Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Relação entre a concentração sérica da vitamina D,
polimorfismos no gene VDR e síndrome metabólica
em indivíduos adultos.**

Natielen Jacques Schuch

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Lígia A. Martini

São Paulo

2011

**Relação entre a concentração sérica da vitamina D,
polimorfismos no gene VDR e síndrome metabólica
em indivíduos adultos.**

Natielen Jacques Schuch

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Lígia A. Martini

São Paulo

2011

É expressamente proibida a comercialização desse 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 identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

Esta pesquisa obteve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob protocolo nº 2009/52636-0.

Dedico esta tese

*A minha orientadora, **Lígia Araújo Martini**, por ter estado sempre ao meu lado, nos momentos de alegria e também nos momentos de angústia e incertezas. Lígia...Obrigada por ter sido uma grande companheira nesta etapa tão importante na minha vida, foram 5 anos de construção e talvez os melhores da minha vida.*

*Ao meu grande amor, **André**, por todo o incentivo dado, incansavelmente, todos os dias que estivemos juntos aqui em São Paulo. Obrigada, meu amor, por estar sempre junto de mim, por ter acreditado em mim e principalmente pela pessoa que você me ensinou a ser. Você sabe que eu te amo mais que o infinito...*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, **Nelson e Ana**, pelo amor, confiança e por tudo que fizeram e ainda fazem por mim, para que eu possa ser a pessoa que sou.

Agradeço a minha mãe, pelo seu amor incondicional e muitas vezes sufocante, mas que somente quando eu tiver filhos, talvez entenda este sentimento. Não posso deixar de fora o meu grande “xodó”, **Jean....** Mano, você é a alegria da nossa família, esses anos aqui em SP senti muito tua falta...

Aos meus sogros, **Augusta e Nelson**, meus segundos pais, por todo amor, carinho e apoio desde a nossa chegada a São Paulo e até a nossa volta para o Rio Grande do Sul. Tia, muito obrigada por me considerar sua “filha”, e pode acreditar que te considero uma segunda mãe... À **Bia**, por todo seu amor e incentivo, você é muito especial.

Agradeço aos meus “filhos do coração”, **Mousse e Pudim**, vocês tornam a minha vida mais doce, e cada dia com vocês, eu aprendo que devemos amar incondicionalmente as pessoas que nos querem bem...

A todas as colegas de pós - graduação, **Aninha, Antonela, Bárbara, Josiane, Karin, Karine, Kelly, Mariana e Stella**.

Agradeço especialmente a **Vivian, Luciana e Milena**, por termos nos tornado companheiras e mais que isso, amigas, obrigada pela ajuda nas horas de insegurança e ansiedade, e pela grande parceria nas horas boas de descontração... Ah, e como foram boas.

Agradeço à **Patrícia**, não tenho palavras para agradecer sua amizade, você é e sempre será uma grande amiga.

Agradeço às professoras *Sandra, Dirce e Regina*, pelos ensinamentos e pelo companheirismo nos momentos desta minha jornada.

Agradeço aos *funcionários da pós-graduação, do departamento de nutrição, e do centro de saúde*, sem vocês eu não teria conseguido finalizar esta tese.

Agradeço de coração a todos os “*indivíduos adultos*” que fizeram parte desta pesquisa, pela sua disponibilidade e atenção para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço à *Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo*, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!!!

“Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro o arco-íris da cartola. E refaço. Colo.

Pinto e bordo. Porque a força de dentro é maior. Maior que todo o mal que existe no mundo.

Maior que todos os ventos contrários.

É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim.”

Caio Fernando Abreu

RESUMO

Schuch NJ. Relação entre a concentração sérica da vitamina D, polimorfismos no gene VDR e síndrome metabólica em indivíduos adultos. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução - O receptor de vitamina D (VDR) é expresso em vários tecidos e quando este se encontra na sua forma ativada, modula a expressão de diversos genes. Esses incluem variações dos níveis circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, variações na densidade mineral óssea, secreção e sensibilidade à insulina em resposta à glicose, suscetibilidade à diabetes tipo 1 e 2, obesidade, dislipidemias e hipertensão arterial. Atualmente, evidências têm sugerido o envolvimento da vitamina D com a síndrome metabólica. **Objetivo** - Investigar a concentração sérica da vitamina D e sua relação com a síndrome metabólica e avaliar a potencial associação entre estes fatores com a presença de polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) em indivíduos adultos. **Métodos** - Trata-se de um estudo transversal, onde foram avaliados 372 indivíduos adultos. Foram coletadas amostras sanguíneas para dosagens laboratoriais da $25(\text{OH})\text{D}_3$, PTH e exames bioquímicos relacionados à SM, além disso foram realizadas avaliações antropométricas (peso, altura, IMC). A síndrome metabólica (SM) foi classificada usando o critério proposto pelo *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III). A resistência a insulina foi estimada pelo cálculo de HOMA IR e a função da célula β pelo cálculo de HOMA β . A $25(\text{OH})\text{D}_3$ foi dosada por HPLC e a insuficiência foi determinada pelo ponto de corte da curva Roc (52,6nmol/l). Foram avaliados também PTH intacto e cálcio sérico. Os polimorfismos BsmI e FokI foram detectados através da digestão das enzimas de restrições específicas para cada polimorfismo e confirmados através da técnica PCR alelo específico (ASPCR) ou amplificação de mutação refratária (ARMs) nos indivíduos com e sem SM (52 % vs. 48%, respectivamente). A análise estatística inclui construção da curva ROC, teste T de Student, testes de correlação, teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, ANOVA, regressão logística binária (*Odds Ratio*). Estas análises foram conduzidas no software SPSS para Windows, versão 18 e $p < 0,05$ foi considerado significativo. **Resultados** - A idade média dos participantes foi 51(15) anos, o IMC médio 29(6) kg/m^2 e 48% apresentaram SM. Como esperado, os

indivíduos com SM apresentaram maiores valores de idade 57(12) anos, IMC 32(6) Kg/m², circunferência de cintura 103(13) cm, pressão sistólica 138(17) mmHg e diastólica 83(10) mmHg, glicemia de jejum 98(12) mg/dl, triglicérides 165(76) mg/dl, índices HOMA-IR 2.2(1.7) e β 116(95), e menores valores de colesterol HDL 41(11) mg/dl. Com relação às concentrações séricas de 25(OH)D₃ propostas pela análise da curva ROC, 43% dos indivíduos com SM e 57% dos indivíduos sem SM apresentam insuficiência desta vitamina. Correlações entre 25(OH)D₃ com PTH ($r = -0.153$; $p = 0.005$) e com circunferência da cintura ($r = -0.106$; $p = 0.05$) foram observada em todos os participantes. Considerando os polimorfismos do gene VDR, nos pacientes com SM, não houve associação entre o polimorfismo BsmI e os componentes da SM, HOMA β e IR, 25(OH)D₃ e PTH. No entanto, indivíduos sem SM, mas com homozigose para polimorfismo BsmI (genótipo recessivo bb), apresentaram concentrações mais baixas de 25(OH)D₃ do que aqueles com o genótipo BB normal. Além disso, os indivíduos com SM e heterozigose para o polimorfismo FokI (genótipo Ff) têm maiores concentrações de PTH e HOMA β do que aqueles com genótipo normal FF. Nesse mesmo grupo, os indivíduos com o genótipo recessivo ff têm maior resistência à insulina do que aqueles com genótipo Ff. Por outro lado, os pacientes sem SM, mas carregando o genótipo Ff, apresentaram maiores concentrações de triglicérides e baixos níveis de HDL do que aqueles com genótipo FF. A presença de um alelo f no genótipo (Ff ou ff) é, aparentemente, o suficiente para aumentar os níveis de triglicérides e resistência à insulina, quando comparados ao genótipo normal FF. **Conclusão** - Os resultados demonstram que o polimorfismo FokI no gene VDR associa-se a resistência à insulina e maiores concentrações de PTH em pacientes que apresentam SM. Além disso, o polimorfismo BsmI associa-se a menores concentrações de 25(OH)D₃ em indivíduos sem SM. Portanto, esses novos dados indicam que polimorfismos no gene do VDR estão associados a diferentes fenótipos dos componentes da SM.

Descritores: Vitamina D, Paratormônio, receptor de vitamina D, síndrome metabólica.

ABSTRACT

Schuch NJ. Relação entre a concentração sérica da vitamina D, polimorfismos no gene VDR e síndrome metabólica em indivíduos adultos./ Relationship between serum concentrations of vitamin D, VDR gene polymorphisms and metabolic syndrome in adults individuals [thesis]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction - The vitamin D receptor (VDR) is expressed in many tissues and when it is in its activated form modulates the expression of several genes. These include changes in circulating levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, variations in bone mineral density, sensitivity and secretion of insulin in response to glucose, susceptibility to type 1 and 2 diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia and hypertension. Currently, evidences have suggested the involvement of vitamin D with the metabolic syndrome. **Objective** - To investigate the serum concentrations of vitamin D and its relationship with metabolic syndrome (MS) and to evaluate the potential association between these factors with the presence of polymorphisms in vitamin D receptor gene in individuals adults. **Methods** - This is a cross-sectional study, which evaluated 243 adults and elderly. We collected blood samples for measurements of $25(\text{OH})\text{D}_3$, iPTH, biochemical tests related to MS, and anthropometric evaluation (weight, height, BMI) were also assessed. MS was classified using the criteria proposed by the *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III). Insulin resistance and β cell secretion were estimated by calculating HOMA IR and HOMA β , respectively. The $25(\text{OH})\text{D}_3$ was measured by HPLC and insufficiency was determined by the Roc curve cut-off (52.6 nmol/L). Intact PTH and serum calcium were also evaluated. The BsmI and FokI polymorphisms were detected by enzymatic digestion with specific enzymes and confirmed by allele specific PCR (ASPCR) or amplification of refractory mutation (ARM) in individuals with or without MS (52% vs. 48%, respectively). Statistical analyses include construction of Roc curves, Student T test, correlation tests, Hardy-Weinberg test, ANOVA, binary logistic regression (odds ratio), and TwoStep Cluster. These analyses were conducted with SPSS for Windows, version 18 and $p < 0.05$ was considered significant. **Results** - The mean age of participants was 51(15) years, mean BMI was $29(6) \text{ kg/m}^2$, and 48% of individuals presented MS. As expected, subjects with MS showed higher values of age (57(12) years), BMI was $32(6) \text{ kg/m}^2$, waist circumference was 103(13) cm, systolic blood pressure was

138(17) mmHg, diastolic was 83(10) mmHg, fasting glucose was 98(12) mg/dl, triglycerides was 165(76) mg/dl, HOMA-IR was 2.2(1.7), HOMA β was 116(95), and lower levels of HDL cholesterol was observed (41 mg/dl(11)). With respect to serum 25(OH)D₃ proposed by ROC curve analysis, 43% of individuals with MS and 57% of individuals without MS presented insufficiency of this vitamin. Correlations between 25(OH)D₃, iPTH ($r = -0,153$, $p = 0.005$), and waist circumference ($r = -0,106$, $p = 0.05$) were observed in all participants. Considering the VDR gene polymorphisms, in patients with MetSyn, there is no association among BsmI polymorphism and components of MetSyn, HOMA IR and β , 25(OH)D₃, and PTH. However, subjects without MetSyn, but with homozygosis for BsmI polymorphism (recessive bb genotype), presented lower levels of 25(OH)D₃ than those with normal BB genotype. In addition, individuals with MetSyn and heterozygosis for FokI polymorphism (Ff genotype) have higher concentrations of PTH and HOMA β than those with normal FF genotype. In this same group, subjects with the recessive ff genotype have higher insulin resistance than those with Ff genotype. On the other hand, patients without MetSyn, but carrying the Ff genotype, have higher concentration of triglycerides and lower levels of HDL than those with FF genotype. Interestingly, the presence of one allele f in the (Ff or ff) genotype is apparently enough to increase triglycerides levels and insulin resistance, when compared to the normal FF genotype. **Conclusion** - The results show that FokI polymorphism in the VDR gene is associated to insulin resistance and higher concentrations of PTH in patients with MetSyn. Moreover, BsmI polymorphism is related to a lower concentration of 25(OH)D₃ in individuals without MetSyn. Therefore, the results indicated that VDR gene polymorphisms are associated to different phenotypes of MetSyn components.

Descriptors: Vitamin D, parathyroid hormone, receptor of vitamin D, metabolic syndrome.

ÍNDICE

1. APRESENTAÇÃO	12
2. INTRODUÇÃO	13
2.1 VITAMINA D	13
2.1.1 Metabolismo e avaliação	13
2.1.2 Gene do receptor da vitamina D	19
2.1.2.1 Polimorfismos no gene do receptor da vitamina D	20
2.1.3 Vitamina D e síndrome metabólica	22
2.1.4 Receptor de vitamina D e síndrome metabólica	25
3. HIPÓTESE	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GERAL	28
4.2 OBJETIVOS GERAIS	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 Delineamento	29
5.2 Área estudada e tamanho amostral	29
5.3 Coleta de dados	30
5.3.1 Avaliação antropométrica e composição corporal	30
5.3.2 Avaliação da exposição solar	32
5.3.3 Coleta de sangue	32
5.4 Genotipagem do gene receptor de vitamina D (VDR)	33
5.5 Aferição da pressão arterial	34
5.6 Classificação da síndrome metabólica	35
5.7 Análises estatísticas	35
5.8 Aspectos éticos	36
6. RESULTADOS	37
ARTIGO 1 - Vitamina D e doenças endocrinometabólicas.	37
ARTIGO 2 – A new vitamin D cutoff for the association between extra-bone	47

25(OH)D ₃ insufficiency and abdominal obesity	
ARTIGO 3 - Relationship between VDR gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome.	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9. ANEXOS	104
Anexo I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	
Anexo II- Questionário de avaliação da exposição solar.	
Anexo III- Aprovação do comitê de ética.	
Anexo IV- Carta de confirmação de submissão do artigo 2 intitulado de “Does the relationship between vitamin D and abdominal obesity indicate that extra-bone 25(OH)D ₃ insufficiency has a central role?” para a revista <i>Annals of Nutrition and Metabolism</i> .	

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Quantidade de vitamina D ₂ e D ₃ nos alimentos.	15
Tabela 2. Comparação entre os valores de ingestões recomendadas pelo <i>Institute of Medicine</i> .	16
Figura 1. Metabolismo da vitamina D.	14
Figura 2. Representação esquemática da ação genômica da 1,25(OH)D ₂ D ₃ .	19
Figura 3: Posição de alguns polimorfismos no gene do receptor da vitamina D.	21

ARTIGO 1

Tabela 1. Indicadores de saúde para vários níveis séricos da 25(OH)D ₃ .	37
Figura 1. Vitamina D - Cálcio vs. intervenção para prevenção de diabetes tipo 2.	39

ARTIGO 2

Table 1. Characteristics of evaluated individuals with normal and elevated waist circumference.	64
Figure 1. Receiver operating characteristics curve for the association between vitamin D concentration and waist circumference data according to NCEP ATP III criteria. The cutoff of 52.6nmol/l for vitamin D concentration significantly discriminated subjects with and without elevated waist circumference.	65
Figure 2 - Receiver operating characteristics curve for the association between vitamin D concentration and waist circumference data according to IDF criteria. The cutoff of 52.6nmol/l for vitamin D concentration significantly discriminated subjects with and without elevated waist circumference.	65

ARTIGO 3

Table 1. Characteristics of the population studied.	84
Table 2. Genotype distribution (%) of VDR polymorphisms among persons with and without MetSyn.	85
Table 3. Mean values of all variables according to BsmI and FokI genotype in individuals with MetSyn.	86

Table 4. - Mean values of all variables according to BsmI and FokI genotypes in individuals without MetSyn. 87

Table 5. Logistic regression analysis of traits associated with the presence FokI polymorphisms in all participants. 88

1. APRESENTAÇÃO

O formato desta tese está conforme 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, publicadas no Guia de Apresentação de Teses da FSP/USP. Sua organização foi feita da seguinte forma: (1) introdução - contemplando o conhecimento sobre assunto. Serão abordados nesta seção: Vitamina D, receptor de vitamina D e seus polimorfismos e por último, a interação com a Síndrome Metabólica; (2) na seção dos métodos são detalhados com rigor científico os procedimentos empregados na coleta, tratamento e análise dos dados; (3) os resultados e discussões são apresentados na forma de três manuscritos, sendo 1 artigo de revisão e os outros 2 artigos originais, que apresentam todos os produtos das análises estatísticas e a discussão pautada nos resultados encontrados, buscando compará-los aos que se observa na literatura.

2. INTRODUÇÃO

2.1 VITAMINA D

2.1.1 Metabolismo e Avaliação

No início do século XX, o raquitismo estava presente em aproximadamente 80% das crianças residentes nas cidades industrializadas da Europa e dos Estados Unidos (HOLICK, 2006; RAJAKUMAR, 2007). Nesta mesma época, Finsen recebeu o prêmio Nobel ao observar que a exposição à luz solar era extremamente eficaz no tratamento não apenas do raquitismo, como também em outras doenças de pele, como por exemplo, o *Lupus vulgaris*. Já em 1915, HOFFMAN comparou a mortalidade por câncer com a latitude das cidades, e demonstrou que quanto maior a distância do equador, maior era a taxa de mortalidade, indicando portanto a possibilidade de efeitos extra ósseos da vitamina D (HOLICK 2010).

Atualmente, sabe-se que a vitamina D é o fator necessário para o desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, e para a manutenção da homeostase normal do cálcio e do fósforo. Além disso, estudos comprovam o envolvimento desta vitamina em diversos processos celulares, incluindo efeitos na diferenciação e proliferação celular, na secreção hormonal, no sistema imune e em diversas doenças crônicas não transmissíveis (DARWISH e DELUCA, 1993; DELUCA, 1988; REICHEL e cols, 1989, PEREIRA e cols, 2002; FORD e cols, 2005; LIU e cols, 2005; SCHUCH 2009, LIU e cols, 2011, BORGES 2011).

A vitamina D, que é um esteróide lipossolúvel, é considerada vitamina por ser também obtida por fonte dietética. Pode ser encontrada em duas formas: como ergocalciferol (vitamina D₂) produzida pelas plantas e fungos, e como colecalciferol (vitamina D₃), produzida pelo tecido animal e pela síntese cutânea sob ação da luz ultravioleta (290 a 310nm) no 7-deidrocolesterol presente na pele humana (MILLER e PORTALE, 1999). Estima-se que 80 a 90% da vitamina D corpórea seja adquirida pela síntese cutânea, e o restante pela ingestão de alimentos que contenham esta vitamina (HOLICK, 1999).

A vitamina D₃ dietética é absorvida no intestino delgado, incorporada a quilomicrons e levada por estes ao fígado. A partir deste momento, o metabolismo é igual ao da vitamina D₃ endógena, sintetizada pela pele.

A vitamina D é um pró-hormônio biologicamente inativo que, para se tornar ativo, deve passar por duas sucessivas hidroxilações. A primeira ocorre no fígado sob a ação da enzima 25-hidroxilase no carbono 25, formando a 25-hidroxivitamina D (25OHD₃), denominada calcidiol. Posteriormente, a segunda ocorre em outros tecidos como na próstata, tecido mamário e no cólon, mas, principalmente nos túbulos renais proximais, sob a ação da enzima CYP27B1 (1 α-hidroxilase) no carbono 1, formando a forma ativa da vitamina D a 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D₃] conhecida como calcitriol (MILLER e PORTALE, 1999; HOLICK, 1999). Estes processos estão ilustrados na figura 1.

Figura 1: Metabolismo da vitamina D. UVB = radiação ultravioleta B. A vitamina D da dieta ou da pele são transportadas para o fígado onde ocorre a primeira hidroxilação sob a ação da enzima 25-hidroxilase, formando a 25-hidroxivitaminaD ou calcidiol. A segunda hidroxilação ocorre principalmente nos rins, mais especificamente, sob a ação da enzima 1 α hidroxilase formando a forma ativa: 1, 25 dihidroxivitamina D ou calcitriol.

Fatores como latitude, estação do ano e período do dia exercem influência sobre a produção cutânea de vitamina D. Durante o verão, o 7-deidrocolesterol cutâneo é mais eficientemente convertido em pré-vitamina D₃. A síntese cutânea da vitamina D é maior em regiões de baixa latitude devido à maior exposição aos raios UVB (WEBB e cols, 1988, LIPS e cols, 2001; HOLICK e cols, 2005, MAEDA e cols, 2010). Contudo, reduzidas concentrações de vitamina D circulantes são observados também em países ensolarados. O uso de filtro solar, quantidade de melanina na pele, tipos de vestimentas, elevados níveis de poluição, podem reduzir a exposição cutânea aos raios UVB e como consequência ocorre diminuição da síntese da vitamina D (LIPS e cols, 2001; BANDEIRA e cols 2010, MALLAH e cols, 2011).

