte (SLATER *et al.*, 2004), conduzido no *software* PC-Side versão 1.0 (Iowa State University, IA, EUA). Este

método estima a proporção de indivíduos com ingestão acima ou abaixo das recomendações, e minimiza erros de estimativas por considerar (e corrigir) características aleatórias (variabilidade) da dieta. Para esta análise, foram considerados os valores de necessidade média estimada de ingestão para indivíduos do sexo masculino e feminino entre 14 e 18 anos para cálcio (EAR = 1.110 mg/dia) e vitamina D (EAR = 10 µg/dia) (IOM, 2011).

Devido ao seu processo de formação, a amostra populacional brasileira pode ser considerada uma amostra de conveniência, entretanto, análises do poder estatístico da amostra para cada modelo de regressão linear testado e para um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) obtiveram resultados $>0,98$, o que demonstra que o tamanho amostral deste estudo foi adequado para as análises realizadas (COHEN, 1988; SOPER, 2015).

Em relação à amostra norte-americana, determinou-se a amostragem de acordo com o objetivo do estudo principal (uma intervenção para avaliar o efeito de suplementação de vitamina D). Deste modo, foi realizado cálculo do tamanho amostral necessário para detectar uma mudança linear proporcional à dose de suplementação de vitamina D dada, para um poder estatístico estabelecido em 80% (LEWIS *et al.*, 2013).

Os dados foram avaliados com o auxílio dos programas IBM SPSS *Statistics Software* (SPSS), versão 22.0 (Chicago, IL, EUA) (para as análises da amostra brasileira) e *Statistical Analysis Software* (SAS) (Cary, NC, EUA), versão 9.4 (para as análises da amostra norte-americana). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($\alpha = 0,05$), tendo sido considerados estatisticamente significantes, portanto, os resultados com valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Resultados e a Discussão são apresentados nesta tese sob a forma de artigos científicos, sendo um artigo de revisão da literatura e três manuscritos com dados originais (dois deles com dados da amostra brasileira e um com dados da amostra norte-americana).

4.1. ARTIGO 1

Vitamin D status and glucose metabolism in youth

Artigo de revisão

Kelly V. Giudici, Wyllenny N. de Souza, Lígia A. Martini

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015.

[Epub ahead of print]

DOI: 10.1080/10408398.2013.866069

Critical Reviews in Food Science and Nutrition

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/bfsn20>

Vitamin D Status and Glucose Metabolism in Youth

Kelly Virecoulon Giudici^a, Wyslenny Nascimento De Souza^a & Lígia Araújo Martini^a

^a Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Accepted author version posted online: 01 Apr 2015.

[Click for updates](#)

To cite this article: Kelly Virecoulon Giudici, Wyslenny Nascimento De Souza & Lígia Araújo Martini (2015): Vitamin D Status and Glucose Metabolism in Youth, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: [10.1080/10408398.2013.866069](https://doi.org/10.1080/10408398.2013.866069)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.866069>

Disclaimer: This is a version of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to authors and researchers we are providing this version of the accepted manuscript (AM). Copyediting, typesetting, and review of the resulting proof will be undertaken on this manuscript before final publication of the Version of Record (VoR). During production and pre-press, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal relate to this version also.

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Vitamin D Status and Glucose Metabolism in Youth

Kelly Virecoulon Giudici, Wyllenny Nascimento de Souza, and Lígia Araújo Martini

Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Address correspondence to Kelly Virecoulon Giudici, Department of Nutrition,
School of Public Health, University of São Paulo, 715 Avenida Doutor Arnaldo, São Paulo,
01246-904 Brazil. E-mail: kellygiudici@gmail.com

Abstract

This study aimed to review and synthesize the available scientific evidence on the relationship between serum 25(OH)D concentrations and glucose metabolism among adolescents. A total of 19 studies were included. Many studies did not find a relation between 25(OH)D concentrations and insulin sensitivity, but most studies have shown that vitamin D status influences glucose dysregulation in youth due to particularities of this life stage. Considering the prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency were high among adolescents, the importance for vitamin D status correction in this young group, in which chronic diseases are not expected but getting every day more common, is mandatory.

Key words: adolescent; vitamin D; insulin; glucose.

Introduction

The role of vitamin D (25 hydroxyvitamin D) in glucose homeostasis, pancreatic β -cell function and insulin secretion and sensitivity has been investigated since the identification of vitamin D receptor in pancreas (Peechakara & Pittas, 2008). Additionally, *in vitro* studies have shown that vitamin D enhances insulin stimulated glucose transport and up-regulates transcription of the insulin receptor gene (Maestro *et al.*, 2000; Maestro *et al.*, 2002).

Adiposity is inversely related to serum vitamin D concentrations (Cheng *et al.*, 2010). Accordingly, vitamin D deficiency is highly prevalent among obese children and adolescents (Smotkin-Tangorra *et al.*, 2007; Rajakumar *et al.*, 2008; Alemdazeh *et al.*, 2008).

Glucose tolerance, insulin secretion, insulin sensitivity and body fat mass are strongly related physiological traits. Insulin has a major impact on body composition and body growth in youth (Veldhuis *et al.*, 2005). Type 2 diabetes (DM2), a disease that used to be common only among adults and elderly, nowadays also affects children and adolescents. Fazeli Farsani *et al.* (2013), in a systematic review with 37 population-based studies in children and adolescents, found a range of 0–330 per 100,000 persons/years for DM2 incidence rates, and 0–5,300 per 100,000 persons for DM2 prevalence rates over the world. The lowest incidence rates were observed in European countries, while United States showed the highest. These data make clear how disturbances on insulin secretion and consequences on glucose metabolism are now a concerning health issue among youth.

Considering that adolescence is a crucial period for prevention of chronic diseases and that vitamin D insufficiency has been highly observed among this population, this study aimed to review and synthesize the recent available scientific evidence on the relationship between serum vitamin D concentrations and insulin sensitivity among adolescents.

Methods

A review of literature from the last six years was made. The search included the original studies published from July 2007 to July 2013 that evaluated the relationship between serum vitamin D concentrations and insulin sensitivity among adolescents.

Observational epidemiological studies and clinical trials (randomized or not, controlled or not) were accepted.

The search strategy of the original studies was designed to be used in PubMed database, and adapted to 4 other databases (Lilacs, SciELO, Scopus and Science Direct). The following search limits were considered: human studies, published in any language and date of publication from July 2007 to July 2013. Three sets of intersection of bibliographic search terms were combined: population (adolescent, adolescence, youth), vitamin D (hydroxyvitamin D, 25(OH)D, calcitriol, 25 hydroxyvitamin D) and outcome (insulin, glucose, glycemic).

Articles were rejected on initial screening if authors determine, based on the analysis of the title and summary, inadequate inclusion criteria or presence of any of the exclusion criteria for the review. Furthermore, articles with incomplete methodology were also excluded. In cases of uncertainty or disagreement, the full text was consulted to confirm their eligibility. In order to complement the search in bibliographic databases, lists of references of included articles were consulted to identify any possible relevant study previously unidentified.

The search strategy found 124 non-duplicate articles, and the vast majority was located through the first appointment made at PubMed (117 articles). At the end, 19 original studies that presented the outcomes measures of interest were selected.

The included studies were conducted in countries around the world, being most North-Americans ($n = 11$), 2 Europeans, 5 Asians and 1 South-American. Associations between serum vitamin D and glucose and/or insulin concentrations were investigated in 18 cross-sectional studies. One study investigated the vitamin D supplementation effects on insulin sensitivity. Studies characteristics, as design, country and population are shown in **Table 1**.

Some of the studies ($n = 7$) that have evaluated vitamin D concentrations in adolescents also included children in their analysis. Although the target of this review was the subjects from 10 to 19 years old, we opted to maintain the studies that also analyzed younger subjects.

Vitamin D deficiency and insufficiency

Most studies evaluated serum 25(OH)D concentrations among children and adolescents, which is a commonly used marker of vitamin D status, since it represents

both endogenous synthesis from the skin and dietary/supplements intake (Ganji *et al.*, 2011). However, it is important to note that not all studies have used the same cutoff points that determine vitamin D insufficiency and vitamin D deficiency.

The vitamin D deficiency, usually but not always defined as serum 25(OH)D < 50 nmol/L, has been shown to be common in healthy adolescent populations, with a higher prevalence in African American youth and during winter months (Holick, 2007; Rajakumar *et al.*, 2005; Alemzadeh *et al.*, 2008). In a recent study with adolescents, 31.5% had vitamin D <50 nmol/L (deficient) and 48.3% had vitamin D from 50 to 75 nmol/L (insufficient) (Ford *et al.*, 2011). Among the included studies, however, vitamin D deficiency varied from 11.2% to 100%.

Impaired glucose metabolism in youth

Glucose homeostasis is affected by different complex metabolic events that correlate and occur simultaneously. Despite the influence of 25(OH)D concentrations – which will be better described below –, other factors such as increased body weight can unbalance the physiological equilibrium between insulin activity in the peripheral tissues and β -cell function.

Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance are the beginning of the spectrum of altered glucose metabolism that drives to type 2 diabetes development, and seems to be similar among youth and adults. β -cell failure can be caused either by a functional defect, in which the cell gets unable to secrete adequate amounts of insulin in response to physiologically elevated blood glucose, or by a progressive reduction of β -cell mass (Giannini & Caprio, 2013).

Adiposity is a strong determinant of insulin sensitivity and secretion (Goran *et al.*, 2003), especially fat subdivision: visceral adiposity, as well as intra-myocellular and liver fat, characterize a significant increase in the risk of developing insulin resistance in obese children and adolescents (Weiss *et al.*, 2003). Many studies also support that obesity in early life is associated with type 2 diabetes development at childhood, as also with increased risk of diabetes in later life (Giannini & Caprio, 2013).

In a study with children and adolescents from 8 to 18 years old, Tfayli *et al.* (2010) found that insulin sensitivity decreased as fasting plasma glucose increased even within the normal reference range, but insulin secretion did not increase sufficiently to maintain the glucose disposition index, what suggests that the impairments in insulin

sensitivity and β -cell response leading to diabetes may be evident at plasma glucose levels within the normoglycemic range. Insulin sensitivity results were also consistent with data from studies with adults, which have used different fasting plasma glucose categories.

Although the mechanisms of impaired glucose metabolism seem to be the same between youth and adults, some studies suggest that glucose dysregulation in youth may advance faster than in adults, possibly due to factors of pubertal development. Despite several other independent risk factors (such as ethnicity and genetic factors) and the transient pubertal insulin resistance (that seems to be a natural phenomenon necessary for growth and maturation, and reverses with time), it is suggested that youth may have a failure in the β -cell compensatory response to insulin resistance (an inability to adequately compensate through increased β -cell secretion) (Goran *et al.*, 2003). The growth hormone, which is high during this phase and declines with completion of puberty, could also play a role, once its administration to non-deficient adolescents is associated with deterioration in insulin action (ADA, 2000).

When considering an adolescent with a genetic predisposition for insulin resistance compounded with environmental risk exposure, the additional charge of the transient pubertal insulin resistance may tip the balance from a state of compensated hyperinsulinemia with normal glucose tolerance, to inadequate insulin secretion and glucose intolerance that are maintained beyond puberty and can reach type 2 diabetes diagnosis (ADA, 2000).

Finally, physical inactivity and dietary factors should be also considered as contributors to impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. Such conditions have been reported as severely inadequate around the world. Otherwise, it is believed that physical activity may decrease the risk for DM2 through associated or even independent factors such as improvement in peripheral insulin resistance, improvement in cardiovascular fitness or by promoting weight loss and visceral fat reduction (Duncan *et al.*, 2003; Giannini & Caprio, 2013).

Regarding diet, a low-glycemic index diet with a greater amount of fibers and minimally processed whole grain products are shown to decrease glycemic and insulin responses, as well as higher intake of polyunsaturated fat (Hu *et al.*, 2001).

Vitamin D status and glucose metabolism in youth

There is a recent increase in researching the effects of vitamin D status on glucose metabolism in adults, and such interest is now also extended to younger populations.

Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), a longitudinal follow-up study, including individuals from 12 to 17 years showed that, after adjustments, insulin concentrations were 24% lower among males with serum vitamin D ≥ 75 nmol/L in comparison to those with serum 25(OH)D concentrations < 50 nmol/L ($p = 0.003$). In this study, 25(OH)D concentrations were inversely associated with glucose concentrations between Mexican-American boys, but not among girls (Ford *et al.*, 2011).

Parikh *et al.* (2012), reassessing data from NHANES, conducted a multiple linear regression analysis which showed that in the lowest tertile of serum 25(OH)D, adolescents presented a significant increase in homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) and fasting glucose concentrations. Meanwhile, an analysis of three cycles from NHANES (2001-2002, 2003-2004, and 2005-2006) with adolescents from 12 to 19 years old ($n = 5,867$) found an inverse association between serum 25(OH)D and HOMA-IR, but not with fasting plasma glucose (Ganji *et al.*, 2011).

Studying African-American obese adolescents, Ashraf *et al.* (2009) found that whole body insulin sensitivity index (WBISI) was significantly lower among the 25(OH)D deficient group. This study also showed a tendency for higher fasting glucose and higher 2-hour insulin concentrations among the 25(OH)D deficient group. Other investigators have shown similar results, with significant inverse associations between vitamin D status and fasting glucose concentration, insulin concentration and/or HOMA-IR (Delvin *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2010; Garanty-Bogacka *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2011; Ashraf *et al.*, 2011).

Expected associations were reported through different parameters when evaluating the relationship between vitamin D status and glucose metabolism during adolescence, as glycated hemoglobin (Alemzadeh *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2011) and insulin sensitivity (Alemzadeh *et al.* 2008; Rajakumar *et al.*, 2012). However, findings are inconsistent among studies. Poomthavorn *et al.* (2012) found no relationship between serum 25(OH)D and HOMA-IR, WBISI, fasting plasma glucose, fasting insulin or 2-hour plasma glucose in Thai obese adolescents. Moreover, no correlations with glucose tolerance, insulin sensitivity or insulin secretion were observed by Ferrarezi *et al.* (2012) with Brazilian obese adolescents, and neither by Erdönmez *et al.* (2011) with

children and adolescents from Turkey. Besides an ethnic component was considered in the above mentioned studies, the differences regarding the latitude, zenith angle of the sun and sun exposure habits could have some influence in the observed results.

Furthermore, many studies included children in their analysis (which means non-pubertal subjects), which may impact differently the studied metabolic pathways. Khadgawat *et al.* (2012), evaluating the influence of puberty on glucose metabolism in obese individuals from 6 to 17 years old, reported an inverse relationship between 25(OH)D and HOMA-IR only in post-pubertal ones.

Better understood in adulthood, the relationship between 25(OH)D concentrations and glucose metabolism is not well explored among the youth, since the consequences of an altered glucose metabolism and insulin resistance or sensitivity in this period are mild. There are, however, possible evidences by which 25(OH)D insufficiency and/or deficiency could contribute to insulin resistance. First, there are gene polymorphisms of vitamin D receptor (VDR), vitamin D binding protein (DBP) and vitamin D 1 α hydroxylase (CYP1 α), that could modify insulin secretion leading to insulin resistance and deregulation of glucose homeostasis (Oh & Barrett-Connor, 2002; Thrailkill *et al.*, 2011; Malecki *et al.*, 2003).

Second is the immune regulatory function of vitamin D, given that almost every cell of the immune system expresses VDR. Studies supported the role of 25(OH)D and calcitriol as anti-inflammatory agents. Calcitriol could inhibit T-cell proliferation, and as also can be produced by activated macrophages (Chagas *et al.*, 2012).

In chronic inflammation, calcitriol could inhibit the release of the TNF α from the macrophages by regulating the activity of the NF- κ B (Teegarden & Donkin, 2009) as well as suppress the expression of Toll like receptor 2 and 4 proteins, reducing the release of cytokines.

Lastly, disturbances on calcium-PTH axis can be mentioned. Hypocalcemia can lower glucose-stimulated insulin secretion in β -cells (Yamaguchi *et al.*, 2011). Higher PTH levels reduces insulin sensitivity and glucose uptake by liver, muscle and adipose cells (Harkness & Cromer, 2005).

Although obesity is an important determinant of both inadequate vitamin D status and abnormal glucose homeostasis, the relationship between these parameters was still significant when models were adjusted by adiposity parameters (Delvin *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2010; Garanty-Bogacka *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2011). In accordance, circulating 25(OH)D was negatively associated with glucose and HOMA-IR after

adjusting by percent of body fat, season, sexual maturation, age and sex in American black and white adolescents living in Augusta, GA (33° North Latitude) (Parikh *et al.*, 2012).

Studies that have evaluated the benefits of vitamin D supplementation on insulin and glucose metabolism during adolescence are scarce. Ashraf *et al.* (2011), after evaluating the relationship between 25(OH)D and the components of metabolic syndrome in obese adolescents, supplemented a subgroup of 14 deficient girls. Authors observed a trend for improvement in fasting glucose.

Belenchia *et al.* (2013) supplemented 35 obese vitamin D deficient adolescents with 4000 IU/day or placebo for 6 months. The supplemented group significantly increased 25(OH)D concentration, and decreased fasting insulin and HOMA-IR, suggesting that the correction of an inadequate 25(OH)D concentration may be important to the standard treatment of obesity and its associated insulin resistance. These results indicate that effects of vitamin D supplementation in glucose metabolism should be further investigated during adolescence, irrespective of geographical localization, sexual maturation, body fat, race and physical activity.

Since some of the differences observed between the studies (such as age, 25(OH)D measurement method and study design) could lead to different results, more prospective interventional controlled studies with different ethnicities, adequate sample size and vitamin D dosage and also greater power test are greatly needed to yield stronger results. Studies using gold-standard techniques to assess insulin resistance as well as 25(OH)D concentration would also bring valuable insights.

Indeed, because vitamin D insufficiency is nowadays a public health concern in many countries, and the prevalence of disturbances of glucose metabolism does not stop increasing, it would be prudent to maintain an adequate concentration of circulating vitamin D. This can be achieved by encouraging not only an active and outdoor lifestyle, but also a balanced diet, composed by foods naturally rich in vitamin D together with fortified foods, if available. When such condition is not achieved, then the vitamin D supplementation should be considered.

Conclusions

In summary, this review showed most evidences that vitamin D status could influences glucose dysregulation that is worsen during adolescence due to factors such

as pubertal development and transient pubertal insulin resistance, as well as inadequate physical activity and dietary habits. The vitamin D status may affect the secretion of pancreatic insulin through their effects on vitamin D metabolism-related genes, immune regulatory function and chronic inflammation. In addition, decreased 25(OH)D concentrations cause alterations in calcium-PTH axis, leading to the speculation that PTH may mediate the effects of vitamin D on insulin sensitivity and glucose tolerance.

Finally, considering the elevated prevalence of 25(OH)D insufficiency and deficiency among adolescents, in which chronic diseases are not expected but getting every day more common, the vitamin D status correction in this young group could contribute to a better health status during older ages.

References

American Diabetes Association (ADA). Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 2000; 23(3): 381-9.

Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M. Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism*. 2008; 57(2): 183-91.

Ashraf A, Alvarez J, Saenz K, Gower B, McCormick K, Franklin F. Threshold for effects of vitamin D deficiency on glucose metabolism in obese female African-American adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(9): 3200-6.

Ashraf AP, Alvarez JA, Gower BA, Saenz KH, McCormick KL. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D and components of the metabolic syndrome in obese adolescent females. *Obesity (Silver Spring)*. 2011; 19(11): 2214-21.

Belenchia AM, Tosh AK, Hillman LS, Peterson CA. Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2013; 97: 774-81.

Boucher-Berry C, Speiser PW, Carey DE, Shelov SP, Accacha S, Fennoy I, et al. Vitamin D, osteocalcin, and risk for adiposity as comorbidities in middle school children. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(2): 283-93.

Chagas CEA, Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients*. 2012; 4(1): 52-67.

Cheng S, Massaro JM, Fox CS, Larson MG, Keyes MJ, McCabe EL et al. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes*. 2010; 59: 242–8.

Delvin EE, Lambert M, Levy E, O'Loughlin J, Mark S, Gray-Donald K, et al. Vitamin D status is modestly associated with glycemia and indicators of lipid metabolism in French-Canadian children and adolescents. *J Nutr*. 2010; 140(5): 987-91.

Duncan GE, Perri MG, Theriaque DW, Hutson AD, Eckel RH, Stacpoole PW. Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults. *Diabetes Care*. 2003, 26: 557–62.

Elder DA, Prigeon RL, Wadwa RP, Dolan LM, D'Alessio DA. β -Cell Function, Insulin Sensitivity, and Glucose Tolerance in Obese Diabetic and Nondiabetic Adolescents and Young Adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 185-91.

Erdönmez D, Hatun S, Çizmecioglu FM, Keser A. No relationship between vitamin D status and insulin resistance in a group of high school students. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2011; 3(4): 198-201.

Fazeli Farsani S, van der Aa MP, van der Vorst MM, Knibbe CA, de Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia*. 2013; 56: 1471-88.

Ferrarezi DA, Bellili-Muñoz N, Nicolau C, Cheurfa N, Guazzelli IC, Frazzatto E, et al. Allelic variations in the vitamin D receptor gene, insulin secretion and parents' heights are independently associated with height in obese children and adolescents. *Metabolism*. 2012; 61(10): 1413-21.

Ford ES, Zhao G, Tsai J, Li C. Associations between concentrations of vitamin D and concentrations of insulin, glucose, and HbA1c among adolescents in the United States. *Diabetes Care*. 2011; 34(3): 646-8.

Ganji V, Zhang X, Shaikh N, Tangpricha V. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-

hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(1): 225-33.

Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Goral J, Krupa B, Syrenicz J, Walczak M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D (25-OH-D) in obese adolescents. *Endokrynol Pol.* 2011; 62(6): 506-11.

Giannini C, Caprio S. Progression of β -cell dysfunction in obese youth. *Curr Diab Rep.* 2013; 13: 89-95.

Goran MI, Ball GD, Cruz ML. Obesity and Risk of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease in Children and Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 1417-27.

Harkness L, Cromer B. Low levels of 25-hydroxy vitamin D are associated with elevated parathyroid hormone in healthy adolescent females. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 109–13.

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

Hu FB, van Dam RM, Liu S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia.* 2001; 44: 805-17.

Johnson MD, Nader NS, Weaver AL, Singh R, Kumar S. Relationships between 25-hydroxyvitamin D levels and plasma glucose and lipid levels in pediatric outpatients. *J Pediatr.* 2010; 156(3): 444-9.

Kelly A, Brooks LJ, Dougherty S, Carlow DC, Zemel BS. A cross-sectional study of vitamin D and insulin resistance in children. *Arch Dis Child.* 2011; 96(5): 447-52.

Khadgawat R, Thomas T, Gahlot M, Tandon N, Tangpricha V, Khandelwal D, Gupta N. The Effect of Puberty on Interaction between Vitamin D Status and Insulin Resistance in Obese Asian-Indian Children. *Int J Endocrinol.* 2012; 2012: 173581.

Maestro B, Campion J, Dávila N, Calle C. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr J*. 2000; 47: 383–91.

Maestro B, Molero S, Bajo S, Dávila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell Biochem Funct*. 2002; 20: 227–32.

Malecki MT, Klupa T, Wolkow P, Bochenski J, Wanic K, Sieradzki J. Association study of the vitamin D: Alpha-hydroxylase (CYP1alpha) gene and Type 2 diabetes mellitus in a polish population. *Diabetes and Metabolism*. 2003; 29: 119-24.

Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism*. 2002; 51: 356–9.

Parikh S, Guo DH, Pollock NK, Petty K, Bhagatwala J, Gutin B, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations are correlated with cardiometabolic risk among American black and white adolescents living in a year-round sunny climate. *Diabetes Care*. 2012; 35(5): 1133-8.

Peechakara SV, Pittas AG. Vitamin D as a potential modifier of diabetes risk. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008; 4(4): 182-3.

Poomthavorn P, Saowan S, Mahachoklertwattana P, Chailurkit L, Khlairit P. Vitamin D status and glucose homeostasis in obese children and adolescents living in the tropics. *Int J Obes (Lond)*. 2012; 36(4): 491-5.

Rajakumar K, Fernstrom JD, Janosky JE, Greenspan SL. Vitamin D insufficiency in preadolescent African-American children. *Clin Pediatr*. 2005; 44(8): 683-92.

Rajakumar K, Fernstrom JD, Holick MF, Janosky JE, Greenspan SL. Vitamin D status and response to vitamin D(3) in obese vs. non-obese African American children. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16: 90–5.

Rajakumar K, de las Heras J, Lee S, Holick MF, Arslanian SA. 25-hydroxyvitamin D concentrations and in vivo insulin sensitivity and β -cell function relative to insulin sensitivity in black and white youth. *Diabetes Care*. 2012; 35(3): 627-33.

Shin YH, Kim KE, Lee C, Shin HJ, Kang MS, Lee HR, et al. High prevalence of vitamin D insufficiency or deficiency in young adolescents in Korea. *Eur J Pediatr*. 2012; 171: 1475-80.

Smotkin-Tangorra M, Purushothaman R, Gupta A, Nejati G, Anhalt H, Ten S. Prevalence of vitamin D insufficiency in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2007; 20(7): 817-23.

Teegarden D, Donkin SS. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutr Res Rev*. 2009; 22: 82–92.

Tfayli H, Lee S, Arslanian S. Declining beta-cell function relative to insulin sensitivity with increasing fasting glucose levels in the nondiabetic range in children. *Diabetes Care*. 2010; 33: 2024–30.

Thrailkill KM, Jo CH, Cockrell GE, Moreau CS, Fowlkes JL. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency? *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(1): 142-9.

Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, Rogol AD, Lovejoy JC, Sheffield-Moore M, Mauras N, Bowers CY. Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocr Rev*. 2005; 26: 114–46.

Weiss R, Dufour S, Taksali SE, Tamborlane WV, Petersen KF, Bonadonna RC, Boselli L, Barbetta G, Allen K, Rife F, Savoye M, Dziura J, Sherwin R, Shulman GI, Caprio S. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet*. 2003; 362: 951-7.

Williams DM, Fraser A, Lawlor DA. Associations of vitamin D, parathyroid hormone and calcium with cardiovascular risk factors in US adolescents. *Heart*. 2011; 97(4): 315-20.