Por outro lado, as fontes dietéticas naturais de vitamina D são limitadas. As principais fontes alimentares como o salmão, sardinha e atum não fazem parte do hábito alimentar da população brasileira. Na tabela 1 demonstramos a quantidade de vitamina D₂ e D₃ em alguns alimentos.

Tabela 1: Quantidade de vitamina D₂ e D₃ nos alimentos:

Alimentos (porções normalmente consumidas)	Vitamina D (µg)	
	Vitamina D ₂	Vitamina D ₃
Salmão cozido (155g)	0.0	36.1
Atum em lata (85g)	0.0	5.7
Sardinha (24g)	0.0	4.8
Bife de fígado (85g)	0.0	1.0
Bife de contra filé (85g)	0.0	0.2
Leite integral fortificado (244g)	0.0	1.3
Leite integral sem vitamina D (244g)	0.0	0.1
Manteiga (5g)	0.0	1.5
Cogumelo tipo portobella (121g)	0.3	0.0
Cogumelo tipo portobella exposto à radiação UVB (121g)	13.1	1.0
Cogumelo tipo shitake cozido (72g)	0.7	0.1
Vegetais (brócoli, espinafre, tomate, cenoura, alface) 100g	0.0	0.0

Fonte: Tabela de Composição Química dos Alimentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA

Recentemente, novas recomendações para a ingestão dietética de vitamina D foram publicadas pelo *Institute of Medicine* (IOM, 2010) (tabela 2). Apesar de ter-se estabelecido os novos valores de *Estimated Average Requirement* (EAR) e *Recommended Dietary Allowance* (RDA), a recomendação aumentou em 400UI/dia ou 10µg/dia. O IOM justifica que os novos valores de referência são baseados em estudos publicados em revistas de grande importância no meio científico sobre a importância da vitamina D, não apenas no metabolismo ósseo, mas também no câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, síndrome metabólica, doenças autoimunes, funcionamento neuropsicológico e desempenho físico. Porém, no relatório publicado, o IOM revelou que os benefícios da vitamina D além dos efeitos extra-ósseos, são inconclusivos e não podem ser considerados confiáveis ou talvez ainda sejam necessários estudos mais robustos para comprovar o efeito benéfico da vitamina D nos efeitos extra-ósseos. Diversos pesquisadores (PUBLIC HEALTH NUTRITION, 2010; HEANEY & HOLICK, 2011) criticaram esta nova recomendação, pois acreditam que uma maior quantidade de vitamina D seria necessária para a manutenção óssea e também para outros desfechos.

Tabela 2: Comparação entre os valores de ingestões recomendados pelo *Institute of Medicine*:

Estágios de vida	IDR 1997	IDR 2010
Bebês de 0 – 12 meses	200UI/dia	400UI/dia
1 – 3 anos	200UI/dia	600UI/dia
4 – 8 anos	200UI/dia	600UI/dia
9 – 13 anos	200UI/dia	600UI/dia
14 – 18 anos	200UI/dia	600UI/dia
19 – 30 anos	200UI/dia	600UI/dia
31 – 50 anos	200UI/dia	600UI/dia
51 – 70 anos	400UI/dia	600UI/dia
> 70 anos	600UI/dia	800UI/dia
Gestantes/lactantes 14 – 18 anos	400UI/dia	600UI/dia
Gestantes/lactantes 19 – 50 anos	400UI/dia	600UI/dia

IDR – ingestão diária recomendada

Após a publicação, esses novos valores estabelecidos tornaram-se alvo de discussões em grande parte do mundo acadêmico. Desde 1997, quando as *Dietary References Intakes* (DRIs) foram publicadas, muito se tem discutido sobre a ação não-calcêmica desta vitamina. E, com essas novas recomendações eleva o número de pesquisadores contrários a esses valores divulgados em 2010.

Sabe-se que para uma pessoa saudável, a dose de ingestão diária recomendada em alimentos e suplementos é de 400 a 600 UI/dia. Porém, especialistas da área acreditam que esse valor seja insuficiente, ou seja, essa dose diária atenderia em torno de 40% das necessidades totais. Cientistas defendem que 1000UI seja a recomendação adequada para manter a concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3 \geq 75\text{nmol/l}$, o qual tem sido considerado um valor ideal e seguro deste indicador para a população. Porém, para alcançar esse valor a suplementação torna-se necessária (HEANEY & HOLICK, 2011).

Estudos realizados no Brasil mostram que o consumo alimentar de vitamina D em nossa população é inferior a nova recomendação do IOM, principalmente em idosos. Em adultos de ambos os sexos com mais de 40 anos e de todas as regiões brasileiras, a ingestão média foi 1,86 $\mu\text{g/d}$ (PINHEIRO e cols, 2009). Quando 143 adolescentes saudáveis de ambos os sexos foram avaliados, a ingestão média foi 3,6 $\mu\text{g/d}$ (PETERS e cols, 2009). Em 2011, PETERS e cols observaram em 160 adolescentes e adultos jovens, com idade entre 16 e 20 anos, que a média de ingestão foi de 3,5 $\mu\text{g/d}$ e nenhum participante atingiu a recomendação dietética para vitamina D. No caso de mulheres idosas com osteoporose, a ingestão média foi 4,2 $\mu\text{g/d}$ (GENARO e cols, 2006). Observa-se também que as médias de ingestão são semelhantes entre as diversas faixas etárias, denotando a ausência de fontes alimentares. Como agravante, a fortificação de alimentos com vitamina D não é estabelecida no Brasil.

A concentração individual ou o indicador nutricional de vitamina D é mensurado através das concentrações séricas de $25(\text{OH})\text{D}_3$. A forma biologicamente ativa da vitamina D, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, não é indicada para este propósito devido a razões como:

- a) as concentrações séricas da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são rigidamente mantidas em concentrações normais;
- b) as concentrações plasmáticas de $25(\text{OH})\text{D}_3$ são aproximadamente 1000 vezes maiores que as de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$;

c) a hidroxilação da 25(OH)D₃ a 1,25(OH)₂D₃ ocorre em diversos tecidos, cobrindo as necessidades locais (MOSEKILDE, 2005).

Entretanto, as concentrações séricas consideradas adequadas ainda são muito discutidas. GRANT e HOLICK (2005), a partir de uma revisão, propuseram que valores de 25(OH)D₃ abaixo de 80 e 50 nmol/l sejam considerados como insuficiência e deficiência, respectivamente.

Adicionalmente, HOLLIS em 2005, considera que a concentração ótima de vitamina D seria aquela necessária para manter o paratormônio (PTH) em concentrações adequadas, visto que a deficiência de vitamina D leva a diminuição do cálcio sérico e, como consequência, estimula as glândulas paratireóides a liberar o PTH, a fim de elevar a reabsorção renal e óssea do cálcio. Neste sentido, vários estudos têm encontrado um platô de absorção de cálcio e concentrações adequadas de paratormônio (PTH), com concentrações de 25(OH)D₃ próximas a 75 nmol/l (CHAPUY e cols, 1997; DAWSON-HUGHES, 2004; HEANEY, 2004; TANGPRICHA e cols, 1997; VIETH e cols, 2003).

Corroborando com estes pontos de corte, DAWSON-HUGHES e cols em 2005, propuseram concentrações ótimas de 25(OH)D₃ para a prevenção de fraturas – 50 a 80 nmol/l, ou em média 75 nmol/l.

Considerando as discussões realizadas no 22nd *Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D*, realizado em Estocolmo em junho de 2007, estima-se que aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo o mundo apresentam insuficiência ou deficiência de vitamina D (JAMES, 2008).

Estudos realizados em São Paulo encontraram presença de hipovitaminose D em diferentes estágios de vida. GENARO e cols (2007) avaliando mulheres pós-menopausadas encontraram que 80% destas apresentavam insuficiência de vitamina D. Corroborando com estes resultados SARAIVA e cols (2007), observando idosos institucionalizados e ambulatoriais, encontraram que 71% dos institucionalizados e 44% dos ambulatoriais apresentaram insuficiência de vitamina D, segundo os pontos de corte de GRANT e HOLICK (2005). PETERS e cols (2006) encontraram que, dos 136 adolescentes saudáveis, 59% apresentavam insuficiência de vitamina D, também segundo os pontos de corte de GRANT e HOLICK (2005).

Adicionalmente, um estudo realizado por SCALCO e cols (2008) em Porto Alegre demonstrou que 86% dos 98 idosos institucionalizados apresentaram hipovitaminose D, segundo os pontos de corte propostos por LIPS (2006).

2.1.2 Gene do receptor da vitamina D (VDR)

Os receptores da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foram primeiramente descritos por Brumbaugh and Haussler em 1973 (NISHII & OKANO, 2001). Posteriormente, STUMPF e cols (1979) demonstraram que além das células do rim e do intestino, existia a presença do metabólito ativo da vitamina D em outras células, como as da pele, do cólon, do cérebro e do pâncreas; o que os levaram a concluir que estas células também expressavam VDR.

Os efeitos biológicos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são mediados pelo fator de transcrição nuclear conhecido como receptor de vitamina D (VDR) situado no núcleo celular (SUTTON e MACDONALD, 2003).

A forma ativa da vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ligada às proteínas transportadoras de vitamina D do sangue, penetra na membrana celular e se liga ao VDR. O complexo formado então se liga ao receptor de ácido retinóico (RXR) formando heterodímeros que atuam nos elementos resposta da vitamina D (VDREs), iniciando assim, uma cascata de interações moleculares que irão modular a transcrição de genes específicos (KIMBALL e cols, 2008) (figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da ação genômica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ penetra na membrana celular e exerce seu efeito genômico pela ativação do VDR. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se liga no domínio de ligação do

VDR, induzindo uma mudança conformacional e a subsequentemente heterodimerização com o receptor do ácido retinóico (RXR). O complexo RXR-VDR se liga nos elementos respostas à vitamina D (VDREs), os quais se ligam na região 5' flanqueadora do promotor ativando a transcrição do gene VDR.

Um amplo conjunto de estudos tem sido realizado com o intuito de desvendar os mecanismos biológicos das ações da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Atualmente sabe-se que 3% do genoma humano é regulado direta ou indiretamente pelo VDR. Quase todas as células nucleadas expressam este receptor, porém a expressão varia muito conforme a especificidade da célula (WALTERS, 1992).

As ações do sistema endócrino de vitamina D são mediadas por rotas genômicas e não-calcêmicas, sendo que uma complementa a outra (NORMAN, 1998).

- Ações genômicas: São ativadas pela ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ao VDR. Esses receptores se ligam nas sequências regulatórias já estabelecidas do gene alvo, modulando a atividade transcricional da região promotora (BOUILLON, 2008).

- Ações calcêmicas: São responsáveis pelas respostas rápidas da vitamina D, como por exemplo, a “transcaltachia”, onde ocorre um aumento rápido na absorção do cálcio pelo intestino, gerado pelo aumento das concentrações séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, independente da ação genômica deste hormônio. Entretanto, podemos considerar que essas vias são ativadas pela ligação da vitamina D a um receptor não clássico (mVDR), sendo este responsável por ações rápidas e transitórias não dependentes de síntese protéica (NORMAN e cols, 2001).

2.1.2.1 Polimorfismos do gene do receptor da vitamina D

Variações genéticas foram identificadas no gene do receptor de vitamina D. Essas alterações podem ser denominadas de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), que podem ou não ter efeitos biológicos (VALDIVIELSO & FERNANDES, 2006).

O tipo mais frequente de polimorfismo no genoma humano consiste em variantes nas posições de um único nucleotídeo em um cromossomo. Estima-se que os SNPs sejam responsáveis por aproximadamente 3 milhões de diferenças, em média entre pares individuais de seres humanos. Uma vez que o genoma humano é composto em torno de 3 bilhões de pares de

bases de DNA, isso significa que os seres humanos individualmente diferem em 1 a cada 1000 bases únicas (JORDE, 2010).

O gene do VDR, em humanos, está localizado no cromossomo 12q12-q14. Esses tipos de mutações são bastante frequentes na população humana, tornando-se alvos para explicar as variações no risco de doenças. Estudos recentes têm indicado que vários polimorfismos (SNPs) existem no gene do VDR, mas a influência destes polimorfismos e sua função ou sinalização ainda são desconhecidos (UITTERLINDEN e cols, 2004).

Os SNPs podem ocorrer em 2 regiões diferentes do gene: nas partes não codificadoras do gene – íntrons – não afetando a proteína; ou nas partes regulatórias do gene – promotora e na região 3' UTR (não traduzida) ou nos éxons – que afetam o padrão de expressão de mRNA, sua estabilidade e a sua tradução em proteína (BURTON, 2005).

Os polimorfismos mais frequentemente observados no gene do VDR estão localizados entre os éxons 8 e 9 e são classificados como Tru9I, TaqI, BsmI, EcoRV e ApaI. Além destes, existe o polimorfismo localizado no éxon 2, classificado como FokI (figura 3) (UITTERLINDEN e cols, 2004).

Figura 3: Posição de alguns polimorfismos no gene do receptor da vitamina D. Fonte: Adaptado de Uitterlinden (2004).

2.1.3 Vitamina D e Síndrome metabólica

Analisando a população com mais de 20 anos que participou do NHANES III, FORD e cols (2005) encontraram concentrações de vitamina D sérica significativamente menores nos indivíduos que apresentavam síndrome metabólica. LIU e cols (2005) avaliaram dados alimentares de vitamina D e cálcio em 10066 mulheres participantes do *Women's Healthy Study*, e a prevalência de síndrome metabólica foi significativamente menor nas mulheres no maior quintil de ingestão de vitamina D e cálcio.

A síndrome metabólica é definida como um complexo de diversos fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular aterosclerótica e morte cardiovascular. Nos últimos anos, dois sistemas de classificação ou critérios diagnósticos vêm sendo utilizados. Segundo SAAD e cols (2006) estes apresentam similaridade quanto aos fatores de risco cardiovasculares, incluindo obesidade abdominal, intolerância à glicose/resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial. A presença de 3 destes componentes indica a presença de síndrome metabólica (GRUNDY e cols, 2004). Nos Estados Unidos a prevalência demonstrada pelo NHANES 1999-2000 foi de 26,7%.

No Brasil, a prevalência de síndrome metabólica não é totalmente estabelecida, porém dados isolados mostram que 10% de homens jovens de Ribeirão Preto (BUSTOS e cols, 2007), 30% de adultos com mais de 25 anos da região semi-árida da Bahia (OLIVEIRA e cols, 2006) e 47% de homens e mulheres do *Japanese Brazilian Diabetes Study*, estudo de base populacional envolvendo 1166 homens e mulheres, apresentam síndrome metabólica (ROSENBAUM e cols, 2005). Mais recentemente, SILVEIRA e cols (2010) demonstraram que a Coorte de nascidos em 1982 de Pelotas atualmente apresenta uma prevalência de síndrome metabólica de aproximadamente 6% segundo os critérios do NCEP-ATP III.

MARTINI & WOOD (2006) revisaram sobre os mecanismos fisiopatológicos da vitamina D nos diversos componentes da síndrome metabólica. Acredita-se que a síndrome metabólica seja uma complicação da obesidade, ou então que a resistência à insulina seja o principal fator de risco. Estes dois fatores estão associados às concentrações séricas reduzidas de vitamina D. BELL e cols (1985) demonstraram as alterações endócrinas da vitamina D em obesos, caracterizada por elevadas concentrações de PTH e da forma ativa da vitamina D

(1,25(OH)₂D₃). Os autores sugerem que a elevada 1,25(OH)₂D₃ seria responsável pelo *feedback* negativo à síntese hepática de 25OHD₃.

ARUNABH e cols (2003) e SNIDJER e cols (2005), observaram correlações negativas entre gordura corporal total com as concentrações séricas de 25OHD₃ em estudos de base populacional. A correlação permaneceu significativa mesmo após o ajuste para idade, estação do ano, ingestão de vitamina D e raça (ARUNABH e cols, 2003). SNIDJER e cols (2005) observaram ainda associação positiva entre gordura corporal, elevadas concentrações de PTH e redução na 25OHD₃ sérica, confirmando a hipótese de BELL e cols (1985). Corroborando com essas evidências, CHAKRO e cols (2011) ao investigarem a relação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ com a glicemia e a insulina de jejum, dislipidemia, adiposidade e prevalência de síndrome metabólica em 292 mulheres pós-menopausadas participantes do estudo *Women's Health Initiative Calcium-Vitamin D*, concluíram que altas concentrações séricas de 25(OH)D₃ estão inversamente associadas com adiposidade, relação triglicérides:HDLcolesterol e síndrome metabólica. Além disso, os resultados da análise de regressão linear múltipla mostraram que a adiposidade é um fator de risco da síndrome metabólica e associa-se inversamente com a concentração de 25(OH)D₃. Ou seja, para cada incremento em uma unidade na concentração da vitamina D, há uma redução de 3,57 vezes no risco metabólico.

Quanto ao metabolismo de glicose-insulina, alguns pesquisadores demonstram associação entre resistência à insulina e vitamina D. A deficiência de vitamina D dificulta a capacidade das células β na conversão da proinsulina à insulina (BOURLON e cols, 1999; AYESHA e cols, 2001). Diversos autores (BOUCHER e cols, 1998; MORRIS e ZEMEL, 2005; MATHIEU e cols, 2005) observaram reduzidas concentrações séricas de 25OHD₃ em indivíduos com intolerância à glicose e/ou com diabetes. CHIU e cols (2004) avaliaram a associação entre 25OHD₃ sérica e sensibilidade à insulina e função das células- β através da técnica do *clamp* de insulina em 126 indivíduos saudáveis, onde encontraram uma correlação positiva entre 25-OHD₃ e o índice de sensibilidade à insulina. Extrapolando os dados, os autores sugerem que um aumento na 25OHD₃ sérica de 10 para 30 ng/ml poderia melhorar a sensibilidade à insulina em 60%. De fato, a suplementação com vitamina D parece melhorar a secreção de insulina em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (BORISSOVA e cols, 2003).

Mais recentemente, em uma série de revisões sistemáticas e meta-análises PITTAS e cols, (2007) confirmaram o envolvimento da vitamina D nos diferentes componentes da síndrome

metabólica, como por exemplo, o diabetes mellitus tipo 2. Neste estudo, foram utilizados dados de suplementação com 700UI de vitamina D₃ e 500 mg de cálcio, durante três anos, em mulheres com mais de 65 anos. Os resultados demonstraram uma redução na glicemia de jejum semelhante à observada no estudo de prevenção de diabetes do *Diabetes Prevention Program (DPP)*, por meio de mudanças do estilo de vida e também pelo uso da metformina.

MITRI e cols, (2011) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de investigar a associação entre a vitamina D e a incidência de diabetes mellitus tipo 2, por meio da análise de inúmeros ensaios clínicos controlados e estudos de suplementação. Os mesmos concluíram que a vitamina D realmente pode desempenhar um papel no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2. Porém, ainda são necessários mais estudos controlados para identificar a relevância das concentrações séricas de 25(OH)D₃ no metabolismo da glicose.

A relação negativa entre as concentrações séricas de vitamina D e hipertensão foi demonstrada por pesquisadores da *Harvard University* (FORMAN e cols, 2007). Os autores avaliaram a associação independente entre 25-OHD₃ medida e o risco de hipertensão, por meio de dados prospectivos de dois estudos de coorte - do *Nurses Healthy Study* e do *Healthy Professional Follow-up Study*, durante 4 à 8 anos. Em 4 anos de seguimento, foi demonstrado que o risco relativo para homens e mulheres com reduzidas concentrações séricas de 25OHD₃ desenvolverem hipertensão foi 3,18 (IC 95%:1,39 a 7,29).

Estudos experimentais demonstraram que a 1,25(OH)₂D₃ inibe a expressão da renina no aparelho justaglomerular (LI e cols, 2002) e bloqueia a proliferação de célula muscular vascular lisa (CARTHY e cols, 1989). Assim, postula-se que a relação entre a vitamina D e a hipertensão pode ocorrer via sistema renina-angiotensina e ações na parede vascular. Além disso, a 1 - α hidroxilase, enzima de conversão da 25OHD₃ a 1,25(OH)₂D₃, tem expressão em diversos tecidos como: células endoteliais, VSMC, além das células renais (MERKE e cols, 1989 e ZEHNDER e cols, 2002), sugerindo um efeito parácrino da 25OHD₃ independente das concentrações circulantes de 1,25(OH)₂D₃.