Yamaguchi T, Kanazawa I, Takaoka S, Sugimoto T. Serum calcium is positively correlated with fasting plasma glucose and insulin resistance, independent of parathyroid hormone, in male patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab Clin Exp*. 2011; 60: 1334–9.

Table 1. Included studies: study design, country, population, sex, age and sample size.

Authors and year of publication	Study Design	Country	Population	Sex	Age	N
Alemzadeh R et al., 2008	Cross-sectional	USA	obese	M/F	6 to 17	127
Ashraf AP et al., 2009	Cross-sectional	USA	obese	F	mean = 14±2	51
Ashraf AP et al., 2011	Cross-sectional / Supplementation trial	USA	obese	F	mean = 14±2	80
Boucher-Berry C et al., 2012	Cross-sectional	USA	normal weight, overweight and obese	M/F	11 to 14	106
Delvin EE et al., 2010	Cross-sectional	Canada	normal weight, overweight and obese	M/F	9, 13 and 16	1745
Erdönmez D et al., 2011	Cross-sectional	Turkey	normal weight and obese	M/F	11 to 18	301
Ferrarezi DA et al., 2012	Cross-sectional	Brazil	obese	M/F	7 to 16	319
Ford ES et al., 2011	Cross-sectional	USA	normal weight, overweight and obese	M/F	12 to 17	1941
Ganji V et al., 2011	Cross-sectional	USA	normal weight, overweight and obese	M/F	12 to 19	5867
Garanty-Bogacka B et al., 2011	Cross-sectional	Poland	obese	M/F	10 to 18	64
Johnson MD et al., 2010	Cross-sectional	USA	normal weight, overweight and obese	M/F	2 to 18	302
Kelly A et al., 2011	Cross-sectional	USA	normal weight and obese	M/F	4 to 18	85
Mutlu A et al., 2011	Cross-sectional	Turkey	type 1 diabetes	M/F	2 to 20	120
Parikh S et al., 2012	Cross-sectional	USA	normal weight, overweight and obese	M/F	14 to 18	701
Poomthavorn P et al., 2012	Cross-sectional	Thailand	normal weight, overweight and obese	M/F	mean = 11.2 ± 2.6	179
Rajakumar K et al., 2012	Cross-sectional	USA	normal weight and obese	M/F	8 to 18	183
Shin YH et al., 2012	Cross-sectional	South Korea	normal weight and overweight	M/F	12 and 13	188
Williams DM et al., 2011	Cross-sectional	UK	normal weight, overweight and obese	M/F	12 to 19	740-5609
Belenchia AM et al., 2013	Randomized controlled trial	USA	obese	M/F	mean = 14 ± 3	35

4.2. ARTIGO 2

Relationships between bone and fat: associations between vitamin D, osteocalcin, adipokines and markers of glucose metabolism among adolescents

Artigo Original

Kelly V. Giudici, Regina Mara Fisberg, Dirce Maria L. Marchioni,
Bárbara Santarosa Emo Peters, Lígia A. Martini

Submetido ao *Journal of Human Nutrition and Dietetics* em 2015.
(Comprovante de submissão – **Anexo 10**)

Title

Relationships between bone and fat: associations between vitamin D, osteocalcin, adipokines and markers of glucose metabolism among adolescents

Running head

Bone and fat relationship among adolescents

Authors and institution

Kelly V. Giudici¹, Regina Mara Fisberg¹, Dirce Maria L. Marchioni¹, Bárbara S. E. Peters¹, Lígia A. Martini¹

¹ Nutrition Department, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author

Lígia Araújo Martini

lmartini@usp.br

Nutrition Department, School of Public Health, University of São Paulo

Avenida Doutor Arnaldo, 715 / Zip Code 01246-904

Cerqueira César, São Paulo, SP, Brazil

Phone +55 11 3061-7859

Author contributions

K. V. Giudici performed the subject recruitment and was involved in data collection and computation, statistical analysis, interpretation of the results and in writing the manuscript. L. A. Martini defended the research grant, managed the study, contributed to the interpretation of the results and assisted preparation and reviewing the manuscript. D. M. L. Marchioni, R. M. Fisberg and B. S. E. Peters assisted in the interpretation of the results as well as in reviewing the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Key words: osteocalcin, leptin, vitamin D, adolescent, obesity, insulin.

Abstract

Background: The way bone and adipose tissue dialogue and how they affect glucose homeostasis depends on the interaction of their products (osteocalcin, leptin and adiponectin). This study aimed to investigate the relationship between 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], osteocalcin, adipokines, markers of glucose metabolism, lipid profile and nutritional status among adolescents. **Methods:** Cross-sectional study with 198 adolescents 14-18 years old. Serum 25(OH)D, parathyroid hormone (PTH), glucose, insulin, carboxylated (cOC) and undercarboxylated (ucOC) osteocalcin, adiponectin, leptin, total cholesterol (TC), triglycerides, HDL-c, LDL-c and VLDL-c were measured. **Results:** Weight excess group (42.6% from total) presented higher PTH, leptin, LDL-c, VLDL-c, TC, triglycerides, waist and hip circumferences, insulin, HOMA-IR, HOMA- β and lower 25(OH)D, adiponectin, cOC, ucOC, HDL-c and QUICKI than normal weight subjects. 25(OH)D positively correlated with ucOC ($r=0.326$; $p<0.0001$), adiponectin ($r=0.151$; $p=0.034$), HDL-c ($r=0.323$; $p<0.0001$) and TC ($r=0.183$; $p=0.01$), and negatively with BMI ($r=-0.294$; $p<0.0001$), weight ($r=-0.307$; $p<0.0001$) and waist circumference ($r=-0.232$; $p=0.001$). The association between 25(OH)D and ucOC was also observed in the multiple regression analysis, after adjustment for age, BMI and season (partial $R^2=0.071$, $p<0.0001$). 25(OH)D and ucOC did not correlate with markers of glucose metabolism, but leptin strongly correlated with insulin ($r=0.746$; $p<0.0001$), HOMA-IR ($r=0.720$; $p<0.0001$), HOMA- β ($r=0.703$; $p<0.0001$) and QUICKI ($r=-0.749$; $p<0.0001$). **Conclusions:** Data confirm the link between obesity, 25(OH)D, osteocalcin and leptin. Overweight/obese subjects presented lower 25(OH)D and osteocalcin concentrations, worse lipid profile and higher risk to future development of diabetes. Findings reinforce the importance of fighting obesity, especially during adolescence, a life stage with important physiological and body changes.

Introduction

It has been increasingly recognized that vitamin D and bone interacts with many tissues and impact plenty of metabolic pathways, both in animal models and among humans. The way bone and adipose tissue dialogue and how they affect glucose homeostasis depends on the production and interaction of their products, like osteocalcin – a protein produced by osteoblasts – and adipokines such as leptin and adiponectin.⁽¹⁻⁶⁾ Leptin plays, through hypothalamic stimulation, an important role on bone formation and glucose homeostasis,^(1,5) while adiponectin is capable to attenuate insulin resistance (IR) by enhancing glucose utilization and fatty acid oxidation by muscle cells and increasing insulin sensitivity of the liver.⁽⁷⁾

Osteocalcin is found in circulation carboxylated (cOC) and undercarboxylated (ucOC). Its carboxylation depends of vitamin K,⁽⁸⁾ and while carboxylated form is known to act in bone mineralization by regulating osteoblasts and osteoclasts activity,⁽⁹⁾ the undercarboxylated form seem to have extra-bone effects, enhancing insulin sensitivity and secretion, stimulating β -pancreatic cell proliferation and promoting adiponectin expression.^(2,4)

Vitamin D is another factor influencing bone-fat-glucose metabolism relationships, since vitamin D receptor (VDR) response elements are found on the osteocalcin^(3,10) and leptin genes⁽¹¹⁾. Liu *et al.*⁽¹²⁾ described that 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] concentration was positively associated with adiponectin and inversely associated with parameters of IR in non-diabetic subjects. Gómez *et al.*⁽¹³⁾ found a negative correlation between vitamin D and body mass index (BMI), fat mass and leptin among vitamin D sufficient individuals. Similarly, 25(OH)D was inversely correlated with IR, triglycerides and fasting glucose among Americans.⁽¹⁴⁾

The increasing prevalence of overweight and vitamin D insufficiency observed among adults and elderly are now reflecting among adolescents, due to shared genetic and environmental factors.^(15,16) In addition, being overweight when young is known to increase the chance of becoming an obese adult,⁽¹⁷⁾ exposed to the full range of metabolic disorders for which obesity is a risk factor, as diabetes mellitus and cardiovascular diseases.

The underlying mechanism by which vitamin D, adipokines and osteocalcin act in the crosstalk between bone and fat mass are not completely understood among youth. Thus, this study aimed to investigate the relationship between serum 25 hydroxyvitamin

D, osteocalcin, adipokines, markers of glucose metabolism, lipid profile and nutritional status among adolescents.

Methods

Study design and population

This cross sectional study included adolescents 14-18 years old living in São Paulo, Brazil. They were participants from the Health Survey – São Paulo (ISA-SP; <http://www.fsp.usp.br/isa-sp>), a multicenter population-based study with people from São Paulo, Brazil; users from the Primary Care Center Horácio Geraldo de Paula Souza of the University of São Paulo or from the League of Childhood Obesity from the School of Medicine of the University of São Paulo. Interviews and blood collection varied from 2011 to 2013. Individuals with chronic diseases besides obesity were not included. From 437 individuals that fitted the inclusion criteria, 241 agreed to join the study, although 198 came to interview and had their blood collected.

The study was approved by the Ethics in Research Committee from the School of Public Health of the University of São Paulo with the protocol number 2307/2011. All participants (or their legal guardian, in case of those <18 years old) signed an informed consent and were informed about the procedures and objectives of the research.

Study variables

Participants were interviewed by trained personnel and answered socioeconomic and demographic questionnaires. Height and weight were measured in duplicate, as well as waist (WC) and hip circumferences (HC), by trained nutritionists. Participants were weighed and had their height measured with light clothes and wearing no shoes. Weight was determined within 0.1 kg for each subject using a digital scale (Filizola ®). Height was determined using a fixed wall-scale stadiometer (Seca bodymeter 208®) to the nearest 0.1 cm. WC and HC were measured with an inextensible 150cm measuring tape. Nutritional status was determined according to BMI-for-age Growth Charts.⁽¹⁸⁾

Blood collection after 12-hour fasting was done for biochemical analysis of: 25(OH)D (HPLC; Immunodiagnostik AG, Germany), parathyroid hormone (ELISA; IBL America, Minneapolis, MN, USA), glucose (enzymatic colorimetric method;

Quibasa, Brazil), insulin (chemiluminescence; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), cOC (ELISA; IBL America, Minneapolis, MN, USA), ucOC (ELISA; Cusabio, China), leptin (ELISA; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), adiponectin (ELISA; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), total cholesterol (TC) (enzymatic colorimetric method; Quibasa, Brazil), triglycerides (enzymatic colorimetric method; Quibasa, Brazil), HDL-c (enzymatic colorimetric method; Quibasa, Brazil), LDL-c (calculated by difference) and VLDL-c (calculated from triglycerides measures).

Vitamin D status was determined according to classification proposed by Holick *et al.*,⁽¹⁹⁾ in which 25 hydroxyvitamin D concentrations <20 ng/mL defines deficiency and 20-30 ng/mL defines insufficiency.

Statistical analysis

Descriptive analyses were used for characterization of the sample. The normality of the distribution of continuous variables was tested by Shapiro-Wilk Test, and logarithmic transformation was used when needed. The comparison of means for quantitative variables was made by two-sided Student's T-test (two means) and by Tukey Test (>2 means). Correlations were tested using Pearson's Correlation. Linear regression models were employed with the 25(OH)D concentration as the independent variable. Age, BMI and season in which blood was collected were included in the model to adjust for their potentially confounding effect. UcOC was also tested as an independent variable. Statistical power analysis was assessed for each tested regression model and, considering a probability level of 5% ($\alpha = 0.05$), found a power of > 0.98, which confirms that our sample size was adequate to the analyses held in the present study. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics Software 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

From the total of 198 participants with mean age of 16.3 years (SD = 1.4), 101 were male (51.0%) and 72 (36.4%) presented vitamin D deficiency, while 70 (35.4%) were vitamin D insufficient. **Table 1** shows biochemical and anthropometric variables according to sex and nutritional status. Girls presented higher leptin ($p < 0.0001$), HDL-

c ($p < 0.0001$), LDL-c ($p = 0.006$) and TC ($p < 0.0001$) than boys, and lower glucose ($p = 0.042$).

From the total, 42.6% ($n = 84$) were classified as overweight or obese. This group presented higher PTH ($p = 0.006$), leptin ($p < 0.0001$), LDL-c ($p < 0.0001$), VLDL-c ($p < 0.0001$), TC ($p = 0.026$), triglycerides ($p < 0.0001$), WC ($p < 0.0001$), HC ($p < 0.0001$), insulin ($p < 0.0001$), HOMA-IR ($p < 0.0001$), HOMA- β ($p < 0.0001$) and lower 25(OH)D ($p < 0.0001$), adiponectin ($p = 0.001$), ucOC ($p = 0.006$), carboxylated osteocalcin ($p = 0.036$), HDL-c ($p = 0.001$) and QUICKI ($p < 0.0001$) than normal weight subjects (**Table 1**).

Correlation analysis demonstrated positive associations between 25(OH)D and ucOC ($r = 0.326$; $p < 0.0001$), adiponectin ($r = 0.151$; $p = 0.034$), HDL-c ($r = 0.323$; $p < 0.0001$) and TC ($r = 0.183$; $p = 0.01$) levels. 25(OH)D negatively correlated with BMI ($r = -0.294$; $p < 0.0001$), weight ($r = -0.307$; $p < 0.0001$) and WC ($r = -0.232$; $p = 0.001$). The associations between 25(OH)D and ucOC, HDL-c, TC and WC were also observed in the multiple regression analysis, after adjustment for age, BMI and season of the year (**Figure 1**). In addition, ucOC was associated to adiponectin (partial $R^2 = 0.042$; $p = 0.003$), after adjusting for age and BMI (**Figure 2**).

UcOC and adiponectin were lower among vitamin D deficient subjects (ucOC: 0.48 ng/mL, SD = 0.70 vs. 0.87 ng/mL, SD = 1.10; $p < 0.0001$; adiponectin: 24.3 μ g/mL, SD = 17.8 vs. 28.9 μ g/mL, SD = 17.1; $p = 0.016$). This group also presented lower HDL-c (39.9 mg/dL, SD = 10.1 vs. 44.5 mg/dL, SD = 10.8; $p = 0.002$), and higher weight (81.1 kg, SD = 31.5 vs. 65.9 kg, SD = 21.0; $p < 0.0001$), BMI (28.6 kg/m², SD = 10.6 vs. 23.3 kg/m², SD = 6.7; $p < 0.0001$) and WC (89.1 cm, SD = 20.8 vs. 81.3 cm, SD = 14.9; $p = 0.006$) when compared to vitamin D non-deficient participants.

Correlations between osteocalcin or 25(OH)D with markers of glucose metabolism were not observed among our sample, however leptin strongly correlated with insulin ($r = 0.746$; $p < 0.0001$), HOMA-IR ($r = 0.720$; $p < 0.0001$), HOMA- β ($r = 0.703$; $p < 0.0001$) and QUICKI ($r = -0.749$; $p < 0.0001$). Significant results were also observed among adiponectin and insulin ($r = -0.318$; $p = 0.011$), HOMA-IR ($r = -0.274$; $p = 0.030$), HOMA- β ($r = -0.410$; $p = 0.001$) and QUICKI ($r = 0.282$; $p = 0.025$) (**Table 2**).

Figure 3 shows markers of glucose metabolism according to leptin quartiles, with lower means for insulin, HOMA-IR and HOMA- β in the first quartile (Q1) of serum leptin concentration and higher means in the fourth quartile (Q4) ($p < 0.0001$ for

all). Accordingly, an inverse relation was observed with QUICKI ($p < 0.0001$), with higher mean in Q1 and lower mean in Q4.

Discussion

Important findings were observed between vitamin D deficient and non-deficient subjects in our study: those with lower serum 25(OH)D concentrations presented lower ucOC, adiponectin and HDL-c, and higher body weight, BMI and WC. Regression analysis showed that this relationship between 25(OH)D with ucOC, HDL-c and WC persisted after adjusting for BMI, age and season of the year. In concordance to our findings, Garanty-Bogacka *et al.*⁽²⁰⁾ have observed a positive correlation between serum total osteocalcin and 25(OH)D concentrations among obese children and adolescents.

Vitamin D acts – through its receptor – on osteocalcin gene. Vitamin D response element (VDRE) located in the distal promoter of the osteocalcin gene leads to the activation of several mechanisms that increases its transcription, like chromatin reorganization, facilitation of interactions between the proximal and distal regulatory domains, and recruitment of receptor co-activator molecules.⁽⁹⁾ Moreover, vitamin D also regulates osteocalcin gene expression at the post-transcriptional level, by stabilizing the osteocalcin mRNA, as demonstrated in clonal osteoblast cells.⁽²¹⁾

Undercarboxylated osteocalcin is known to increase pancreatic β -cell proliferation and insulin secretion, and to improve insulin sensitivity by regulating the expression of adiponectin in adipocytes.⁽²⁾ Studies with rodents have shown that ucOC produced by osteoblasts increases adiponectin production and decreases fat mass accumulation and the risk of developing diabetes.^(22,23) Not many studies have evaluated ucOC concentrations among adolescents yet, and, similar to vitamin D, there are plenty of different methods used to make this assessment, turning it difficult to make comparisons.

Polgreen *et al.*⁽²⁴⁾ found a mean ucOC of 12.7 ng/mL (SD = 0.6) among 137 youth at mean age 18.6 years (17–22 years). They did not observe significant associations between ucOC and any marker of glucose metabolism or BMI though. Neither did Rochefort *et al.*⁽²⁵⁾ among 13 normal weight and 27 obese children 9-12 years old. They only found a negative relationship between ucOC and insulin confined to a subgroup of obese participants ($n = 13$) that went through a 6-month physical training programme ($R^2 = 0.424$; $p = 0.009$).

Other studies that did not assess ucOC separately have shown low total osteocalcin to be related to IR and obesity among youth^(20,26) and adults^(27,28). Garanty-Bogacka *et al.*⁽²⁰⁾ found that serum total osteocalcin was inversely associated with IR, abnormal lipid profile, systemic inflammation and body fatness among obese children and adolescents. Other studies have also indicated an inverse correlation between osteocalcin and glucose concentrations in older populations.⁽²⁷⁻³⁰⁾ Our study, however, failed to show a correlation between osteocalcin and IR or insulin secretion, as also did Abseyi *et al.*⁽⁶⁾ when evaluating 150 obese nondiabetic children and adolescents. A possible explanation to our finding is that osteocalcin may have different effects among diabetic and euglycemic individuals, as shown by Rosato *et al.*⁽³¹⁾ in a study with noninsulin-dependent diabetic subjects and healthy controls. Thus, the few cases with abnormal glucose concentrations in our sample might be one of the factors responsible for this lack of relationship.

Very curiously, there is evidence that, *in vitro*, adipocytes from human abdominal visceral fat (from nonobese males) is capable of producing and releasing both cOC and ucOC.⁽³²⁾ This fact shows that the knowledge about how bone and fat tissue contribute to circulating osteocalcin and its metabolic functions is still on its halfway, and how important is to further investigate these pathways, especially in early life stages.

Meanwhile, we found that higher adiponectin was associated with lower insulin, HOMA-IR, HOMA- β and with higher QUICKI. This negative correlation among adiponectin and IR have also been observed in other studies with children and adolescents.^(6,33) In addition, positive correlations between adiponectin and both cOC and ucOC were observed in the present study, and the relationship between ucOC and adiponectin persisted after adjusting for age and BMI, what indicates that circulating adiponectin may play a significant role in the relationship between osteocalcin and glucose homeostasis among nondiabetic adolescents. This hypothesis is supported by a study from Lee *et al.*,⁽²⁾ who created mice compound heterozygote for osteocalcin and adiponectin genes (Ocn+/-; Adipo+/-). They observed decreased insulin sensitivity and adiponectin concentrations in these animals (compared to wild type or single heterozygote mice), while glucose and insulin concentrations and insulin secretion remained within the normal range, and concluded that osteocalcin regulates insulin sensitivity independently of its effect on insulin secretion and that this regulation is, at least partly, mediated by adiponectin.

Other adipokine particularly involved in the interplay between bone and glucose metabolism is leptin, a hormone that is overproduced among overweight people. It is capable of inhibiting bone formation and favoring bone resorption through the regulation of the central nervous system: the expression of its receptor (LEPR) leads to noradrenalin release and, then, to the activation of β -2 adrenergic receptor (β 2R) in osteoblasts, reducing their activity.⁽¹⁾ Leptin also decreases the bioactivity of osteocalcin through stimulating the expression of *Esp* gene in osteoblasts in mice,⁽³⁴⁾ what leads to reduced adiponectin expression and, in consequence, to a decrease on its beneficial effects on glucose homeostasis. Other metabolic actions of this hormone are related to the regulation of food intake and the increase in energy expenditure through sympathetic nerve activity. However, these actions are not effective in the fight against overweight, given that leptin resistance affects the majority of obese people, who becomes insensitive to endogenous hyperleptinemia.⁽³⁵⁾ Leptin concentrations strongly correlated with IR and insulin secretion ($p < 0.0001$) in the present study. These correlations between leptin and markers of glucose metabolism remained significant after controlling for age and BMI. Similar results were found among young women⁽³⁶⁾ and male adults⁽³⁷⁾. These data reinforce the idea that obesity is a risk factor for metabolic disorders by affecting glucose homeostasis partly through the role of leptin.

We found important differences when comparing overweight/obese people with eutrophic subjects. Beyond presenting worse lipid profile and higher leptin and PTH levels, WC and HC, those with weight excess also presented lower cOC, ucOC and adiponectin, worse indicators of IR and higher β -cell function. Adiposity is a strong determinant of insulin sensitivity and secretion,⁽³⁸⁾ and obesity seem to promote a hypersecretory pattern on pancreatic β -cells. The different types of fat and sites of lipid accumulation in the body are also important to this metabolic interactions. In prediabetic obese children and adolescents, Weiss *et al.*⁽³⁹⁾ found that intra-abdominal and intramyocellular lipid accumulation was closely linked to the development of severe peripheral IR. This exacerbated insulin secretion is probably a compensatory way in which metabolism acts to maintain a normal glycemia. The problem is that the overload in these cells could lead to cell exhaustion, and to a consequent loss of their ability to function properly, what is especially concerning among youth, and makes it clear how exposed they are to a higher risk of developing glucose intolerance and diabetes.

In a sample of adolescents with over 40% of weight excess, we found 25(OH)D to be inversely correlated to BMI. This negative association is explained by Hypponen &

Power⁽⁴⁰⁾ as a causal relation between risk factor and outcome: in a study using Mendelian randomization analysis, based on a bi-directional genetic approach that limits confounding, they observed that higher BMI was a strong determinant for lower 25(OH)D concentrations. This is explained, in part, by the fact that BMI is an indicator of high fat mass content, and that adipocytes abduct vitamin D (a molecule soluble in fat) from circulation, making it stored and unavailable.⁽⁴¹⁾ On the other hand, some findings in literature also suggest that vitamin D deficiency could promote greater adiposity, through elevating PTH release, which may promote calcium influx into adipocytes and thereby enhance lipogenesis.⁽⁴²⁾ Although we did not observe a correlation between 25(OH)D and PTH, overweight/obese individuals presented higher PTH concentrations than normal weight subjects ($p = 0.006$) in our study.

25 hydroxyvitamin D did not relate to IR or fasting insulin in our study, similar to the results found by others.⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ These findings disagree with some cross-sectional nationwide studies with young populations, that have consistently reported inverse associations between 25(OH)D levels and fasting hyperglycaemia and/or increased HOMA-IR, even after adjustment for BMI.^(46,47) The positive effect of vitamin D on glucose metabolism was also showed by Chung *et al.*⁽⁴⁸⁾ They observed a significant inverse relationship between vitamin D status and IR, independent of adiposity, among Korean adolescents.

Despite TC concentrations were not significantly different among vitamin D deficient and non-deficient people in our analysis, its positive weak correlation to 25(OH)D persisted after the adjustment. Our findings partly agrees with a meta-analysis with 17 cross-sectional studies (and 25,394 subjects) from Kelishadi *et al.*,⁽⁴⁹⁾ who found 25(OH)D to be directly related to HDL-c, but inversely related to TC.

The present study has some limitations. Because of their cross-sectional design, these results do not allow to indicate causality and temporal associations. We were not able to measure fat mass percentage or bone mineral density with densitometry, magnetic resonance or computed tomography, which would have provided more precise information about visceral fat tissue and bone mass, since anthropometric measures do not distinguish fat from lean mass. However, our results clearly indicates the crosstalk between vitamin D, the bone released protein osteocalcin and weight excess among adolescents. We have also measured both carboxylated and undercarboxylated forms of osteocalcin, what is very scarce in literature among this age group.

Our data confirm the link between obesity, vitamin D, osteocalcin and leptin. Overweight/obese subjects presented lower 25(OH)D, adiponectin, cOC and ucOC concentrations, worse lipid profile and higher risk to future development of diabetes. Taken together with these findings, the low 25(OH)D concentrations observed among people in the process of bone mass gain and body growth lead us to reinforce the importance of fighting obesity and stimulating safe sun exposure and the intake of food sources containing vitamin D.

Although 25(OH)D and osteocalcin did not associate with glucose metabolism, adiponectin and leptin have shown to be part of these complex metabolic interactions. Further prospective studies are needed to assess the impact of low vitamin D and osteocalcin levels in the risk for developing chronic diseases among this population.

Acknowledgements

We thank São Paulo Research Foundation (FAPESP) for project funding (2012/11061-8) and for K. V. Giudici's PhD scholarship (2011/22768-2). The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ducy P, Amling M, Takeda S *et al.* Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000; **100**: 197-207.
2. Lee NK, Sowa H, Hinoi E *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007; **130**: 456-469.
3. Carvallo L, Henríquez B, Paredes R *et al.* 1alpha,25dihidroxy vitamin D3-enhanced expression of the osteocalcin gene involves increased promoter occupancy of the basal transcription regulators and gradual recruitment of the 1alpha,25dihidroxy vitamin D3 receptor-SCR-1 coactivator complex. *J Cell Physiol*. 2008; **214**: 740-749.
4. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G *et al.* Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; **105**: 5266-5270.
5. Confraveux CB, Levine RL, Karsenty G. A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; **310**: 21-29.
6. Abseyi N, Şıklar Z, Berberoğlu M *et al.* Relationships between osteocalcin, glucose metabolism, and adiponectin in obese children: Is there crosstalk between bone tissue and glucose metabolism? *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2012; **4**:182-188.
7. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*. 2003; **148**: 293-300.
8. Wolf G. Energy regulation by the skeleton. *Nutr Rev*. 2008; **66**: 229-233.
9. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol*. 2013; **228**: 1149-1153.

10. Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev.* 1996; **54**: 332-333.
11. Menendez C, Lage M, Peino R *et al.* Retinoic acid and vitamin D3 powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol.* 2001; **170**: 425-431.
12. Liu E, Meigs JB, Pittas AG *et al.* Plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with markers of the insulin resistant phenotype in nondiabetic adults. *J Nutr.* 2009; **139**: 329-334.
13. Gómez JM, Maravall FJ, Gómez N *et al.* Relationship between 25-(OH)D3, the IGF-1 system, leptin, anthropometric and body composition variables in a healthy, randomly selected population. *Horm Metab Res.* 2004; **36**: 48-53.
14. Pinelli NR, Jaber LA, Brown MB *et al.* Serum 25-hydroxy vitamin D and insulin resistance, metabolic syndrome, and glucose intolerance among Arab Americans. *Diabetes Care.* 2010; **33**: 1373-1375.
15. Fonseca VM, Sichieri R, Veiga GV. Fatores associados à obesidade em adolescentes. *Rev Saúde Pública.* 1998; **32**: 541-549.
16. Peters BS, dos Santos LC, Fisberg M *et al.* Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. *Ann Nutr Metab.* 2009; **54**: 15-21.
17. Malina RM, Bouchard C. *Growth, maturation and physical activity.* New York, Versa Press, USA, 1991.
18. World Health Organization (WHO). Multicentre Growth Reference Study Group. *WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development.* Geneva: WHO; 2006.

19. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; **96**: 1911-30.
20. Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Rać M *et al.* Association between serum osteocalcin, adiposity and metabolic risk in obese children and adolescents. *Endokrynol Pol.* 2013; **64**: 346-352.
21. Mosavin R, Mellon WS. Posttranscriptional regulation of osteocalcin mRNA in clonal osteoblast cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys.* 1996; **332**:142-52.
22. Nakashima R, Kamei N, Yamane K *et al.* Decreased total and high molecular weight adiponectin are independent risk factors for the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; **91**: 3873–3877.
23. Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y *et al.* Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes.* 2008; **57**: 980–986.
24. Polgreen LE, Jacobs DR Jr, Nathan BM *et al.* Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity (Silver Spring).* 2012; **20**: 2194-2201.
25. Rochefort GY, Rocher E, Aveline PC *et al.* Osteocalcin-insulin relationship in obese children: a role for the skeleton in energy metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011; **75**: 265-270.
26. Reinehr T, Roth CL. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes.* 2010; **34**: 852-858.
27. Pittas AG, Harris SS, Eliades M *et al.* Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; **94**: 827-832.

28. Zhou M, Ma X, Li H *et al.* Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in chinese individuals. *Eur. J. Endocrinol.* 2009; **161**: 723-729.
29. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M *et al.* Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; **94**: 45-49.
30. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O *et al.* Plasma osteocalcin ins inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res.* 2009; **24**: 785-791.
31. Rosato MT, Schneider SH, Shapses SA. Bone turnover and insulin-like growth factor I levels increase after improved glycemic control in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int.* 1998; **63**:107-11.
32. Foresta C, Strapazzon G, De Toni L *et al.* Evidence for osteocalcin production by adipose tissue and its role in human metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; **95**: 3502-3506.
33. Magge SN, Stettler N, Koren D *et al.* Adiponectin is associated with favorable lipoprotein profile, independent of BMI and insulin resistance, in adolescents. *J Clin Endocrin Metab.* 2012; **96**: 1549-1554.
34. Hinoi E, Gao N, Jung DY *et al.* The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol.* 2008; **183**:1235–1242.
35. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism.* 2015; **64**: 24-34.
36. Lu C, Ivaska KK, Alen M *et al.* Serum osteocalcin is not associated with glucose but is inversely associated with leptin across generations of nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; **97**: 4106-4114.

37. Jung CH, Rhee EJ, Choi JH *et al.* The relationship of adiponectin/leptin ratio with homeostasis model assessment insulin resistance index and metabolic syndrome in apparently healthy korean male adults. *Korean Diabetes J.* 2010; **34**: 237-243.
38. Goran MI, Ball GD, Cruz ML. Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; **88**: 1417-1427.
39. Weiss R, Dufour S, Taksali SE *et al.* Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet.* 2003; **362**: 951-957.
40. Hypponen E, Power C. Vitamin D status and glucose status homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity. *Diabetes Care.* 2006; **29**: 2244–2246.
41. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC *et al.* Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000; **72**: 690-3.
42. McCarty MF, Thomas CA. PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine-induced lipolysis-implications for the impact of calcium, vitamin D, and alcohol on body weight. *Med Hypotheses.* 2003; **61**: 535-542.
43. Erdönmez D, Hatun S, Çizmecioğlu FM *et al.* No relationship between vitamin D status and insulin resistance in a group of high school students. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2011; **3**: 198-201.
44. Ferrarezi DA, Bellili-Muñoz N, Nicolau C *et al.* Allelic variations in the vitamin D receptor gene, insulin secretion and parents' heights are independently associated with height in obese children and adolescents. *Metabolism.* 2012; **61**: 1413-1421.
45. Poomthavorn P, Saowan S, Mahachoklertwattana P *et al.* Vitamin D status and glucose homeostasis in obese children and adolescents living in the tropics. *Int J Obes (Lond).* 2012; **36**: 491-495.

46. Reis JP, von Mühlen D, Miller ER 3rd *et al.* Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics*. 2009; **124**: e371–e379.
47. Ganji V, Zhang X, Shaikh N *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardio- metabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001–2006. *Am J Clin Nutr*. 2011; **94**: 225–233.
48. Chung SJ, Lee YA, Hong H *et al.* Inverse relationship between vitamin D status and insulin resistance and the risk of impaired fasting glucose in Korean children and adolescents: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Public Health Nutr*. 2013; **19**: 1-8.
49. Kelishadi R, Farajzadegan Z, Bahreynian M. Association between vitamin D status and lipid profile in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr*. 2014; **65**: 404-410.

Table 1. Anthropometric and biochemical characterization of adolescents according to sex and nutritional status.

	Total (n = 198)	Sex		Nutritional status	
		Male (n = 101)	Female (n = 97)	Normal weight (n = 113)	Overweight / obese (n = 84)
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)
Age (years)	16.3 (1.4)	16.3 (1.4)	16.3 (1.4)	16.4 (1.4)	16.1 (1.4)
Anthropometric measures					
Weight (kg)	71.4 (26.3)	73.8 (28.2)	69.0 (24.1)	55.4 (7.2)	93.3 (27.0) [†]
Height (m) (n=197)	1.68 (0.09)	1.74 (0.08)	1.62 (0.06) [†]	1.69 (0.08)	1.67 (0.10)
BMI (kg/m ²) (n=197)	25.2 (8.7)	24.3 (8.4)	26.1 (8.9)	19.4 (1.9)	33.0 (8.1) [†]
Waist circumference (cm) (n=186)	84.3 (17.8)	84.3 (18.6)	84.3 (16.9)	72.1 (5.3)	100.1 (15.6) [†]
Hip circumference (cm) (n=69)	113.1 (20.8)	113.6 (23.4)	112.7 (18.3)	88.7 (6.6)	122.4 (16.4) [†]
Vitamin D and PTH					
25 hydroxyvitamin D (ng/mL)	25.2 (13.4)	23.4 (11.1)	27.0 (15.2)	27.5 (12.9)	22.0 (13.5) [†]
PTH (pg/mL) (n=195)	43.6 (27.9)	44.5 (29.2)	42.6 (26.5)	39.3 (25.3)	49.6 (30.3) [†]
Lipid profile					
HDL-c (mg/dL)	42.8 (10.7)	39.9 (9.6)	45.8 (11.1) [†]	45.7 (10.9)	38.9 (9.3) [†]
LDL-c (mg/dL)	79.2 (22.5)	74.8 (20.7)	83.8 (23.6) [†]	74.7 (20.3)	85.3 (24.1) [†]
VLDL-c (mg/dL)	16.5 (7.2)	15.7 (6.7)	17.3 (7.7)	14.5 (5.3)	19.1 (8.5) [†]
Total cholesterol (mg/dL)	138.5 (26.8)	130.4 (23.9)	146.9 (27.1) [†]	134.9 (26.3)	143.4 (27.0) [†]
Triglycerides (mg/dL) (n=197)	82.8 (35.8)	78.5 (33.4)	87.2 (37.8)	73.1 (26.3)	95.9 (42.3) [†]
Adipokines					
Leptin (ng/mL)	29.5 (21.4)	16.6 (18.3)	42.9 (15.3) [†]	18.1 (16.0)	45.1 (17.5) [†]
Adiponectin (μg/mL)	27.2 (17.5)	27.7 (17.6)	26.7 (17.4)	30.1 (17.5)	23.6 (16.9) [†]
Osteocalcin					
ucOC (ng/mL) (n=194)	0.73 (1.00)	0.79 (0.88)	0.65 (1.10)	0.77 (0.94)	0.69 (1.07) [†]
cOC (ng/mL) (n=185)	52.7 (65.9)	59.5 (74.5)	44.9 (53.7)	60.2 (75.4)	41.9 (47.6) [†]
Energy metabolism markers					
Glucose (mg/dL) (n=69)	90.7 (9.3)	93.1 (9.5)	88.5 (8.6) [†]	90.8 (6.5)	90.7 (10.2)
Insulin (mUI/L) (n=63)	10.8 (7.1)	10.2 (7.2)	11.5 (7.0)	4.8 (2.1)	13.4 (6.9) [†]
HOMA-IR (n=63)	2.4 (1.6)	2.4 (1.7)	2.5 (1.6)	1.1 (0.5)	3.0 (1.6) [†]
HOMA-β (n=63)	165.8 (134.3)	135.7 (104.8)	194.9 (153.8) [†]	66.3 (32.4)	208.7 (138.9) [†]
QUICKI (n=63)	0.35 (0.04)	0.35 (0.04)	0.34 (0.03)	0.39 (0.03)	0.33 (0.03) [†]

SD, standard deviation; BMI, body mass index; PTH, parathyroid hormone; HDL-c, high density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low density lipoprotein cholesterol; VLDL-c, very low density lipoprotein cholesterol; ucOC, undercarboxylated osteocalcin; cOC, carboxylated osteocalcin; HOMA-IR, Homeostatic Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance; HOMA-β, Homeostatic Model of Assessment Estimate of β Cell Function; QUICKI, Quantitative Insulin Sensitivity Check Index; [†] p<0.05 (Student's T-test).

Table 2. Pearson's correlation coefficients between markers of glucose metabolism and 25 hydroxyvitamin D, osteocalcin and adipokines among adolescents.

	Glucose (n = 69)		Insulin (n = 63)		HOMA-IR (n = 63)		HOMA- β (n = 63)		QUICKI (n = 63)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
25(OH)D	-0.041	NS	-0.16	NS	-0.16	NS	-0.118	NS	0.151	NS
cOC	0.197	NS	-0.029	NS	-0.005	NS	-0.143	NS	-0.012	NS
ucOC	0.148	NS	0.041	NS	0.046	NS	0.032	NS	-0.015	NS
Leptin	0.013	NS	0.746	< 0.0001	0.72	< 0.0001	0.703	< 0.0001	-0.749	< 0.0001
Adiponectin	0.174	NS	-0.318	0.011	-0.274	0.03	-0.41	0.001	0.282	0.025

25(OH)D, 25 hydroxyvitamin D; cOC, carboxylated osteocalcin; ucOC, undercarboxylated osteocalcin; HOMA-IR, Homeostatic Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance; HOMA- β , Homeostatic Model of Assessment Estimate of β Cell Function; QUICKI, Quantitative Insulin Sensitivity Check Index; NS, not significant.

Figure 1. Linear regression analyses of 25 hydroxyvitamin D with (A) carboxylated osteocalcin and (B) undercarboxylated osteocalcin, (C) adiponectin, (D) leptin, (E) HDL-cholesterol, (F) total cholesterol, (G) parathyroid hormone and (H) waist circumference adjusted for body mass index, age and season of the year among adolescents.

Figure 2. Linear regression analysis of undercarboxylated osteocalcin and adiponectin adjusted for body mass index and age among adolescents.

Figure 3. Boxplots with mean values for (A) HOMA-IR, (B) HOMA-β, (C) insulin and (D) QUICKI according to leptin quartiles among adolescents. P-values for differences between first quartile (Q1) and fourth quartile (Q4) (Tukey test). HOMA-IR: Homeostasis Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance; HOMA-β: Homeostasis Model of Assessment Estimate of β Cell Function; QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index.

4.3. ARTIGO 3

Osteocalcin, leptin and energy metabolism in American children

Artigo original

Kelly V. Giudici, Berdine R. Martin, Emma M. Laing, George P. McCabe, Linda D. McCabe, Dorothy B. Hausman, Lígia A. Martini, Richard D. Lewis, Connie M. Weaver, Munro Peacock, Kathleen M. Hill Gallant

Submetido ao *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* em 2015.

(Comprovante de submissão – **Anexo 11**)

Osteocalcin, leptin and energy metabolism in American children

Kelly Virecoulon Giudici¹, Berdine R. Martin², Emma M. Laing³, George P. McCabe⁴, Linda Doyle McCabe², Dorothy B. Hausman³, Lígia Araújo Martini¹, Richard D. Lewis³, Connie M. Weaver², Munro Peacock⁵, Kathleen M. Hill Gallant^{2,5}

¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Nutrition Science, Purdue University, West Lafayette, Indiana, United States

³ Department of Foods and Nutrition, University of Georgia, Athens, Georgia, United States

⁴ Department of Statistics, Purdue University, West Lafayette, Indiana, United States

⁵ Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, United States

Abbreviated title: Osteocalcin, leptin, and energy metabolism

Keywords: osteocalcin, leptin, bone, obesity, glucose, insulin, children.

Word count: 2883

Corresponding author and person to whom reprint request should be addressed:

Kathleen M. Hill Gallant, PhD, RD

700 West State Street, Stone Hall 207

West Lafayette, IN 47907

Ph: 765-494-0101; Fx: 765-494-0674; email: hillgallant@purdue.edu

Grants or fellowships support: This study was funded by NIH grants HD057126 (PI: Lewis) and RR025761 (Indiana CTSI, PI: Shekhar). K.V.G. has fellowship support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) 2013/15823-2.

Disclosure statement: The authors have nothing to declare relevant to this manuscript.

Clinical Trial Registration Number: NCT00931580

Abstract

Context: Inverse associations between osteocalcin and leptin and insulin resistance have been observed previously in children suggesting that osteocalcin and leptin may link bone, fat, and energy metabolism.

Objective: To investigate the relationships among serum osteocalcin, leptin and markers of energy metabolism among healthy American boys and girls having a wide range of body mass index (BMI)-for-age percentiles.

Methods: Secondary, cross-sectional analyses of baseline data from 161 boys and 157 girls ages 8-13 years who participated in a randomized controlled trial of vitamin D supplementation. Relationships among fasting serum total osteocalcin (tOC), undercarboxylated osteocalcin (ucOC), leptin, glucose, insulin and indices of insulin resistance and sensitivity (HOMA-IR, HOMA- β and QUICKI) were analyzed.

Results: 137 children (43.1%) were overweight or obese and 15 (4.7%) had increased fasting serum glucose (>99 mg/dL). Serum tOC was not correlated with leptin, glucose, insulin, HOMA-IR, HOMA- β , nor QUICKI after adjusting for fat mass. Serum ucOC negatively correlated with leptin (partial $r=-0.16$; $p=0.04$) and glucose (partial $r=-0.16$; $p=0.04$) after adjustment for body fat mass percentage, but did not correlate with insulin, HOMA-IR, HOMA- β , nor QUICKI. Leptin was a predictor of all markers of energy metabolism, after adjusting for age, sex, and body fat mass (insulin: partial $r=0.47$; glucose: partial $r=0.20$; HOMA-IR: partial $r=0.48$; HOMA- β : partial $r=0.29$; QUICKI: partial $r=-0.48$, all $p<0.001$)

Conclusions: These results confirm the strong relationship between leptin and markers of fat and energy metabolism but do not support the concept that total or undercarboxylated osteocalcin link fat and energy metabolism in healthy children.

Introduction

The interaction between bone, fat and energy homeostasis has been the focus of recent studies (1-4). This has been due to observations that fat mass and bone mass are related (5), and that leptin, a hormone produced by adipocytes, has apparent direct and indirect effects on bone cells (1). Osteocalcin, a protein produced by osteoblasts and present in serum in both carboxylated (cOC) and undercarboxylated (ucOC) forms, may link the interaction between these systems. When osteocalcin is secreted by the osteoblast, most is deposited in extracellular bone matrix. The osteocalcin present in serum represents the fraction of total osteocalcin (tOC) that has not adsorbed to hydroxyapatite. Whereas cOC has higher affinity for hydroxyapatite and is considered as the active form in bone matrix, ucOC enters blood more easily than cOC (6).

Osteocalcin-null mice versus wild-type mice have increased visceral fat, serum glucose and insulin resistance (3). In humans, findings are inconsistent with some studies (7-9), but not all (10,11), showing an inverse correlation between serum tOC and glucose concentrations. Further, obese children had lower serum tOC than normal weight children, and serum tOC inversely correlated with serum leptin and insulin resistance (12). But, experimental studies have shown ucOC to be more important than tOC in relation to energy homeostasis, since this fraction is able to increase pancreatic β -cell proliferation, insulin secretion, and insulin sensitivity by regulating the expression of adiponectin in adipocytes (3, 4).

The relationships observed in humans between obesity and bone are complex. In adults, body mass index (BMI) tends to be positively related to bone mass over a range of normal to overweight BMI, but not at higher levels of BMI in the obesity range (13). In children, overweight and obese tend to have lower bone mass compared with normal weight (5). Leptin is a key hormone linking fat mass with bone mass, but its actions are also complex and controversial (14). Ducy et al. (1) identified leptin as a potent inhibitor of bone formation acting through the central nervous system. In mice, intracerebroventricular leptin infusion stimulated its receptor (LEPR) expression in hypothalamus, promoting norepinephrine release. This sympathetic stimulation, in turn, activated β 2-adrenergic receptors in osteoblasts, decreasing osteoblast activity and increasing bone resorption (1, 15). Conversely, peripheral leptin signaling through LEPR in bone marrow stromal cells promotes differentiation to the osteoblastic lineage over the adipocytic lineage (16), and LEPR signaling in osteoblasts increases osteoprotegerin

(OPG) and decreases the receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), which decreases osteoclastogenesis. Thus, the effects of peripheral leptin signaling, opposed to leptin signaling through the central nervous system, are to increase bone formation and decrease bone resorption (14).

The objective of the present study was to determine relationships among serum osteocalcin (tOC and ucOC), leptin, glucose, insulin, and energy metabolism in a large sample of healthy American boys and girls representing a wide range in body mass index (BMI)-for-age. We hypothesized that leptin and osteocalcin would be inversely related, and that greater leptin would be associated with more adverse measures of serum glucose, insulin, insulin resistance and sensitivity. We also hypothesized that osteocalcin, particularly ucOC, would be associated with more favorable values of these measures.

Methods

Study design and population

This cross sectional study was conducted as an ancillary study to a larger randomized placebo-controlled trial of vitamin D supplementation (17), and included baseline data from 318 boys and girls ages 8 to 13 years living in the United States (GAPI Trial – University of Georgia [UGA], Purdue University [PU] and Indiana University [IU]). Healthy participants were recruited from the community by advertisement.

The GAPI study was approved by the Institutional Review Boards for Human Subjects at Purdue University, the University of Georgia and Indiana University School of Medicine. All participants and their parents or legal guardians provided informed assent and consent, respectively.

Study variables

Blood samples were collected after 12-hour fasting for the biochemical analyses of serum glucose, insulin, tOC, ucOC and leptin. Serum was stored at -80°C until analysis. Each analyte was measured at a single laboratory for all participants.

Serum tOC and ucOC were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (tOC: MicroVue™, Quidel Corp., San Diego, CA; ucOC: Takara Bio, Inc., Japan). Serum leptin and insulin were measured by radioimmunoassay (RIA) (EMD Milipore, Billerica, MA). Serum glucose was measured by microtiter modification of the enzymatic Autokit Glucose method (Wako Chemicals USA, Richmond, VA). The Homeostasis Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated as: $\text{fasting glucose (mg/dL)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) / 405$. The Homeostatic Model of Assessment Estimate of β Cell Function (HOMA- β) was calculated as: $[360 \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL})] / [\text{fasting glucose (mg/dL)} - 63]$. The Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was determined as: $1 / (\log \text{insulin} + \log \text{glucose})$. Height and weight were measured and BMI was calculated as $[\text{weight (kg)} / \text{height}^2 (\text{m}^2)]$. BMI-for-age percentiles were calculated from the 2000 CDC Growth Charts, and overweight/obese status was defined at $\geq 85^{\text{th}}$ BMI-for-age percentile (18).

Fat mass percentage was assessed using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (Delphi-A, Hologic Inc [UGA]; Lunar iDXA, GE Medical Instruments [PU]; and Hologic Discovery-W [IU]). The same technician at each site conducted scans and performed analyses using instrument-specific software and protocols. Detailed procedures are described previously (17).

Statistical analysis

Descriptive statistics were used for characterization of the study subjects. The normality of the distribution of each variable was assessed using the Shapiro-Wilk test, and variables were transformed as required. Means for quantitative variables were compared by Student's t-tests (two means) or analysis of variance (ANOVA) (more than two means). Pearson correlations and regression analyses were used to determine relationships among variables with adjustments for potential confounding variables. Fat mass was used as a variable of adjustment to eliminate adiposity as a confounder in the relationships between leptin, osteocalcin, and measures of glucose metabolism. Partial correlations adjusted for fat mass or BMI yielded similar results. Statistical analyses were performed using the Statistical Analysis Software (SAS), version 9.4 (Cary, NC). Statistical significance for all analyses was set at $\alpha = 0.05$.

Results

Anthropometrics and Biochemistry

A total of 318 subjects (50.6% boys) participated in the study, with mean age of 11.4 years (Standard Deviation [SD] 1.2) and mean BMI-for-age percentile of 68.3 (SD 29.3). Fifteen subjects (4.7%) had high fasting serum glucose concentrations (> 99 mg/dL). Based on BMI-for-age percentiles, 43.1% ($n = 137$) of participants were overweight or obese (BMI $> 85^{\text{th}}$ percentile). Compared with the normal weight subjects, overweight / obese individuals had higher serum leptin (18.0 ng/mL, Standard error of the mean [SEM] 0.9 vs. 5.8 ng/mL SEM 0.4; $p < 0.0001$), insulin (24.6 $\mu\text{U/mL}$ SEM 1.1 vs. 17.0 $\mu\text{U/mL}$ SEM 0.6; $p < 0.0001$), HOMA-IR (5.4 SEM 0.2 vs. 3.7 SEM 0.1; $p < 0.0001$) and HOMA- β (372.6 SEM 27.9 vs. 258.2 SEM 11.2; $p < 0.0001$), and lower QUICKI (0.304 SEM 0.002 vs. 0.320 SEM 0.001; $p < 0.0001$).

Girls compared with boys were younger ($p < 0.0001$), shorter in height ($p < 0.0001$), had higher body fat mass % ($p < 0.0001$), higher serum leptin ($p < 0.0001$), and higher HOMA- β ($p < 0.001$). Blacks compared with whites were younger ($p < 0.001$), had higher BMI-for-age percentile ($p = 0.001$), higher serum leptin ($p < 0.05$), higher HOMA- β ($p < 0.01$) and higher serum tOC ($p < 0.0001$), but lower serum ucOC ($p < 0.0001$). Black females presented higher serum insulin concentrations ($p < 0.0001$), higher HOMA-IR ($p < 0.001$), and lower QUICKI ($p < 0.001$), when compared with all other subgroups (black males, white males and white females) (**Table 1**).

Correlations with tOC and ucOC

Total osteocalcin did not correlate with measures of energy metabolism or with leptin. UcOC negatively correlated with leptin (partial $r = -0.162$; $p < 0.05$) and glucose (partial $r = -0.159$; $p < 0.05$) in partial correlation adjusted for fat mass percentage, although only the relationship between ucOC and leptin remained significant in the multiple regression analysis, after adjusting for age, sex and fat mass percentage (partial $r = -0.17$; $p < 0.05$) (**Figure 1**). Correlations with other measures of energy metabolism were not significant (**Table 2**).

Leptin was significantly and positively correlated with fat mass and BMI-for-age percentile ($r = 0.878$, $p < 0.0001$; $r = 0.596$, $p < 0.0001$, respectively). After adjusting for

age, sex, and fat mass percentage, regression analyses showed leptin as a predictor of all markers of energy metabolism measured: leptin was positively related to serum glucose (partial $r = 0.20$, $p = 0.001$), insulin (partial $r = 0.47$, $p < 0.0001$), HOMA-IR (partial $r = 0.48$, $p < 0.0001$), and HOMA- β (partial $r = 0.29$, $p < 0.0001$), and negatively related to QUICKI (partial $r = -0.48$, $p < 0.0001$) (**Figure 2**).

Discussion

Recent findings have identified new potential metabolic interactions between the skeleton, fat, and energy metabolism. Karsenty & Ferron (19) have suggested that insulin, bone resorption, and osteocalcin activity are regulated by a feed forward loop, in which insulin signaling in osteoblasts decreases the expression of the gene that encodes the osteoprotegerin (*Opg*) gene, increasing bone resorption by osteoclasts, which occurs at a pH of 4.5. This acidic pH favors osteocalcin decarboxylation, and higher circulating ucOC would, in turn, control pancreatic insulin release and regulate insulin sensitivity. Furthermore, leptin has been shown to negatively modulate insulin sensitivity by reducing osteocalcin bioactivity in osteoblasts (2). The metabolic cross talk between bone, fat and energy metabolism has been recently investigated in humans, but there are still few studies in youth. We tested the hypothesis that osteocalcin (especially ucOC) and leptin are related to markers of energy metabolism among healthy children. However, despite a weak negative correlation between leptin and ucOC, our analysis did not find a relation between osteocalcin and insulin resistance or other measures of energy metabolism among this population. This finding corroborates with the results from Abseyi *et al.* (10), in which 150 obese non-diabetic children and adolescents were evaluated and no relationship between osteocalcin and insulin resistance was found. Another study of 248 young Finnish women also found no correlations among osteocalcin, glucose, insulin, and HOMA-IR (11).