Dados do *INTERSALT Study* com mais de 10000 indivíduos de diversos países mostram que a pressão arterial sistólica e diastólica está positivamente associada com a distância do equador, o que teoricamente, coincide com a redução gradual da exposição solar. (INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 1988).

2.1.4 Receptor de Vitamina D (VDR) e Síndrome metabólica

Os polimorfismos frequentemente encontrados no gene VDR podem estar associados a uma variedade de fenótipos patológicos e fisiológicos em diferentes populações. Estes incluem variações das concentrações circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (HOWARD e cols, 1995), variações na densidade mineral óssea (COOPER, 1996; HAUACHE, 1998), risco para fraturas ósseas (JI e cols 2010), modulação do crescimento intrauterino e pós-natal (SUAREZ e cols, 1997; LORENTZON, 2000) e altura na vida adulta (LORENTZON, 2000). Outros estudos apresentam associações relacionadas à sensibilidade à ação da insulina (OH, 2002), secreção de insulina em resposta à glicose (HITMAN, 1998; OGUNKOLADE e cols, 2002), suscetibilidade ao diabetes tipo 1 e tipo 2 (MCDERMOTT, 1997; OH, 2002), ao peso corporal (YE e cols, 2001) e hipertensão arterial (LI e cols, 2004).

Em relação à função do VDR e a suscetibilidade ao diabetes tipo 2 (DM2), estudos associam uma possível função do VDR e suas variações alélicas no mecanismo de homeostase de glicose. Já está bem estabelecido que as células β expressam VDR (LEE, 1994). Desta forma, estudos fisiológicos em humanos sugerem que variações alélicas do gene VDR modulam a função da célula β , de modo que, em uma população considerada de risco para DM2, os polimorfismos do gene VDR influenciaram a secreção de insulina em resposta ao teste oral de tolerância à glicose (HITMAN e cols, 1998). Além disso, sugere-se que a secreção de insulina em resposta à carga de glicose oral é significativamente correlacionada com os níveis de mRNA de VDR em monócitos (OGUNKOLADE, 2002).

Também foram observadas associações entre diferentes genótipos do gene VDR e fenótipos relacionados ao peso corpóreo (BARGER-LUX e cols, 1995; GRUNDBERG e cols, 2004). Os mecanismos fisiopatológicos destas associações permanecem desconhecidos. Porém, alguns estudos realizados em culturas de pré-adipócitos de camundongos demonstraram que a inibição da adipogênese é dependente de $25(\text{OH})\text{D}_3$. Esse fenômeno ocorre em nível molecular, através da inibição do VDR e da expressão do PPAR- γ , que é o principal regulador da adipogênese (WOOD, 2007; FOSS, 2009).

FILUS e cols (2008) utilizaram as enzimas de restrição *BsmI* e *FokI* com o objetivo de investigar a associação entre polimorfismos no gene VDR com parâmetros antropométricos e bioquímicos na síndrome metabólica em 176 homens de uma população polonesa. Os autores

encontraram que os indivíduos com genótipo *BB* tendem a ter maiores valores de índice de massa corporal (IMC) ($p = 0.024$) e circunferência de cintura (CC) ($p = 0.014$) que os indivíduos com genótipo *bb*. Além disso, os indivíduos *FF* apresentaram maiores concentrações de insulina de jejum, sugerindo que os polimorfismos do gene VDR parecem influenciar no IMC, CC e insulina plasmática. Por outro lado, TWOROWSKA-BARDZINSKA e cols (2008) não encontraram associação dos polimorfismos do VDR com IMC e resistência à insulina em mulheres polonesas na pós-menopausa.

A relação entre vitamina D e hipertensão também tem sido avaliada através de estudos com cultura de células justaglomerulares 4.1hVDR e camundongos “knockout” para o gene VDR, com o intuito de elucidar a hipótese de que a vitamina D pode controlar a pressão sanguínea através da regulação da atividade do sistema renina-angiotensina (YUAN e cols, 2007; QIAO e cols, 2005; XIANG e cols, 2005; KONG e LI, 2003; LI, 2003; LI, 2002). Camundongos “knockout” para o gene VDR, apresentam concentrações elevadas de renina e elevada pressão arterial. Além disso, a administração da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em camundongos “wild type” diminuiu a expressão do gene da renina (LI e cols, 2002). Desta forma, uma ativação inapropriada do sistema renina-angiotensina está interligada ao desenvolvimento de hipertensão, sugerindo que adequadas concentrações de vitamina D podem ser importantes para a diminuição do risco de hipertensão.

Na população brasileira ainda existem poucos estudos avaliando os polimorfismos do gene VDR. HAUACHE e cols avaliaram polimorfismos do gene VDR também utilizando a enzima de restrição BmsI, e a sua relação com a densidade mineral óssea em uma população de 94 indivíduos adultos saudáveis e 78 indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 (DMID). O estudo mostrou que o grupo diabético tem menor densidade mineral óssea que o grupo controle. A distribuição genotípica *BB*, *Bb* e *bb* não diferiu entre os dois grupos, porém o grupo diabético com genótipo *Bb* apresentou maior peso corporal quando comparado com o genótipo *BB*.

Contudo, apesar de inúmeros estudos encontrarem as associações dos polimorfismos no gene VDR com a síndrome metabólica ou com seus componentes individuais em diferentes populações, estas relações ainda não foram demonstradas em estudos com a população brasileira.

3. HIPÓTESE

Considerando que estudos isolados realizados em nosso meio têm relatado presença marcante de ingestão insuficiente de vitamina D e de reduzidas concentrações séricas desta vitamina, bem como a associação destes fatores com doenças crônicas e as importantes implicações da síndrome metabólica, o presente estudo foi desenvolvido a fim de investigar se baixas concentrações séricas da vitamina D e a presença de polimorfismos no gene VDR estão associadas com os componentes da Síndrome metabólica em indivíduos adultos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar as concentrações séricas da vitamina D e suas associações com a síndrome metabólica e avaliar a potencial relação entre estes fatores com a presença de polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) em uma amostra de indivíduos adultos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as concentrações séricas de vitamina D em adultos de ambos os sexos.
- Avaliar a composição corporal e pressão arterial.
- Avaliar marcadores bioquímicos do metabolismo glicídico, lipídico e ósseo.
- Avaliar a presença de polimorfismos no gene VDR e suas possíveis associações com os componentes da síndrome metabólica.
- Correlacionar as variáveis do estudo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Estudo transversal.

5.2 ÁREA ESTUDADA E TAMANHO AMOSTRAL

A amostra deste estudo foi composta por indivíduos adultos de ambos os sexos, frequentadores do Centro de Saúde Paula Souza e participantes de rastreamento de indivíduos de risco para *Diabetes Mellitus* tipo 2. Outra parte da amostra foi dos participantes do Inquérito de Saúde da Cidade de São Paulo - ISA-SP - estudo multicêntrico, transversal de base populacional.

Os participantes foram abordados pessoalmente pelas nutricionistas que auxiliavam na coleta de dados do projeto.

Todos os participantes selecionados foram atendidos no Centro de Saúde Paula Souza, localizado na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizada a estimativa da prevalência de insuficiência de vitamina D entre os indivíduos com e sem síndrome metabólica coletados em estudo piloto. A partir desta estimativa os valores de prevalência foram de 55% de insuficiência de vitamina D nos indivíduos sem síndrome metabólica e 36% de insuficiência de vitamina D nos indivíduos com síndrome metabólica.

Fixando o nível de significância alfa em 5% e o poder do teste em 80%, obteve-se um tamanho amostral de 104 indivíduos para cada grupo. Assim, considerando os critérios de exclusão, mais as possíveis perdas ou recusa na participação no estudo em aproximadamente 10%, a amostra prevista deveria ser composta por 230 indivíduos, sendo 115 indivíduos com síndrome metabólica e 115 indivíduos sem síndrome metabólica.

Os critérios de exclusão adotados foram:

- Indivíduos diabéticos, afro-descendentes, crianças, adolescentes, gestantes, lactantes,
- Indivíduos com doenças crônicas que potencialmente alteram o metabolismo da vitamina D, como por exemplo: insuficiência renal crônica, câncer e insuficiência cardíaca;
- Indivíduos que faziam uso de suplementos vitamínicos de cálcio e ou vitamina D.

5.3 COLETA DE DADOS

Para este estudo os participantes realizaram:

- Avaliação antropométrica (peso, altura, circunferência da cintura e quadril, e impedância bioelétrica) e verificação de pressão arterial.
- Coleta de sangue para determinação das concentrações de creatinina sérica, vitamina D, cálcio e paratormônio, glicemia de jejum, colesterol total e frações e triglicérides.

Todos os indivíduos concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1) e compareceram ao Centro de Saúde Paula Souza, localizado na Faculdade de Saúde Pública – Av. Dr. Arnaldo 715, em dia e horário pré-estabelecido.

Neste local foram realizadas as coletas de sangue, medidas antropométricas, de composição corporal e aferição da pressão arterial.

5.3.1 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

Peso e estatura

Para avaliação do peso corporal foi utilizada uma balança eletrônica do tipo plataforma, com capacidade para 150 kg, sensibilidade de 100 gramas, da marca TANITA®. Os participantes foram pesados com roupas leves e descalços, posicionados em postura ereta, com os pés inteiramente compreendidos na plataforma, de forma paralela com braços ao longo do corpo e olhar no horizonte.

Para a aferição da estatura foi utilizado um estadiômetro com escala em milímetros, da marca Seca bodymeter 208®, a ser fixado na parede. Para esta medida os participantes permaneceram com os pés unidos, em postura ereta, olhando para frente, sem fletir ou estender a cabeça. O ápice da orelha e o canto externo no olho ficaram em linha paralela, formando um ângulo reto com a parede. Depois que a barra móvel do estadiômetro foi abaixada e apoiada sobre a cabeça, efetuou-se a leitura em centímetros.

Estes dados foram utilizados para calcular o Índice de Massa Corporal (IMC), definido como massa corporal em quilos dividido pela estatura em metro elevada ao quadrado (kg/m^2), e

posterior classificação de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1995). Estes dados foram coletados por pesquisadores de campo previamente treinados.

Avaliação da composição corporal

A realização da medida de avaliação da massa magra, gordura corporal e água corporal foram realizadas através da impedância bioelétrica, utilizando um aparelho Quantum BIA – 101Q da marca RJL-101 (Detroit, MI), tetrapolar, com apresentação digital dos valores de resistência (R) e reactância (Xc).

A fim de minimizar os erros de medida, os indivíduos foram instruídos a adotar as seguintes recomendações: manter-se em jejum pelo menos 4 horas antes da realização do exame; não ingerir bebidas alcoólicas nas 48 horas anteriores ao exame; não realizar atividades físicas extenuantes nas 24 horas anteriores ao exame; urinar 30 minutos antes do exame; não utilizar medicamentos diuréticos nos 7 dias que antecedem o exame; permanecer, pelo menos, 5 minutos deitado em decúbito dorsal, em total repouso antes da execução do exame (HEYWARD e STOLARCZYK, 1996)

Utilizando o software RJL systems Cyprus 1.2 C Body Composition Analysis ¹⁰⁶, quando se aplicam os valores de R, Xc, peso corporal, altura, sexo e idade do examinado, os valores do ângulo de fase, e dos componentes corporais como a gordura corporal total (GCT), massa magra (MM), água corporal total (ACT), água intracelular (AIC) e da água extracelular (AEC) nos foram apresentados.

Para a classificação da composição corporal de acordo com o percentual de gordura corporal, foi utilizado o critério de LOHMAN e GOING (2003).

Além disso, foram aferidas as medidas de circunferências da cintura e quadril. Todas as medidas foram realizadas com fita métrica flexível e não extensível.

- Circunferência da Cintura: a medida da circunferência da cintura foi realizada com a fita métrica posicionada sobre o ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca do indivíduo em pé, com a leitura feita no momento da expiração.

- Circunferência do Quadril: a circunferência do quadril foi feita circundando a fita métrica pelo participante com roupas finas e pés unidos, realizando a leitura na região de maior perímetro entre a cintura e a coxa do indivíduo.

Estes dados foram coletados por pesquisadores de campo previamente treinados.

5.3.2 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO SOLAR

Foi realizado um questionário sobre a exposição solar (Anexo 2) tendo em vista a importante relação entre exposição solar e as concentrações séricas de vitamina D.

5.3.3 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue e o rastreamento dos participantes foi realizada durante o período de agosto de 2007 a janeiro de 2009. Os indivíduos foram instruídos a realizar jejum de 12h, após o qual foi realizada a coleta de sangue. Para todas as análises foram coletados 20 ml de sangue venoso. A coleta de sangue foi realizada por profissionais especializados, com utilização de materiais descartáveis. O sangue foi aliqotado em microtubos e imediatamente estocados a uma temperatura de -80°C até a análise bioquímica.

Metodologia para as dosagens laboratoriais:

- *Vitamina D sérica* - 25OHD_3 foi analisada por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Para classificação de adequação, insuficiência e deficiência de 25-OHD_3 , foram considerados os pontos de corte de GRANT e HOLICK (2005).

- *Cálcio sérico* - método calorimétrico em espectrofotômetro - Kits comerciais Bioclin® ou similar. Valor de referência- 8,5 a 10,5 mg/dl.

- *Paratormônio intacto sérico* - pelo método eletroquimioluminescência. Valor de referência- 15 a 65 pg/ml.

- *Creatinina sérica* - método calorimétrico em espectrofotômetro - Kits comerciais Celm® ou similar . Valores normais até 1,2 mg/dl.

- *Colesterol Total e frações e Triglicérides* - método calorimétrico em espectrofotômetro - Kits comerciais Celm® ou similar

- *Glicemia de Jejum* - método calorimétrico em espectrofotômetro - Kits comerciais Celm® ou similar

- *Insulina de Jejum* - Kits comerciais IMMULITE® - metodologia enzimaímunométrica quimiluminescente

Obs: os valores normais para colesterol total e frações, triacilgliceróis e glicemia de jejum, foram os estabelecidos pelos critérios no NCEP-ATP III para diagnóstico da Síndrome metabólica, descritos no item 5.6 deste projeto.

5.4 GENOTIPAGEM DO GENE RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR)

Escolha dos polimorfismos:

- Polimorfismo BsmI (rs 1544410) localizado no íntron 8 e resultante da substituição adenina – guanina (A/G);
- Polimorfismo FokI (rs 2228570) localizado no éxon 2 e resultante da substituição citosina – timina (C/T).

Extração de DNA:

O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando-se o método de *salting out*, descrito por MILLER e cols (1988). Após a extração, a viabilidade do material extraído foi visualizada em gel de agarose 1% e a concentração foi obtida por leitura em espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Genotipagem SNPs:

A genotipagem dos SNPs selecionados para esse projeto foi realizada através da técnica conhecida como PCR alelo específico (ASPCR) ou amplificação de mutação refratária (ARMs)

(NEWTON e cols 1989). Essa técnica baseia-se no princípio de que a Taq polimerase não apresenta atividade 3'-5', portanto, se um dos primers for desenhado com uma base mutada na região 3', a amplificação não deve ocorrer. Dessa forma, um experimento padrão envolve o desenho de três primers: *primer normal (NOR)*, usado para amplificar o alelo sem a mutação, *primer mutante (MUT)*, para amplificar o alelo com a mutação, e o *primer comum (COM)*, usado como primer inverso, juntamente com os primers *NOR* ou *MUT* usados como primers diretos. As duas reações (*NOR/COM* e *MUT/COM*) permitem identificar cada amostra como *homozigoto normal*, ou *homozigoto mutante*, se apenas uma das reações resultarem em um produto detectável, ou *heterozigoto*, se ambas as reações resultarem em produtos identificáveis. A detecção dos produtos é feita através de energia de ressonância de fluorescência (FRET), a qual baseia-se na transferência de energia de uma molécula doadora, para uma molécula receptora, no caso fluoróforos (LIVAK e cols 1995). Quando ambas se encontram a uma determinada distância, ou seja, quando ocorre amplificação do produto, a emissão de um fluoróforo sobrepõe-se ao espectro excitatório do outro, emitindo um sinal que será captado por um leitor de fluorescência utilizado para a clusterização e posterior identificação dos genótipos.

Os indivíduos foram classificados como FF ou BB Homozigotos normais, Ff ou Bb heterozigotos e ff ou bb homozigoto recessivos.

5.5 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial foi obtida por meio de aparelho automático (Omron model HEM-712C, Omron Health Care, Inc, USA). Três medidas de pressão arterial foram realizadas com adequação do manguito à circunferência braquial. Após 5 minutos de repouso na posição sentada, com o braço direito apoiado na altura do átrio esquerdo, o manguito foi automaticamente insuflado, além do valor de oclusão do pulso braquial. Para os valores finais de pressão sistólica e diastólica (em mmHg) foram considerados aqueles que representam a média aritmética das 2 últimas medidas.

5.6 CLASSIFICAÇÃO DA SÍNDROME METABÓLICA

Foram utilizados os critérios do *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) de 2005, para classificação da Síndrome metabólica, a saber:

Presença de pelo menos 3, dos seguintes critérios:

Glicemia de jejum ≥ 100 mg/dl ou medicação;

Cintura > 102 ou 88 cm (homens e mulheres, respectivamente);

Triglicérides ≥ 150 mg/dl;

HDL < 40 ou 50 mg/dl (homens e mulheres, respectivamente);

Pressão arterial $\geq 130/85$ mmHg ou medicação.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente, foi verificado se as variáveis estudadas possuíam distribuição normal através do teste Kolmogorov-Smirnov. Não apresentaram normalidade as seguintes variáveis: PTH, colesterol HDL, Triglicérides, IMC, circunferência da cintura e índices HOMA β e HOMA IR, sendo então transformadas em logaritmo para fins de análise estatística.

Para cálculo de HOMA β e HOMA IR foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- Homa IR (HOMA-insulin resistance), obtido através da fórmula [glicemia de jejum] X [Insulina de jejum] / 22,5 descrita por Matthews et al(1985).

- Homa β (HOMA- β -cell function), obtido através da fórmula $20 \times \text{insulina de jejum}(\mu\text{U/mL}) / [\text{glicemia de jejum}(\text{mmol/L}) - 3,5]$ descrita por Matthews et al (1985).

Testes *t de Student* foram aplicados para a comparação de médias entre 2 grupos e a análise de variância (ANOVA) para comparação de médias entre 3 grupos. A correlação de Pearson foi aplicada para verificar a associação entre as variáveis do estudo. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparação de prevalências entre os grupos. A curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi utilizada para definir o ponto de corte adequado de concentração de 25(OH)D₃, em relação aos valores de circunferência da cintura. A significância estatística da análise foi observada pela área sob a curva ROC e pelo intervalo de confiança a 95% (IC 95%).

Para avaliar as frequências genotípicas foi utilizado o teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Posteriormente, pelo modelo de regressão logística binária foi estimado a *Odds Ratios* (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para verificarmos a associação entre a presença de polimorfismos no gene do VDR (variável dependente) e as demais variáveis significantes para o modelo.

Os dados do presente estudo foram avaliados com o auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 18.0. O valor de significância considerado será de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

5.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (COEP) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo de acordo com os requisitos CNS/196/96. Protocolo de pesquisa 1676 (anexo III). Todos os indivíduos que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6. RESULTADOS

ARTIGO 1:

“Vitamina D e doenças endocrinometabólicas”

Artigo de revisão

Publicado nos Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

Vitamina D e doenças endocrinometabólicas

Vitamin D and endocrine diseases

Natielen Jacques Schuch¹, Vivian Cristina Garcia¹, Ligia Araújo Martini¹

RESUMO

Atualmente, a insuficiência/deficiência de vitamina D tem sido considerada um problema de saúde pública no mundo todo, em razão de suas implicações no desenvolvimento de diversas doenças, entre elas, o diabetes melito tipo 2 (DMT2), a obesidade e a hipertensão arterial. A deficiência de vitamina D pode predispor à intolerância à glicose, a alterações na secreção de insulina e, assim, ao desenvolvimento do DMT2. Esse possível mecanismo ocorre em razão da presença do receptor de vitamina D em diversas células e tecidos, incluindo células-β do pâncreas, no adipócito e no tecido muscular. Em indivíduos obesos, as alterações do sistema endócrino da vitamina D, caracterizada por elevados níveis de PTH e da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são responsáveis pelo *feedback* negativo da síntese hepática de $25\text{-OH}\text{D}_3$ e também pelo maior influxo de cálcio para o meio intracelular, que pode prejudicar a secreção e a sensibilidade à insulina. Na hipertensão, a vitamina D pode atuar via sistema renina-angiotensina e também na função vascular. Há evidências de que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibe a expressão da renina e bloqueia a proliferação da célula vascular muscular lisa. Entretanto, estudos prospectivos e de intervenção em humanos que comprovem a efetividade da adequação do *status* da vitamina D sob o aspecto “prevenção e tratamento de doenças endocrinometabólicas” são ainda escassos. Mais pesquisas são necessárias para se garantir o benefício máximo da vitamina D nessas situações. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53(5):625-33.