Our results indicate that the role of osteocalcin in glucose homeostasis may be minor or dwarfed in whole body physiology in healthy children. Other evidence also suggests that the role of osteocalcin in energy metabolism may be minor in the broader physiologic context in humans. Antiresorptive therapy drugs (such as bisphosphonates and denosumab) decrease tOC circulating concentrations from 30% to 50% (20,21). However, people under treatment with these drugs do not exhibit higher fasting glucose concentrations, increased insulin resistance or increased diabetes risk (22-24). Further,

among postmenopausal women, phylloquinone (vitamin K1) administration for 1 year decreased ucOC concentrations (by affecting osteocalcin carboxylation), but this change was not associated with insulin secretion nor insulin resistance (25).

It is possible that osteocalcin may play a larger role in individuals with diabetes or abnormal glucose homeostasis. In our sample of healthy, non-diabetic children, fewer than 5% presented elevated fasting serum glucose concentrations (> 99 mg/dL). A study from Botolin & McCabe (26) found that osteoblasts respond to chronic hyperglycemia through modulated gene expression. The investigators observed that chronic hyperglycemia leads to an increase in alkaline phosphatase activity and to a decrease in osteocalcin secretion by osteoblasts from mice. Studies with humans have also observed similar results: Rosato *et al.* (27) reported that diabetic adults had 71% lower tOC concentrations than healthy controls. Improved glycemic control after a 2-month intervention (therapy with insulin or oral medication) among diabetic subjects was associated with an increase in tOC concentrations and the change from baseline to end of study values for fasting serum glucose and tOC were inversely related ($r = -0.47$; $p = 0.034$). Meanwhile, no significant correlations were found between tOC and fasting glucose for the healthy control group. Okazaki *et al.* (28) have also observed an increase in tOC after therapy in poorly controlled noninsulin-dependent patients.

In addition to the relatively small number of studies that have evaluated ucOC in relation to energy metabolism among adolescents, it is also difficult to compare across studies because the range of values for ucOC depends on the assay employed. Applying the same method of analysis used in our study (ELISA), Van Summeren *et al.* (29) found mean ucOC concentrations of 31.3 ng/mL (SD = 23.8) among 86 children and adolescents from 3 to 18 years of age from the Netherlands. Rochefort *et al.* (30) observed mean ucOC of 34.5 ng/mL among 13 nonobese children and 34.3 ng/mL among 27 obese children aged 9 to 12 years old. Using RIA, Pollock *et al.* (31) found mean ucOC of 5.6 ng/mL among normal glucose subjects and 7.8 ng/mL among subjects with prediabetes in a group of American overweight children from 7 to 11 years old. Alfadda *et al.* (32) found median levels of 0.53 ng/mL for cOC, 1.14 ng/mL for ucOC and 8.8 ng/mL for tOC in a group of adults with type 2 diabetes, and they were lower among overweight / obese adults in comparison to what has been reported with normal individuals. Thus, it was observed that the measured tOC was unexpectedly much higher than the value obtained by summing up the two individual fractions in this study. While tOC was measured by ELISA, its fractions were measured by enzyme immunoassay

(EIA). This result leads to the importance of considering the differences among the methods established for measuring osteocalcin.

In our study, leptin and ucOC were negatively correlated independent of fat mass, and this association remained significant after adjustments for age, sex and fat mass in regression analyses. Leptin, in turn, had a strong positive correlation with insulin resistance and β -cell function, and results persisted after adjustments for age, sex, and fat mass in regression analysis. Despite being capable of inhibiting insulin secretion, the positive correlation of leptin with HOMA- β (an estimate of beta-cell function) was not unexpected. In non-diabetic populations – especially among youth – increased insulin secretion precedes insulin resistance (33) and, in the presence of obesity, indicates a risk of developing diabetes mellitus (34).

When analyzing differences in energy metabolism according to sex, girls versus boys have been shown to have higher propensity toward insulin resistance (35-37). Differences in sex steroids secretion and genetics may partially explain why girls are more inclined than boys to develop disturbances in glucose metabolism (37). In our study, girls indeed had higher HOMA- β , body fat mass percentage and leptin concentrations compared with boys. Lee *et al.* (36) reported that female subjects had significantly higher mean HOMA-IR than male subjects ($p = 0.02$), but in our study this finding was only statistically significant for black girls. Lee *et al.* (36) also showed that overweight and obese adolescents had higher HOMA-IR levels compared with normal weight adolescents ($p < 0.001$), and no other factor was more influential on HOMA-IR than weight status and specifically obesity. Important differences between overweight/obese and normal weight groups were also observed in our study, that is, individuals with weight excess presented higher leptin, insulin, HOMA-IR and HOMA- β and lower QUICKI values.

We observed that black subjects had higher HOMA- β , BMI-for-age percentile, serum leptin and tOC than white subjects, and lower ucOC. Black girls also had higher insulin, HOMA-IR and lower QUICKI than other subjects. These racial differences have been found by others (35, 38), but not consistently in all studies (36). A meta-analysis with 74 study cohorts including 3,813 individuals showed that Africans had significantly lower insulin sensitivity and higher insulin response than Caucasian and East Asian subpopulations (38). This study also found that the stabilization points in the hyperbolic relationship between insulin sensitivity and insulin response in Africans with normal glucose tolerance were located around unstable extreme points in the curve, where a

small change in one variable is associated with a large nonlinear change in the other variable. Thus, among Africans, even a small increase in insulin resistance could lead to a rapid increase in the amount of released insulin required to maintain normal glucose tolerance, which suggests that this race group is more vulnerable to the development of diabetes. Indeed, the prevalence of diabetes is 13.2% in people of African decent versus 7.6% in people of non-Hispanic European decent (39).

Our study has some limitations. Because of the cross-sectional design, these results do not allow causal inference or temporal associations. The indices used to define insulin resistance, β -cell function and insulin sensitivity (HOMA-IR, HOMA- β and QUICKI) are measures that do not take into account the larger variability of insulin sensitivity between populations. In an apparently healthy population the insulin-mediated glucose disposal was shown to vary more than six-fold (40). Our study included healthy children in a narrow range of puberty, thus generalizability to children at all stages of maturation is limited. Additionally, our subjects represented otherwise healthy children and included only a small number who presented increased fasting serum glucose.

Conclusions

This cross-sectional analysis shows that leptin concentrations negatively correlated with undercarboxylated osteocalcin and positively correlated with insulin resistance and β -cell function estimates in healthy children. However, associations between osteocalcin and markers of energy metabolism were not observed. These data support that osteocalcin plays at most a minor role in whole body energy metabolism in healthy children. Further prospective or intervention studies in children evaluating the role of undercarboxylated osteocalcin in glucose homeostasis are needed to confirm our findings.

Acknowledgements

The authors would like to thank Anthony Acton for technical support at IUSM; Connie Sullivan, Rachel Limbach, and Marian Hart, nurse coordinators at IUSM; and Jessica Smith, research coordinator at UGA.

References

1. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100: 197-207, 2000.
2. Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers Jr MG, Chua Jr SC, Kim JK, Kaestner KH, Karsenty G. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 183:1235–42, 2008.
3. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confraveux C, Dacquin R, Mee PJ, Mckee MD, Jung DY, Zhng Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-69, 2007.
4. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105; 5266-70, 2008.
5. Dimitri P, Bishop N, Walsh JS, Eastell R. Obesity is a risk factor for fracture in children but is protective against fracture in adults: a paradox. *Bone* 50(2):457-66, 2012.
6. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69:990–1047, 1989.
7. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Melltrom D. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 24: 785-91, 2009.
8. Pittas, AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hunghes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 827-32, 2009.

9. Zhou M, Ma X, Li H, Pan X, Tang J, Gao Y, Hou X, Lu H, Bao Y, Jia W. Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in chinese individuals. *Eur J Endocrinol* 161: 723-9, 2009.

10. Abseyi N, Siklar Z, Berberoglu M, Hacıhamdioglu B, Savas Erdeve S, Oçal G. Relationships between osteocalcin, glucose metabolism, and adiponectin in obese children: Is there crosstalk between bone tissue and glucose metabolism? *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 4(4):182-8, 2012.

11. Lu C, Ivaska KK, Alen M, Wang Q, Tormakangas T, Xu L, Wiklund P, Mikkola TM, Pekkala S, Tian H, Vaananen HK, Cheng S. Serum osteocalcin is not associated with glucose but is inversely associated with leptin across generations of nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab* 97(11):4106-14, 2012.

12. Reinehr T, Roth CL. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes (Lond)* 34(5): 852-8, 2010.

13. Núñez NP, Carpenter CL, Perkins SN, Berrigan D, Jaque SV, Ingles SA, Bernstein L, Forman MR, Barrett JC, Hursting SD. Extreme obesity reduces bone mineral density: complementary evidence from mice and women. *Obesity (Silver Spring)* 15(8): 1980-7, 2007.

14. Motyl KJ, Rosen CJ. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie* 94(10): 2089-96, 2012.

15. Takeda S, Karsenty G. Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass. *Bone* 42: 837-40, 2008.

16. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140(4): 1630-8, 1999.

17. Lewis RD, Laing EM, Hill Gallant KM, Hall DB, McCabe GP, Hausman DB, Martin BR, Warden SJ, Peacock M, Weaver CM. A randomized trial of vitamin D3 supplementation in children: dose-response effects on vitamin D metabolites and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 4816–25, 2013.
18. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, Mei Z, Curtin LR, Roche AF, Johnson CL. CDC growth charts: United States. *Adv Data* (314): 1-27, 2000.
19. Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole organism physiology. *Nature* 481: 314–20, 2012.
20. Lipton A, Steger GG, Figueroa J, Alvarado C, Solal-Celigny P, Body JJ, Boer R, Berardi R, Gascon P, Tonkin KS, Coleman RE, Paterson AHG, Gao GM, Kinsey AC, Peterson MC, Jun S. Extended Efficacy and safety of denosumab in breast cancer patients with bone metastases not receiving prior bisphosphonate therapy. *Clin Cancer Res* 14(20): 6690-6, 2008.
21. Grey A, Bolland MJ, Wattie D, Home A, Gamble G, Reid IR. The antiresorptive effects of a single dose of zoledronate persist for two years: a randomized, placebo controlled trial in osteopenic post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 538-44, 2009.
22. Vestergaard P. Risk of newly diagnosed type 2 diabetes is reduced in users of alendronate. *Calcif Tissue Int* 89: 265–70, 2011.
23. Hong SH, Koo JW, Hwang JK, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, Kim DY. Changes in serum osteocalcin are not associated with changes in glucose or insulin for osteoporotic patients treated with bisphosphonate. *J Bone Metab* 20(1): 37-41, 2013.
24. Schwartz AV, Schafer AL, Grey A, Vittinghoff E, Palermo L, Lui LY, Wallace RB, Cummings SR, Black DM, Bauer DC, Reid IR. Effects of antiresorptive therapies on glucose metabolism: results from the FIT, HORIZON-PFT, and FREEDOM trials. *J Bone Miner Res* 28(6): 1348-54, 2013.

25. Kumar R, Binkley N, Vella A. Effect of phylloquinone supplementation on glucose homeostasis in humans. *Am J Clin Nutr* 92(6): 1528-32, 2010.
26. Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem* 99(2): 411-24, 2006.
27. Rosato MT, Schneider SH, Shapses SA. Bone turnover and insulin-like growth factor I levels increase after improved glycemic control in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int* 63(2): 107-11, 1998.
28. Okazaki R, Totsuka Y, Hamano K, Ajima M, Miura M, Hirota Y, Hata K, Fukumoto S, Matsumoto T. Metabolic improvement of poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus decreases bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 82(9): 2915-20, 1997.
29. Van Summeren M, Braam L, Noirt F, Kuis W, Vermeer C. Pronounced elevation of undercarboxylated osteocalcin in healthy children. *Pediatr Res* 61: 366–70, 2007.
30. Rochefort GY, Rocher E, Aveline PC, Garnerio P, Bab I, Chappard C, Jaffré C, Benhamou CL. Osteocalcin-insulin relationship in obese children: a role for the skeleton in energy metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 75(2): 265-70, 2011.
31. Pollock NK, Bernard PJ, Gower BA, Gundberg CM, Wenger K, Misra S, Bassali RW, Davis CL. Lower uncarboxylated osteocalcin concentrations in children with prediabetes is associated with beta-cell function. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7): E1092-9, 2011.
32. Alfadda AA, Masood A, Shaik SA, Dekhil H, Goran M. Association between osteocalcin, metabolic syndrome, and cardiovascular risk factors: role of total and undercarboxylated osteocalcin in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2013: 197519, 2013.

33. Cali AM, Caprio S. Prediabetes and type 2 diabetes in youth: an emerging epidemic disease? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15(2): 123-7, 2008.

34. Steinberger J, Daniels SR; American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young); American Heart Association Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). *Circulation* 107(10): 1448-53, 2003.

35. Arslanian S, Suprasongsin C. Differences in the in vivo insulin secretion and sensitivity of healthy black versus white adolescents. *J Pediatr* 129: 440–3, 1996.

36. Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study. *Diabetes Care* 29(11): 2427-32, 2006.

37. Murphy MJ, Metcalf BS, Voss LD, Jeffery AN, Kirkby J, Mallam KM, Wilkin TJ, EarlyBird Study 6. Girls at five are intrinsically more insulin resistant than boys: The Programming Hypotheses Revisited – The EarlyBird Study (EarlyBird Study 6). *Pediatrics* 113(1): 82-6, 2004.

38. Kodama K, Tojjar D, Yamada S, Toda K, Patel CJ, Butte AJ. Ethnic differences in the relationship between insulin sensitivity and insulin response: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 36(6): 1789-96, 2013.

39. USDHHS. United States Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. *National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States, 2014*. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services; 2014.

40. Yeni-Komshian H, Carantoni M, Abbasi F, Reaven GM. Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care* 23: 171-5, 2000.

Table 1. Anthropometric and biochemical characterization of the population according to sex and race.

		Total	Black male	Black female	White male	White female	Effects		
			(n=82)	(n=80)	(n=79)	(n=77)	Sex	Race	Sex x Race
			n	mean (SEM) <i>min-max</i>	mean (SEM) <i>min-max</i>	mean (SEM) <i>min-max</i>	mean (SEM) <i>min-max</i>	mean (SEM) <i>min-max</i>	p-value
Age (years)	318	11.4 (0.1)	11.8 (0.1)	10.5 (0.1)	12.1 (0.1)	11.0 (0.1)	< 0.0001	0.0006	NS
Anthropometry									
Weight (kg)	318	47.5 (0.7) <i>23.8-84.1</i>	49.4 (1.4) <i>27.3-83.7</i>	48.0 (1.3) <i>27.9-79.5</i>	48.0 (1.5) <i>28.7-84.1</i>	44.4 (1.1) <i>23.8-74.0</i>	NS	NS	NS
Height (m)	318	1.51 (0.01) <i>1.23-1.79</i>	1.52 (0.01) <i>1.32-1.79</i>	1.48 (0.01) <i>1.23-1.70</i>	1.54 (0.01) <i>1.30-1.75</i>	1.49 (0.01) <i>1.34-1.73</i>	< 0.0001	NS	NS
BMI-for-age (percentile)	318	68.3 (1.6) <i>0.3-99.7</i>	72.1 (2.9) <i>3.0-99.7</i>	77.6 (3.1) <i>2.7-99.6</i>	56.9 (3.6) <i>4.3-99.7</i>	66.5 (3.1) <i>0.3-99.1</i>	NS	0.0013	NS
Fat mass (%)	301	29.9 (0.6) <i>10.2-58.5</i>	25.5 (1.0) <i>10.2-51.0</i>	33.2 (0.9) <i>14.8-54.3</i>	28.3 (1.1) <i>11.8-58.5</i>	33.3 (1.0) <i>17.2-51.4</i>	< 0.0001	NS	NS
Biochemistry									
Leptin (ng/mL)	305	11.1 (0.6)	8.1 (0.9)	16.0 (1.2)	8.7 (1.2)	11.6 (0.9)	< 0.0001	0.0269	NS
ucOC (ng/mL)	170	30.6 (1.4)	20.3 (2.4)	27.6 (2.6)	39.8 (1.7)	41.8 (3.1)	NS	< 0.0001	NS
Total osteocalcin (ng/mL)	303	33.3 (0.7)	38.5 (1.5)	35.5 (1.6)	29.8 (0.9)	29.5 (0.8)	NS	< 0.0001	NS
Glucose (mg/dL)	317	89.0 (0.4)	89.4 (0.8)	89.4 (0.8)	89.1 (0.8)	87.9 (0.8)	NS	NS	NS
Insulin (μU/mL)	318	20.3 (0.6)	18.9 (0.8)	25.9 (1.5)	18.1 (1.4)	18.0 (0.9)	0.0006	< 0.0001	0.0236
QUICKI	317	0.313 (0.001)	0.314 (0.002)	0.303 (0.002)	0.319 (0.003)	0.317 (0.002)	0.0032	< 0.0001	0.0484
HOMA-β	317	307.3 (13.9)	301.5 (31.8)	389.4 (36.6)	263.4 (20.7)	274.2 (13.2)	0.0007	0.0015	NS
HOMA-IR	317	4.5 (0.1)	4.2 (0.2)	5.7 (0.3)	4.0 (0.3)	4.0 (0.2)	0.002	< 0.0001	0.0257

Standard Error of the Mean; Body mass index; Undercarboxylated osteocalcin; Quantitative Insulin Sensitivity Check Index; Homeostasis Model of Assessment Estimate of β Cell Function; Homeostasis Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance; NS, Not significant. Results of two-way ANOVA for sex, race and sex x race interactions investigated. All variables were analyzed after logarithmic transformation, except for QUICKI.

Table 2. Partial correlation adjusted for fat mass percentage of osteocalcin with biochemical variables.

	Total osteocalcin	Undercarboxylated osteocalcin
	partial r	partial r
Leptin	0.041	-0.162
Insulin	0.096	-0.076
Glucose	-0.033	-0.159
HOMA-IR	0.082	-0.096
HOMA- β	0.096	0.036
QUICKI	-0.080	0.100

Homeaostasis Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance;
 Homeaostasis Model of Assessment Estimate of β Cell Fucntion; Quantitative
 Insulin Sensitivity Check Index; Correlation coefficients marked in bold were
 considered statistically significant ($p < 0.05$). All variables were analyzed after
 logarithmic transformation, except for QUICKI.

Figure 1. Regression analyses between undercarboxylated osteocalcin and (A) glucose and (B) leptin adjusted for age, sex and fat mass percentage among American children. N.S. = not significant.

Figure 2. Regression analyses between leptin and (A) serum insulin, (B) HOMA-IR, (C) HOMA- β , (D) QUICKI and (E) serum glucose adjusted for age, sex and fat mass percentage among American children.

4.4. ARTIGO 4

Lifestyle factors and dietary vitamin D intake: relationships with vitamin D status and adipokines among adolescents

Artigo original

Kelly V. Giudici, Regina Mara Fisberg,
Dirce Maria L. Marchioni, Lígia A. Martini

Manuscrito a ser submetido.

Lifestyle factors and dietary vitamin D intake: relationships with vitamin D status and adipokines among adolescents

Kelly Virecoulon Giudici¹, Regina Mara Fisberg², Dirce Maria Lobo Marchioni², Lígia Araújo Martini²

¹ PhD student, Nutrition Department, School of Public Health, University of São Paulo, Brazil

² Associate Professor, Nutrition Department, School of Public Health, University of São Paulo, Brazil

Short title: Lifestyle factors, vitamin D and adipokines among adolescents

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author:

Kelly Virecoulon Giudici

kellyg@usp.br

Nutrition Department, School of Public Health, University of São Paulo

Avenida Doutor Arnaldo, 715 / Cerqueira César, São Paulo, SP

CEP 01246-904

Abstract

Objective: To investigate modifiable risk factors for vitamin D (VD) insufficiency and its relationship with adipokines in adolescents. **Methods:** Cross-sectional study with 198 subjects 14-18y, 51% male. Serum 25(OH)D, adiponectin (A), leptin (L), glucose and insulin were obtained after 12h fasting. Calcium and vitamin D intake were measured by a 24h food record. Student's T-test, Pearson correlation and regression analysis were performed. **Results:** While 9% of participants were sedentary, 22% were insufficiently active (IA), 51% active and 18% very active (VA). A/L ratio was lower among sedentary/IA subjects (2.2, SD=4.0 vs 5.6, SD=12.3; $p=0.01$), compared to active/VA subjects. Physical activity level (PAL) was not associated with VD status or markers of glucose metabolism. Serum 25(OH)D positively associated with VD intake, after adjusting for sex, sun exposure and season of the year in regression analysis (partial $R^2=0.026$; $p=0.02$). **Conclusions:** Poor PAL was associated to lower A/L ratio. VD status did not associate with sun exposure habits, but positively correlated with VD intake.

Descriptors: vitamin D, adiponectin, leptin, physical activity, adolescent.

Introduction

Vitamin D deficiency and insufficiency are conditions highly prevalent in many countries, and are related to the risk of several chronic diseases^{1,2}. Circulating vitamin D is a sum of the amount ingested with diet (calciferol) or produced by skin when exposed to sunlight². Since not many food sources naturally contains great amounts of vitamin D (fish, fish oil, oysters, eggs, milk), most of this vitamin found in circulation comes from endogenous production³. In Brazil, food fortification with this nutrient is not mandatory, and foods naturally containing vitamin D are not highly frequent in Brazilians diet⁴. A study reviewing vitamin D data among children and adolescents have shown that low vitamin D intake is frequent in many different populations⁵. Thus, it is difficult to determine how dietary vitamin D intake contributes to serum 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] concentrations.

Besides vitamin D deficiency and insufficiency, sedentary lifestyle and low physical activity level are getting every day more common among populations all over the world^{6,7}, and studies indicate that such conditions are associated. Among adults, vitamin D status were related to physical activity levels⁸ and to the frequency of outdoor physical activity⁹, but studies evaluating this relationship among adolescents^{10,11} are less frequent.

Physical inactivity is a main risk factor for cardiovascular disease¹² and insulin resistance¹³ among children and adolescents. Alongside, high physical activity level has been shown to favor the maintenance of adequate levels of total body fat, lower visceral body fat and normal insulin sensitivity, by increasing energy expenditure and improving peripheral insulin resistance and cardiovascular fitness^{14,15}. Weight excess is of particular concern in public health for favoring insulin resistance, a potent risk factor for diabetes mellitus and other chronic diseases in children¹⁶.

Energy homeostasis is regulated by a complex neuroendocrine system that includes hypothalamic signaling and adipokines such as leptin¹⁷ and adiponectin¹⁸. While higher levels of circulating leptin is found among overweight and obese individuals, adiponectin is normally inversely correlated with adiposity measures¹⁹. Adipokines concentrations may vary dramatically according to physical activity level²⁰ and physical fitness parameters²¹ among adolescents. Adiponectin/leptin (A/L) ratio (or leptin/adiponectin ratio) is considered a good parameter to estimate metabolic alterations

and the risk of developing chronic diseases, such as diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular diseases²²⁻²⁴, even in youth²⁵.

Considering that changes in lifestyle and diet are the key factors responsible for the increases in adiposity in children, it is important to understand how vitamin D, adipokines and markers of glucose metabolism are related to physical activity levels during growth and maturation. Accordingly, we hypothesized that higher physical activity level is associated with better nutritional status and vitamin D status, higher adiponectin/leptin ratio, higher calcium and calciferol intake and lower risk to disturbances in glucose homeostasis among adolescents, and also that serum 25(OH)D concentrations should be associated with sun exposure habits and with calciferol from diet. Thus, this study aimed to investigate the relationship between physical activity level, serum 25(OH)D, calciferol and calcium intake, sun exposure habits, A/L ratio and markers of glucose metabolism among adolescents living in Brazil.

Methods

Study design and population

A total of 198 adolescents aged 14 to 18 years old living in São Paulo, Brazil (latitude -23.5 degrees South) were evaluated in this cross sectional study. Sample was formed from participants of the Health Survey – São Paulo (ISA-SP; <http://www.fsp.usp.br/isa-sp>), a multicenter and population-based study with people from the city of São Paulo, Brazil; users from the League of Childhood Obesity of the School of Medicine of the University of São Paulo and from the Primary Care Center Horácio Geraldo de Paula Souza of the University of São Paulo. Individuals with chronic diseases (besides obesity) or taking supplements of calcium or vitamin D were not included. From the total of 437 eligible individuals, 241 agreed to participate and signed the informed consent, however only 198 came to blood collection, even after rescheduling. Measurements of fasting serum glucose and insulin were available for 63 subjects.

Study variables

Height, weight, waist and hip circumferences were measured in duplicate by trained personnel. Participants were weighed and had their height measured wearing light clothes and no shoes. Weight was determined within 0.1 kg using a digital scale

(Filizola®). Height was determined using a fixed wall-scale stadiometer to the nearest 0.1 cm. Waist (WC) and hip circumferences (HC) were measured with an inextensible 150 cm measuring tape. Body mass index (BMI) was defined as weight (kg) / height² (m²). Nutritional status was determined according to BMI-for-age Growth Charts²⁶. Adolescents between percentiles 3 and 85 (equivalent to Z-score -2 and 1) were considered normal weight; between percentiles 85 and 97 (or between Z-score 1 and 2) were considered overweight, and those above percentile 97 (Z-score >2) were considered obese.

Blood collection after 12-hour fasting was done for biochemical assessment of 25 hydroxyvitamin D (measured by HPLC; Immunodiagnostik AG, Germany), parathyroid hormone (ELISA; IBL America, Minneapolis, MN, USA), leptin (ELISA; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), adiponectin (ELISA; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), glucose (enzymatic colorimetric method; Quibasa, Brazil) and insulin (chemiluminescence; Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Vitamin D status was classified according to HOLICK *et al.*²⁷: subjects with 25 hydroxyvitamin D concentrations < 20 ng/mL were considered deficient and those between 20 and 30 ng/mL were considered insufficient. The Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was determined as: $1 / (\log \text{insulin} + \log \text{glucose})$. The Homeostatic Model of Assessment Estimate of β Cell Function (HOMA- β) was calculated as: $[360 \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL})] / [\text{fasting glucose (mg/dL)} - 63]$. The Homeostasis Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated as: $\text{fasting glucose (mg/dL)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) / 405$.

Physical activity status was determined according to the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)²⁸, and individuals were classified as sedentary, insufficiently active, active and very active. Sun exposure was measured according to a questionnaire adapted from SZKLO *et al.*²⁹. Another sun exposure questionnaire, proposed by HANWELL *et al.*³⁰ was also answered by a subset sample of 65 participants. This weekly sun exposure recall questionnaire is a 7-day record about sun exposure habits of the individual, and gives a score according to the time (<5 minutes, 5 to 30 minutes or > 30 minutes) and body part exposed (hands and face; hands, face and arms; hand, face and legs; bathing suit) to the sun in the prior 7 days before the interview.

Total energy, vitamin D (calciferol) and calcium intake were assessed by a 24-hour Food Record (R24h), repeated in non-consecutive days, with more than a week

interval, in 62.6% (n = 124) of the sample. Interviews were done by trained personnel, in person or by telephone. Conducting food records by telephone has become a usual and valid way to collect dietetic information in studies evaluating food intake³¹, especially when repeated measures are done to obtain more than one day of food intake.

Subjects were solicited to report everything they have eaten or drunk in the day before the interview. The Multiple Pass Method, developed by the United States Department of Agriculture (USDA) was used to obtain detailed information³². This method is based on five steps to help guiding the interviewed person to describe her food intake (quick list, forgotten foods, time and occasion, detailed cycle and final probe)³³. A detailed description of all types of foods and servings consumed was obtained using rigorous standardization according to a specific guide of household measures transformation³⁴. Preparations were disrupted by their ingredients and standardized according to a Brazilian manual for calculating dietary surveys³⁵. Dietetic information was calculated using the Nutrition Data System for Research (NDSR) software (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, MN, USA), version 2007, which includes food composition data from USDA.

In order to minimize errors in estimating calcium intake (a nutrient not mandatorily fortified in Brazilian foods), food composition from NDSR was compared to Brazilian data (from the Brazilian Table of Food Composition – TACO)³⁶, and every ingredient with more than 20% of difference was corrected to the values from TACO³⁷. Such correction was not possible for vitamin D, since Brazilian data for this nutrient is still not available.

Statistical analysis

Descriptive analyses were used for characterization of the samples. The normality of the distribution of each variable was tested by the Shapiro-Wilk test, and logarithmic transformation was used when needed. The comparison between subgroups for quantitative variables with normal distribution was made by Student's t-test. Categorical variables were analyzed by Pearson's chi-square test. Correlations between variables were tested using Pearson Correlation. Linear regression analysis was performed with serum 25(OH)D as the independent variable, and sex, the season of the year in which blood was collected, and the habit of getting exposed to sunlight for more than 30 minutes were used as variables of adjustment. Statistical analysis was held using

the IBM SPSS Statistics Software, version 22.0. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Based on repeated measures of 24h Food Records, intrapersonal variability of intake was corrected using the Multiple Source Method (MSM) software³⁸. In order to estimate the prevalence of nutrient intake below or above the recommendations, the intakes of calcium and vitamin D were compared to their Estimated Average Requirement (EAR), which are, respectively, 1,100 mg/day and 10 µg/day for males and females aged 14 to 18 years old³⁹. The analyses of estimated inadequate intake were conducted on the PC-side software version 1.0 (Iowa State University, IA, USA). Studies evaluating food intake usually exclude diet reports that exceed 4,000 kcal / day or that are lower than 500 kcal / day, in order to minimize overreport or underreport of ingestion³¹. In our sample, no food record was excluded from analysis, once minimum and maximum individual energy intake were, respectively, 1,052 kcal and 3,414 kcal.

Ethics

Patients who agreed to participate were informed about the objectives and procedures of the research and signed an informed consent (in case of those under 18 years old, this document was signed by their legal guardian). This study was approved by the Ethics in Research Committee from the School of Public Health of the University of São Paulo (FSP/USP) under protocol number 2307/2011.

Results

The characteristics of the studied population according to physical activity level are listed in **Table 1**. The mean age was 16.3 years (Standard deviation – SD = 1.4), and 49% of participants were female. Overall, 16.2% of participants were overweight (BMI-for-age Z score between 1 and 2) and 26.4% were obese (BMI-for-age Z score > 2). While 9.3% of participants were classified as sedentary, 21.8% were considered insufficiently active, 50.8% active and 18.1% very active. Physical activity level was not associated with nutritional status nor with markers of glucose metabolism.

Mean adiponectin/leptin ratio was 4.5 (SD = 10.4), lower among individuals classified as sedentary or insufficiently active (2.2, SD = 4.0 vs 5.6, SD = 12.3; $p = 0.013$), compared to active or very active subjects (**Table 1**). No correlations, however, were observed between A/L ratio and vitamin D status. A negative correlation was

observed between serum leptin and serum adiponectin ($r = -0.175$; $p = 0.014$). Such inverse association was stronger among those with vitamin D deficiency ($n = 72$) ($r = -0.385$; $p = 0.001$).

Subjects presented mean calcium and vitamin D intake of, respectively, 281.1 mg/1,000 kcal (SD = 86.7) and 1.5 μ g/1,000 kcal (SD = 0.4) (**Table 1**). Analysis of inadequate food intake based on EAR values revealed that the intake of calcium and vitamin D were lower than the recommended among, respectively, 97.8% and 100% of the sample. Despite this high prevalence of inadequate intake, vitamin D intake positively correlated with serum 25(OH)D ($r = 0.175$, $p = 0.014$), and this association persisted after adjusting for sex, sun exposure and season of the year in linear regression analysis (partial $R^2 = 0.026$; $p = 0.024$) (**Figure 1**).

Although 88.4% of the sample have declared to usually expose themselves to sunlight for a minimum period of 30 minutes and 68.8% reported rarely or never applying sunscreen when exposed to sunlight for >30 minutes, 63.3% frequently or always choose to stay in the shadow when is a sunny location (**Table 2**), and 71.8% were classified as vitamin D deficient or insufficient [25(OH)D concentrations below 30 ng/mL]. Vitamin D status was not correlated with sun exposure habits though, and neither associated with physical activity level among the studied population.

A sun-exposure score was determined to a subset of 65 individuals, who answered a questionnaire whose maximum score is 42 (for a condition in which someone report to expose himself to sunlight every day in the prior 7 days for more than 30 minutes using a bathing suit). Mean score was 21.1 (SD = 6.6), but this measure did not associate with serum 25(OH)D, nutritional status, physical activity level or other variables.

Discussion

Our study evaluating life habits (such as physical activity, sun exposure, calcium and vitamin D intake) and their relation to vitamin D status and adipokines concentrations among a sample of adolescents revealed that over 70% of the population were vitamin D deficient or insufficient, in spite of living in a sunny country and declaring usual exposure to sunlight for >30 minutes (88%) and not wearing sunscreen when exposed to sunlight for >30 minutes (69%). Vitamin D status did not correlate with sun exposure habits though. PARK & JOHNSON⁴⁰, reviewing some studies with

American populations, concluded that living in lower latitude regions does not appear to protect from poor vitamin D status. Indeed, over 60% of our sample also declared frequently or always choosing to stay in the shadow when in a sunny location.

Sun exposure habits were also evaluated with an instrument proposed by HANWELL *et al.*³⁰. They developed a weekly sun exposure recall questionnaire which, among healthy Caucasian adults from Italy, was correlated with 25(OH)D concentrations in the summer, but not in the winter. Their observed correlation was almost entirely driven by time in sun rather than the amount of exposed skin, suggesting that the categories for time exposed to sunlight proposed by them (<5 min, 5–30 min and >30 min) are easily recalled and likely to be of biological significance. Positive (but moderate) correlations of sun exposure score and 25(OH)D concentrations were also seen among North-American youth (1 to 21 years old)⁴¹. WAKAYO *et al.*⁴², evaluating Ethiopian adolescents with this questionnaire, did not present results using the scores, but found the duration of exposure to sunlight and the amount of body part exposed to sunlight to predict vitamin D deficiency. Our study, however, did not find any association with this questionnaire, and neither did FORNEY *et al.*⁴³ with North-American college-aged youth and SHAM *et al.*⁴⁴ with young Canadian adults (18 to 35 years old).

Whilst being widely recognized that major circulating 25(OH)D comes from skin production driven by sunlight exposure³, our analysis found a weak, but positive correlation among vitamin D intake and serum 25(OH)D, even after adjusting for sex, sun exposure and season of the year. This is an important finding, given that we were able to show that, even in a population with vitamin D intake below the recommendations and with the majority of individuals presenting vitamin D insufficiency or deficiency, vitamin D intake from diet (not from supplements) was significantly associated with higher 25(OH)D levels. Other studies with Brazilian adolescents have also observed a high proportion of inadequate vitamin D intake: less than 16% of individuals reached the recommendations for this nutrient, however in both studies an association between vitamin D from diet and 25(OH)D concentrations was not found^{45,46}. On the other hand, XU *et al.*⁴⁷ found that consuming foods naturally containing vitamin D was associated with higher 25(OH)D levels among children and adolescents from Hong Kong. Our study found the intake of calcium was also inadequate for almost the entire sample. Such condition has already been observed among other populations⁴⁸ and is also concerning, since it has been associated with

several chronic diseases, as obesity, osteoporosis, hypertension, cervical cancer and autoimmune diseases⁴⁹.

This study found a prevalence of low physical activity level of 31.1% (with 9.3% of our sample being sedentary and 21.8% insufficiently active) among Brazilian adolescents aged 14-18 years old. Other studies from different countries have also shown considerable frequencies of physical inactivity among adolescents: 50.3% of males and 67.8% of females in a sample of 7,982 Canadian youth (mean age 15.6 years) were classified as inactive⁶. Data from the 2003-2004 National Health and Nutritional Examination Survey (NHANES) described that only 5.6% to 8% of North-American adolescents (12 to 19 years old) achieved the national recommendations of physical activity⁷. In addition to the concerning frequencies of insufficiently active youth, evidences showed that infrequent participation in sports and low grades in school sports during adolescence were associated with physical inactivity in adulthood⁵⁰.

Substantial evidence points toward the importance of physical exercise in protecting from obesity in childhood and adolescence^{15,51}. In spite of the usual positive correlation between low physical activity level and obesity⁵² and risk for diabetes observed by others⁵³, our results do not show an association between physical activity and nutritional status, insulin resistance or β -cell function. On the other hand, adiponectin/leptin ratio, a good parameter for disturbances on glucose homeostasis and adiposity^{22,24}, was shown to be higher among active and very active adolescents, compared to sedentary and insufficiently active subjects.

We did not find other studies evaluating the relationship between physical activity level and A/L (or L/A) ratio among adolescents. JÜRIMÄE⁵⁴, in a review study, analyzed adiponectin and leptin responses to acute exercise and sport training in children and adolescents, and also found scarce publications among people this age. The author concluded that acute exercise do not seem to impact adiponectin and leptin concentrations among children and adolescents. On the other hand, chronic training seem to influence lower leptin levels, given that leptin concentrations are lower in young athletes compared with untrained controls. Studies mentioned in this article were focused on specific (acute or chronic) training, majorly among athletes, differing from the objective in our study of evaluating regular physical activity level among normal (non-athlete) adolescents.

The present study has some limitations. Its cross-sectional design does not enable inferring causality or temporal associations between the measured variables. Serum

glucose, insulin and sun exposure score were measured in a subset sample. Opting for the 24-hour recall as a method to estimate food intake was another limiting factor because despite being an appropriate tool to estimate average values of food intake in a population sample, it depends on the memory of the interviewed, and refers to the current diet, not the habitual one. On the other hand, adequate statistical adjustments⁵⁵ made it possible to reduce the effects of variabilities from diet and to improve accuracy of ingestion estimates.

The number of studies evaluating the relationship between physical activity level and adipokines concentrations in children and adolescents is still limited. Further prospective research, especially intervention studies, are needed to better understand how low physical activity levels may influence vitamin D status, circulating adipokines and markers of energy metabolism. This may help creating preventive actions which favors the achievement of better health status and lower risk of developing chronic diseases in adolescence and in other life stages.

In conclusion, we showed that poor physical activity level was associated to lower adiponectin/leptin ratio among Brazilian adolescents. Vitamin D status did not associate with physical activity levels or with sun exposure habits, but positively correlated with vitamin D intake. Despite being a weak correlation, this result is relevant and illustrates the importance of stimulating an adequate intake of vitamin D through natural food sources, or with fortified products, if available. Vitamin D supplementation should be considered only in specific cases. Supplements may be effective in correcting vitamin D status individually, however are not affordable for populations, due to conditions as low adherence and high cost. Additionally, the adoption of a healthy lifestyle, composed by usual physical activity practice, safe – but regular – sun exposure and a diversified healthy diet should also be encouraged.

Acknowledgements:

We thank São Paulo Research Foundation (FAPESP) for project funding (2012/11061-8) and for K. V. Giudici's PhD scholarship (2011/22768-2).

Contributions

K. V. Giudici performed the subject recruitment and was involved in data collection and computation, statistical analysis, interpretation of the results and in writing the manuscript. L. A. Martini defended the research grant, managed the study, contributed to the interpretation of the results and assisted preparation and reviewing the manuscript. D. M. L. Marchioni and R. M. Fisberg assisted in the interpretation of the results as well as in reviewing the manuscript. All authors have approved the final version.

References

1. Fonseca VM, Sichieri R, Veiga GV. Fatores associados à obesidade em adolescentes. *Rev Saúde Pública* 1998; 32: 541-9.
2. Holick MF. Vitamin D deficiency. *New Engl J Med* 2007; 357: 266-81.
3. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003; 88(2): 296-307.
4. Souza AM, Pereira RA, Yokoo EM, Levy RB, Sichieri R. Most consumed foods in Brazil: National Dietary Survey 2008-2009 *Rev Saude Publica* 2013; 47 Suppl 1: 190S-9S.
5. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4): 339-414.
6. Koezuka N, Koo M, Allison KR, Adlaf EM, Dwyer JJ, Faulkner G, Goodman J. The relationship between sedentary activities and physical inactivity among adolescents: results from the Canadian Community Health Survey. *J Adolesc Health* 2006; 39(4): 515-22.
7. Troiano RP, Berrigan D, Dodd KW, Mâsse LC, Tilert T, McDowell M. Physical activity in the United States measured by accelerometer. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40(1): 181-8.
8. Nakamura K, Kitamura K, Takachi R, Saito T, Kobayashi R, Oshiki R, Watanabe Y, Tsugane S, Sasaki A, Yamazaki O. Impact of demographic, environmental, and lifestyle factors on vitamin D sufficiency in 9084 Japanese adults. *Bone* 2015; 74: 10-7.
9. Scragg R, Camargo CA Jr. Frequency of leisure-time physical activity and serum 25-hydroxyvitamin D levels in the US population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2008; 168(6): 577-86.

10. Oberg J, Jorde R, Almås B, Emaus N, Grimnes G. Vitamin D deficiency and lifestyle risk factors in a Norwegian adolescent population. *Scand J Public Health* 2014; 42(7): 593-602.
11. Colao A, Muscogiuri G, Rubino M, Vuolo L, Pivonello C, Sabatino P, Pizzo M, Campanile G, Fittipaldi R, Lombardi G, Di Somma C. Hypovitaminosis D in adolescents living in the land of sun is correlated with incorrect life style: a survey study in Campania region. *Endocrine* 2015; 49(2): 521-7.
12. Väistö J, Eloranta AM, Viitasalo A, Tompuri T, Lintu N, Karjalainen P, Lampinen EK, Ågren J, Laaksonen DE, Lakka HM, Lindi V, Lakka TA. Physical activity and sedentary behaviour in relation to cardiometabolic risk in children: cross-sectional findings from the Physical Activity and Nutrition in Children (PANIC) Study. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2014; 11: 55.
13. Rizzo NS, Ruiz JR, Oja L, Veidebaum T, Sjöström M. Associations between physical activity, body fat, and insulin resistance (homeostasis model assessment) in adolescents: the European Youth Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(3): 586-92.
14. Duncan GE, Perri MG, Theriaque DW, Hutson AD, Eckel RH, Stacpoole PW. Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults. *Diabetes Care* 2003; 26: 557–62.
15. Reichert FF, Baptista Menezes AM, Wells JC, Carvalho Dumith S, Hallal PC. Physical activity as a predictor of adolescent body fatness: a systematic review. *Sports Med* 2009; 39(4): 279-94.
16. Roemmich JN, Clark P, Lusk M, Friel A, Weltman A, Epstein LH, Rogol AD. Pubertal alterations in growth and body composition: pubertal insulin resistance – relationship to adiposity, body fat distribution and hormone release. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:701–9.

17. Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers MG Jr *et al.* The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 2008; 183: 1235–42.
18. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148(3): 293-300.
19. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 173–80.
20. Jiménez-Pavón D, Ortega FB, Artero EG, Labayen I, Vicente-Rodriguez G, Huybrechts I, Moreno LA, Manios Y, Béghin L, Polito A, De Henauw S, Sjöström M, Castillo MJ, González-Gross M, Ruiz JR; HELENA Study Group. Physical activity, fitness, and serum leptin concentrations in adolescents. *J Pediatr* 2012; 160(4): 598-603.
21. Martinez-Gomez D, Eisenmann JC, Gomez-Martinez S, Veses A, Romeo J, Veiga OL, Marcos A; AFINOS Study Group. Associations of physical activity and fitness with adipocytokines in adolescents: the AFINOS Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; 22(3): 252-9.
22. Inoue M, Yano M, Yamakado M, Maehata E, Suzuki S. Relationship between the adiponectin-leptin ratio and parameters of insulin resistance in subjects without hyperglycemia. *Metabolism* 2006; 55: 1248-54.
23. Norata GD, Raselli S, Grigore L, Garlaschelli K, Dozio E, Magni P, Catapano AL. Leptin:adiponectin ratio is an independent predictor of intima media thickness of the common carotid artery. *Stroke* 2007; 38(10): 2844-6.
24. Jung CH, Rhee EJ, Choi JH, Bae JC, Yoo SH, Kim WJ *et al.* The relationship of adiponectin/leptin ratio with homeostasis model assessment insulin resistance index and metabolic syndrome in apparently healthy korean male adults. *Korean Diabetes J* 2010; 34(4): 237-43.

25. Donoso MA, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, Martínez G, Hawkins F, Argente J. Increased leptin/adiponectin ratio and free leptin index are markers of insulin resistance in obese girls during pubertal development. *Horm Res Paediatr* 2013; 80(5): 363-70.

26. World Health Organization (WHO). Multicentre Growth Reference Study Group. WHO *Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development*. Geneva: WHO; 2006.

27. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7): 1911-30.

28. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngye A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 1381-95.

29. Szklo AS, Almeida LM, Figueiredo V, Lozana JA, Mendonça GAS, Moura L, Szklo M. Comportamento relativo à exposição e proteção solar na população de 15 anos ou mais de 15 capitais brasileiras e Distrito Federal, 2002-2003. *Cad Saúde Pública* 2007; 23(4): 823-34.

30. Hanwell HE, Vieth R, Cole DE, Scillitani A, Modoni S, Frusciante V, Ritrovato G, Chiodini I, Minisola S, Carnevale V. Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1-2): 334-7.

31. Willet WC. 24-hour dietary recall and food record methods. In: *Nutritional epidemiology*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1998.

32. Buzzard IM, Faucett CL, Jeffery RW, McBane L, McGovern P, Baxter JS, Shapiro AC, Blackburn GL, Chlebowski RT, Elashoff RM, Wynder EL. Monitoring dietary

change in a low-fat diet intervention study: advantages of using 24-hour dietary recalls vs food records. *J Am Diet Assoc* 1996; 96(6): 574-9.

33. Moshfegh AJ, Rhodes DG, Baer DJ, Murayi T, Clemens JC, Rumpler WV, Paul DR, Sebastian RS, Kuczynski KJ, Ingwersen LA, Staples RC, Cleveland LE. The US Department of Agriculture automated multiple-pass method reduces bias in the collection of energy intakes. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 324-32.

34. Fisberg RM, Villar BS. Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus; 2002.

35. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Bezencry EH, Gomes MCG, Costa VM. Tabela para Avaliação do Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu; 2004.

36. NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas. Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) 4. ed. revisada e ampliada - Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

37. Fisberg RM, Marchioni DML. Manual de avaliação do consumo alimentar em estudos populacionais: a experiência do Inquérito de Saúde em São Paulo (ISA). Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Grupo de Pesquisa de Avaliação do Consumo Alimentar. São Paulo, 2012. 197 p.

38. Hoffmann K, Boeing H, Dufour A, Volatier JL, Telman J, Virtanen M, Becker W, De Henauw S; EFCOSUM Group. Estimating the distribution of usual dietary intake by short-term measurements. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 Suppl 2: S53-62.

39. Institute of Medicine (IOM). US Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, editors. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.

40. Park S, Johnson MA. Living in low-latitude regions in the United States does not prevent poor vitamin D status. *Nutr Rev* 2005; 63: 203-9.
41. Simmons J, Sheedy C, Lee H, Koh S, Alvarez J, Koyama T, Friedman D. Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in child and adolescent patients undergoing hematopoietic cell transplantation compared to a healthy population. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60(12): 2025-30.
42. Wakayo T, Belachew T, Vatanparast H, Whiting SJ. Vitamin D deficiency and its predictors in a country with thirteen months of sunshine: the case of school children in central Ethiopia. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120963.
43. Forney LA, Earnest CP, Henagan TM, Johnson LE, Castleberry TJ, Stewart LK. Vitamin D status, body composition, and fitness measures in college-aged students. *J Strength Cond Res* 2014; 28(3): 814-24.
44. Sham L, Yeh EA, Magalhaes S, Parra EJ, Gozdzik A, Banwell B, Hanwell HE. Evaluation of fall Sun Exposure Score in predicting vitamin D status in young Canadian adults, and the influence of ancestry. *J Photochem Photobiol B* 2015; 145: 25-9.
45. 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.
46. Oliveira RM, Novaes JF, Azeredo LM, Cândido AP, Leite IC. Association of vitamin D insufficiency with adiposity and metabolic disorders in Brazilian adolescents. *Public Health Nutr* 2014; 17(4): 787-94.
47. Xu C, Perera RA, Chan YH, Fang VJ, Ng S, Ip DK, Kam AM, Leung GM, Peiris JS, Cowling BJ. Determinants of serum 25-hydroxyvitamin D in Hong Kong. *Br J Nutr* 2015; 114(1): 144-51.
48. Wang Y, Li S. Worldwide trends in dairy production and consumption and calcium intake: is promoting consumption of dairy products a sustainable solution for inadequate calcium intake? *Food Nutr Bull* 2008; 29(3): 172-85.

49. Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest* 2005; 35(5): 290-304.
50. Tammelin T, Näyhä S, Laitinen J, Rintamäki H, Järvelin MR. Physical activity and social status in adolescence as predictors of physical inactivity in adulthood. *Prev Med* 2003; 37(4): 375-81.
51. Flodmark CE, Marcus C, Britton M. Interventions to prevent obesity in children and adolescents: a systematic literature review. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30(4): 579-89.
52. Abbott RA, Davies PS. Habitual physical activity and physical activity intensity: their relation to body composition in 5.0-10.5-y-old children. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58(2): 285-91.
53. Rubin DA, McMurray RG, Harrell JS. Insulin and weight status in adolescents: independent effects of intensity of physical activity and peak aerobic power. *Pediatr Exerc Sci* 2008; 20(1): 29-39.
54. Jürimäe J. Adipocytokine and ghrelin responses to acute exercise and sport training in children during growth and maturation. *Pediatr Exerc Sci* 2014; 26(4): 392-403.
55. Guenther PM, Kott PS, Carriquiry AL. Development of an approach for estimating usual nutrient intake distributions at the population level. *J Nutr* 1997; 127(6): 1106-12.

Table 1. Characterization of the studied sample according to physical activity level.

	Total (n = 198)	Physical activity level (n = 193)	
		Sedentary or Insufficiently active	Active or very active
		(n = 60)	(n = 133)
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)
Age (years)	16.3 (1.4)	16.4 (1.4)	16.2 (1.3)
Anthropometric measures			
Weight (kg)	71.4 (26.3)	72.1 (30.5)	70.9 (23.9)
Height (m) (n = 197)	1.68 (0.09)	1.68 (0.08)	1.68 (0.09)
BMI (kg/m ²) (n = 197)	25.2 (8.7)	25.5 (9.7)	25.0 (8.2)
Waist circumference (cm) (n = 186)	84.3 (17.8)	85.7 (20.1)	83.5 (16.4)
Hip circumference (cm) (n = 69)	113.1 (20.8)	117.7 (20.7)	111.2 (20.9)
Sun exposure			
Time of exposure score (n = 65)	6.8 (3.3)	6.0 (3.1)	7.3 (3.4)
Skin exposure score (n = 65)	14.2 (4.1)	13.4 (4.0)	14.7 (4.2)
Total score (n = 65)	21.1 (6.6)	19.4 (6.4)	22.0 (6.7)
Nutrient intake			
Energy (kcal/day)	2101.7 (452.3)	2096.1 (446.8)	2108.0 (462.6)
Calcium (mg/day)	583.1 (199.0)	581.8 (207.7)	584.4 (198.4)
Calcium (mg/1000 kcal)	281.1 (86.7)	277.8 (79.8)	282.0 (89.8)
Vitamin D (µg/day)	3.0 (0.9)	2.9 (0.8)	3.1 (0.9)
Vitamin D (µg/1000 kcal)	1.5 (0.4)	1.4 (0.4)	1.5 (0.4)
Vitamin D and PTH			
25 hydroxyvitamin D (ng/mL)	25.2 (13.4)	25.7 (11.7)	25.0 (14.1)
PTH (pg/mL) (n = 195)	43.6 (27.9)	48.5 (34.5)	41.5 (24.4)
Adipokines			
Leptin (ng/mL)	29.5 (21.4)	33.6 (19.7)	27.7 (22.0)†
Adiponectin (µg/mL)	27.2 (17.5)	25.8 (18.3)	28.1 (17.3)
Adiponectin / leptin ratio	4.5 (10.4)	2.2 (4.0)	5.6 (12.3)†
Markers of energy metabolism			
Glucose (mg/dL) (n = 69)	90.7 (9.3)	91.3 (10.4)	90.5 (8.3)
Insulin (mUI/L) (n = 63)	10.8 (7.1)	13.0 (7.3)	10.2 (7.0)
HOMA-IR (n = 63)	2.4 (1.6)	2.9 (1.6)	2.3 (1.7)
HOMA-β (n = 63)	165.8 (134.3)	209.3 (178.1)	148.8 (104.4)
QUICKI (n = 63)	0.35 (0.04)	0.34 (0.03)	0.35 (0.04)

SD, standard deviation; BMI, body mass index; PTH, parathyroid hormone; HOMA-IR, Homeostatic Model of Assessment Estimate of Insulin Resistance; HOMA-β, Homeostatic Model of Assessment Estimate of β Cell Function; QUICKI, Quantitative Insulin Sensitivity Check Index; † p<0.05 (Student's T-test).