Descritores

Vitamina D; diabetes melito; obesidade; hipertensão

ABSTRACT

Vitamin D insufficiency/deficiency has been worldwide reported in all age groups in recent years. It has been considered a Public Health matter since decreased levels of vitamin D has been related to several chronic diseases, as type 2 diabetes mellitus (T2DM), obesity and hypertension. Glucose intolerance and insulin secretion has been observed during vitamin D deficiency, both in animals and humans resulting in T2DM. The supposed mechanism underlying these findings is presence of vitamin D receptor in several tissues and cells, including pancreatic β-cells, adipocyte and muscle cells. In obese individuals, the impaired vitamin D endocrine system, characterized by high levels of PTH and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ could induce a negative feedback for the hepatic synthesis of $25(\text{OH})\text{D}$ and also contribute to a higher intracellular calcium, which in turn secrete less insulin and deteriorate insulin sensitivity. In hypertension, vitamin D could act on renin-angiotensin system and also in vascular function. Administration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ could decrease renin gene expression and inhibit vascular smooth muscle cell proliferation. However, prospective and intervention human studies that clearly demonstrates the benefits of vitamin D status adequacy in the prevention and treatment of endocrine metabolic diseases are lacking. Further research still necessary to assure the maximum benefit of vitamin D in such situations. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53(5):625-33.

Keywords

Vitamin D; diabetes mellitus; obesity; hypertension

¹ Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (FSP/USP), São Paulo, SP, Brasil

Correspondência para:
Ligia Araújo Martini
Departamento de Nutrição,
Faculdade de saúde pública da
Universidade de São Paulo
Av. Doutor Arnaldo, 715, 2º andar
01246-904 – São Paulo, SP, Brasil
lmartini@usp.br

Recebido em 14/Abr/2009
Aceito em 26/Abr/2009

VITAMINA D, NOVOS HORIZONTES

A atuação da vitamina D em processos metabólicos é pesquisada desde o século 17 e foi objeto de prêmio Nobel em 1938 (1). Atualmente, são conhecidos aproximadamente 41 metabólitos da vitamina D e um hormônio principal, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que atua como ligante para o fator de transcrição nuclear VDR (do inglês vitamin D receptor, receptor da vitamina D), regulando a transcrição gênica e a função celular em diversos tecidos. Há evidências de que 3% do genoma humano seja regulado pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1).

A vitamina D é bastante conhecida pela sua função no desenvolvimento e na manutenção do tecido ósseo, bem como pela manutenção da homeostase normal do cálcio e do fósforo. Porém, evidências recentes sugerem o envolvimento dessa vitamina em diversos processos celulares vitais, como: diferenciação e proliferação celular, secreção hormonal (por exemplo: insulina), assim como no sistema imune e em diversas doenças crônicas não transmissíveis (1-5).

Na maioria dos indivíduos, a síntese cutânea é a principal fonte de vitamina D, sendo o restante obtido pela alimentação e pelo uso de suplementos (2). Após a síntese cutânea, a vitamina D entra na circulação e é transportada para o fígado, unida à proteína ligante da vitamina D (DBP). No fígado, ocorre a primeira hidroxilação para a $25(\text{OH})\text{D}$, que será secretada no plasma. Para se tornar ativa, a $25(\text{OH})\text{D}$ é metabolizada pela enzima 25-hidroxivitamina D 1α -hidroxilase (CYP27B1) nos rins, formando $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A produção desse metabólito é controlada principalmente pela concentração de paratormônio (PTH), cálcio e fósforo séricos.

Os efeitos biológicos da forma ativa da vitamina D são mediados pelo VDR, presente nos principais sítios de ação da vitamina D, como rim, glândulas paratireoides, intestino e osso. No núcleo das células-alvo, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se associa ao VDR. Esse complexo se liga ao receptor de ácido retinoico (RXR), formando heterodímeros que atuam nos elementos-resposta da vitamina D (VDRE), iniciando, assim, a cascata de interações moleculares que modulam a transcrição de genes específicos (3).

Apesar de o rim ser o principal sítio de hidroxilação para a forma ativa da vitamina D, a presença de CYP27B1 e do VDR foi identificada em outros tecidos, como próstata, mama, cólon, pâncreas e células do sistema imune. Acredita-se, porém, que a hidroxilação extrarrenal tenha efeito autócrino e parácrino local e não faça parte da circulação (6).

O nível individual do *status* da vitamina D é mensurado por meio dos níveis plasmáticos da $25(\text{OH})\text{D}$. A forma biologicamente ativa da vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, não é indicada para esse propósito devido a razões como: a) os níveis plasmáticos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são rigidamente mantidos em concentração normais; b) os níveis plasmáticos de $25(\text{OH})\text{D}$ são aproximadamente cem vezes maiores do que os de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; c) a hidroxilação da $25(\text{OH})\text{D}$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ocorre em diversos tecidos, cobrindo as necessidades locais; e d) a meia-vida da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é de aproximadamente seis horas, enquanto a da $25(\text{OH})\text{D}$, de duas a três semanas (7).

Os níveis séricos tidos como adequados ou não ainda são muito discutidos na literatura. Hollis (8) considera que o nível ótimo de vitamina D seria aquele necessário para manter o PTH em níveis adequados, visto que a deficiência de vitamina D leva à diminuição do cálcio sérico, o qual, em consequência, estimula as glândulas paratireoides a liberar o PTH, a fim de elevar a reabsorção renal e óssea do cálcio (8). Neste sentido, vários estudos têm encontrado um platô de absorção de cálcio e níveis adequados de PTH, com níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ próximos a 50 nmol/L (9-11).

Revisando estudos sobre os pontos de corte da vitamina D, Grant e Holick, em 2005 (12), propuseram que a concentração abaixo de 50 nmol/L seja considerada como deficiência de vitamina D; as concentrações entre 50 e 80 nmol/L seriam indicadoras de insuficiência. Os valores de $25(\text{OH})\text{D}$ normalmente são expressos em nmol/L ou ng/mL (1 ng/mL corresponde a 2,496 nmol/L). Os pontos de corte estão ilustrados na tabela 1.

Tabela 1. Indicadores de saúde para vários níveis séricos da 25-OHD_3

25-OHD_3 (ng/mL)	25-OHD_3 (nmol/L)	Indicador de saúde
< 20	> 50	Deficiência
20-32	50-80	Insuficiência
32-100	80-250	Suficiência
54-90	135-225	Normal em países ensolarados
> 100	> 250	Excesso
> 150	> 325	Intoxicação

Adaptado de Grant e Holick (12).

Atualmente, a insuficiência/deficiência de vitamina D tem sido considerada um problema de saúde pública no mundo todo, em razão de suas implicações no desenvolvimento de diversas doenças (3). Em 2008, a publicação referente ao 22nd *Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D* relatou insuficiência de vitamina D em 1 bilhão de indivíduos ao redor do mundo (4).

Apesar da suposta maior exposição solar em nosso meio, concentrações insuficientes de 25(OH)D sérica são também reportadas. Saraiva e cols. (13) e de Souza Genaro e cols. (14) encontraram concentrações inadequadas em 42% de idosos na cidade de São Paulo e em 24% de mulheres com osteoporose. Em adolescentes saudáveis e adultos jovens, a prevalência foi de 60% e 50%, respectivamente (15,16).

O marcante número de publicações que identificam uma inadequação na concentração sérica de vitamina D em todo o mundo tem despertado o interesse de pesquisadores, que frequentemente identificam a relação dessa vitamina não somente com a osteoporose, mas também com o desenvolvimento de doenças endocrinometabólicas (5,6,17). Este artigo revisou as evidências sobre a participação da vitamina D nessas doenças, assim como elucidou os prováveis mecanismos de ação.

DIABETES MELITO

É bem conhecida a relação do cálcio sérico e do PTH com o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2 (DMT2) (18); entretanto, atualmente, estudos em humanos sugerem que a 25(OH)D pode atuar como potente agente modificador do risco para o aparecimento dessa doença (19,20). Estudos clínicos e epidemiológicos confirmam essa hipótese, pois demonstram que indivíduos com redução na concentração de 25(OH)D sérica apresentam maior risco para desenvolver DMT2 (21,23).

O desenvolvimento de DMT2 envolve alterações na função das células- β do pâncreas e resistência periférica à ação da insulina. A 25(OH)D pode atuar nesses mecanismos em virtude da presença (VDR) nas células- β e de proteínas ligadoras de cálcio dependente de vitamina D (DBP) no tecido pancreático (24).

A vitamina D pode afetar a resposta insulínica ao estímulo da glicose direta ou indiretamente (25). O efeito direto parece ser mediado pela ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ao VDR da célula- β . Alternativamente, a ativação da vitamina D pode ocorrer dentro das células- β pela enzima 1α -hidroxilase, expressa nessas células (26).

O efeito indireto é mediado pelo fluxo de cálcio intra e extracelular nas células- β . Zemel (17) demonstrou que o aumento na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e no PTH induz maior influxo de cálcio para o interior das células. Como a secreção de insulina é um processo cálcio-dependente mediado pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e pelo PTH, o aumento nas concentrações destes, devido à insuficiência de 25(OH)D, pode reduzir a capacidade secretora

dessas células (25,27). Adicionalmente, a deficiência de 25(OH)D parece dificultar a capacidade das células- β na conversão da pró-insulina à insulina (28,29).

Com relação à ação da 25(OH)D na resistência à insulina, os efeitos podem também ser diretos (via estímulo da vitamina D para expressão do receptor da insulina, aumentando, assim, a resposta insulínica ao estímulo da glicose) ou indiretos (via concentração de cálcio intracelular) (30). O cálcio intracelular é essencial para mediar a resposta insulínica nos tecidos muscular e adiposo; desse modo, alterações na concentração de cálcio nesses tecidos podem contribuir para elevar a resistência periférica à ação da insulina, via redução da transdução de sinal e redução na atividade do transportador de glicose 4 (GLUT-4) (23). De fato, alguns autores (22,31), mas não todos (32), encontraram associação inversa entre o *status* da vitamina D e/ou do cálcio à resistência à insulina.

Evidências em estudos *in vivo* e em humanos

Ismail e Namala (27) demonstraram em ratos Wistar que uma dieta deficiente em vitamina D prejudica a tolerância à glicose, causando a alteração da sensibilidade à insulina. Em camundongos com VDR inativo nas ilhotas pancreáticas, observou-se diminuição na tolerância à glicose, quando eles eram submetidos à sobrecarga oral ou subcutânea de glicose. Adicionalmente, os autores observaram diminuição no mRNA da insulina (25). Por outro lado, Mathieu e cols. (33) não encontraram o mesmo efeito. Esses resultados controversos podem ser atribuídos às diferentes linhagens genéticas usadas para gerar esses animais sem VDR.

Em humanos, há também evidências da associação inversa entre resistência à insulina e 25(OH)D. Alguns autores (34,35) observaram reduzidas concentrações séricas de 25(OH)D em indivíduos com intolerância à glicose e/ou com diabetes. Chiu e cols. (22) avaliaram a associação entre 25(OH)D sérica e sensibilidade à insulina e função das células- β , por meio da técnica do *clamp* de insulina em indivíduos saudáveis, além de demonstrar correlação positiva entre 25(OH)D e o índice de sensibilidade à insulina. Liu e cols. (36), analisando a existência de relação entre 25(OH)D e resistência à insulina representada pelo modelo de avaliação da homeostase da sensibilidade à insulina (HOMA-IR) e o índice de sensibilidade à insulina (ISI_{0-120}) em 808 participantes não diabéticos do Framingham Offspring Study, encontraram que as concentrações séricas de 25(OH)D foram inversamente associadas às concentrações de

glicemia de jejum, insulina de jejum e HOMA-IR. A concentração de 25(OH)D foi positivamente associada com ISI_{0-120} , adiponectina e colesterol de alta densidade (HDL) e inversamente associada a triacilgliceróis.

Corroborando esses dados, estudo de coorte realizado na Finlândia comprovou associação inversa entre 25(OH)D e o risco de desenvolvimento de DMT2. Matilla e cols. (37), avaliando 4.423 indivíduos de ambos os sexos e idade média entre 40 e 69 anos, com o objetivo de determinar a incidência de DMT2, encontraram risco relativo para desenvolver diabetes melito de 0,7 (IC 95% 0,42-1,16; $P_{trend} = 0,07$), ajustado para índice de massa corpórea (IMC), exercício nas horas de lazer, fumo e nível educacional, quando comparados o maior e o menor quintil de concentrações de 25(OH)D.

Evidências de estudos de intervenção

Resultados de estudos referentes à suplementação com 25(OH)D sugerem melhora na secreção de insulina em indivíduos com DMT2. Borissova e cols. (38) observaram que o aumento na 25(OH)D sérica de 10 para 30 ng/mL pode melhorar a sensibilidade à insulina em 60%. Outros pesquisadores confirmam que a suplementação de 25(OH)D em humanos pode aumentar a secreção de insulina estimulada em resposta à carga de glicose oral em pacientes com DMT2 (sem glicemia de jejum alterada) em adultos saudáveis não diabéticos e em indivíduos com deficiência de vitamina D sem DMT2 estabelecida (22,32).

Pittas e cols. (39), analisando a população do *Nurses' Health Study*, com 84 mil mulheres sem história de DMT2 no início do estudo, encontraram incidência de 4.843 casos de diabetes decorridos 20 anos nessa população. O risco relativo para DMT2 foi de 0,87 (IC 95% 0,75-1,00; $P_{trend} = 0,04$), quando comparada a maior (800UI) com a menor (400UI) concentração de suplementação de 25(OH)D.

De fato, a suplementação de vitamina D em concentração de 400UI também não mostrou efeito positivo na prevenção de DMT2 no Women's Health Initiative, estudo prospectivo placebo-controlado com 33.951 mulheres, durante sete anos (40).

Em 2007, uma metanálise de estudos clínicos e observacionais sobre o papel da 25(OH)D e do cálcio em relação ao DMT2 foi realizada. Os estudos observacionais demonstram que o baixo *status* de 25(OH)D, cálcio e derivados do leite está relacionado à maior prevalência de DMT2 e síndrome metabólica. Nos indivíduos com

maiores concentrações de 25(OH)D, a razão de chance para desenvolver DMT2 foi de 0,36 (IC95% = 0,16-0,80), quando estes foram comparados aos indivíduos com menores concentrações. O mesmo fator protetor esteve presente para a incidência de DMT2, em que a razão de chance foi 0,82 (IC95% = 0,72-0,93). Além disso, os estudos de intervenção sugerem que a suplementação de 25(OH)D e/ou cálcio parece ser importante para a prevenção de DMT2, particularmente em indivíduos com intolerância à glicose (23).

Comparação dos efeitos da vitamina D com mudanças no estilo de vida e medicamentos no controle glicêmico

Utilizando dados de estudo de suplementação com 700UI de vitamina D₃ e 500 mg de cálcio, durante três anos, em mulheres com mais de 65 anos, Pittas e cols. (41) demonstraram redução na glicemia de jejum semelhante à observada no estudo de prevenção de diabetes do Diabetes Prevention Program (DPP) por meio de mudanças do estilo de vida e também pelo uso da metformina (42). Esses dados estão ilustrados na figura 1.

Apesar da semelhança na concentração da glicemia de jejum, ainda são necessários estudos futuros que comparem o efeito da adequação do *status* da vitamina D somado às mudanças no estilo de vida na prevenção do DMT2.

Figura 1. Vitamina D – Cálcio vs. intervenção para prevenção do diabetes tipo 2. (Adaptado de Pittas e cols. (23).

Em resumo, os resultados dos estudos sobre os efeitos da vitamina D no diabetes melito evidenciam que a deficiência de 25(OH)D altera a síntese e a secreção de insulina, tanto em modelos animais como em humanos. Além disso, a deficiência dessa vitamina parece acarretar a intolerância à glicose e a secreção de insulina prejudicada e contribuir para o maior risco de DMT2. Entretanto, o diabetes melito é uma doença multifatorial,

cujas prevenção envolve alterações significantes no estilo de vida, como adequação na alimentação e na prática de atividade física. As recentes evidências da participação da vitamina D nos processos de secreção e ação da insulina e no controle glicêmico sugerem que a vitamina D deve ser mais um fator considerado tanto na prevenção como no tratamento do diabetes melito.

OBESIDADE

Reduzidas concentrações de 25(OH)D são frequentemente observadas em indivíduos obesos (43-47). Especula-se que a insuficiência de vitamina D não seja apenas consequência da menor exposição solar em obesos, mas também um dos fatores que desencadeia o acúmulo de gordura corporal.

Evidências sugerem que uma das causas da deficiência de 25(OH)D em indivíduos obesos e com DMT2 possa estar ligada ao depósito de vitamina D nos adipócitos, diminuindo a sua biodisponibilidade e acionando o hipotálamo para desenvolver uma cascata de reações que resulta no aumento da sensação de fome e na diminuição do gasto energético (48). Tal situação também gera aumento nos níveis de PTH, consequente diminuição da sensibilidade à insulina e aumento desproporcional na concentração de cálcio intracelular (44,49-52).

Evidências em estudos epidemiológicos

Correlação negativa entre gordura corporal total com concentração sérica de 25(OH)D foi demonstrada em estudos de base populacional. Tal correlação permaneceu significativa, mesmo após o ajuste para idade, estação do ano, ingestão de vitamina D e raça (43,44).

Snidjer e cols. (44), no *Longitudinal Aging Study Amsterdam* (LASA), observaram que a soma das dobras cutâneas e o percentual de gordura corporal estiveram fortemente associados à baixa concentração de 25(OH)D e à maior concentração de PTH.

A hipótese de que indivíduos obesos apresentam maiores concentrações de PTH foi confirmada por Bell e cols. (45). Maior secreção de PTH é sinal para hidroxilação da forma ativa da vitamina D. Os autores sugerem que, devido à elevação na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ocorra *feedback* negativo à síntese hepática de 25(OH)D.

Posteriormente, estudo avaliando as concentrações de micronutrientes em homens e mulheres que participaram do *National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III) demonstrou que somente nas mulheres pré e pós-menopausadas ($n = 8.137$)

houve associação negativa da vitamina D com o IMC (46). Entretanto, associação da relação entre obesidade e PTH não foi demonstrada.

Evidências *in vivo* e *in vitro*

Foi demonstrado que, em culturas de adipócitos, o PTH (47) e a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podem elevar a concentração de cálcio intracelular, fato que impede a lipólise induzida por catecolaminas e promove a expressão do ácido graxo sintase, contribuindo para o acúmulo de gordura (48).

Recentes estudos feitos com modelos de culturas de pré-adipócitos de camundongos levantaram a hipótese de que o papel da 25(OH)D na inibição da adipogênese é mediado em nível molecular por meio da inibição do VDR e da expressão do regulador-mestre da adipogênese (PPAR γ), reduzindo, consequentemente, sua atividade (49). No entanto, estudos realizados há mais de 20 anos indicaram que culturas de pré-adipócitos tratados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tiveram sua diferenciação para adipócito afetada. Esse estudo mostrou que concentrações nanomolares de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podem inibir a adipogênese e reduzir o acúmulo de triacilglicerol em até 50%, em comparação com as células-controle diferenciadas (24). Essas descobertas são condizentes com a ideia de que qualquer influência da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na adipogênese poderia ser exercida antes da transição de pré-adipócito para o adipócito, quando existe maior disponibilidade de VDR. Essa importante observação sugere também que o papel principal da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na adipogênese parece ser a supressão de um evento molecular-chave primário ou anterior no processo de diferenciação do pré-adipócito (49).