Table 2. Sun exposure habits and physical activity level according to sex among Brazilian adolescents.

	Total	Sex	
		Male	Female
	n (%)	n (%)	n (%)
Sun exposure			
Usual exposure to sunlight >30 minutes (n=173)			
Yes	153 (88.4)	79 (88.8)	74 (88.1)
No	20 (11.6)	10 (11.2)	10 (11.9)
Use of sunscreen when exposed >30 minutes (n=173)			
Never / Rarely	119 (68.8)	69 (77.5)	50 (59.5)
Sometimes	29 (16.8)	9 (10.1)	20 (23.8)
Frequently / Always	25 (14.4)	11 (12.3)	14 (16.7)
Use of hat or similar when exposed >30 minutes (n=172)			
Never / Rarely	104 (60.4)	42 (47.1)	62 (74.7)
Sometimes	19 (11.0)	12 (13.5)	7 (8.4)
Frequently / Always	49 (28.5)	35 (39.3)	14 (16.8)
Choice of staying in the shadow when in a sunny location (n=173)			
Never / Rarely	26 (15.0)	14 (15.7)	12 (14.3)
Sometimes	37 (21.4)	23 (25.8)	14 (16.7)
Frequently / Always	110 (63.6)	52 (58.4)	58 (69.1)
Time of exposure score (n = 65)*	6.8 (3.3)	7.3 (3.8)	6.3 (2.8)
Skin exposure score (n = 65)*	14.2 (4.1)	15.4 (4.6)	13.3 (3.4)
Total score (n = 65)*	21.1 (6.6)	22.7 (7.6)	19.6 (5.3)
Physical activity level (n=193)			
Sedentary	18 (9.3)	10 (10.2)	8 (8.4)
Insufficiently active	42 (21.8)	16 (16.3)	26 (27.4)
Active	98 (50.8)	49 (50.0)	49 (51.6)
Very Active	35 (18.1)	23 (23.5)	12 (12.6)

* Mean (Standard deviation).

Figure 1. Linear regression analysis of vitamin D intake and serum 25 hydroxyvitamin D adjusted for sex, sun exposure and season of the year among adolescents.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos apresentados nesta tese, com jovens brasileiros e norte-americanos, confirmaram relações positivas entre o excesso de peso (e consequentes elevadas concentrações de leptina e menores valores para a razão adiponectina/leptina) e indicadores de alteração na homeostase da glicose, apontando maior risco para o desenvolvimento de intolerância à glicose e de *diabetes mellitus* dentre aqueles com sobrepeso e obesidade. Embora a associação direta entre a osteocalcina e marcadores do metabolismo da glicose não tenha sido observada, as concentrações de ambas as formas de osteocalcina (carboxilada e não-carboxilada) foram menores dentre os indivíduos com excesso de peso no estudo com adolescentes brasileiros. Ademais, encontrou-se associação positiva entre osteocalcina não-carboxilada e adiponectina, que por sua vez mostrou-se inversamente relacionada às concentrações de insulina e a medidas de resistência à insulina e de função das células β -pancreáticas.

Entre os adolescentes brasileiros foram observadas elevadas prevalências de insuficiência e de deficiência de vitamina D, que juntas somaram 71,8%. Indivíduos deficientes em vitamina D apresentaram menores concentrações de osteocalcina não-carboxilada, adiponectina e HDL-c, e maiores índice de massa corporal e circunferência de cintura. Apesar de viverem em um país ensolarado, observou-se que parte destes indivíduos não relatam exposição solar regular e não têm o hábito de ingerir grandes quantidades de alimentos naturalmente ricos em vitamina D (como peixes, ostras, ovos, leite e fígado). Por não haver no Brasil uma política mandatória de fortificação de vitamina D, a disponibilidade de alimentos fortificados com esta vitamina é modesta e geralmente apresenta custo mais elevado. Refletindo esta realidade, a inadequação da ingestão de vitamina D observada na amostra de adolescentes deste estudo foi de 100%. Curiosamente, mesmo com a ingestão aquém das recomendações e elevada prevalência de insuficiência e deficiência de vitamina D, foi observada uma correlação positiva entre a ingestão desta vitamina e suas concentrações séricas, achado que reforça a importância de uma alimentação adequada.

Apesar dos discrepantes intervalos de referência propostos na literatura utilizados para a classificação do *status* de vitamina D, sabe-se que a insuficiência de vitamina D é atualmente um notável problema de saúde pública que afeta diversos países no mundo. Sendo esta condição tão intimamente relacionada à obesidade, encoraja-se que medidas para a correção do *status* de vitamina D sejam incentivadas, a exemplo de adoção de um

estilo de vida ativo e composto de exposição solar consciente, porém regular, e de uma dieta equilibrada e rica em alimentos naturalmente fonte de vitamina D e/ou fortificados com este nutriente, se disponíveis. Na impossibilidade de se atingir tal condição, a suplementação de vitamina D deve ser considerada. Suplementos podem ser efetivos para adequar as necessidades deste nutriente de modo individual, porém este método apresenta eficácia limitada quando aplicado para populações, devido a quesitos como baixa aderência e elevado custo.

É possível que a osteocalcina e a vitamina D tenham efeitos menos pronunciados no metabolismo da glicose em indivíduos não-diabéticos. Sugere-se, portanto, que a ausência de associação direta entre marcadores do metabolismo da glicose e as concentrações séricas de osteocalcina e de 25(OH)D seja explicada em parte pelo fato de que a grande maioria dos indivíduos em ambas as amostras populacionais eram normoglicêmicos. É preocupante o fato de que, em crianças e adolescentes, elevados índices HOMA-IR e HOMA- β tenham sido observados, mesmo que acompanhados de glicemia normal. É provável que a secreção exacerbada de insulina preceda a falência das células β -pancreáticas, que podem, por um mecanismo compensatório, ser levadas à exaustão e à consequente perda de função após tentarem manter o controle da glicemia por determinado período. Tais achados ressaltam como indivíduos destas faixas etárias estão expostos ao risco para o desenvolvimento de intolerância à glicose e de *diabetes mellitus*.

Os achados dos presentes estudos reforçam ainda a importância de se combater o excesso de peso, principalmente durante a infância e a adolescência, estágios da vida marcado por significativas alterações metabólicas e corporais e que configuram um importante alvo de ações de políticas de saúde pública, de modo a prevenir ou retardar o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, as quais são responsáveis por altas taxas de mortalidade no mundo todo e têm um alto custo para os sistemas de saúde.

Apesar da natureza observacional e transversal das análises realizadas nos presentes estudos impedirem a inferência de causalidade e de associações temporais, os resultados observados avalizam, em crianças e adolescentes, evidências previamente obtidas em estudos com animais e com indivíduos adultos e/ou idosos, ampliando o conhecimento sobre esta temática. É importante ressaltar que mais estudos, especialmente os prospectivos e de intervenção, são necessários para a mais profunda compreensão da maneira pela qual osso e tecido adiposo interagem e como isto afeta outras vias metabólicas, o que seria extremamente relevante para o estabelecimento de

estratégias terapêuticas com foco nos adipócitos e no tecido ósseo visando ao adequado funcionamento do metabolismo da glicose.

Por fim, evidências experimentais de que a osteocalcina não seja uma proteína exclusivamente óssea – tendo sido secretada por adipócitos, *in vitro*, em estudo de FORESTA *et al.* (2010) – indicam que o conhecimento acerca de como o osso e o tecido adiposo contribuem para a quantidade de osteocalcina circulante e para as suas funções metabólicas encontra-se ainda não totalmente esclarecido. Os achados desta tese, porém, contribuem com evidências de que esta proteína provavelmente se relaciona com a vitamina D.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott RA, Davies PS. Habitual physical activity and physical activity intensity: their relation to body composition in 5.0-10.5-y-old children. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58(2): 285-91.

Abseyi N, Siklar Z, Berberoglu M, Hacıhamdioglu B, Savas Erdeve S, Oçal G. Relationships between osteocalcin, glucose metabolism, and adiponectin in obese children: Is there crosstalk between bone tissue and glucose metabolism? *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2012; 4(4): 182-8.

ADA. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 2000; 23(3): 381-9.

Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M. Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism* 2008; 57(2): 183-91.

Alfadda AA, Masood A, Shaik SA, Dekhil H, Goran M. Association between osteocalcin, metabolic syndrome, and cardiovascular risk factors: role of total and undercarboxylated osteocalcin in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2013: 197519.

Al-Musharaf S, Al-Othman A, Al-Daghri NM, Krishnaswamy S, Yusuf DS, Alkharfy KM, Al-Saleh Y, Al-Attas OS, Alokail MS, Moharram O, Yakout S, Sabico S, Chrousos GP. Vitamin D deficiency and calcium intake in reference to increased body mass index in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2012; 171(7): 1081-6.

Arslanian S, Suprasongsin C. Differences in the in vivo insulin secretion and sensitivity of healthy black versus white adolescents. *J Pediatr* 1996; 129: 440-3.

Ashraf A, Alvarez J, Saenz K, Gower B, McCormick K, Franklin F. Threshold for effects of vitamin D deficiency on glucose metabolism in obese female African-American adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(9): 3200-6.

Ashraf AP, Alvarez JA, Gower BA, Saenz KH, McCormick KL. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D and components of the metabolic syndrome in obese adolescent females. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19(11): 2214-21.

Baczynski R, Massry SG, Magott M, el-Belbessi S, Kohan R, Brautbar N. Effect of parathyroid hormone on energy metabolism of skeletal muscle. *Kidney Int* 1985; 28(5): 722-7.

Beaulieu C, Kestekian R, Havrankova J, Gascon-Barré M. Calcium is essential in normalizing intolerance to glucose that accompanies vitamin D depletion in vivo. *Diabetes* 1993; 42(1): 35-43.

Belenchia AM, Tosh AK, Hillman LS, Peterson CA. Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2013; 97: 774-81.

Bonnet N, Plerroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008; 8: 94-104.

Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem* 2006; 99(2):411-24.

Boucher-Berry C, Speiser PW, Carey DE, Shelov SP, Accacha S, Fennoy I, Rapaport R, Espinal Y, Rosenbaum M. Vitamin D, osteocalcin, and risk for adiposity as comorbidities in middle school children. *J Bone Miner Res* 2012; 27(2): 283-93.

Bouillon R, Carmeliet G, Lieben L, Watanabe M, Perino A, Auwerx J, Schoonjans K, Verstuyf A. Vitamin D and energy homeostasis: of mice and men. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(2): 9-87.

Brasil. Ministério da Saúde, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. 130 p.

Bueno G, Bueno O, Moreno LA, García R, Tresaco B, Garagorri JM, Bueno M. Diversity of metabolic syndrome risk factors in obese children and adolescents. *J Physiol Biochem* 2006; 62: 125-33.

Buzzard IM, Faucett CL, Jeffery RW, McBane L, McGovern P, Baxter JS, Shapiro AC, Blackburn GL, Chlebowski RT, Elashoff RM, Wynder EL. Monitoring dietary change in a low-fat diet intervention study: advantages of using 24-hour dietary recalls vs food records. *J Am Diet Assoc* 1996; 96(6): 574-9.

Cali AM, Caprio S. Prediabetes and type 2 diabetes in youth: an emerging epidemic disease? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15(2): 123-7.

Carvallo L, Henríquez B, Paredes R, Olate J, Onate S, Van Wijen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M. 1 α ,25dihidroxy vitamin D₃-enhanced expression of the osteocalcin gene involves increased promoter occupancy of the basal transcription regulators and gradual recruitment of the 1 α ,25dihidroxy vitamin D₃ receptor-SCR-1 coactivator complex. *J Cell Physiol* 2008; 214: 740-9.

Chagas CEA, Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients* 2012; 4(1): 52-67.

Chang E, Donkin SS, Teegarden D. Parathyroid hormone suppresses insulin signaling in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 307(1-2): 77-82.

Cheng S, Massaro JM, Fox CS, Larson MG, Keyes MJ, McCabe EL, Robins SJ, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Jacques PF, Booth SL, Vasan RS, Wolf M, Wang TJ. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes* 2010; 59(1): 242-8.

Chung SJ, Lee YA, Hong H, Kang MJ, Kwon HJ, Shin CH, Yang SW. Inverse relationship between vitamin D status and insulin resistance and the risk of impaired

fasting glucose in Korean children and adolescents: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Public Health Nutr* 2013; 19: 1-8.

Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences (2nd Edition). Hillsdale, NJ: Lawrence Earlbaum Associates, 1988.

Colao A, Muscogiuri G, Rubino M, Vuolo L, Pivonello C, Sabatino P, Pizzo M, Campanile G, Fittipaldi R, Lombardi G, Di Somma C. Hypovitaminosis D in adolescents living in the land of sun is correlated with incorrect life style: a survey study in Campania region. *Endocrine* 2015; 49(2): 521-7.

Confavreux CB, Levine RL, Karsenty G. A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 310: 21-9.

Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngye A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 1381-95.

Delvin EE, Lambert M, Levy E, O'Loughlin J, Mark S, Gray-Donald K, Paradis G. Vitamin D status is modestly associated with glycemia and indicators of lipid metabolism in French-Canadian children and adolescents. *J Nutr* 2010; 140(5): 987-91.

Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148(3): 293-300.

Dimitri P, Bishop N, Walsh JS, Eastell R. Obesity is a risk factor for fracture in children but is protective against fracture in adults: a paradox. *Bone* 2012; 50(2): 457-66.

Donoso MA, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, Martínez G, Hawkins F, Argente J. Increased leptin/adiponectin ratio and free leptin index are markers of insulin resistance in obese girls during pubertal development. *Horm Res Paediatr* 2013; 80(5): 363-70.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000; 100: 197-207.

Duncan GE, Perri MG, Theriaque DW, Hutson AD, Eckel RH, Stacpoole PW. Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults. *Diabetes Care* 2003; 26: 557-62.

Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36(3): 387-96.

Elder DA, Prigeon RL, Wadwa RP, Dolan LM, D'Alessio DA. β -Cell function, insulin sensitivity, and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic adolescents and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 185-91.

Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, Ogawa Y, Liu X, Ware SM, Craigen WJ, Robert JJ, Vinson C, Nakao K, Capeau J, Karsenty G. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3258-63.

Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005; 434: 514-20.

Erdönmez D, Hatun S, Çizmecioğlu FM, Keser A. No relationship between vitamin D status and insulin resistance in a group of high school students. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2011; 3(4): 198-201.

Fazeli Farsani S, van der Aa MP, van der Vorst MM, Knibbe CA, de Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia* 2013; 56(7): 1471-88.

Ferrarezi DA, Bellili-Muñoz N, Nicolau C, Cheurfa N, Guazzelli IC, Frazzatto E, Velho G, Villares SM. Allelic variations in the vitamin D receptor gene, insulin secretion and parents' heights are independently associated with height in obese children and adolescents. *Metabolism* 2012; 61(10): 1413-21.

Ferreira AP, Oliveira CER, França NM. Metabolic syndrome and risk factors for cardiovascular disease in obese children: the relationship with insulin resistance (HOMA-IR). *J Pediatr* 2007; 83: 21-6.

Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 5266-70.

Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010; 142(2): 296-308.

Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone* 2012; 50(2): 568-75.

Fisberg RM, Villar BS. Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus; 2002.

Fisberg RM, Marchioni DML. Manual de avaliação do consumo alimentar em estudos populacionais: a experiência do Inquérito de Saúde em São Paulo (ISA). Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Grupo de Pesquisa de Avaliação do Consumo Alimentar. São Paulo, 2012. 197 p.

Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol* 1998; 83: 1407-13.

Flodmark CE, Marcus C, Britton M. Interventions to prevent obesity in children and adolescents: a systematic literature review. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30(4): 579-89.

Fonseca VM, Sichieri R, Veiga GV. Fatores associados à obesidade em adolescentes. *Rev Saúde Pública* 1998; 32: 541-9.

Ford ES, Zhao G, Tsai J, Li C. Associations between concentrations of vitamin D and concentrations of insulin, glucose, and HbA1c among adolescents in the United States. *Diabetes Care* 2011; 34(3): 646-8.

Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Giancesello L, Calcagno A, Pilon C, Plebani M, Vettor R. Evidence for osteocalcin production by adipose tissue and its role in human metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3502-6.

Fornari R, Francomano D, Greco EA, Marocco C, Lubrano C, Wannenes F, Papa V, Bimonte VM, Donini LM, Lenzi A, Aversa A, Migliaccio S. Lean mass in obese adult subjects correlates with higher levels of vitamin D, insulin sensitivity and lower inflammation. *J Endocrinol Invest* 2015; 38: 367-72.

Forney LA, Earnest CP, Henagan TM, Johnson LE, Castleberry TJ, Stewart LK. Vitamin D status, body composition, and fitness measures in college-aged students. *J Strength Cond Res* 2014; 28(3): 814-24.

Foss YJ. Vitamin D deficiency is the cause of common obesity. *Med Hypotheses* 2009; 72(3): 314-21.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

Ganji V, Zhang X, Shaikh N, Tangpricha V. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1): 225-33.

Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Goral J, Krupa B, Syrenicz J, Walczak M, Syrenicz A. Serum 25-hydroxyvitamin D (25-OH-D) in obese adolescents. *Endokrynol Pol* 2011; 62(6): 506-11.

Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Rać M, Krupa B, Czaja-Bulsa G, Walczak M, Sowińska-Przepiera E, Syrenicz A. Association between serum osteocalcin, adiposity and metabolic risk in obese children and adolescents. *Endokrynol Pol* 2013; 64(5): 346-52.

Giannini C, Caprio S. Progression of β -cell dysfunction in obese youth. *Curr Diab Rep* 2013; 13: 89-95.

Gómez JM, Maravall FJ, Gómez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J. Relationship between 25-(OH)D₃, the IGF-1 system, leptin, anthropometric and body composition variables in a healthy, randomly selected population. *Horm Metab Res* 2004; 36: 48-53.

Goran MI, Ball GD, Cruz ML. Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1417-27.

Grey A, Bolland MJ, Wattie D, Home A, Gamble G, Reid IR. The antiresorptive effects of a single dose of zoledronate persist for two years: a randomized, placebo controlled trial in osteopenic post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 538-44.

Guenther PM, Kott PS, Carriquiry AL. Development of an approach for estimating usual nutrient intake distributions at the population level. *J Nutr* 1997; 127(6): 1106-12.

Gundberg CM, Nieman SD, Abrams S, Rosen H. Vitamin K status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(9): 3258-66.

Halaas J, Gajiwala K, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight reducing effect of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269:543-6.

Hannon TS, Danadian K, Suprasongsin C, Arslanian SA. Growth hormone treatment in adolescent males with idiopathic short stature: changes in body composition, protein, fat, and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8): 3033-9.

Hanwell HE, Vieth R, Cole DE, Scillitani A, Modoni S, Frusciante V, Ritrovato G, Chiodini I, Minisola S, Carnevale V. Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1-2): 334-7.

Harkness L, Cromer B. Low levels of 25-hydroxy vitamin D are associated with elevated parathyroid hormone in healthy adolescent females. *Osteoporos Int* 2005; 16: 109-13.

Harttig U, Haubrock J, Knüppel S, Boeing H. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65(S1):S87-91.

Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3925-9.

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69: 990-1047.

Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers Jr MG, Chua Jr SC, Kim JK, Kaestner KH, Karsenty G. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 2008; 183: 1235-42.

Hoffmann K, Boeing H, Dufour A, Volatier JL, Telman J, Virtanen M, Becker W, De Henauw S; EFCOSUM Group. Estimating the distribution of usual dietary intake by short-term measurements. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 Suppl 2: S53-62.

Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003; 88(2): 296-307.

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

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7): 1911-30.

Hong SH, Koo JW, Hwang JK, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, Kim DY. Changes in serum osteocalcin are not associated with changes in glucose or insulin for osteoporotic patients treated with bisphosphonate. *J Bone Metab* 2013; 20(1): 37-41.

Hu FB, van Dam RM, Liu S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia* 2001; 44: 805-17.

Hyppönen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity. *Diabetes Care* 2006; 29(10): 2244-6.

Inoue M, Yano M, Yamakado M, Maehata E, Suzuki S. Relationship between the adiponectin-leptin ratio and parameters of insulin resistance in subjects without hyperglycemia. *Metabolism* 2006; 55: 1248-54.

IOM. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences. Washington, D.C.: National Academy Press, 1997.

IOM. Institute of Medicine. US Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, editors. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington (DC): National Academies Press, 2011.

Jiménez-Pavón D, Ortega FB, Artero EG, Labayen I, Vicente-Rodriguez G, Huybrechts I, Moreno LA, Manios Y, Béghin L, Polito A, De Henauw S, Sjöström M, Castillo MJ, González-Gross M, Ruiz JR; HELENA Study Group. Physical activity, fitness, and serum leptin concentrations in adolescents. *J Pediatr* 2012; 160(4): 598-603.

Johnson MD, Nader NS, Weaver AL, Singh R, Kumar S. Relationships between 25-hydroxyvitamin D levels and plasma glucose and lipid levels in pediatric outpatients. *J Pediatr* 2010; 156(3):444-9.

Jung CH, Rhee EJ, Choi JH, Bae JC, Yoo SH, Kim WJ, Park CY, Mok JO, Kim CH, Lee WY, Oh KW, Park SW, Kim SW. The relationship of adiponectin/leptin ratio with homeostasis model assessment insulin resistance index and metabolic syndrome in apparently healthy korean male adults. *Korean Diabetes J* 2010; 34(4): 237-243.

Jürimäe J. Adipocytokine and ghrelin responses to acute exercise and sport training in children during growth and maturation. *Pediatr Exerc Sci* 2014; 26(4): 392-403.

Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano SL, Sugimoto T. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 45-9.

Kaneko I, Sabir MS, Dussik CM, Whitfield GK, Karrys A, Hsieh JC, Haussler MR, Meyer MB, Pike JW, Jurutka PW. 1,25-Dihydroxyvitamin D regulates expression of the tryptophan hydroxylase 2 and leptin genes: implication for behavioral influences of vitamin D. *FASEB J* 2015; 29(9): 4023-35.

Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole organism physiology. *Nature* 2012; 481: 314–20.

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(7): 2402-10.

Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ. Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 365-72.

Kayaniyil S, Harris SB, Retnakaran R, Vieth R, Knight JA, Gerstein HC, Perkins BA, Zinman B, Hanley AJ. Prospective association of 25(OH)D with metabolic syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 80(4): 502-7.

Kelishadi R, Farajzadegan Z, Bahreynian M. Association between vitamin D status and lipid profile in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr* 2014; 65: 404-10.

Kelly A, Brooks LJ, Dougherty S, Carlow DC, Zemel BS. A cross-sectional study of vitamin D and insulin resistance in children. *Arch Dis Child* 2011; 96(5):447-52.

Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis* 1972; 25(6): 329-43.

Khadgawat R, Thomas T, Gahlot M, Tandon N, Tangpricha V, Khandelwal D, Gupta N. The effect of puberty on interaction between vitamin D status and insulin resistance in obese Asian-Indian children. *Int J Endocrinol* 2012; 2012: 173581.

Kim MK, Kang MI, Oh KW, Kwon HS, Yoon JH, Son HY. The association of serum vitamin D levels with presence of metabolic syndrome and hypertension on middle-aged Korean subjects. *Clin Endocrinol* 2010; 73: 330-8.

Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4): 339-414.

Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Melltröm D. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 785-91.

Kodama K, Tojjar D, Yamada S, Toda K, Patel CJ, Butte AJ. Ethnic differences in the relationship between insulin sensitivity and insulin response: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2013; 36(6): 1789-96.

Koezuka N, Koo M, Allison KR, Adlaf EM, Dwyer JJ, Faulkner G, Goodman J. The relationship between sedentary activities and physical inactivity among adolescents:

results from the Canadian Community Health Survey. *J Adolesc Health* 2006; 39(4): 515-22.

Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, Mei Z, Curtin LR, Roche AF, Johnson CL. CDC growth charts: United States. *Adv Data* 2000; (314): 1-27.

Kull M, Kallikorm R, Lember M. Body mass index determines sunbathing habits: implications on vitamin D levels. *Intern Med J* 2009; 39(4): 256-8.

Kumar R, Binkley N, Vella A. Effect of phylloquinone supplementation on glucose homeostasis in humans. *Am J Clin Nutr* 2010; 92(6): 1528-32.

Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study. *Diabetes Care* 2006; 29(11): 2427-32.

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130: 456-69.

Lewis RD, Laing EM, Hill Gallant KM, Hall DB, McCabe GP, Hausman DB, Martin BR, Warden SJ, Peacock M, Weaver CM. A randomized trial of vitamin D₃ supplementation in children: dose-response effects on vitamin D metabolites and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(12): 4816-25.

Lipton A, Steger GG, Figueroa J, Alvarado C, Solal-Celigny P, Body JJ, Boer R, Berardi R, Gascon P, Tonkin KS, Coleman RE, Paterson AHG, Gao GM, Kinsey AC, Peterson MC, Jun S. Extended Efficacy and safety of denosumab in breast cancer patients with bone metastases not receiving prior bisphosphonate therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(20): 6690-6.

Liu E, Meigs JB, Pittas AG, Mckeown NM, Economos, CD, Booth SL, Jacques PF. Plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with markers of the insulin resistant phenotype in nondiabetic adults. *J Nutr* 2009; 139: 329-34.

Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev* 2004; 5: 4-85.

Lu C, Ivaska KK, Alen M, Wang Q, Törmäkangas T, Xu L, Wiklund P, Mikkola TM, Pekkala S, Tian H, Väänänen HK, Cheng S. Serum osteocalcin is not associated with glucose but is inversely associated with leptin across generations of nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 4106-14.

Maestro B, Campión J, Dávila N, Calle C. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr J* 2000; 47(4): 383-91.

Maestro B, Molero S, Bajo S, Dávila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell Biochem Funct* 2002; 20(3): 227-32.

Magge SN, Stettler N, Koren D, Levitt Katz LE, Gallagher PR, Mohler ER 3rd, Rader DJ. Adiponectin is associated with favorable lipoprotein profile, independent of BMI and insulin resistance, in adolescents. *J Clin Endocrin Metab* 2012; 96: 1549-54.

Malecki MT, Klupa T, Wolkow P, Bochenski J, Wanic K, Sieradzki J. Association study of the vitamin D: 1 α -hydroxylase (CYP1 α) gene and type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Metab* 2003; 29(2 Pt 1): 119-24.

Malina RM, Bouchard C. Growth, maturation and physical activity. New York, Versa Press, 1991.

Martinez-Gomez D, Eisenmann JC, Gomez-Martinez S, Veses A, Romeo J, Veiga OL, Marcos A; AFINOS Study Group. Associations of physical activity and fitness with adipocytokines in adolescents: the AFINOS Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; 22(3): 252-9.

Martini LA, Wood RJ. Vitamin D status and the metabolic syndrome. *Nutr Rev* 2006; 64(11): 479-86.

Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y, Edelstein S, Bray GA, Kahn SE, Crandall J, Marcovina S, Goldstein B, Goldberg R; Diabetes Prevention Program. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 2008; 57: 980-6.

Matkovic V, Tomislav J, Wardlaw GM, Ilich JZ, Goel PK, Wright JK, Andon MB, Smith KT, Heaney RP. Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. *J Clin Invest* 1994; 93: 799-808.

Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 173-80.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7): 412-9.

McCarty MF, Thomas CA. PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine-induced lipolysis-implications for the impact of calcium, vitamin D, and alcohol on body weight. *Med Hypotheses* 2003; 61(5-6): 535-42.

Menendez C, Lage M, Peino R, Baldelli R, Conheiro P, Diéguez C, Casanueva FF. Retinoic acid and vitamin D3 powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol* 2001; 170: 425-31.

Motyl KJ, Rosen CJ. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie* 2012; 94(10): 2089-96.

Mosavin R, Mellon WS. Posttranscriptional regulation of osteocalcin mRNA in clonal osteoblast cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys* 1996; 332:142-52.

Moshfegh AJ, Rhodes DG, Baer DJ, Murayi T, Clemens JC, Rumpler WV, Paul DR, Sebastian RS, Kuczynski KJ, Ingwersen LA, Staples RC, Cleveland LE. The US Department of Agriculture automated multiple-pass method reduces bias in the collection of energy intakes. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 324-32.

Murphy MJ, Metcalf BS, Voss LD, Jeffery AN, Kirkby J, Mallam KM, Wilkin TJ, EarlyBird Study 6. Girls at five are intrinsically more insulin resistant than boys: The Programming Hypotheses Revisited – The EarlyBird Study (EarlyBird Study 6). *Pediatrics* 2004; 113(1): 82-6.

Nakamura K, Kitamura K, Takachi R, Saito T, Kobayashi R, Oshiki R, Watanabe Y, Tsugane S, Sasaki A, Yamazaki O. Impact of demographic, environmental, and lifestyle factors on vitamin D sufficiency in 9084 Japanese adults. *Bone* 2015; 74: 10-7.

Nakashima R, Kamei N, Yamane K, Nakanishi S, Nakashima A, Kohno N. Decreased total and high molecular weight adiponectin are independent risk factors for the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3873-7.

Naves M, Alvarez-Hernández D, Fernández-Martín JL, Paz-Jiménez J, García-Prado P, Fernández-Coto T, Santamaría I, Cannata-Andía J. Effect of VDR gene polymorphisms on osteocalcin secretion in calcitriol-stimulated human osteoblasts. *Kidney Int Suppl* 85: S23-7, 2003.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas. Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) 4. ed. revisada e ampliada - Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol* 2013; 228(6): 1149-53.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, Abraham JP, Abu-Rmeileh NM, Achoki T, AlBuhairan FS, Alemu ZA, Alfonso R, Ali MK, Ali R, Guzman NA, Ammar W, Anwar P, Banerjee A, Barquera S, Basu S, Bennett DA, Bhutta Z, Blore J, Cabral N, Nonato IC, Chang JC, Chowdhury R, Courville KJ, Criqui MH, Cundiff DK, Dabhadkar KC, Dandona L, Davis A, Dayama A, Dharmaratne SD, Ding EL, Durrani AM, Esteghamati A, Farzadfar F, Fay DF, Feigin VL, Flaxman A, Forouzanfar MH, Goto A, Green MA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Hankey GJ, Harewood HC, Havmoeller R, Hay S, Hernandez L, Hussein A, Idrisov BT, Ikeda N, Islami F, Jahangir E, Jassal SK, Jee SH, Jeffreys M, Jonas JB, Kabagambe EK, Khalifa SE, Kengne AP, Khader YS, Khang YH, Kim D, Kimokoti RW, Kinge JM, Kokubo Y, Kosen S, Kwan G, Lai T, Leinsalu M, Li Y, Liang X, Liu S, Logroscino G, Lotufo PA, Lu Y, Ma J, Mainoo NK, Mensah GA, Merriman TR, Mokdad AH, Moschandreas J, Naghavi M, Naheed A, Nand D, Narayan KM, Nelson EL, Neuhouser ML, Nisar MI, Ohkubo T, Oti SO, Pedroza A, Prabhakaran D, Roy N, Sampson U, Seo H, Sepanlou SG, Shibuya K, Shiri R, Shiue I, Singh GM, Singh JA, Skirbekk V, Stapelberg NJ, Sturua L, Sykes BL, Tobias M, Tran BX, Trasande L, Toyoshima H, van de Vijver S, Vasankari TJ, Veerman JL, Velasquez-Melendez G, Vlassov VV, Vollset SE, Vos T, Wang C, Wang X, Weiderpass E, Werdecker A, Wright JL, Yang YC, Yatsuya H, Yoon J, Yoon SJ, Zhao Y, Zhou M, Zhu S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E. Global, regional, and national prevalence of overweight and

obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014; 384(9945): 766-81.

Norata GD, Raselli S, Grigore L, Garlaschelli K, Dozio E, Magni P, Catapano AL. Leptin:adiponectin ratio is an independent predictor of intima media thickness of the common carotid artery. *Stroke* 2007; 38(10): 2844-6.

Núñez NP, Carpenter CL, Perkins SN, Berrigan D, Jaque SV, Ingles SA, Bernstein L, Forman MR, Barrett JC, Hursting SD. Extreme obesity reduces bone mineral density: complementary evidence from mice and women. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15(8): 1980-7.

Oberg J, Jorde R, Almås B, Emaus N, Grimnes G. Vitamin D deficiency and lifestyle risk factors in a Norwegian adolescent population. *Scand J Public Health* 2014; 42(7): 593-602.

Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism* 2002; 51: 356-9.

Okazaki R, Totsuka Y, Hamano K, Ajima M, Miura M, Hirota Y, Hata K, Fukumoto S, Matsumoto T. Metabolic improvement of poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus decreases bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(9): 2915-20.

Oliveira RM, Novaes JF, Azeredo LM, Cândido AP, Leite IC. Association of vitamin D insufficiency with adiposity and metabolic disorders in Brazilian adolescents. *Public Health Nutr* 2014; 17(4): 787-94.

Parikh S, Guo DH, Pollock NK, Petty K, Bhagatwala J, Gutin B, Houk C, Zhu H, Dong Y. Circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations are correlated with cardiometabolic risk among American black and white adolescents living in a year-round sunny climate. *Diabetes Care* 2012; 35(5):1133-8.

Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism* 2015; 64: 24-34.

Park S, Johnson MA. Living in low-latitude regions in the United States does not prevent poor vitamin D status. *Nutr Rev* 2005; 63: 203-9.

Patel MS, Eleftheriou F. The new field of neuroskeletal biology. *Calcif Tissue Int* 2007; 80: 337-47.

Peechakara SV, Pittas AG. Vitamin D as a potential modifier of diabetes risk. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4(4): 182-3.

Pellymounter M, Cullen M, Baker M, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-3.

Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest* 2005; 35(5): 290-304.

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

Pinelli NR, Jaber LA, Brown MB, Herman WH. Serum 25-hydroxyvitamin D and insulin resistance, metabolic syndrome, and glucose intolerance among Arab Americans. *Diabetes Care* 2010; 33: 1373-5.

Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Bezencry EH, Gomes MCG, Costa VM. Tabela para Avaliação do Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu; 2004.

Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 827-32.

Polgreen LE, Jacobs DR Jr, Nathan BM, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 2194-201.

Pollock NK, Bernard PJ, Gower BA, Gundberg CM, Wenger K, Misra S, Bassali RW, Davis CL. Lower uncarboxylated osteocalcin concentrations in children with prediabetes is associated with beta-cell function. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 96(7): E1092-9.

Poomthavorn P, Saowan S, Mahachoklertwattana P, Chailurkit L, Khlairit P. Vitamin D status and glucose homeostasis in obese children and adolescents living in the tropics. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36(4): 491-5.

Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1447–51.

Rajakumar K, Fernstrom JD, Janosky JE, Greenspan SL. Vitamin D insufficiency in preadolescent African-American children. *Clin Pediatr* 2005; 44(8): 683-92.

Rajakumar K, Fernstrom JD, Holick MF, Janosky JE, Greenspan SL. Vitamin D status and response to vitamin D3 in obese vs. non-obese African American children. *Obesity* 2008; 16: 90-5.

Rajakumar K, de las Heras J, Lee S, Holick MF, Arslanian SA. 25-hydroxyvitamin D concentrations and in vivo insulin sensitivity and β -cell function relative to insulin sensitivity in black and white youth. *Diabetes Care* 2012; 35(3): 627-33.

Rajakumar K, Moore CG, Yabes J, Olabopo F, Ann Haralam M, Comer D, Bogusz J, Nucci A, Sereika S, Dunbar-Jacob J, Holick MF, Greenspan SL. Effect of vitamin D3 supplementation in black and in white children: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(8): 3183-92.

Reichert FF, Baptista Menezes AM, Wells JC, Carvalho Dumith S, Hallal PC. Physical activity as a predictor of adolescent body fatness: a systematic review. *Sports Med* 2009; 39(4): 279-94.

Reinehr T, Roth CL. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes* 2010; 34: 852-8.

Reis JP, von Mühlen D, Miller ER 3rd, Michos ED, Appel LJ. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics* 2009; 124: E371-9.

Rizzo NS, Ruiz JR, Oja L, Veidebaum T, Sjöström M. Associations between physical activity, body fat, and insulin resistance (homeostasis model assessment) in adolescents: the European Youth Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(3): 586-92.

Rocheffort GY, Rocher E, Aveline PC, Garnerio P, Bab I, Chappard C, Jaffré C, Benhamou CL. Osteocalcin-insulin relationship in obese children: a role for the skeleton in energy metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 75: 265-70.

Roemmich JN, Clark P, Lusk M, Friel A, Weltman A, Epstein LH, Rogol AD. Pubertal alterations in growth and body composition: pubertal insulin resistance – relationship to adiposity, body fat distribution and hormone release. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 701-9.

Rosato MT, Schneider SH, Shapses SA. Bone turnover and insulin-like growth factor I levels increase after improved glycemic control in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int* 1998; 63: 107-11.

Rubin DA, McMurray RG, Harrell JS. Insulin and weight status in adolescents: independent effects of intensity of physical activity and peak aerobic power. *Pediatr Exerc Sci* 2008; 20(1): 29-39.

Schwartz AV, Schafer AL, Grey A, Vittinghoff E, Palermo L, Lui LY, Wallace RB, Cummings SR, Black DM, Bauer DC, Reid IR. Effects of antiresorptive therapies on glucose metabolism: results from the FIT, HORIZON-PFT, and FREEDOM trials. *J Bone Miner Res* 2013; 28(6): 1348-54.

Scragg R, Camargo CA Jr. Frequency of leisure-time physical activity and serum 25-hydroxyvitamin D levels in the US population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2008; 168(6): 577-86.

Sham L, Yeh EA, Magalhaes S, Parra EJ, Gozdzik A, Banwell B, Hanwell HE. Evaluation of fall Sun Exposure Score in predicting vitamin D status in young Canadian adults, and the influence of ancestry. *J Photochem Photobiol B* 2015; 145: 25-9.

Shin YH, Kim KE, Lee C, Shin HJ, Kang MS, Lee HR, Lee YJ. High prevalence of vitamin D insufficiency or deficiency in young adolescents in Korea. *Eur J Pediatr* 2012; 171: 1475-80.

Simmons J, Sheedy C, Lee H, Koh S, Alvarez J, Koyama T, Friedman D. Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in child and adolescent patients undergoing hematopoietic cell transplantation compared to a healthy population. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60(12): 2025-30.

Singh R, Bhansali A, Sialy R, Aggarwal A. Prevalence of metabolic syndrome in adolescents from a north Indian population. *Diabet Med* 2007; 24: 195-9.

Sinha A, Hollingsworth KG, Ball S, Cheetham T. Improving the vitamin D status of vitamin D deficient adults is associated with improved mitochondrial oxidative function in skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(3): E509-13.

Slater B, Marchioni DL, Fisberg RM. Estimating prevalence of inadequate nutrient intake. *Rev Saude Publica* 2004; 38(4): 599-605.

Smotkin-Tangorra M, Purushothaman R, Gupta A, Nejati G, Anhalt H, Ten S. Prevalence of vitamin D insufficiency in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007; 20(7): 817-23.

Soper DS. Post-hoc Statistical Power Calculator for Multiple Regression [Software]. 2015. Disponível em <http://www.danielsoper.com/statcalc>

Souza AM, Pereira RA, Yokoo EM, Levy RB, Sichieri R. Most consumed foods in Brazil: National Dietary Survey 2008-2009 *Rev Saude Publica* 2013; 47 (Supl 1): 190S-9S.

Steinberger J, Daniels SR; American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young); American Heart Association Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). *Circulation* 2003; 107(10): 1448-53.

Sukumar D, Shapses SA, Schneider SH. Vitamin D supplementation during short-term caloric restriction in healthy overweight/obese older women: Effect on glycemic indices and serum osteocalcin levels. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 410: 73-7.

Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a “bone-a-fide” hormone. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 177-91.

Szklo AS, Almeida LM, Figueiredo V, Lozana JA, Mendonça GAS, Moura L, Szklo M. Comportamento relativo à exposição e proteção solar na população de 15 anos ou mais de 15 capitais brasileiras e Distrito Federal, 2002-2003. *Cad Saúde Pública* 2007; 23(4): 823-34.

Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111: 305-17.

Takeda S, Karsenty G. Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass. *Bone* 2008; 42: 837-40.

Tammelin T, Näyhä S, Laitinen J, Rintamäki H, Järvelin MR. Physical activity and social status in adolescence as predictors of physical inactivity in adulthood. *Prev Med* 2003; 37(4): 375-81.

Teegarden D, Donkin SS. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutr Res Rev* 2009; 22: 82-92.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-8.

Tfayli H, Lee S, Arslanian S. Declining beta-cell function relative to insulin sensitivity with increasing fasting glucose levels in the nondiabetic range in children. *Diabetes Care* 2010; 33: 2024-30.

Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 1999; 140(4): 1630-8.

Thrailkill KM, Jo CH, Cockrell GE, Moreau CS, Fowlkes JL. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency? *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(1): 142-9.

Travers SH, Jeffers BW, Bloch CA, Hill JO, Eckel RH. Gender and Tanner stage differences in body composition and insulin sensitivity in early pubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 172-8.

Troiano RP, Berrigan D, Dodd KW, Mâsse LC, Tilert T, McDowell M. Physical activity in the United States measured by accelerometer. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40(1): 181-8.

USDHHS. United States Department of Health and Human Services. Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General, 2004.

USDHHS. United States Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services; 2014.

Väistö J, Eloranta AM, Viitasalo A, Tompuri T, Lintu N, Karjalainen P, Lampinen EK, Ågren J, Laaksonen DE, Lakka HM, Lindi V, Lakka TA. Physical activity and sedentary behaviour in relation to cardiometabolic risk in children: cross-sectional findings from the Physical Activity and Nutrition in Children (PANIC) Study. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2014; 11: 55.

Van Summeren M, Braam L, Noirt F, Kuis W, Vermeer C. Pronounced elevation of undercarboxylated osteocalcin in healthy children. *Pediatr Res* 2007; 61: 366-70.

Vasilopoulos Y, Sarafidou T, Kotsa K, Papadimitriou M, Goutzelas Y, Stamatis C, Bagiatis V, Tsekmekidou X, Yovos JG, Mamuris Z. VDR TaqI is associated with obesity in the Greek population *Gene* 2013; 512(2): 237-9.

Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, Rogol AD, Lovejoy JC, Sheffield-Moore M, Mauras N, Bowers CY. Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocr Rev* 2005; 26(1): 114-46.

Vestergaard P. Risk of newly diagnosed type 2 diabetes is reduced in users of alendronate. *Calcif Tissue Int* 2011; 89: 265–70.

Vimaleswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT, Cooper JD, Dastani Z, Li R, Houston DK, Wood AR, Michaëlsson K, Vandenput L, Zgaga L, Yerges-Armstrong LM, McCarthy MI, Dupuis J, Kaakinen M, Kleber ME, Jameson K, Arden N, Raitakari O, Viikari J, Lohman KK, Ferrucci L, Melhus H, Ingelsson E, Byberg L, Lind L, Lorentzon M, Salomaa V, Campbell H, Dunlop M, Mitchell BD, Herzig KH, Pouta A, Hartikainen AL; Genetic Investigation of Anthropometric Traits-GIANT Consortium, Streeten EA, Theodoratou E, Jula A, Wareham NJ, Ohlsson C, Frayling TM, Kritchevsky SB, Spector TD, Richards JB, Lehtimäki T, Ouwehand WH, Kraft P, Cooper C, März W, Power C, Loos RJ, Wang TJ, Järvelin MR, Whittaker JC, Hingorani AD, Hyppönen E. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 2013; 10(2): E1001383.

Wakayo T, Belachew T, Vatanparast H, Whiting SJ. Vitamin D deficiency and its predictors in a country with thirteen months of sunshine: the case of school children in central Ethiopia. *PLoS One* 2015; 10(3): E0120963.

Wang Y, Li S. Worldwide trends in dairy production and consumption and calcium intake: is promoting consumption of dairy products a sustainable solution for inadequate calcium intake? *Food Nutr Bull* 2008; 29(3): 172-85.

Weiss R, Dufour S, Taksali SE, Tamborlane WV, Petersen KF, Bonadonna RC, Boselli L, Barbetta G, Allen K, Rife F, Savoye M, Dziura J, Sherwin R, Shulman GI, Caprio S. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet* 2003; 362: 951-7.

WHO. World Health Organization. Physical Status: the use and interpretation of anthropometry: Report of a WHO expert committee. (WHO technical report series; 854) WHO, 1995.

WHO. World Health Organization. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. Geneva: WHO; 2006.

WHO. World Health Organization. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation. 2008.

WHO. World Health Organization. WHO World health statistics 2015. Geneva: WHO; 2015.

Willet WC. 24-hour dietary recall and food record methods. In: Nutritional epidemiology. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1998.

Williams DM, Fraser A, Lawlor DA. Associations of vitamin D, parathyroid hormone and calcium with cardiovascular risk factors in US adolescents. *Heart* 2011; 97(4): 315-20.

Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev* 2008; 66(1): 40-6.

Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev* 1996; 54: 332-3.

Wolf G. Energy regulation by the skeleton. *Nutr Rev* 2008; 66: 229-33.

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.

Xu C, Perera RA, Chan YH, Fang VJ, Ng S, Ip DK, Kam AM, Leung GM, Peiris JS, Cowling BJ. Determinants of serum 25-hydroxyvitamin D in Hong Kong. *Br J Nutr* 2015; 114(1): 144-51.

Yamaguchi T, Kanazawa I, Takaoka S, Sugimoto T. Serum calcium is positively correlated with fasting plasma glucose and insulin resistance, independent of parathyroid hormone, in male patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab Clin Exp* 2011; 60: 1334-9.

Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 181-6.

Yeni-Komshian H, Carantoni M, Abbasi F, Reaven GM. Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care* 2000; 23: 171-5.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse ob gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.

Zhuo Q, Wang Z, Fu P, Piao J, Tian Y, Xu J, Yang X. Comparison of adiponectin, leptin and leptin to adiponectin ratio as diagnostic marker for metabolic syndrome in older adults of Chinese major cities. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 84(1): 27-33.

ANEXOS

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 03, 2015

This is a License Agreement between Kelly V Giudici ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3701500753265
License date	Sep 03, 2015
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Nutrition Reviews
Licensed content title	Energy regulation by the skeleton
Licensed content author	George Wolf
Licensed content date	2008-04-01
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	None
Title of your work	Relação entre tecido adiposo e osso: associações entre vitamina D, osteocalcina, adipocinas e homeostase da glicose em crianças e adolescentes
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Oct 2015
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD
Total	0.00 USD
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.

4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
12. Other Terms and Conditions:

v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/427/11

02 de dezembro de 2011.

Prezadas pesquisadora e orientadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em sua **9.ª/11 Sessão Ordinária**, realizada em **18/11/2011**, analisou, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º 2307, intitulado **"RELAÇÃO ENTRE TECIDO ADIPOSEO E TECIDO ÓSSEO: INTERAÇÃO METABÓLICA ENTRE VITAMINA D, GENÓTIPOS PARA RECEPTOR DE VITAMINA D, OSTEOCALCINA E LEPTINA EM ADOLESCENTES"**, do grupo I, sob responsabilidade da pesquisadora **Kelly Virecoulon Giudici** e orientação da Professora **Ligia Araujo Martini**, considerando-o **APROVADO**. Solicita-se que o pesquisador envie carta ao Comitê assumindo, explicitamente, o compromisso de que as informações serão, sempre que necessário, devolvidas aos sujeitos de pesquisa, juntamente com as orientações e demais encaminhamentos necessários.

Informo que, de acordo com o item VIII.4."c" da Resolução CNS 196/96, devido à área temática especial do protocolo de pesquisa, o mesmo será encaminhado à apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, devendo a pesquisadora responsável aguardar a sua aprovação para dar início à pesquisa.

Cabe lembrar que, de acordo com a Res. CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a): 1) Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; 2) Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; 3) Comunicar formalmente a este Comitê por ocasião do encerramento da pesquisa; 4) Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; 5) Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Claudio Leone

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Assoc. **Ligia Araujo Martini**

Departamento de Nutrição

Faculdade de Saúde Pública da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/037/13

02 de maio de 2013.

Prezadas pesquisadora e orientadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em sua 3.ª/13 Sessão Ordinária, realizada em 26/04/2013, analisou, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º 2307, intitulado "RELAÇÃO ENTRE TECIDO ADIPOSEO E TECIDO ÓSSEO: INTERAÇÃO METABÓLICA ENTRE VITAMINA D, GENÓTIPOS PARA RECEPTOR DE VITAMINA D, OSTEOCALCINA E LEPTINA EM ADOLESCENTES", do grupo I, sob responsabilidade da pesquisadora Kelly Virecoulon Giudici e orientação da Professora Ligia Araujo Martini, considerando-o APROVADO.

Cabe lembrar que, de acordo com a Res. CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a): 1) Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; 2) Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; 3) Comunicar formalmente a este Comitê por ocasião do encerramento da pesquisa; 4) Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; 5) Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Claudio Leone

Decano do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Assoc. Ligia Araujo Martini
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública da USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
CENTRO DE SAÚDE ESCOLA "GERALDO DE PAULA SOUZA"

Av. Dr. Arnaldo, 925 – CEP: 01245-905 – Cerqueira César – São Paulo

Fone/fax: 3061-7721 – endereço eletrônico: csgps@usp.br

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que esta Diretoria mostra-se favorável ao desenvolvimento da pesquisa "Relação entre tecido adiposo e tecido ósseo: interação metabólica entre vitamina D, genótipos para receptor de vitamina D, osteocalcina e leptina em adolescentes" da doutoranda Kelly Virecoulon Giudici no Centro de Saúde Escola "Geraldo de Paula Souza" da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 05 de abril de 2012.

Prof. Dra. Patrícia Helen de Carvalho Rondó
Diretora CSE "Geraldo de Paula Souza"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

São Paulo, 18 de outubro de 2011

Ao Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Saúde Pública - USP

Ilmo Sr

Prof Tit Claudio Leone

Prezado Professor,

Eu, Regina Mara Fisberg, Coordenadora do estudo **"Fatores dietéticos, homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR e risco cardiovascular em adultos e idosos: estudo de base populacional – ISA-Capital"** aprovado pela **FAPESP (2009/15831-0)** autorizo a aluna Kelly Virecoulon Giudici a utilizar dados de socioeconômica, de estilo de vida (consumo dietético, atividade física) e amostras de soro/plasma para dosagem dos biomarcadores necessários, como dados adicionais para seu projeto de doutorado intitulado **"Relação entre tecido adiposo e tecido ósseo: interação metabólica entre vitamina D, genótipos para receptor de vitamina D, osteocalcina e leptina em adolescentes"**

Coloco-me a disposição para maiores esclarecimentos

Atenciosamente

Profa Assoc Regina Mara Fisberg

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:
Documento de Identidade Nº : Sexo: M () F () Data Nasc./...../.....
Endereço: Nº: Apto:
Bairro: Cidade:
CEP: Telefone:
2. Responsável Legal:
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):
Documento de Identidade Nº : Sexo: M () F () Data Nasc./...../.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

O(A) Sr(a) está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada: **“Relação entre tecido adiposo e tecido ósseo: interação metabólica entre vitamina D, genótipos para receptor de vitamina D, osteocalcina e leptina em adolescentes”**, de responsabilidade de:

- Lígia Araújo Martini, **Documento de Identidade 9708905-9**, exercendo o cargo de **Professora Associada do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP**.
- Kelly Virecoulon Giudici, **Documento de Identidade 28797436-4**, **doutoranda** junto ao **Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP** e sob a orientação da Prof^a Assoc. Lígia Araújo Martini.