De fato, Blumberg e cols. (50), utilizando uma linhagem de células de pré-adipócitos 3T3-L15B2, demonstraram que o tratamento com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibiu parcialmente a formação endógena de ligantes de PPAR γ . Assim, com a redução da expressão do PPAR γ e consequente diminuição de sua atividade na presença de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ocorre inibição da adipogênese. Contudo, pesquisas adicionais são necessárias para melhor esclarecer o decréscimo de PPAR γ na presença de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e investigar a extensão da interação entre VDR e PPAR γ em pré-adipócitos *in vivo* (49).

Evidências em estudo de suplementação

Caan e cols. (51), analisando dados de 36.282 mulheres na pós-menopausa com idade entre 50 e 79 anos

participantes do Women's Health Initiative (WHI), encontraram menor ganho de peso durante o uso de suplementação (1.000 mg de cálcio e 400UI de colecalciferol) quando comparadas ao grupo controle.

Estudo duplo-cego placebo-controlado, realizado com 445 indivíduos de 21 a 70 anos e IMC entre 28 e 47 kg/m², utilizou suplementação de colecalciferol em três grupos:

- 1) 20.000UI duas vezes por semana;
- 2) 20.000UI uma vez por semana + placebo uma vez por semana;
- 3) placebo duas vezes por semana.

Todos os participantes receberam 500 mg de cálcio. Houve aumento significativo na concentração de 25(OH)D e redução no PTH, mas não houve mudanças significantes em peso, relação cintura-quadril e percentual de gordura corporal intragrupo e intergrupo, mesmo quando avaliados a partir das concentrações séricas basais de 25(OH)D (52). Entretanto, estudos que avaliem os efeitos da suplementação da vitamina D na prevenção da obesidade ainda são necessários.

HIPERTENSÃO

Dados do *Intersalt Study*, importante trabalho sobre fatores de risco e controle de hipertensão com mais de 10.000 indivíduos de diversos países, mostram pressão arterial sistólica e diastólica positivamente associada à distância do equador, elucidando que a exposição solar e, supostamente, a menor concentração de 25(OH)D estariam relacionadas à pressão arterial (53).

Adicionalmente, em estudo realizado por Krause e cols. (54) com pacientes hipertensos submetidos à radiação ultravioleta três vezes por semana, durante três meses, foi demonstrado aumento de 180% nos níveis séricos de 25(OH)D e redução de 6 mmHg na pressão arterial sistólica e diastólica.

A hipertensão ocorre principalmente pela ativação inadequada do sistema renina-angiotensina. São vários os estudos que apontam níveis séricos de 1,25(OH)₂D₃ inversamente associados à pressão arterial ou à atividade da renina plasmática em normotensos e hipertensos (55-57). A ação da 1,25(OH)₂D₃ influenciando a expressão gênica ocorre por meio do receptor de vitamina D (VDR) presente em vários tecidos/células, como no aparelho justaglomerular (58). Em 2008, Kong e cols. (59) demonstraram que a supressão da expressão de renina pela 1,25(OH)₂D₃ *in vivo* é independente do PTH e do cálcio.

Estudos experimentais demonstraram que a 1,25(OH)₂D₃ inibe a expressão da renina no aparelho justaglomerular (60) e bloqueia a proliferação de célula vascular muscular lisa (VSMC) (61). Assim, a relação vitamina D/hipertensão pode ocorrer via sistema renina-angiotensina e função vascular. Além disso, a 1-α hidroxilase, enzima de conversão da 25(OH)D em 1,25(OH)₂D₃, tem expressão em diversos tecidos, como células endoteliais, VSMC, além das células renais (62,63), sugerindo um efeito parácrino da 25(OH)D independente dos níveis circulantes de 1,25(OH)₂D₃.

Evidências em estudos epidemiológicos

Analisando a população com mais de 20 anos que participou do NHANES III, Scragg e cols. (64) encontraram pressão arterial sistólica e diastólica (3,0 e 1,6 mmHg, respectivamente) menor no maior quintil (25(OH)D ≥ 85,7 nmol/L), em comparação ao menor quintil de vitamina D (25(OH)D ≤ 40 nmol/L). Adicionalmente, Martins e cols. (65) encontraram em adultos americanos prevalência de hipertensão 30% maior no menor quartil, quando comparada ao maior quartil de vitamina D.

Recentemente, a associação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o risco de doença coronariana nos indivíduos que participaram do Health Professionals Follow-up Study (HPFS) foi avaliada. Homens com deficiência de vitamina D (≤ 15 ng/mL ou 37 nmol/L) apresentam risco significativamente maior de desenvolver infarto do miocárdio quando comparados àqueles com níveis suficientes de vitamina D (≥ 30 ng/mL ou 75 nmol/L) (RR = 2,09; IC95% = 1,24-3,54) (66). Resultados semelhantes foram observados por Kendrick e cols. (67) ao avaliarem a população acima de 18 anos do NHANES III, na qual indivíduos com deficiência de vitamina D (25(OH)D < 20 ng/mL) apresentaram maior risco de doença cardiovascular (OR = 1,2; IC95% = 1,01-1,36) após os ajustes por potenciais fatores de confusão.

Utilizando ainda os dados do HPFS e do *Nurses' Health Study*, a relação negativa entre níveis séricos de vitamina D e hipertensão foi também demonstrada (68). Aos quatro anos de seguimento, o risco relativo, para homens com reduzidos níveis de 25(OH)D sérica desenvolverem hipertensão, foi de 6,13 (IC95% = 1,00-37,80), enquanto, nas mulheres, foi de 2,67 (IC95% = 1,05-6,97). Após oito anos de seguimento, nos homens, o risco relativo foi de 3,53 (IC95% = 1,02-12,3) e, nas mulheres, 1,7 (IC95% = 0,92-3,16).

Em outra análise, esta com 1.484 mulheres participantes do *Nurses' Health Study* que foram divididas em 742 casos que desenvolveram hipertensão e em 742 controles que não desenvolveram hipertensão, foi observado que a concentração de 25(OH)D era menor nos casos (25,6 ng/mL) do que nos controles (27,3 ng/mL; $p = 0,001$). As mulheres que se encontravam no menor quartil de vitamina D apresentaram maior risco de desenvolver hipertensão do que as mulheres no maior quartil (razão de chance ajustada de 1,66; IC95% = 1,11-2,48; $p = 0,01$). O mesmo foi observado quando comparadas mulheres com níveis suficientes e deficientes de vitamina D (razão de chance ajustada de 1,47; IC95% = 1,10-1,97) (69).

Evidências *in vivo*

Zhou e cols. (70) demonstraram regulação do sistema renina-angiotensina por meio da suplementação de 1,25(OH)₂D₃ em ratos isentos da enzima 1- α hidroxilase. Entretanto, Thierry-Palmer e cols. (71) aumentaram a oferta de vitamina D pela dieta em ratos sal-sensíveis com alimentação salgada e, apesar do aumento dos níveis séricos de 25(OH)D, a hipertensão não foi atenuada.

Evidências em estudos de suplementação

Em estudo duplo-cego placebo-controlado, foi observada a redução na pressão arterial de 39 indivíduos hipertensos com a suplementação de vitamina D (72). Essa redução também foi ressaltada em mulheres idosas suplementadas com cálcio e vitamina D (73).

Em outro ensaio clínico, foi observado que administração de 1,25(OH)₂D₃ reduziu a pressão arterial, além da atividade da renina plasmática e dos níveis de angiotensina II (74).

No entanto, ainda é preciso avaliar os efeitos da suplementação de 25(OH)D em estudos de base populacional e também em subgrupos específicos na prevenção da hipertensão arterial, além de analisar o *status* da vitamina D necessário em diferentes populações para garantir o benefício máximo desta na pressão arterial.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidências recentes demonstram que a insuficiência da vitamina D pode estar relacionada ao diabetes melito, à obesidade e à hipertensão. Entretanto, estudos prospectivos e de intervenção em humanos que comprovem a efetividade da adequação do *status* da vitamina D,

tanto na prevenção como no tratamento dessas doenças, ainda são escassos. Mais ainda, a compreensão dos mecanismos exatos pelos quais a 25(OH)D ou a forma ativa 1,25(OH)₂D₃ promovem melhor funcionamento das células- β , do sistema renina-angiotensina e da regulação da quantidade de gordura corporal são também incompletos.

Contudo, considerando que a insuficiência de vitamina D é comumente observada e que há importantes lacunas no conhecimento sobre a ação dessa vitamina em relação à prevenção e ao tratamento de doenças endocrinometabólicas, a investigação da adequação do *status* da vitamina D nessas situações deve ser objeto de futuras pesquisas.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29(6):726-76.
2. Heaney RP, Armas LAG, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. *Am J Clin Nut.* 2008; 87(6):1738-42.
3. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(4):339-414.
4. James WP. 22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D. *Nut Rev.* 2008;66(5):286-90.
5. Peterlick M, Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest.* 2005;35(5):290-304.
6. Prentice A, Goldberg G, Schoenmakers I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am J Clin Nut.* 2008;88(2):500S-506S.
7. Mosekilde L. Vitamin D and the elderly. *Clin Endocrinol.* 2005; 62(3):265-81.
8. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr.* 2005;135(2):317-22.
9. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int.* 1997;7(5):439-43.
10. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med.* 2002;112(8):659-62.
11. Vieth R, Ladak Y, Walsh PG. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):185-91.
12. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev.* 2005;10(2):94-111.
13. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araújo LM, Vieira JGH, Kunii I, et al. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25 hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of São Paulo (23° 0' 34'S), Brazil. *Osteoporos Int.* 2005;16(12):1649-54.
14. de Souza Genaro P, de Paiva Pereira GA, de Medeiros Pinheiro M, Szejnfeld VL, Araújo Martini L. Relationship between nutrient

- intake and vitamin D status in osteoporotic women. *Int J Vitam Nutr Res*. 2007;77(6):376-81.
15. Peters BSE, 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.
 16. Maeda SS, Kuni IS, Hayashi L, Lazaretti-Castro M. The effects of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(12):1653-9.
 17. Zemel MB. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *J Nutr*. 2003;133:252S-256S.
 18. Levy J. Abnormal cell calcium homeostasis in type 2 diabetes mellitus: a new look on old disease. *Endocrine*. 1999;10(1):1-6.
 19. Gregori S, Giarratana N, Smirlando S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002;51(5):1367-74.
 20. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2008;93(6):512-7.
 21. Hyppönen E, Lärä E, Reunanen A, Järvelin M-R, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001;358(9292):1500-3.
 22. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):820-5.
 23. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2017-29.
 24. Ishida H, Norman AW. Demonstration of a high affinity receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat pancreas. *Moll Cell Endocrinol*. 1988;60(2-3):109-17.
 25. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J*. 2003;17(3):509-11.
 26. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV, Chan SL, Squires PE, et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D3- α -hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90(1-5):121-5.
 27. Ismail A, Namala R. Impaired glucose tolerance in vitamin D deficiency can be corrected by calcium. *J Nutr Biochem*. 2000;11(3):170-5.
 28. Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol*. 1999;160(1):87-95.
 29. Ayesha I, Bala TS, Reddy CV, Raghuramulu N. Vitamin D deficiency reduces insulin secretion and turnover in rats. *Diabetes Nutr Metab*. 2001;14(2):78-84.
 30. 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.
 31. Scragg R, Sowers M, Bell C; Third National Health and Nutrition Examination Survey. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*. 2004;27(12):2813-8.
 32. Orwoll E, Riddle M, Prince M. Effects of vitamin D on insulin and glucagon secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 1994;59(5):1083-7.
 33. Mathieu C, Van Etten E, Gysemans C, Decallonne B, Kato S, Laureys J, et al. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res*. 2001;16(11):2057-65.
 34. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia*. 1995;38(10):1239-45.
 35. Morris KL, Zemel MB. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obes Res*. 2005;13(4):670-9.
 36. Liu E, Meigs JB, Pittas AG, McKeown NM, Economos CD, Booth SL, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with markers of the insulin resistant phenotype in nondiabetic adults. *J Nutr*. 2009;139(2):329-34.
 37. Mattila C, Knekt P, Männistö S, Rissanen H, Laaksonen MA, Montonen J, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and subsequent risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30(10):2569-70.
 38. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract*. 2003;57(4):258-61.
 39. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*. 2006; 29(3):650-6.
 40. de Boer IH, Tinker LF, Connelly S, Curb JD, Howard BV, Kestenbaum B, Larson JC, Manson JE, Margolis KL, Siscovick DS, Weiss NS; Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of incident diabetes in the Women's Health Initiative. *Diabetes Care*. 2008;31(4):701-7.
 41. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care*. 2007;30(4):980-6.
 42. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. 2002;346(6):393-403.
 43. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(1):157-61.
 44. Snijder MB, van Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, et al. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):4119-23.
 45. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest*. 1985;76(1):370-3.
 46. Kimmons JE, Blanck HM, Tohill BC. Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults. *Med Gen Med*. 2006;8(4):59.
 47. Ni Z, Smogorjewski M, Massry SG. Effects of parathyroid hormone on cytosolic calcium of rat adipocytes. *Endocrinology*. 1994;135(5):1837-44.
 48. Su X, Zemel MB. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(8):1305-11.
 49. Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev*. 2007; 66(1):40-6.
 50. Blumberg JM, Tzameli I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11205-13.
 51. Caan B, Neuhauser M, Aragaki A, Lewis CB, Jackson R, LeBoff MS, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of postmenopausal weight gain. *Arch Intern Med*. 2007; 147(9):893-902.
 52. Sneve M, Figenschau Y, Jorde R. Supplementation with cholecalciferol does not result in weight reduction in overweight and obese subjects. *Eur J Endocrinol*. 2008;159(6):675-84.

53. INTERSALT Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ*. 1988;297(6644):319-28.
54. Krause R, Bühring M, Hopfenmüller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet*. 1998;352(9129):709-10.
55. Resnick LM, Nicholson JP, Laragh JH. Calcium metabolism in essential hypertension: relationship to altered renin system activity. *Fed Proc*. 1986;45(12):2739-45.
56. Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M. Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1990;3(12 Pt 1):903-5.
57. Imaoka M, Morimoto S, Kitano S, Fukuo F, Ogiwara T. Calcium metabolism in elderly hypertensive patients: possible participation of exaggerated sodium, calcium and phosphate excretion. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1991;18(9):631-41.
58. Li YC. Vitamin D regulation of the rennin-angiotensin system. *J Cell Biochem*. 2003;88(2):327-31.
59. Kong J, Qiao G, Zhang Z, Liu SQ, Li YC. Targeted vitamin D receptor expression in juxtaglomerular cells suppresses renin expression independent of parathyroid hormone and calcium. *Kidney Int*. 2008;74(12):1577-81.
60. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;110(2):229-38.
61. Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 1989;13(6 Pt 2):954-9.
62. Merke J, Milde P, Lewicka S, Hugel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, et al. Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest*. 1989;83(6):1903-15.
63. Zehnder D, Bland R, Walker EA, Bradwell AR, Howie AJ, Hewison M et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(12):2465-73.
64. Scragg R, Sowers MF, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Healthy and Nutrition Examination Survey. *J Am Hyper*. 2007;20(7):713-9.
65. Martins D, Wolf M, Pan D, Zadshir A, Tareen N, Thadhani R, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Healthy and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*. 2007;167(11):1159-65.
66. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2008;168(11):1174-80.
67. Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis*. 2008;1-6.
68. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension*. 2007;49(5):1063-9.
69. Forman JP, Curhan GC, Taylor EN. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension among young women. *Hypertension*. 2008;52(5):828-32.
70. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH₂)D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney Int*. 2008;74(2):170-9.
71. Thierry-Palmer M, Cephas S, Muttardy FF, Al-Mahmoud A. High dietary cholecalciferol increases plasma 25-hydroxycholecalciferol concentration, but does not attenuate the hypertension of Dahl salt-sensitive rats fed a high salt diet. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;111(1-2):7-12.
72. Lind L, Wengle B, Ljunghall S. Blood pressure is lowered by vitamin D (alphacalcidol) during long-term treatment of patients with intermittent hypercalcemia. A double-blind, placebo-controlled study. *Acta Med Scand*. 1987;222(5):423-7.
73. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of short-term vitamin D₃ and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(4):1633-7.
74. Kimura Y, Kawamura M, Owada M, Oshima T, Murooka M, Fujiwara T, et al. Effectiveness of 1,25-dihydroxyvitamin D supplementation on blood pressure reduction in pseudohypoparathyroidism patient with high renin activity. *Intern Med*. 1999;38(1):31-5.

**A new vitamin D cutoff for the association between extra-bone
25(OH)D₃ insufficiency and abdominal obesity**

Artigo Original

Submetido ao Annals of Nutrition & Metabolism (anexo IV)

**A NEW VITAMIN D CUTOFF FOR THE ASSOCIATION BETWEEN EXTRA-BONE
25(OH)D₃ INSUFFICIENCY AND ABDOMINAL OBESITY**

Natielen Jacques Schuch, Vivian Cristina Garcia, Sandra Roberta Gouveia Ferreira Vívol, Lígia
Araújo Martini

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

Author for correspondence

Ligia A Martini, PhD - lmartini@usp.br

Nutrition Department – School of Public Health – USP

Av Dr Arnaldo, 715, CEP 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil

Phone: 55 11 3061-7859

Fax: 55 11 3061-7771

Short title: Relationship between Vitamin D and Waist Circumference.

ABSTRACT

Background/Aims: Considering that abdominal obesity is the central role for several chronic diseases, the aim of the present study was to determine a new vitamin D cutoff and to investigate the association between extra-bone insufficiency and elevated waist circumference (WC) in an adult population. **Methods:** A single blood sample for biochemical parameters and anthropometric measurements were undertaken. ROC curve were used to define the appropriate 25(OH)D₃ cutoff for elevated WC. **Results:** 372 individuals participated in the study. Mean age was 51 (15) years, WC 94 (13) cm and BMI 29 (6) kg/m². Mean 25(OH)D₃ and PTH were 56 (18) nmol/l and 42 (21) pg/ml, respectively. From the ROC curve, a 25(OH)D₃ ≥ 52.6 nmol/l was significantly discriminated between individuals with and without elevated WC, where people with 25(OH)D₃ levels close to this cutoff presented the higher WC values. The correlation between 25(OH)D₃ and WC was significant among all participants ($r = -0.106$; $p = 0.05$). However, when this analysis was stratified by gender, it was statistically significant only in men ($r = -0.187$; $p = 0.043$). Correlations between 25(OH)D₃ and PTH ($r = -0.153$; $p = 0.005$) were observed in all participants. Based on this new cutoff for 25(OH)D₃, the prevalence of vitamin D insufficiency among individuals was only 45%. **Conclusion:** The study demonstrated a negative association between 25(OH)D₃ levels and abdominal obesity, thus suggesting that this new vitamin D cutoff is relevant to indicate potential risks for the development of several chronic diseases related to obesity.

Key words – Abdominal Obesity, Vitamin D, Parathyroid hormone.

INTRODUCTION

Vitamin D is well recognized to have an essential role in bone metabolism and calcium homeostasis. In addition, recent evidences have suggested that this vitamin is involved in several extra-bone metabolisms and in various chronic diseases, including obesity [1-5].

It has been estimated that one billion people around the world present vitamin D insufficiency or deficiency. This is observed even in countries with high insolation, where mostly adults and elderly people are affected [6, 7]. Other factors such as latitude, season, and time of day have influence on vitamin D production in the skin. Furthermore, sunscreen use, melanin levels in the skin, types of clothing, and high atmospheric pollution levels may also reduce skin exposure to UVB radiation, thus giving rise to the decreased synthesis of vitamin D.

It has been proposed that the low levels of 25(OH)D₃ observed in obese individuals are related to the decreased hormonal bioavailability due to the sequestration of 25(OH)D₃ in body fat [8-10]. Snijder et al. [11], in the Longitudinal Aging Study Amsterdam, observed that a higher skinfold sum, as well as percentage of body fat were strongly associated with a lower 25(OH)D₃ concentration and a higher PTH concentration. Subsequently, the evaluation of 25(OH)D₃ concentration in men and women enrolled in NHANES III showed that only in pre and postmenopausal women there was a negative association between vitamin D and body mass index (BMI) [12].

Over recent decades, it has been considered that abdominal obesity explains a greater variance in obesity-related health risk and that waist circumference (WC) is a useful measurement to estimate abdominal fat [13, 14]. Numerous studies have shown strong associations between WC and risk factors for cardiovascular disease [15-18]. Furthermore, WC

is considered a robust predictor for the prevalence of metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular disease.

In addition, several researchers have observed important associations between vitamin D and chronic diseases [3-5, 19]. The Cutoff values for adequacy and insufficiency of serum 25(OH)D₃ are based in the level that an increase in parathormone concentration is observed, since it is a well-known marker for bone metabolism. However, a vitamin D cutoff value able to detect extra-bone disturbances has still not been evaluated.

Therefore, the present study was undertaken in order to evaluate the association between abdominal obesity and serum concentration of 25(OH)D₃, by using a new specific cutoff for vitamin D insufficiency, in adults and elderly people living in the city of São Paulo, Brazil (23°3'S). Hereby, a new vitamin D cutoff focused on the prevalence of high WC values is suggested in this work.

Research design and methods

Subjects

This was a cross sectional study carried out between August 2007 and January 2009 that included all seasons over these months. Initially, 462 individuals were selected from the Primary Diabetes Mellitus prevention campaigns coordinated by the Healthcare Unit at the School of Public Health, University of Sao Paulo, and from the Adult Health Survey of the City of São Paulo (ISA-SP). Based on the exclusion criteria study, the presence of chronic illnesses that potentially alter the vitamin D metabolism, use of medications known to affect bone metabolism, Afro-descendants, pregnant women, breastfeeding women, and use of vitamin supplements, 372 participants were eligible to participate in this work. A signed consent form was obtained from

all participants. The ethics committee of the School of Public Health, University of São Paulo, approved the study protocol.

Anthropometry

Body weight to the nearest 0.1 kg and standing height to the nearest 0.1 cm were measured using a Tanita[®] electronic scale (Tanita Corporation of America Inc, Illinois, USA) and Seca[®] stadiometer (Seca, Hamburg, Germany). Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Waist circumference (WC) was measured to the nearest 0.1 cm using a steel measuring tape at the level of the iliac crest at the end of the normal expiration phase. The participants were divided into two groups (normal and elevated waist circumference), in accordance with the waist circumference classification criteria of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) [20]. The BIA (Bioelectrical Impedance Analyzer 101Q; RJL Systems Inc., Detroit, MI, USA) was used to check the body composition of all participants. Blood pressure was measured three times using the Omron[®] automated digital blood pressure meter (Omron model HEM-712C, Omron Health Care, Inc, USA), while the subjects were seated, after a five-minute rest. The average from all the available readings was used in the analyses. The subjects were asked about their use of sunscreen and outdoor practicing of physical activity.

Laboratory measurements

A blood sample was obtained from each individual by means of venipuncture after an overnight fast, and it was immediately centrifuged, aliquoted and frozen at -80°C until analysis. Serum levels of 25(OH)D₃ were measured using high performance liquid chromatography

(HPLC) (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). Serum intact parathyroid hormone (PTH) was measured using an electrochemiluminescence assay (Roche Diagnostics™, São Paulo, SP, Brazil) to determine the PTH levels: the intra and interassay CVs were both 6% with a reference range of 10-65 pg/ml. Serum total calcium was measured by colorimetric assay (Bioclin™, Belo Horizonte, Brazil), for which the normal range was 8.6-10.2 mg/dl. Plasma creatinine was analyzed using a colorimetric assay (Celm™, Barueri, São Paulo, Brazil), for which the normal range until 1.2 mg/dl. Fasting glucose, HDL cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic colorimetric assay (Celm™, Barueri, Brazil). For these parameters, the normal values for diagnosing metabolic syndrome were based on those established by NCEP-ATP III. Plasma insulin was assayed by chemiluminescence detection (IMMUNOLITE® commercial kit, Siemens Health Diagnostics, Deerfield, USA). Insulin resistance was estimated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) equation, calculated as (fasting glucose, mmol/l) X (fasting insulin, mU/ml)/22.5; and HOMA-β-cell function was obtained using the formula $[20 \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL})] / [\text{fasting glucose (mmol/l)} - 3.5]$, as described by Matthews (1985) [21].

Statistical analysis

Each variable was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test to determine whether this distribution was normal. Logarithmic transformation was performed to obtain normal distribution for skewed variables (PTH, BMI, triacylglycerol and HDL-cholesterol). Student t test was used to compare means between groups with and without elevated WC. The Roc curve was used to define the appropriated cutoff for 25(OH)D₃ concentration in relation to elevated WC according to both IDF and NCEP ATP III criteria. Pearson's correlation was used to evaluate the goodness of the linear fit between the variables. The analyses were conducted using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software for Windows, version 18 (SPSS

Inc., Chicago, IL, USA) and the Statistical Analysis System vs. 8.02 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Results were taken to be statistically significant when p values were < 0.05. The data were expressed as the mean (with SD).

Results

As presented in Table 1, a total of 372 individuals (234 women) were enrolled in the present evaluation. The mean age was 51 (15) years and the mean BMI was 29 (6) kg/m². The mean 25(OH)D₃ and PTH concentrations were 56 (18) nmol/l and 42 (21) pg/ml, respectively. As expected, stratifying the individuals according to WC, the mean age, as well as BMI, fat mass, triglycerides, fasting glucose, diastolic blood pressure, HOMA-β, and HOMA-IR were significantly higher among individuals with elevated WC. However, the mean 25(OH)D₃ was significantly lower among those with normal WC (p < 0.009), and the PTH concentrations were higher among individuals with elevated WC (p = 0.015).

In Figure 1 is shown the new cutoff determined by Roc curve analysis for the association between vitamin D and waist circumference, according to NCEP ATP III criteria. This result indicates that the level of 25(OH)D₃ is 52.6 nmol/l, since it was the value that allowed us to significantly discriminate between subjects with and without elevated waist circumference. The new vitamin D cutoff presented a surface under the curve at 58.3% (CI 95% = 52.4 – 64.2, p = 0.006). According to this value, 45% of the individuals presented inadequate levels of this vitamin.

Considering the whole sample, 20% of the individuals presented normal WC and serum 25(OH)D₃ levels. On the other hand, 22% had elevated WC and vitamin D insufficiency. This difference was statistically significant (p < 0.002). Then, the participants were dichotomized by using the cutoff for healthy bone (75 nmol/l). As expected, the prevalence of individuals with

vitamin D insufficiency increased to 85%, whereas it was 5% among those with normal WC and serum 25(OH)D₃ levels, and 47% among those with elevated WC and vitamin D insufficiency ($p = 0.046$).

In parallel, another cutoff was evaluated by Roc curve analysis considering the association between vitamin D and waist circumference for IDF criteria. Interestingly, the results indicated a very similar vitamin D cutoff (a surface under the curve at 60.2%, CI 95% = 52.2 – 68.1, $p = 0.013$).

In relation to sunscreen use and outdoor practicing of physical activity, 58% of individuals reported that they were exposed to sunlight only at times of low incidence of ultraviolet radiation, or never were exposed to the sun. On the other hand, 27% were exposed between 10:00 am to 4:00 pm, and 24% practiced outdoor physical activities while exposed to the sun, but among these only 23% used sunscreen. No difference in 25(OH)D₃ was found between individuals who reported that they did and did not use sunscreen.

Significant correlations were observed between the serum levels of 25(OH)D₃ and total cholesterol ($r = 0.510$; $p = 0.000$), as well as for the serum levels of 25(OH)D₃ and triglycerides (TG) ($r = 0.483$; $p = 0.000$). Taking these correlations into account, the data were further adjusted for total cholesterol and TG. The results indicate that negative correlations occurred between vitamin D and PTH ($r = -0.153$; $p = 0.005$), as well as for vitamin D and WC ($r = -0.106$; $p = 0.05$) in all participants of this work. However, gender classification showed a statistically significant negative correlation between vitamin D and WC ($r = -0.187$; $p = 0.043$), and only a tendency between vitamin D and HDL cholesterol ($r = 0.171$; $p = 0.06$) in men with no significant correlation in women.

Discussion

Abdominal obesity is involved in a cascade of metabolic abnormalities related to overweight or obesity, including metabolic syndrome, insulin resistance and cardiovascular disease. The present study demonstrated that 25(OH)D₃ has an extra-bone role in abdominal obesity in individuals living in a middle latitude city, thereby emphasizing the relationship between adiposity and serum vitamin D concentration, since waist circumference is a better marker for abdominal fat accumulation than body mass index (BMI) [14]. Furthermore, by using this new cutoff for vitamin D insufficiency, it allows us to statistically discriminate the border line related to the risk for obesity development in subjects with and without elevated WC.

In the sense of confirming the usefulness of this new cutoff, we have evaluated the association between vitamin D with two different data base for waist circumference (IDF and NCEP ATP III). Interestingly, both cutoffs determinate by each Roc curve were equal, thus indicating that the calculated vitamin D concentration of 52.6nmol/l is the border line for the risk of developing elevated waist circumference.

In fact, the results are in agreement with previous work of McGill et al. (2008) [22], which enrolled 250 (18-year-old) New Zealanders, with a BMI of 35 (5) kg/m². They reported a decrease of 0.29 nmol/l ($p = 0.01$) in serum 25(OH)D₃ for each increase of 1 cm in waist circumference. Additionally, Cheng et al. (2009) [23] investigated the relationship between serum 25(OH)D₃ concentrations and cardiometabolic risk index in 3,890 non-diabetic individuals. They observed an association ($p = 0.004$) between 25(OH)D₃ and anthropometric measurements, including waist circumference, even after excluding potential confounders, such as age, sex, and winter season.

However, in the presented study, we showed that these relationships were observed at a lower range of BMI, i.e. 29 (5), being men more affected than women. This is a noteworthy observation, considering the importance of the association between gender differences in abdominal adiposity and the risk of chronic diseases, since males tend to accumulate more abdominal fat [24]. Consistent with this data, previous studies have indicated that vitamin D insufficiency in obese individuals is caused by decreased bioavailability secondary to deposition of vitamin D in body fat compartments [25], especially in visceral fat stores [23].

At the end of the 1940s raised the first observations that regional distribution of body fat is one of the most important complications correlated to obesity [26]. Thirty years later, Kissebah et al. [27] showed simultaneous metabolic and epidemiological data that confirmed the notion that the proportion of abdominal fat was a key factor that really correlate with diabetogenic and atherogenic metabolic abnormalities. Since then, the health consequences of elevated abdominal obesity have been investigated all over the world. Today, the regional distribution of fat, and specifically, the abdominal obesity quantified by the waist circumference measurement, as an anthropometric index for abdominal fat deposition, is considered to be a predictor of chronic diseases, such as diabetes and cardiovascular diseases at any BMI level. Therefore, it is clearly demonstrated the importance for evaluating metabolic factors related to abdominal obesity.

Although there is evidence that excess of body fat is associated with an increased risk for suboptimal vitamin D status [28, 29], it is still unclear to what extent the poor vitamin D status is a consequence of obesity or if it is, in some way, involved in its development. The current hypothesis is that, since vitamin D is a fat-soluble vitamin, the sequestration of vitamin D metabolites in fat compartments decreases their bioavailability, especially in obese individuals [30]. This was confirmed by Worstman et al. [25], in a study with healthy white obese

individuals [(BMI; in kg/m^2) ≥ 30], and matched lean control subjects (BMI ≤ 25), who received either whole-body ultraviolet radiation or an orally pharmacological dose of vitamin D₂. It was found that the obesity-associated vitamin D insufficiency was probably due to the decreased bioavailability of vitamin D₃ from cutaneous and dietary sources, due to its deposition in body fat compartments.

However, it is suggested that secretion of both PTH and 1,25(OH)D₂D₃ vary inversely with calcium uptake, thereby modulating the lypogenesis/lypolysis, as well as regulating the triglycerides stocks from the intracellular variation of calcium inside adipocytes (31).

Another possibility raised by recent studies based on pre-adipocyte cultures is that the role of 25(OH)D₃ in inhibiting adipogenesis at the molecular level is mediated through inhibition of vitamin D receptors (VDRs) and expression of the master regulator of adipogenesis, i.e. peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR γ), thereby reducing its activity [33]. As a consequence, depletion of vitamin D stores may lead to excess the differentiation of pre-adipocytes to adipocytes [32].

In the present study, when the bone cutoff was used, 85% of the subjects were classified as vitamin D insufficient. However, when the proposed cutoff for serum 25(OH)D₃ was applied, the prevalence of vitamin D insufficiency decreased to 45%. Therefore, the results indicate that this new cutoff for 25(OH)D₃ is important for evaluating the fine tuning existing in association to vitamin D insufficiency and obesity. Until now, no study has evaluated vitamin D insufficiency as a specific outcome marker to discriminate subjects with or without elevated WC. However caution is recommended when using the proposed cutoff value, since more studies are necessary to confirm its usefulness in other population.

Investigations on 25(OH)D₃ inadequacy in epidemiological studies have demonstrated alarming results. Ginde et al. (2009) [35] evaluated data from NHANES that marked a decrease in mean serum 25(OH)D₃ levels from 1988-1994 to 2001-2004, and a corresponding increase in vitamin D insufficiency across all demographic strata. In the 2001-2004 survey, only 23% of the US adolescent and adult population had serum 25(OH)D₃ levels of 30 ng/ml or more, which is the minimum level that seems to be necessary for general health benefits [36-10]. This analysis described a much higher prevalence (77% during NHANES 2001-2004) of vitamin D insufficiency in the US population than had previously been reported [37, 38].

Since the exposure to UV-B rays is the primary determinant of vitamin D status in humans, the absence of exposure to sunlight seems to be the main cause for the increasing prevalence of vitamin D insufficiency. In our data, 24% of the individuals reported practicing outdoor physical activities with sun exposure, and only 23% of them used sunscreen.

Although widespread campaigns for sunscreen use and sun avoidance have reduced the incidence of skin cancers, sunscreen with a sun protection factor of 15 also decreases vitamin D₃ synthesis by 99% [39]. Increased sunscreen use with a higher sun protection factor has probably contributed towards the reported trend of lower 25(OH)D₃ levels in the general population. In addition, decreased outdoor activity levels and obesity have been associated with vitamin D insufficiency. Worstman (2000) [25] and Scragg (2008) [40] reported that the increased inactivity and obesity in the US population is likely to have contributed towards the observed rise in vitamin D insufficiency.

Thus, other cross-sectional studies, such as the present one, are important for generating knowledge for further research, although these cannot establish cause-and-effect relationships. Moreover, it is important to consider that the sample enrolled in this work was not homogeneous

in terms of age, percentages of overweight and obese individuals, as well as it also presents different ethnic background.

In conclusion, it is demonstrated that there is a negative association between 25(OH)D₃ concentration and abdominal obesity, thus suggesting that vitamin D may play a role for the deterioration of the cardiometabolic profile. Therefore, the present study helps to provide new information to the field regarding vitamin D classification, since the determination of this new cutoff value for extra-bone 25(OH)D₃ insufficiency has a significant importance for further researches focused on the effects of abdominal obesity.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (under protocol n^o 2009/52636-0). The authors state no conflict of interest.

References

1. Darwish H & DeLuca HF: Vitamin D regulated gene expression. Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression 1993; 3:39-116.
2. DeLuca HF: The vitamin D story: A collaborative effort of basic science and clinical medicine. FASEB J 1988; 2:224-236.
3. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW: The role the vitamin D endocrine system in health and disease. N Engl J Med 1989; 320:980-991.
4. Pereira MA, Jacobs DR, Jr., Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. JAMA 2002; 287:2081-9.
5. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S: Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. Diabetes Care 2005; 28:1228-30.
6. Holick MF: Vitamin D deficiency in 2010: health benefits of vitamin D and sunlight: a D-bate. Nat Rev Endocrinol 2011; 7(2):73-5.

7. Lips P, Duong T, Oleksik A, et al.: A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1212-21.
8. Buffington C, Walker B, Cowan GS Jr, Scruggs D: Vitamin D deficiency in the morbidly obese. *Obes Surg* 1993; 3:421-4.
9. Hamoui N, Anthone G, Crookes PF: Calcium metabolism in the morbidly obese. *Obes Surg* 2004; 14:9-12.
10. Holick MF: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-81.
11. Snidjer MB, van Dam RM, Visser M. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4119-4123.
12. Kimmons JE, Blanck HM, Tohill BC: Associations between Body Mass Index and the Prevalence of Low Micronutrient Levels among US Adults. *Med Gen Med* 2006; 8(4): 59.
13. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R: Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 200; 79(3), 379-384.
14. Després JP, Arsenault BJ, Cartier MCA, Lemieux I: Abdominal obesity: The cholesterol of the 21st century? *Can J Cardiol* 2008; 24(Suppl D):7D-12D.
15. Foucan L, Hanley J, Deloumeaux J, Suissa S: Body mass index (BMI) and waist circumference (WC) as screening tools for cardiovascular risk factors in Guadeloupean women. *J Clin Epidemiol* 2002; 55:990-6.
16. Moreno LA, Pineda I, Rodriguez G, Fleta J, Sarria A, Bueno M: Waist circumference for the screening of the metabolic syndrome in children. *Acta Paediatr* 2002; 91:1307-12.
17. Rheeeder P, Stolk RP, Veenhouwer JF, Grobbee DE: The metabolic syndrome in black hypertensive women—waist circumference more strongly related than body mass index. *S Afr Med J* 2002; 92:637-41.
18. Hwu CM, Fuh JL, Hsiao CF, et al.: Waist circumference predicts metabolic cardiovascular risk in postmenopausal Chinese women. *Menopause* 2003;10:73-80.
19. Heaney RP, Holick MF: Why the IOM recommendations for vitamin D are deficient. *J Bone Miner Res* 2011; 26(3):455-7.
20. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F: American Heart Association; National

Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 25; 112(17):2735-52.

21. Mattheus D, Hosjer J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R: Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 421-419.

22. McGill AT, Stewart JM, Lithander FE et al. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutr J* 2008; 7:412–421.

23. 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* 2009; 59:242–248.

24. Johnson LK, Hofsø D, Aasheim ET, Tanbo T, Holven KB, Andersen LF, Røislien J, Hjeltnes J: Impact of gender on vitamin D deficiency in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *European Journal of Clinical Nutrition* 2011; 1–8. doi: 10.1038/ejcn.2011.140.

25. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC et al.: Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:690–693.

26. Vague J: Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *Presse Méd* 1947; 30:339-40.

27. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW: Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54(2):254-60.

28. Florez H, Martinez R, Chacra W, Strickman-Stein N, Levis S: Outdoor exercise reduces the risk of hypovitaminosis D in the obese. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:679–681.

29. Hypponen E, Power C: Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity. *Diabetes Care* 2006; 29:2244–2246.

30. Zemel MB: Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: Implications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Molecular and cellular biochemistry* 1998; 188:129-136.

31. Foss YJ: Vitamin D deficiency is the cause of common obesity. *Medical Hypotheses* 2009; 72(3):314-321.
32. Ni Z, Smogorjewski M & Massry SG: Effects of parathyroid hormone on cytosolic calcium of rat adipocytes. *Endocrinology* 1994; 135:1837-1844.
33. Wood, RJ: Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutrition Reviews* 2007; 66(1):40–46.
34. Blumberg JM, Tzamelis I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 2006; 281(16):11205-13.
35. Ginde A, Liu MC, Camargo Jr CA. Demographic Differences and Trends of Vitamin D Insufficiency in the US Population, 1988-2004: *Arch Intern Med* 2009; 169(6):626-632
36. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B: Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(1):18-28.
37. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR: Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone* 2002; 30(5):771-777.
38. Zadshir A, Tareen N, Pan D, Norris K, Martins D: The prevalence of hypovitaminosis D among US adults. *Ethn Dis* 2005; 15(4) (suppl 5):S5-97-S5-101.
39. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF: Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 64(6):1165-1168.
40. 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):577-586.

Table 1 - Characteristics of evaluated individuals with normal and elevated WC.

	Total sample n=372	Normal WC n=158	Elevated WC n= 211	p-value
Age (years)	51 (15)	48 (16)	53 (19)	0.002
BMI (kg/m ²)	29 (6)	25 (3)	32 (5)	0.000
Waist circumference (cm)	97 (14)	87 (9)	104 (12)	0.000
Triglycerides (mmol/l)	133 (73)	118 (73)	146 (71)	0.000
Fasting glucose (mmol/l)	93 (12)	92 (12)	95 (12)	0.005
SBP (mmHg)	130 (20)	128 (19)	132 (20)	NS
DBP (mmHg)	79 (12)	77 (11)	81(12)	0.001
Fat mass %	33 (10)	26 (8)	38 (7)	0.000
HOMA-β	114 (93)	93 (72)	129 (103)	0.000
HOMA-IR	2 (1.5)	1.5 (1.4)	2.4 (1.5)	0.000
25(OH)D ₃ (nmol/l)	56 (18)	54 (19)	59 (17)	0.009
PTHi (pg/ml)	42 (21)	39 (21)	44 (21)	0.015

Abbreviations: BMI – body mass index; SBP – systolic blood pressure; DBP – diastolic blood pressure; HOMA insulin resistance; HOMA β cell function; iPTH – intact parathyroid hormone. Data are expressed as means (with SD).