Avaliação de risco da pesquisa: Os procedimentos de pesquisa apresentam mínimo risco de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante. Incluem preenchimento de questionário, medidas de composição corporal e coleta de 20 mL de sangue venoso em jejum. Este procedimento, realizado por um profissional de Enfermagem, pode trazer pequeno desconforto. Raramente, a punção venosa pode provocar pequeno hematoma (manchas roxas) no local em que foi realizada, que, em geral, desaparecem após 3 a 5 dias. Os materiais serão todos descartáveis e para a coleta será necessário manter-se em jejum por 8 horas.

Duração da pesquisa: 24 (vinte e quatro) meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO SUJEITO DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

A pesquisa tem por **objetivos:** Investigar as correlações entre níveis sanguíneos de vitamina D e o genótipo para receptor de vitamina D com os produtos secretados pelo tecido adiposo e o metabolismo ósseo em adolescentes. Quantificar concentrações séricas de vitamina D, osteocalcina, leptina e adiponectina. Investigar parâmetros metabólicos relacionados ao sobrepeso e à obesidade em adolescentes. Avaliar a presença de polimorfismos no gene do receptor de vitamina D. O termo “polimorfismo” é usado para modificações nos genes, estruturas intracelulares responsáveis pela nossa herança genética.

Antes de tomar uma decisão sobre a sua participação no estudo, é importante que você leia e compreenda a explicação dos procedimentos propostos abaixo. Este termo de consentimento livre e

esclarecido descreve a finalidade, os procedimentos, os benefícios, os riscos, desconfortos e advertências deste estudo. Sua participação inclui:

- a) Responder a um questionário sobre características sócio-econômicas, de consumo alimentar, de saúde e de exposição solar;
- b) Realizar exame de bioimpedância elétrica, medidas de circunferência da cintura e do quadril. Estes exames não causam dor ou qualquer desconforto. A duração média é de 15 (quinze) minutos. Para a bioimpedância elétrica, são colocados dois eletrodos descartáveis na mão e no pé esquerdo, e é medida a passagem de corrente elétrica. O exame não causa choque. Para as medidas das circunferências são usadas fitas métricas, e um pesquisador treinado realiza cada medida 3 (três) vezes;
- c) Permitir a coleta de 20 mL de sangue por punção venosa, para avaliação de vitamina D, paratormônio, glicemia, insulina, osteocalcina carboxilada e não-carboxilada, leptina, adiponectina, colesterol total, triglicérides, LDL-c e HDL-c), creatinina, proteína C reativa, e para determinação de genótipo para receptor de vitamina D, genótipo para osteocalcina, genótipo para receptor de leptina e genótipo para adiponectina. A coleta será realizada por profissional habilitado pelo Conselho Regional de Enfermagem com materiais descartáveis.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA E CONTATOS

Não haverá riscos para a integridade física, mental ou moral da sua pessoa. Todas as informações são de caráter confidencial e serão utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo das pesquisas acima mencionadas, sem qualquer identificação pessoal. Esclarecemos que o seu consentimento está sendo pedido para a participação neste estudo, não sendo extensível a nenhum outro projeto de pesquisa. É garantida e respeitada a **privacidade** na divulgação dos resultados da pesquisa, e não haverá, de forma alguma, a sua identificação.

Se o(a) Sr(a) não entender algum aspecto ora mencionado, solicite esclarecimentos que julgar necessários. Estaremos a disposição para informá-lo(a) sobre os riscos e benefícios decorrentes desta pesquisa.

É garantido o **direito de desistir** a qualquer momento da sua participação sem prejuízo algum para você. O(A) Sr(a) tem a liberdade de não participar do estudo, ou retirar o seu consentimento a qualquer momento.

Você poderá entrar em **contato** em qualquer momento com a Prof^a Dr^a Lígia A. Martini (Telefone: 3061-7859 ou pelo e-mail: lmartini@usp.br) com a doutoranda Kelly V. Giudici (Telefone: 3061-7859 ou pelo e-mail: kellygiudici@gmail.com) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública (Telefone: 3061-7779 ou pelo e-mail: cpq@fsp.usp.br).

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 715, 2º Andar, Depto. de Nutrição, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP 01246-904.

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Inquérito de Saúde no Município de São Paulo

Modificado para prfas Sandra e Ligia

Folha de controle

Nome completo do entrevistado: _____

End.: _____ Nº: _____ Compl.: _____

Bairro: _____ Tels.: _____

B 04. Data de nascimento:

__/__/__

B 05. Sexo: masculino 1

feminino 2

DOENÇAS CRÔNICAS

BLOCO D

O(a) sr.(a) tem alguma doença crônica, uma doença de longa duração ou que se repete com alguma frequência?

	não	sim	NS/NR
D 02. Hipertensão (pressão alta)	1	2 <i>preencha o bloco D 1</i>	9
D 03. Diabetes (SE FOR SOMENTE DIABETES GESTACIONAL ASSINALAR NÃO)	1	2 <i>preencha o bloco D 2</i>	9
D 04. Doença de pele	1	2	9
D 05. Alergia	1	2	9
D 06. Anemia	1	2	9
D 07. Doença de coluna/ costas (séria, importante)	1	2	9
D 08. Artrite/ reumatismo/ artrose	1	2	9
D 09. Doença renal crônica	1	2	9
D 10. Acidente vascular cerebral (derrame cerebral)	1	2	9
D 11. Depressão/ ansiedade/ problemas emocionais	1	2	9
D 12. Enxaqueca/ dor de cabeça	1	2	9
D 13. Osteoporose	1	2	9
D 14. Cirrose	1	2	9
D 15. Epilepsia (ataque)	1	2	9
D 16. Doença de Chagas	1	2	9
D 17. Hanseníase	1	2	9
D 18. Tuberculose	1	2	9
D 19. Esquistossomose (barriga d'água)	1	2	9
D 20. Câncer (tumor maligno), especif.: _____	1	_____. _____. _____. _____. _____.	9999 9999

D 21. Doença do coração, especif.: _____	1	____ _ . ____ ____ _ . ____	9999 9999
D 22. Doença crônica do pulmão (asma/ bronquite/ enfisema), especif.: _____	1	____ _ . ____ ____ _ . ____	9999 9999
D 23. Doença digestiva crônica (úlceras/ gastrite), especif.: _____	1	____ _ . ____ ____ _ . ____	9999 9999
D 24. e D 25. Alguma outra doença crônica, especif. _____	1	____ _ . ____ ____ _ . ____	9999 9999
D 26. Rinite	1	2	9
D 27. Sinusite	1	2	9

Nome do entrevistado: _____

L 22. O(a) sr.(a) já fumou, ao menos algum cigarro por dia, todos os dias durante ao menos um mês?

passa p/ questão L 33. não **1**
sim **2**
NS/NR **9**

L 23. Que idade o(a) sr.(a) tinha quando começou a fumar regularmente?

_____ anos
NS/NR **99**

L 24a. O(a) sr.(a) fuma atualmente?

passa p/ questão L 25. não **1**
sim **2**
NS/NR **9**

L 24b. Se sim, qual?

passa p/ questão L 29. cigarro **1**
passa p/ questão L 34. { charuto **2**
cachimbo **3**
cigarro de palha **4**
NS/NR **9**

L 25. Há quantos meses ou anos o(a) sr.(a) deixou de fumar?

1 ____ _ anos **2** ____ _ meses
NS/NR **999**

L 26. Por que o(a) sr.(a) deixou de fumar?*Pode haver mais de uma resposta.*

acha que faz mal para saúde	1
teve algum problema de saúde	2
restrição ao fumo no trabalho/locais públicos	3
restrição em casa	4
por vontade própria	5
outro, especif.:	6
NS/NR	9

L 27. Contou com algum tipo de apoio quando deixou de fumar?*Pode haver mais de uma resposta*

não	1
sim, grupo de apoio em serviço de saúde	2
sim, local de trabalho	3
sim, parente e amigo	4
sim, usou acupuntura	5
sim, algum tipo de tratamento (ex: adesivo), especif.:	6
sim, motivo religioso	7
outro, especif.:	8
NS/NR	9

L 28. Quantos cigarros em média o(a) sr.(a) fumava por dia?*passa p/ questão L 33.* ____ ____ cigarros

NS/NR	99
-------------	----

L 29. Quanto tempo após acordar o(a) sr.(a) fuma o primeiro cigarro?

na primeira meia hora	25
na segunda meia hora	26
após: ____ ____ horas	
NS/NR	99

L 30. Atualmente quanto o(a) sr.(a) fuma por dia?

____ ____ cigarros

NS/NR	99
-------------	----

L 31. O(a) sr.(a) já tentou parar de fumar?

<i>passa p/ questão L 34.</i>	não	1
	sim	2
	NS/NR	9

L 32. Por que?*Pode haver mais de uma resposta.*

<i>passse p/ questão L 34.</i>	{	acha que faz mal para saúde	1
		teve algum problema de saúde	2
		restrição ao fumo no trabalho/locais públicos	3
		restrição em casa	4
		por vontade própria	5
		outro, especif.:	6
		NS/NR	9

L 33. O(a) sr.(a) que não fuma, quantas horas por dia fica exposto/próximo de alguém fumando?

1 ____ horas **2** ____ minutos

NS/NR **99**

L 34. Qual é a bebida de sua preferência? *se referir bebida alcoólica - passe p/ questão L 37.*

especif.: _____

L 35. Qual é a bebida alcoólica de sua preferência?

passse p/ questão L 37. especif.: _____

não bebe álcool **01**

L 36. Há quanto tempo o(a) sr.(a) não ingere bebida alcoólica?

<i>passse p/ questão M 01.</i>	{	nunca bebeu	1
		não bebe há mais de um ano	2
		parou de beber há menos de um ano	3
		NS/NR	9

“PARA OS QUE BEBEM”

L 37. Alguma vez o(a) sr.(a) sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ou parar de beber?

não **1**

sim **2**

NS/NR **9**

L 38. As pessoas o aborrecem porque criticam o seu modo de beber?

não **1**

sim **2**

NS/NR **9**

L 39. O(a) sr.(a) costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca?

não	1
sim	2
NS/NR	9

L 40. O(a) sr.(a) fica chateado ou se sente culpado pela maneira como costuma beber?

não	1
sim	2
NS/NR	9

L 41. Com que frequência o(a) sr.(a) toma ou tomava bebida alcoólica?

todos os dias	1
4 a 6 vezes por semana	2
2 a 3 vezes por semana	3
1 vez por semana	4
1 a 2 vezes por mês	5
menos de 1 vez por mês	6
NS/NR	9

Qual bebida alcoólica e em que quantidade o(a) sr.(a) consome ou consumia num dia típico quando está bebendo?

L 42a. Bebida: _____

L 42b. Quantidade: _____

L 42c. Bebida: _____

L 42d. Quantidade: _____

L 42e. Bebida: _____

L 42f. Quantidade: _____

CARACTERÍSTICAS SÓCIO-ECONÔMICAS

(INFORMAÇÕES DO ENTREVISTADO)

O 02. Onde o(a) sr.(a) nasceu?

outro município, especifique o município e estado:

no próprio município	0000001
NS/NR	9999999

O 03. Há quanto tempo o(a) sr.(a) mora nesse município?

1 ____ anos **2** ____ meses **3** ____ dias

O 04. Há quanto tempo o(a) sr.(a) mora nesse domicílio?

1 ____ anos **2** ____ meses **3** ____ dias
 NS/NR 999

O 05. Qual é a sua situação conjugal?

casado(a) 1
 união conjugal estável 2
 solteiro(a) 3
 separado(a) 4
 desquitado(a) ou divorciado(a) 5
 viúvo(a) 6
 NS/NR 9

O 06. Até que ano da escola o(a) sr.(a) completou?

nunca freqüentou, não sabe ler e escrever 01
 nunca freqüentou, sabe ler e escrever 02
 ensino fundamental/ 1º grau ou primário (ano/série) (11 - 14) 1 ____
 ensino fundamental/ 1º grau ou ginásio (ano/série) (15 - 18) 1 ____
 ensino médio/2º grau ou colegial (ano/série) (21 - 23) 2 ____
 cursos técnicos de nível médio incompletos 25
 cursos técnicos de nível médio completos 26
 curso superior incompleto 30
 curso superior completo . , 31
 outros, especif.: _____ 40
 NS/NR 99

O 07. Atualmente o(a) sr.(a) exerce alguma atividade seja ela remunerada ou não remunerada de trabalho?

sim, em atividade 01
 sim, mas afastado por motivo de doença 02
 sim, e também aposentado 03
 não, desempregado 04
 não, aposentado 05
 não, dona de casa 06
 não, pensionista 07
 não, só estudante 08
 outros 09
 NS/NR 99

passa p/ questão **O 15.**

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA.

Nome: _____ Data: ____/____/____
Idade : ____ Sexo: F () M () Você trabalha de forma remunerada: () Sim () Não.
Quantas horas você trabalha por dia: ____ Quantos anos completos você estudou: ____
De forma geral sua saúde está: () Excelente () Muito boa () Boa () Regular () Ruim

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física em uma semana **última semana**. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

- Atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal
- Atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

SEÇÃO 1- ATIVIDADE FÍSICA NO TRABALHO

Esta seção inclui as atividades que você faz no seu serviço, que incluem trabalho remunerado ou voluntário, as atividades na escola ou faculdade e outro tipo de trabalho não remunerado fora da sua casa. **NÃO** incluir trabalho não remunerado que você faz na sua casa como tarefas domésticas, cuidar do jardim e da casa ou tomar conta da sua família. Estas serão incluídas na seção 3.

- 1a. Atualmente você trabalha ou faz trabalho voluntário fora de sua casa?
() Sim () Não – Caso você responda não **Vá para seção 2: Transporte**

As próximas questões são em relação a toda a atividade física que você fez na **última semana** como parte do seu trabalho remunerado ou não remunerado. **NÃO** inclua o transporte para o trabalho. Pense unicamente nas atividades que você faz por **pelo menos 10 minutos contínuos**:

- 1b. Em quantos dias de uma semana normal você **anda**, durante **pelo menos 10 minutos contínuos**, como parte do seu trabalho? Por favor, **NÃO** inclua o andar como forma de transporte para ir ou voltar do trabalho.

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 1d.**

- 1c. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** caminhando **como parte do seu trabalho** ?

_____ horas _____ minutos

- 1d. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades **moderadas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como carregar pesos leves **como parte do seu trabalho**?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 1f**

1e. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades moderadas **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minutos

1f. Em quantos dias de uma semana normal você gasta fazendo atividades **vigorosas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como trabalho de construção pesada, carregar grandes pesos, trabalhar com enxada, escavar ou subir escadas **como parte do seu trabalho**:

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 2a.**

1g. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades físicas vigorosas **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 2 - ATIVIDADE FÍSICA COMO MEIO DE TRANSPORTE

Estas questões se referem à forma típica como você se desloca de um lugar para outro, incluindo seu trabalho, escola, cinema, lojas e outros.

2a. O quanto você andou na ultima semana de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para questão 2c**

2b. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** andando de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ horas _____ minutos

Agora pense **somente** em relação a caminhar ou pedalar para ir de um lugar a outro na ultima semana.

2c. Em quantos dias da ultima semana você andou de bicicleta por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua o pedalar por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a questão 2e.**

2d. Nos dias que você pedala quanto tempo no total você pedala **POR DIA** para ir de um lugar para outro?

_____ horas _____ minutos

2e. Em quantos dias da ultima semana você caminhou por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a Seção 3.**

2f. Quando você caminha para ir de um lugar para outro quanto tempo **POR DIA** você gasta? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 3 – ATIVIDADE FÍSICA EM CASA: TRABALHO, TAREFAS DOMÉSTICAS E CUIDAR DA FAMÍLIA.

Esta parte inclui as atividades físicas que você fez na última semana na sua casa e ao redor da sua casa, por exemplo, trabalho em casa, cuidar do jardim, cuidar do quintal, trabalho de manutenção da casa ou para cuidar da sua família. Novamente pense **somente** naquelas atividades físicas que você faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**.

3a. Em quantos dias da última semana você fez atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer, rastelar **no jardim ou quintal**.

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 3c.**

3b. Nos dias que você faz este tipo de atividades quanto tempo no total você gasta **POR DIA** fazendo essas atividades moderadas **no jardim ou no quintal**?

_____ horas _____ minutos

3c. Em quantos dias da última semana você fez atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer ou limpar o chão **dentro da sua casa**.

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 3e.**

3d. Nos dias que você faz este tipo de atividades moderadas **dentro da sua casa** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

3e. Em quantos dias da última semana você fez atividades físicas **vigorosas** **no jardim ou quintal** por pelo menos 10 minutos como carpir, lavar o quintal, esfregar o chão:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a seção 4.**

3f. Nos dias que você faz este tipo de atividades vigorosas **no quintal ou jardim** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 4- ATIVIDADES FÍSICAS DE RECREAÇÃO, ESPORTE, EXERCÍCIO E DE LAZER.

Esta seção se refere às atividades físicas que você fez na ultima semana unicamente por recreação, esporte, exercício ou lazer. Novamente pense somente nas atividades físicas que faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**. Por favor, **NÃO** inclua atividades que você já tenha citado.

4a. Sem contar qualquer caminhada que você tenha citado anteriormente, em quantos dias da ultima semana você caminhou **por pelo menos 10 minutos contínuos** no seu tempo livre?

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4c**

4b. Nos dias em que você caminha no seu tempo livre, quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

4c. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades moderadas no seu tempo livre por pelo menos 10 minutos, como pedalar ou nadar a velocidade regular, jogar bola, vôlei, basquete, tênis :

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4e.**

4d. Nos dias em que você faz estas atividades moderadas no seu tempo livre quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

4e. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades vigorosas no seu tempo livre por pelo menos 10 minutos, como correr, fazer aeróbicos, nadar rápido, pedalar rápido ou fazer Jogging:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para seção 5.**

4f. Nos dias em que você faz estas atividades vigorosas no seu tempo livre quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 5 - TEMPO GASTO SENTADO

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

5a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de semana?

_____ horas _____ minutos

5b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um dia de final de semana?

_____ horas _____ minutos

Anexo I. Questionário de Exposição Solar

1. Sr(a) fica em ambientes ensolarados por qualquer motivo, por exemplo, lazer/atividade física, ou quando está andando de um lugar para o outro por, pelo menos, 30 minutos seguidos, mesmo que de vez em quando?
() Sim () Não
2. Quando o Sr(a) está em um ambiente ensolarado por mais de 30 minutos, com que frequência o Sr.(a) aplica protetor solar?
() sempre () quase sempre () algumas vezes () raramente () nunca
3. Quando o Sr(a) está em um ambiente ensolarado por mais de 30 minutos, com que frequência fica na sombra?
() sempre () quase sempre () algumas vezes () raramente () nunca
4. Quando o Sr(a) está em um ambiente ensolarado por mais de 30 minutos, com que frequência usa chapéu com abas ou qualquer outro tipo de proteção para o rosto?
() sempre () quase sempre () algumas vezes () raramente () nunca

Adaptado: Szklo AS, Almeida LM, Figueiredo V, Lozana JA, Mendonça GAS, Moura L, Szklo M. Comportamento relativo à exposição e proteção solar na população de 15 anos ou mais de 15 capitais brasileiras e Distrito Federal, 2002-2003. Cad Saúde Pública 2007;23(4):823-834.

H.E.C. Hanwell et al. / Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 121 (2010) 334–337

	Time Outdoors			Amount of Skin Exposed			
	<5 min	5-30 min	>30min	Hands and face	Hands, face, arms	Hands, face, legs	Bathing suit
Monday	0	1	2	1	2	3	4
Tuesday	0	1	2	1	2	3	4
Wednesday	0	1	2	1	2	3	4
Thursday	0	1	2	1	2	3	4
Friday	0	1	2	1	2	3	4
Saturday	0	1	2	1	2	3	4
Sunday	0	1	2	1	2	3	4

Fig. 1. Scoring for the weekly sun exposure recall questionnaire. Shown in gray are the values ascribed to each category and the method for deriving the Sun Exposure Score (sum of the daily products of Time Outdoors and Skin Exposure). The range of the Sun Exposure Score is from the 0 (lowest amount of time spent outdoors and lowest amount of skin exposed) to a maximum score 56 (outdoors for more than 30 min in a bathing suit every day).

Recordatório Alimentar de 24 horas

Nome: _____

ID: _____ Data: ____/____/____ Dia da semana: _____

[illegible]

Medidas:

Peso: (1) _____ (2) _____ Média: _____ kg

Estatura: (1) _____ (2) _____ Média: _____ cm

Circunferência de cintura: (1) _____ (2) _____ Média: _____ cm

Circunferência de quadril: (1) _____ (2) _____ Média: _____ cm

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Human Nutrition and Dietetics*.

Manuscript ID: JHND-15-06-0241-OR

Title: Relationships between bone and fat: associations between vitamin D, osteocalcin, adipokines and markers of glucose metabolism among adolescents

Authors: Giudici, Kelly
Fisberg, Regina
Marchioni, Dirce
Peters, Barbara
Martini, Lígia

Date Submitted: 30-Jun-2015

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

Kelly Giudici <kellygiudici@gmail.com>

FW: JCEM / Submission Confirmation for Osteocalcin, leptin and energy metabolism in American children1 mensagem

Gallant, Kathleen Hill <hillgallant@purdue.edu>

22 de julho de 2015 17:41

Para: "Kelly Giudici (kellygiudici@gmail.com)" <kellygiudici@gmail.com>

Submission confirmation email from JCEM

Kathleen Hill Gallant, PhD, RD, CD
Assistant Professor of Nutrition Science
Director, Didactic Program in Dietetics
Department of Nutrition Science
Purdue University
Stone Hall, Room 207
700 West State Street
West Lafayette, IN 47907
Email: hillgallant@purdue.edu
Phone: 765-494-0101
Fax: 765-494-0674
Faculty page

Purdue University Department of Nutrition Science feature in USA Today Special Edition honoring the 150th Anniversary of the U.S. Department of Agriculture

-----Original Message-----

From: em.jcem.0.4489d8.bdb68cc8@editorialmanager.com [mailto:em.jcem.0.4489d8.bdb68cc8@editorialmanager.com] On Behalf Of JCEM

Sent: Friday, July 17, 2015 3:46 PM

To: Gallant, Kathleen Hill

Subject: JCEM / Submission Confirmation for Osteocalcin, leptin and energy metabolism in American children

Dear Dr. Hill Gallant,

Your submission entitled "Osteocalcin, leptin and energy metabolism in American children" has been received by The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jcem.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

The Journal Office

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism jcem@endocrine.org

Kelly Virecoulon Giudici

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7047961890409888>

Última atualização do currículo em 05/08/2015

Nutricionista formada pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP). Tem experiência em pesquisa na área de avaliação da ingestão alimentar de indivíduos adultos vivendo com HIV/Aids. Atualmente é aluna de Doutorado Direto em Nutrição em Saúde Pública (FSP/USP), com pesquisa na área de metabolismo ósseo e vitamina D com crianças e adolescentes. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Kelly Virecoulon Giudici
Nome em citações bibliográficas	GIUDICI, K. V.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo. Av. Doutor Arnaldo, 715 01246-903 - Sao Paulo, SP - Brasil
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2011	Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Relação entre tecido adiposo e tecido ósseo: interação metabólica entre vitamina D, genótipos para receptor de vitamina D, osteocalcina e leptina em adolescentes, Orientador: Lúgia Araújo Martini. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2006 - 2010	Graduação em Nutrição. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - Atual	Vínculo: Aluna de Doutorado Direto, Enquadramento Funcional: Bolsista de Doutorado Direto FAPESP, Regime: Dedicação exclusiva.
---------------------	--

Vínculo institucional

2008 - 2010	Vínculo: Bolsista Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Bolsista Iniciação Científica PIBIC-CNPq, Carga horária: 20
--------------------	--

Lígia Araújo Martini

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2 - CA SN - Saúde Coletiva e Nutrição

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1709520521624949>

Última atualização do currículo em 20/07/2015

Graduação em Nutrição pelo Centro Universitário São Camilo - Campus Pompeia (1989), mestrado em Nutrição pela Universidade Federal de São Paulo (1993) e doutorado em Nutrição pela Universidade Federal de São Paulo (1998). Realizou Pós-Doutorado no USDA Jean Mayer Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University - Boston MA. Foi Pesquisador Associado nível 3 no Mineral Bioavailability Laboratory da mesma instituição entre 2000 e 2001. Atualmente é Professor Associado nível III da Universidade de São Paulo. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da USP (2010-2014) e Vice-presidente da Comissão de Pós-graduação da FSP-USP (início em 2013). É vice-chefe do Departamento de Nutrição, representante da categoria de professor associado no Conselho do Departamento e Congregação da FSP-USP. É membro do conselho deliberativo do Núcleo de Pesquisas em Alimentos e Nutrição - NAPAN- da USP. Em 2013 participou do grupo de pesquisas do Prof Michael Holick na Boston University desenvolvendo a técnica de extração de vitamina D em alimentos. É membro da American Society of Clinical Nutrition, Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN), Associação Brasileira de Avaliação óssea e osteometabolismo (ABRASSO) e institucionalmente da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO). Atua como editor contribuinte do Nutrition Reviews e revisor científico da Clinical Nutrition, Annals of Nutrition and Metabolism, Journal of Nutrition, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, Cadernos de Saúde Pública entre outras. É consultor ad hoc de agências de fomento CNPq, FAPESP e outras. Ao longo da carreira científica publicou mais de 80 artigos em periódicos arbitrados, possibilitando no momento índice H = 20 (SCOPUS). É líder na área de Nutrição e Metabolismo Ósseo sendo convidada para palestras, conferências e seminários sobre esta temática em inúmeros eventos científicos. Atua área de Nutrição, com ênfase em Nutrição e Metabolismo, destacando-se os seguintes temas: metabolismo mineral ósseo, vitamina D, hormônios calcêmicos, síndrome metabólica e marcadores bioquímicos da ingestão alimentar. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Lígia Araújo Martini
Nome em citações bibliográficas	MARTINI, LA;Martini, L. A.;Martini, Lígia A.;Martini, Lígia Araújo;Araujo Martini, Ligia;MARTINI, LÍGIA

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Av: Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617859 Fax: (11) 30617130
------------------------------	---