Figure 1 - Receiver operating characteristics curve for the association between vitamin D concentration and waist circumference data according to NCEP ATP III criteria. The cutoff of 52.6nmol/l for vitamin D concentration significantly discriminated subjects with and without elevated waist circumference.

Figure 2 - Receiver operating characteristics curve for the association between vitamin D concentration and waist circumference data according to IDF criteria. The cutoff of 52.6nmol/l for vitamin D concentration significantly discriminated subjects with and without elevated waist circumference.

ARTIGO 3:

“Relationship between VDR gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome”.

Artigo Original

A ser Submetido

RELATIONSHIP BETWEEN VDR GENE POLYMORPHISMS AND THE COMPONENTS OF METABOLIC SYNDROME

Natielen Jacques Schuch, Vivian Cristina Garcia, Sandra Roberta Gouveia Ferreira Vívol, Lígia Araújo Martini.

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

Author for correspondence

Ligia A Martini, PhD - lmartini@usp.br

Nutrition Department – School of Public Health – USP

Av Dr Arnaldo, 715, CEP 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil

Phone: 55 11 3061-7859

Fax: 55 11 3061-7771

ABSTRACT

Background/Aims - The vitamin D receptor gene (VDR) is expressed in many tissues and when it is in its activated form modulates the expression of several genes. The aim of the present study was to investigate the potential association between metabolic syndrome (MetSyn) with the presence of FokI or BsmI polymorphisms in VDR gene in Brazilian adult. **Methods** - In a cross-sectional study, 243 Brazilian adult individuals were included. MetSyn was classified using the criteria proposed by NCEP-ATP III. Insulin resistance and β cell secretion were estimated by calculating HOMA IR and HOMA β , respectively. The BsmI (A/G rs1544410) and FokI (C/T rs2228570) polymorphisms were detected by enzymatic digestion with specific enzymes and confirmed by allele specific PCR (ASPCR) or amplification of refractory mutation (ARM) in individuals with or without MetSyn. **Results** - In patients with MetSyn, there is no association among BsmI polymorphism and components of MetSyn, HOMA IR and β , 25(OH)D₃, and PTH. However, subjects without MetSyn, but with homozygosis for BsmI polymorphism (recessive bb genotype), presented lower levels of 25(OH)D₃ than those with normal BB genotype. In addition, individuals with MetSyn and heterozygosis for FokI polymorphism (Ff genotype) have higher concentrations of PTH and HOMA β than those with normal FF genotype. In this same group, subjects with the recessive ff genotype have higher insulin resistance than those with Ff genotype. On the other hand, patients without MetSyn, but carrying the Ff genotype, have higher concentration of triglycerides and lower levels of HDL than those with FF genotype. Interestingly, the presence of one allele f in the genotype (Ff or ff) is apparently enough to increase triglycerides levels and insulin resistance, when compared to the normal FF genotype. **Conclusion** - The results show that FokI polymorphism in the VDR gene is associated to insulin resistance and higher concentrations of PTH in patients with MetSyn. Moreover, BsmI polymorphism is related to a lower concentration of 25(OH)D₃ in individuals without MetSyn. Therefore, the results indicated that VDR gene polymorphisms are associated to different phenotypes of MetSyn components.

Descriptors: Vitamin D, parathyroid hormone, receptor of vitamin D, metabolic syndrome.

Introduction

The actions of vitamin D in bone metabolism are already well established. There is increasing evidences showing the extra-skeletal effects of this vitamin and its role in various metabolic processes and gene regulation (1, 2). Recently, several lines of research have suggested nontraditional roles for vitamin D and PTH in conditions frequently observed in metabolic syndrome (MetSyn), including reduced insulin secretion and sensitivity (3, 4), obesity (5, 6), diabetes (7-10), and hypertension (11, 12). The mechanisms underlying the role of vitamin D in MetSyn remain incompletely explained. However, the effects of vitamin D are mediated by genomics and non-genomics routes (13).

The biological effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ are mediated by the nuclear vitamin D receptor (VDR). It has been hypothesized the involvement of VDR in various cells types and its possible modulation on the expression of several genes (14). Molecularly, vitamin D exerts its function by inhibiting or stimulating transcription of target genes after binding to VDR that binds to response elements of vitamin D (VDRE), usually through the formation of heterodimer with the retinoid X receptor. Several polymorphisms have described for the VDR gene. The most studied are ApaI (C/T rs7975232), BsmI (A/G rs1544410), FokI (C/T rs 2228570), and TaqI (T/C rs 731236). It has been demonstrated that polymorphisms in VDR gene is associated with type 2 diabetes mellitus and insulin secretion (15, 16), as well as with metabolic changes related to obesity (17).

Although relationship between vitamin D insufficiency and MetSyn was demonstrated by other researches (18 -20), few studies have shown the role of VDR polymorphisms in such condition (21, 22, 17). Thus, the aim of the present study is to find whether there is an association between the BsmI (A/G rs1544410) or FokI (C/T rs2228570) polymorphisms and the components of MetSyn in Brazilian adults.

Subjects and methods

Subjects

This was a cross sectional study carried out between August 2007 and January 2009. Initially, 462 individuals were selected from Diabetes Mellitus prevention campaigns coordinated by the Primary Healthcare Unit at the School of Public Health, University of São Paulo, and from the Adult Health Survey of the City of São Paulo (ISA-SP). Based on the study exclusion criteria study, such as the presence chronic illnesses that potentially alter vitamin D metabolism, use of medications known to affect bone metabolism, Afro-descendants, pregnant women, breastfeeding women, and use of vitamin supplements, 372 participants were eligible to participate in this work. However, only 243 blood samples were collected for genotyping.

Anthropometric measurements

Body weight to the nearest 0.1 kg and standing height to the nearest 0.1 cm were measured using a Tanita[®] electronic scale (Tanita Corporation of America Inc, Illinois, USA) and Seca[®] stadiometer (Seca, Hamburg, Germany). Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Waist circumference (WC) was performed to the nearest 0.1 cm using a steel measuring tape at the level of the iliac crest at the end of a normal expiration. Blood pressure was measured three times in seated subjects after a 5-min rest with an automatic digital Blood pressure Omron[®] (Omron model HEM-712C, Omron Health Care, Inc, USA). The average of all available readings was used in analyses. The participants were divided in two groups, with and without MetSyn, according to criteria by National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP – ATP III) (23).

Laboratory measurements

Blood samples were obtained by venipuncture after an overnight fast and immediately centrifuged, aliquoted and frozen at -80°C until the beginning of analyses. Serum levels of 25(OH)D₃ were measured using High Performance Liquid Chromatography - HPLC (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). The serum intact parathyroid hormone (PTH) was evaluated using an electrochemiluminescence assay (Roche Diagnostics™, São Paulo, SP, Brazil); intra and interassay CVs were both 6% with a reference range of 10–65 pg/ml. Serum total calcium was measured by colorimetric assay (Bioclin™, Belo Horizonte, MG); normal range 8.6 – 10.2 mg/dl. Fasting glucose, total cholesterol and fractions, triglycerides were determined by enzymatic colorimetric assay (Celm™, Barueri, SP). For these parameters, the normal values established by the NCEP-ATP III were considered for diagnosis of MetSyn. Plasma insulin was assayed by using chemiluminescence (IMMUNOLITE® commercial kit, Siemens Health Diagnostics, Deerfield, USA). Insulin resistance was estimated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) equation, calculated as (fasting glucose, mmol/l)X(fasting insulin, mU/ml))/22.5; and HOMA-β-cell function, obtained using the formula $20 \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) / \{\text{fasting glucose (mmol/L)} - 3.5\}$, as described by Matthews (1985) (24).

DNA studies

Genomic DNA was extracted from whole blood using the *salting out* method described by Miller et al. (1988) (25). After extraction, the viability of the extracted material was visualized in 1% agarose gel and concentration was obtained by a spectrophotometer Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Genotyping of selected polymorphisms was

performed using a technique known as allele specific PCR (ASPCR) or amplification refractory mutation (ARMs) (26). This technique is based on the principle that the Taq polymerase does not have activity 3' to 5', so if a primer is designed with a mutated base at the 3' region, amplification should not occur. Thus, a standard experiment involves the design of three primers: a normal primer (NOR) used to amplify the allele without the mutation, a mutant primer (MUT) to amplify the allele with the mutation, and the common primer (COM) used as a reverse primer along with NOR or MUT primers used as direct. Both reactions (NOR / COM and MUT / COM) identify each sample as normal homozygous or mutant homozygous, if only one of the reactions result in a detectable product; or heterozygous if both reactions result in identifiable products. The detection of the products is made using fluorescence resonance energy (FRET) (27). When both are at a certain distance, or when there is amplification product, the fluorophore emission overlaps the spectrum, sending a signal to be captured by a fluorescence reader used for clustering and further identification genotypes.

Statistical analysis

The descriptive data were expressed as mean (standard deviation). The normality of the distribution of each variable was analyzed by Kolmogorov-Smirnov test. Logarithmic transformation was performed to obtain normal distribution for skewed variables (PTH, BMI, waist circumference, HOMA IR, HOMA β , triacylglycerol, HDL-cholesterol). The Student t test was used for comparison of groups means between with and without MetSyn. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to examine the variability of variables in genotypes and adjusted for age. Differences between groups (genotypes) were assessed using the Bonferroni LSD test (post-hoc test). Allelic frequencies were estimated by gene counting and genotype distribution of

polymorphisms and were tested against through Hardy - Weinberg equilibrium, by Chi-square analysis. Logistic regression analysis was performed to evaluate associations between clinical and genetic parameters. Gender, age, elevated waist circumference, increased glucose fasting levels, presence of arterial hypertension, increased triglycerides levels, decreased HDL cholesterol, increased total cholesterol levels, presence of MetSyn, HOMA IR and β , increased PTH, and 25(OH)D₃ levels were included as independent variable, and the presence or absence of polymorphisms was characterized as categorical dependent variable. Analyses were conducted with Package for the Social Science SPSS software for Windows, version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The statistical significance was assumed when p values were < 0.05.

Results

In this work, a total of 243 individual were included. The mean age was 51(15) years, being 39% male and 61% female. Mean BMI was 29(6) kg/m². MetSyn was present in 48% of the population. General characteristics of the whole sample and differences between individuals according to the presence of MetSyn are presented in Table 1. As expected, all variables were significantly higher in individuals with MetSyn, except the concentrations of HDL cholesterol. The mean of 25(OH)D₃ was significantly lower among those without MetSyn (p=0.003). No significant differences were observed in PTH and serum calcium concentrations.

Table 2 shows the genotype frequency in total sample. The frequency of the recessive ff genotype is higher among individuals with MetSyn, and the same occurs for the frequency of the heterozygous Bb genotype. The genotype frequencies of BsmI and FokI polymorphisms did not differ statistically for MetSyn status, thus demonstrating Hardy-Weinberg equilibrium.

Following this analysis, the associations between VDR gene polymorphisms, vitamin D status, and the components of MetSyn in individuals were evaluated separately according to the presence or absence of MetSyn. Table 3 shows the distribution of mean values of clinical variables according to the genotypes in individuals with MetSyn. No association between BsmI polymorphism was observed with the components of MetSyn, 25(OH)D₃, and iPTH. However, individuals carrying the recessive ff genotype presented a significantly higher insulin resistance index (HOMA-IR) than individuals with the heterozygous Ff genotype. Additionally, the presence of at least one f allele (Ff/ff genotypes) was related to a higher β -cell secretion (HOMA- β) and iPTH concentrations when compared to normal homozygous FF genotypes.

In the group of patients without MetSyn, significantly higher triglycerides and lower HDL levels were observed in individuals with Ff genotype, when compared with individual that presented the normal FF genotype. Moreover, the presence of homozygous recessive bb genotype for the BsmI polymorphism presented a lower concentration of 25(OH)D₃ in comparison to the heterozygous Bb genotype ($p=0.022$) (Table 4).

In relation to other anthropometric and biochemical parameters, such as diastolic and systolic blood pressure, glucose fasting and waist circumference, these were similar among carriers of all genotypes for both VDR gene polymorphisms here evaluated.

Analyzing all individuals by the presence of, at least, one f allele, the subjects with Ff/ff genotype have higher triglycerides levels (144(77) vs. 121(55), $p=0.016$), lower HDL cholesterol (43(11) vs. 47(12), $p=0.017$), and higher values of β cell secretion (HOMA β) (4.6(0.7) vs. 4.3(0.7), $p=0.02$) than the normal FF genotype. On the other hand, for BsmI genotype, the presence of, at least, one b allele, the subjects with Bb/bb genotype have higher levels of 25(OH)D₃ than the normal BB genotype (59(19) vs. 54(15), $p=0.028$).

The presence of FokI polymorphism (Ff/ff) was independently associated with HDL cholesterol concentration (odds ratio, 0.967, β = - .032; 95% CI = 0.945 – 0.993, p = 0.011) (table 5). It was not found any association between other anthropometrics or biochemical parameters with the presence of this polymorphism.

Discussion

The VDR gene is expressed in a large number of different tissues (28, 16). Among these different types of cells that respond to vitamin D are the adipocytes and pancreatic β -cells (21, 22). In this work we demonstrate that FokI and BsmI polymorphisms may influence the status of vitamin D and PTH, as well as the parameters described by the MetSyn in a sample of Brazilian adults. In individuals with MetSyn, the FokI polymorphism is apparently related to insulin sensibility and PTH concentration. In individuals without MetSyn, the same polymorphism may lead to higher triglycerides and lower HDL levels. Furthermore, the presence of BsmI polymorphism is associated to lower concentration of 25(OH)D₃ in subjects without MetSyn.

In addition to our findings, Oh and Barrett-Connor (2002) (22) evaluated the association between VDR polymorphisms with type 2 diabetes and MetSyn in 1545 older adults participants in the Rancho Bernardo Cohort. It was observed that persons with recessive bb genotype (BsmI polymorphism) showed significantly higher levels of HOMA-IR compared to those with normal homozygous BB or heterozygous Bb genotypes.

In the early 1980's, Norman et al (29) demonstrated that pancreatic insulin secretion is inhibited by vitamin D deficiency. In addition, it was showed the role of vitamin D, and especially, of its active form (1,25(OH)D₂D₃) in the regulation of the function of endocrine pancreas, especially in the β cell. However, besides the presence of classical nuclear

1,25(OH) D_2D_3 receptor, it was also suggested the existence of a receptor localized in the membrane. Thus, the non-genomic pathway, which is dependent on membrane VDR, is involved in rapid calcium fluxes that may implicate in the effects of vitamin D on insulin secretion (30 – 33). In fact, Sergeev (1995) (34) demonstrated that 1,25(OH) D_2D_3 directly influences insulin secretion in β cell through an increase in intracellular free calcium concentration via voltage-dependent Ca^{2+} channels.

Considering that impaired level of glucose is one of the main characteristic of diabetes mellitus type 2, we did not find association between fasting glucose levels and VDR polymorphisms in this Brazilian sample. Differently, Ortlepp et al (2001) (15) found that, in 293 young men considered at high risk for coronary artery disease, the VDR genotype is associated with altered fasting glucose levels. However, corroborating with our results Malecki et al (2003) (35) examining of BsmI, TaqI, and FokI VDR polymorphisms in 548 Polish individuals with and without Diabetes mellitus type 2, and it was not found association for all examined polymorphisms and glucose levels.

Another extra-bone role of vitamin D linked to lipid profile may explain the relationship between MetSyn and cardiovascular disease. However, this issue is receiving little attention in scientific investigations. Thus, in an attempt to investigate whether the lack of vitamin D has some effect on cholesterol metabolism, Wang et al (2009) (36) found that serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level was 22% ($P=0.03$) higher in male VDR knockout gene mice than in Wild Type mice.

However, different results were observed in humans. In the most recent NHANES 2000–2004 survey, vitamin D deficiency (< 15 ng/mL) was associated with lower HDL-cholesterol [$OR = -3.03$ mg/dl (-5.02 to -1.04)] levels. This association was not seen in individuals with

25(OH)D₃ concentrations ≥ 30 ng/mL (37). In another study involving 73 women with morbid obesity (38), those with 25(OH)D₃ concentration < 20 ng/mL presented lower HDL-cholesterol levels. Further, a significant positive relationship was found between vitamin D concentration and HDL-cholesterol levels ($r = 0.325$; $p = 0.033$).

The mechanistic role of vitamin D in lipid profile can occur in the liver, which is also the central organ for vitamin D synthesis. However, the direct involvement of the vitamin D-VDR axis on the lipid metabolism remains to be evaluated, since opposite results have demonstrated (39, 40).

It is well known that vitamin D is a member of the steroid receptor superfamily, and that it can modulate the transcription of apolipoprotein AI gene (Apo AI), which is the major apolipoprotein of high-density lipoprotein (HDL). Thus, in order to assess the role of VDR in Apo AI gene expression, Wehmeier et al (40) investigated the effect of 1,25(OH)D₂D₃, as well as the vitamin D antagonist ZK-191784 (ZK) on Apo AI gene expression and promoter activity in the human hepatoma cell line HepG2. The Apo AI secretion and its mRNA levels were both suppressed in a dose-dependent manner in these cells treated with 1,25(OH)D₂D₃. This was accompanied by a similar decrease in Apo AI promoter activity. Additionally, the treatment with vitamin D receptor antagonist ZK inhibited the ability of 1,25(OH)D₂D₃ to repress Apo AI promoter activity, while higher doses of ZK increased Apo AI promoter activity.

Moreover, it was also shown negative association between vitamin D and triglycerides. In a longitudinal study where 1762 subjects were followed for 14 years, an increase in serum 25(OH)D₃ was accompanied by a corresponding decrease in serum triglycerides (41). In addition, Rodríguez-Rodríguez (2011) (42) observed in children that higher triglycerides concentration occurs in the first quartile of serum 25(OH)D₃, when compared to the fourth

quartile (86.0 ± 35.7 vs. 64.1 ± 26.7 mg/dl; $p < 0.05$). After adjusting this analysis for age, sex, BMI, and physical activity, the serum 25(OH)D level was found to be inversely proportional to the triglycerides ($r = -0.857$; $p = 0.010$). Similarly, in a recent study with 3577 adolescents aged 12–19 years undertaken by the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2000–2004), it was presented that subjects with serum 25(OH)D₃ in the lowest quartile (<15 ng/mL) were at greater risk of hypertriglyceridemia than those in the highest quartile (>26 ng/mL) [OR = 1.00 (1.33–2.39)], after adjusting for age, sex, race, BMI, socioeconomic status, and physical activity (43).

According to Zittermann et al (2009) (44) there are few possible mechanisms involved in the relationship between triglycerides and vitamin D metabolism. The first could be that vitamin D increases intestinal calcium absorption (45), and this can trigger a reduction of serum triglycerides through reducing the hepatic triglyceride formation and secretion (46). The second hypothesis is that PTH suppression by vitamin D can occur, since elevated PTH concentrations are accompanied by a reduction in plasma post-heparin lipolytic activity (47). Thus, a reduction in serum PTH may reduce serum triglycerides via increased peripheral removal.

The main limitation of the present study is mainly related to the number of participants, since to extrapolating the observed relationship between the VDR gene polymorphisms and MetSyn components, a larger population should be necessary. Additionally, the design of the study did not allow us to provide a full comprehension of the mechanisms involved in the role of vitamin D or its receptor (VDR) on MetSyn components. However, taking all together, by investigating the polymorphisms on the VDR gene it was possible to demonstrate an important association of vitamin D in some components of MetSyn, such as insulin resistance, HDL and triglycerides.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo) (under protocol n^o 2009/52636-0). The authors state no conflict of interest.

References

1. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 371(1-2):1-12.
2. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338(2):143-56.
3. Chiu KC, Chu A, go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:820-825.
4. Chiu KC, Chuang LM, Yoon C. The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. *BMC Medical Genetics* (2001) 2:2
5. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest* 1985; 76:370-3.
6. Bolland, M.J., Bacon, C.J., Horne, A.M. et al. Vitamin D insufficiency and health outcomes over 5 year in older women. *American Journal of Clinical Nutrition* 2010, 91: 82–89.
7. Martins D, Wolf M, Pan D, Zadshir A, Tareen N, Thadhani R, Felsenfeld A, Levine B, Mehrotra R, Norris K. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007; 167(11):1159-65.
8. Isaia G, Giorgino R, Adami S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes Care* 2001; 24(8):1496.
9. Scragg R, Holdaway I, Singh V, Metcalf P, Baker J, Dryson E. Serum 25-hydroxyvitamin D₃ levels decreased in impaired glucose tolerance and diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1995, 27(3):181-188.

10. Scragg R, Sowers MF, Colin B. Serum 25-Hydroxyvitamin D, Diabetes, and Ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2004; 27(12):2813-2818.
11. Snidjer MB, van Dam RM, Visser M. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4119-4123.
12. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willet WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin d levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007; 49: 1-7.
13. Norman AW. Receptors for 1 α , 25(OH)₂D₃: past, present, and future. *J Bone Miner Res* 1998; 13(9):1360-9.
14. Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol* 2003; 17(5):777-91.
15. Ortlepp JR, Lauscher J, Hoffmann R, Hanrath P, Joost HG. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of Type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabetic Medicine*, 18, 842-845.
16. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah JM, *et al.* Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 2002; 51:2294-300.
17. Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Płaksej J, Tworowska U, Jedrzejuk D, Milewicz A, Medraś M. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male* 2008; 11(3):134-9.
18. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care*. 2005; 28(5):1228-30.
19. Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005; 28:2926-32.
20. Pittas AG, Stark PC, Harris SS, Dawson-Hughes B. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care* 2007; 30:980-986.

21. Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-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(2):181–186.
22. 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(3):356–359.
23. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 25;112(17):2735-52.
24. Mattheus D, Hosjer J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R: Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 421-419.
25. Miller SA, Dykes DD Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3), 1215.
26. Newton CR, Graham A Heptinstall LE Powell SJ Summers C Kalsheker N Smith JC Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989, 17(7): 2503-2516.
27. Livak KJ, Flood SJ Marmaro J Giusti W Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995, 4(6):357-362.
28. Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab* 2005 ; 31(4)1:318-25.
29. Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science*. 1980; 209(4458):823-5.
30. Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* 1994; 134(4):1602-10.

31. Cade C, Norman AW. Rapid normalization/stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin secretion and glucose tolerance in the vitamin D-deficient rat. *Endocrinology* 1987; 120(4):1490-7.
32. de Boland AR, Norman AW. Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcalcitachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport). *Endocrinology* 1990; 127(5):2475-80.
33. Norman AW. The vitamin D endocrine system: identification of another piece of the puzzle. *Endocrinology* 1994; 134(4):1601A-1601C.
- Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. Update on biological actions of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 197(1-2):1-13.
34. Sergeev IN, Rhoten WB. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line. *Endocrinology* 1995; 136(7):2852-61.
35. Malecki MT, Frey J, Moczulski D, Klupa T, Kozek E, Sieradzki J. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111(8):505-9.
36. Wang JH, Keisala T, Solakivi T, Minasyan A, Kalueff AV, Tuohimaa P. Serum cholesterol and expression of ApoAI, LXRBeta and SREBP2 in vitamin D receptor knock-out mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 113(3-5):222-6.
37. Kim DH, Sabour S, Sagar UN, Adams S, Whellan DJ. Prevalence of hypovitaminosis D in cardiovascular diseases (from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2004). *Am J Cardiol* 2008; 102(11):1540-4.
38. Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Villafruela JJ, Balsa JA, Vázquez C, Escobar-Morreale HF. Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr* 2007; 26(5):573-80.
39. Zúñiga S, Firrincieli D, Housset C, Chignard N. Vitamin D and the vitamin D receptor in liver pathophysiology. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35(4):295-302.

40. Wehmeier KR, Mazza A, Hachem S, Ligaray K, Mooradian AD, Wong NC, Haas MJ. Differential regulation of apolipoprotein A-I gene expression by vitamin D receptor modulators. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780(2):264-73.
41. Jorde R, Figenschau Y, Hutchinson M, Emaus N, Grimnes G. High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64(12):1457-64.
42. Rodríguez-Rodríguez E, Navia-Lombán B, López-Sobaler AM, Ortega RM. Associations between abdominal fat and body mass index on vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64(5):461-7.
43. 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(3):e371-9.
44. Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, Götting C, Kuhn J, Kleesiek K, Stehle P, Koertke H, Koerfer R. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(5):1321-7.
45. Barger-Lux MJ, Heaney RP, Lanspa SJ, Healy JC, DeLuca HF. An investigation of sources of variation in calcium absorption efficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80(2):406-11.
46. Cho HJ, Kang HC, Choi SA, Ju YC, Lee HS, Park HJ. The possible role of Ca²⁺ on the activation of microsomal triglyceride transfer protein in rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 2005;;28(8):1418-23.
47. Lacour B, Basile C, Drüeke T, Funck-Brentano JL. Parathyroid function and lipid metabolism in the rat. *Miner Electrolyte Metab*. 1982 Mar;7(3):157-65.

Table 1 - Clinical characteristics of the studied sample:

Variables	All	With MetSyn N=116	Without MetSyn N=127	p value
Age	51(15)	57(12)	46(16)	0.000
% women		71	51	
BMI (kg/m ²)	29(6)	32(6)	27(5)	0.000
Waist circumference(cm)	98(14)	103(13)	92(14)	0.000
BPS (mmHg)	130(20)	138(38)	121(20)	0.000
BPD (mmHg)	79(12)	83(10)	76(12)	0.000
Fasting glucose (mg/dl)	95(12)	98(12)	92(10)	0.000
Triglycerides(mg/dl)	136(70)	165(76)	109(51)	0.000
HOMA IR	2.2(1.70)	2.7(1.8)	1.6(1.4)	0.000
HOMA β	116(95)	133(109)	98(75)	0.002
Total Cholesterol (mg/dl)	192(43)	202(45)	184(38)	0.001
HDL cholesterol(mg/dl)	44(12)	41(11)	47(12)	0.000
LDL cholesterol(mg/dl)	121(38)	128(41)	115(34)	0.008
25(OH)D ₃ (nmol/l)	57(18)	61(19)	54(16)	0.003
iPTH (pg/dl)	41(20)	43(21)	38(20)	0.063
Serum calcium (mg/dl)	9.3(0.4)	9.4(0.4)	9.3(0.4)	0.132

Abbreviations: BMI – body mass index; SBP – systolic blood pressure; DBP – diastolic blood pressure; HOMA insulin resistance; HOMA β cell function; iPTH – intact parathyroid hormone. Data are expressed as means (with SD).

Table 2 - Genotype distribution (%) of VDR gene polymorphisms among individuals with and without MetSyn:

Genotype Distribution		With MetSyn n=116	Without MetSyn n=127	p-value
FokI	FF	10	8	p= 0.16
	Ff	47	57	
	ff	40	35	
BsmI	BB	18	9	p= 0.79
	Bb	43	41	
	bb	37	50	

The distribution of the VDR alleles was in the Hardy-Weinberg equilibrium. Abbreviations: homozygous normal FF; heterozygous Ff; homozygous recessive ff; homozygous normal BB; heterozygous Bb; homozygous recessive bb.

Table 3 - Mean values of all variables according to BsmI and FokI genotype in individuals with MetSyn.

Variables	Fok I			p	Bsm I			p
	FF	Ff	ff		BB	Bb	bb	
	n=127	n=91	n=22		n=107	n=102	n=32	
WC(cm)	103(13)	103(12)	106(13)	0.433	104(13)	103(13)	104(13)	0.863
Triglycerides (mg/dl)	155(59)	174(81)	163(103)	0.204	151(59)	173(87)	163(64)	0.523
BPS (mmHg)	140(18)	137(16)	147(24)	0.377	139(14)	139(20)	134(20)	0.490
BPD (mmHg)	84(12)	82(10)	85(12)	0.726	84(10)	83(10)	82(8)	0.822
Fasting glucose (mg/dl)	99(10)	98(13)	99(14)	0.707	100(12)	97(13)	99(12)	0.404
HDL cholesterol (mg/dl)	43(12)	40(9)	40(12)	0.306	43(12)	42(10)	40(12)	0.231
HOMA IR	2(2)	3(2)	4(3) [†]	0.014	3(1)	3(2)	4(3)	0.259
HOMA β	100(77)	159(137) [‡]	145(61)	0.010	123(77)	142(137)	137(107)	0.729
25(OH)D ₃ (nmol/l)	60(17)	62(21)	60(20)	0.828	60(16)	62(21)	60(20)	0.389
iPTH (pg/dl)	37(19)	49(22) [‡]	42(25)	0.022	44(15)	49(22)	46(25)	0.649

Abbreviations: WC – waist circumference; BPS – systolic blood pressure; BPD – diastolic blood pressure; HOMA IR insulin resistance; HOMA β cell function; iPTH – intact parathyroid hormone; 25(OH)D₃ – Vitamin D. Data are expressed as means (with SD). P-values were calculated using ANOVA are followed by bonferroni test and adjusted for age. [†] significant at the Bb or Ff genotype; [‡] significant at the BB or FF genotype.

Table 4 - Mean values of all variables according to BsmI and FokI genotypes in individuals without MetSyn.

Variables	Fok I			p	Bsm I			p
	FF	Ff	ff		BB	Bb	bb	
	n=127	n=91	n=22		n=107	n=102	n=32	
WC (cm)	89(10)	95(16)	90(9)	0.086	93(14)	93(13)	86(11)	0.293
Triglycerides (mg/dl)	90(28)	117(54) ‡	134(80)	0.005	107(46)	113(58)	100(45)	0.696
BPS (mmHg)	122(17)	121(21)	124(14)	0.923	119(21)	125(16)	121(21)	0.194
BPD (mmHg)	75(10)	76(14)	79(10)	0.316	75(13)	77(11)	74(14)	0.556
Fasting glucose (mg/dl)	92(10)	92(11)	89(10)	0.607	92(11)	90(9)	93(8)	0.588
HDL cholesterol(mg/dl)	50(11)	45(12) ‡	42(11)	0.031	47(13)	47(11)	42(6)	0.253
Homa IR	1.6(1.4)	1.7(1.4)	1.0(0.4)	0.398	1.7(1.7)	1.6(0.9)	1.2(0.7)	0.749
Homa β	92(62)	103(80)	87(93)	0.711	96(81)	107(71)	70(46)	0.424
25(OH)D ₃ (nmol/L)	50(15)	55(16)	61(12)	0.062	52(14)	58(16)	45(18) †	0.023
iPTH (pg/dl)	41(24)	36(18)	38(11)	0.019	40(20)	37(20)	32(24)	0.361

Abbreviations: WC – waist circumference; BPS – systolic blood pressure; BPD – diastolic blood pressure; HOMA IR insulin resistance; HOMA β cell function; iPTH – intact parathyroid hormone; 25(OH)D₃ – Vitamin D. Data are expressed as means (with SD). P-values were calculated using ANOVA are followed by bonferroni test and adjusted for age. † significant at the Bb or Ff genotype; ‡ significant at the BB or FF genotype.

Table 5 - Logistic regression analysis of traits associated with the presence of FokI polymorphism in all participants:

Variables	B	Odds Ratio	P	95% confidence interval	
				Lower	Upper
Age	.014	1.014	.244	.991	1.037
Gender	-.395	.674	.357	.291	1.561
WC	.007	1.007	.662	.977	1.037
Blood pressure	.009	1.009	.594	.977	1.042
Glucose fasting	.041	1.041	.136	.987	1.099
Triglycerides	.005	1.005	.187	.998	1.012
HDL cholesterol	-.032	.967	.011	.945	.993
Total cholesterol	.005	1.005	.310	.996	1.014
MetSyn	-.136	.474	.239	.696	1.095
HOMA IR	-.128	.880	.558	.573	1.351
HOMA β	.007	1.007	.112	.998	1.017
iPTH	.000	1.000	.970	.985	1.016
25(OH)D ₃	.007	1.007	.536	.985	1.029

Abbreviations: WC – waist circumference; MetSyn – metabolic syndrome; HOMA IR insulin resistance; HOMA β cell function; iPTH – intact parathyroid hormone; 25(OH)D₃ – Vitamin D.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que a insuficiência de vitamina D atinge 1 bilhão de indivíduos em todo o mundo. Esta elevada prevalência afeta a população independente da localização mundial, faixa etária e nível socioeconômico ou cultural, sendo a principal causa a baixa exposição solar e o inadequado consumo de alimentos que contenham esta vitamina. A relação entre 25(OH)D₃ e desfechos ósseos já está bem estabelecida no meio científico. Recentemente, estudos têm demonstrado fortes associações entre vitamina D e doenças crônicas não transmissíveis, dentre as quais se encontra a síndrome metabólica e ou seus fatores de risco.

- Vitamina D e obesidade abdominal

Os resultados deste estudo indicam uma importante associação entre vitamina D e obesidade abdominal, sendo este um dos principais componentes preditivos da síndrome metabólica. A partir disso, sugerimos um novo valor de ponto de corte para a insuficiência de Vitamina D (52,6 nmol/L). Este seria o ponto de corte a partir do qual ocorre associação entre insuficiência de vitamina D e alteração na circunferência da cintura. Contudo, como este é o primeiro estudo a sugerir um novo indicador nutricional de vitamina D recomendado para as doenças relacionadas com a obesidade, mais estudos são necessários para melhor compreendermos a aplicação destes resultados.

- Polimorfismos no gene do receptor da vitamina D e componentes da síndrome metabólica

Neste trabalho mostrou-se que existe uma interação entre os polimorfismos no gene VDR com importantes componentes da síndrome metabólica. Até o presente momento, poucos investigadores avaliaram esta associação. Com a análise de dois principais polimorfismos (BsmI e FokI), demonstramos que o gene do VDR está ligado ao metabolismo de secreção e resistência à insulina, como também indicamos que existe associação entre a presença de polimorfismos no gene VDR e alterações do metabolismo lipídico, mais especificamente, nas concentrações séricas de HDL colesterol e triglicérides.

Desta forma, podemos concluir que este estudo reforça prévias evidências do meio científico e indica que diferentes fenótipos relacionados à síndrome metabólica estão associados aos polimorfismos no gene do VDR.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:157-161.

Ayesha I, Bala TS, Reddy CV, Raghuramulu N. Vitamin D deficiency reduces insulin secretion and turnover in rats. *Diabetes Nutr Metab* 2001; 14:78-84.

Bandeira F, Griz L, Freese E, Lima DC, Thé AC, Diniz ET. TF, Lucena CS. Deficiência de vitamina D e sua relação com a densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa residentes nos trópicos *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54(2): 85-86.

Barger-Lux MJ, Heaney RP, Hayes J, DeLuca HF, Johnson ML, Gong G. Vitamin D receptor gene polymorphism, bone mass, body size, and vitamin D receptor density. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:161-2.

Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest* 1985; 76:370-3.

Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition* 2011; 27(4):399-404.

Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract* 2003; 57:258-61.

Boucher BJ. Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome 'X'? *Br J Nutr* 1998; 79:315-27.

Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29(6):726-76.

Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* 1999; 160:87-95.

Burton RP, Tobin MD, Hopper JL Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet* 2005, 366 (9489): 941 – 951.

Bustos P, Silva AA, Amigo H, Bettiol H, Barbieri MA. Metabolic syndrome in young adults from two socioeconomic Latin American settings. *Nutr Metab Cardiovasc Diseases* 2007; 17(8): 581-589.

Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1989; 13:954-959.

Chacko SA, Song Y, Manson JE, Horn LV, Eaton C, Martin LW, McTiernan A, Curb JD, Wylie-Rosett J, Phillips LS, Plodkowski RA, Liu S. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in relation to cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2011; 94:209–17.

Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7:439-443.

Chiu KC, Chu A, go VL, Saad MF. Hipovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:820-825.

Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 1998; 11:1841-9.

Darwish H & DeLuca HF. Vitamin D regulated gene expression. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* 1993; 3:39-116.

Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporosis Int* 2005; 16: 713-716.

Dawson-Hughes B. Racial/ethnic considerations in making recommendations for vitamin D for adult and elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1763S-1766S.

DeLuca HF. The vitamin D story: A collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* 1988; 2:224-236.

Institute of Medicine. Dietary reference intakes. Calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington, D.C.: National Academy Press, 1997.

Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Płaksej J, Tworowska U, Jedrzejuk D, Milewicz A, Medraś M. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male* 2008; 11(3):134-9.

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

Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willet WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxivitamin d levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007; 49: 1-7.

Foss YJ. Vitamin D deficiency is the cause of common obesity. *Medical Hypotheses* 2009; 72(3):314-321.

Genaro PS, Pereira GAP, Pinheiro MM, Szejnfeld VL, Martini LA. Relationship with between nutrient intake and vitamin D status in osteoporotic women. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 2007; 77(6):376-381.

Genaro PS ; Pereira GAP ; Pinheiro MM. ; Szjenfeld VL; Martini LA. Fatores dietéticos, atividade física e composição corporal de mulheres na pós-menopausa com osteoporose. *Nutrire (SBAN)*, São Paulo, v. 30, p. 67-78, 2006.

Grant WB & Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev* 2005; 10(2):94-111.

Grundberg E, Brandstrom H, Ribom EL, Ljunggren O, Mallmin H, Kindmark A. Genetic variation in the human vitamin D receptor is associated with muscle strength, fat mass and body weight in Swedish women. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:323-8.

Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109:433-8.

Hauache O, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism: correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 1998; 8:204-10.

Heaney RP, Holick MF. Why the IOM Recommendations for Vitamin D Are Deficient. *Journal of Bone and Mineral Research* 2011; 26(3): 455–457.

Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1706S-1709S.

Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 1998; 47:688-90.

Holick MF. Vitamin D: Extraskeletal Health. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2010; 39: 381–400.

Holick MF. Evolutions, biologic function, and recommended dietary allowances for vitamin D. In *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press, p 1-16, 1999.

Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116:2062-2072.

Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr* 2005; 135:2739S-48S.

Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005; 135:317-322.

Howard G, Nguyen T, Morrison N, *et al*. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2800-05.

Institute of Medicine (IOM). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington, DC: National Academies Press, 2011.

Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24h urinary sodium and potassium excretion. *BMJ* 1988; 297: 319-328.

James WPT. 22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D. *Nutrition Reviews* 66(Suppl. 2):S213–S217.

Ji GR, Yao M, Sun CY, Li ZH, Han Z. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: a meta-analysis. Bone 2010;47(3):681-6.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. Variação Genética: sua Origem e Detecção. In Genética Médica. Seattle, Washington: Ed Elsevier, 4^a edição, p.26-55,2010

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

Kong J, Li YC. Effect of ANG II type I receptor antagonist and ACE inhibitor on vitamin D receptor-null mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 285:R255–261.

Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and pancreatic β -cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. Endocrinology 1994; 134:1602-10.

Letters to the editor. Public Health Nutrition 2010; 14(4), 740-750.

Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. J Cell Biochem 2003; 88:327–331.

Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25 Dihydroxivitamin D3 is a negative endocrine regulator of rennin-angiotensin system. J Clin Invest 2002; 110: 229-238.

Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin–angiotensin system and blood pressure. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2004; 89-90(1-5):387-92.

Lips P, Duong T, Oleksik A, et al. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:1212-21.

Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med* 2006; 260(3): 245–254.

Liu E, McKeown NM, Pittas AG, Meigs JB, Economos CD, Boothand SL, Jacques PF. Predicted 25-hydroxyvitamin D score and change in fasting plasma glucose in the Framingham offspring study. *European Journal of Clinical Nutrition* , 2011 doi:10.1038/ejcn.2011.181.

Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005; 28:2926-32.

Lorentzon M, Lorentzon R, Nordstrom P. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with birth height, growth to adolescence, and adult stature in healthy caucasian men: a cross-sectional and longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1666-70.

Maeda SS, Kunii IS, Hayashi LF , Lazaretti-Castro M. Increases in summer serum 25-hydroxyvitamin D (25OHD) concentrations in elderly subjects in São Paulo, Brazil vary with age, gender and ethnicity. *BMC Endocrine Disorders* 2010; 10:12.

Mallah EM, Hamad MF, Manaseer MA, Qinna NA, Idkaidek NM, Arafat TA, Matalaka KZ. Plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D among Jordanians: Effect of biological and habitual factors on vitamin D status. *BMC Clinical Pathology* 2011, 11:8.

Martini LA & Wood RJ. Vitamin D status and the Metabolic Syndrome. *Nutr Reviews* 2006; 64(11):479-486.

Matthews D, Hosjer J, Rudenki A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:421-419

Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and Diabetes. *Diabetologia* 2005; 48:1247-1257.

Merke J, Milde P, Lewieka S, Hugel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E. Identification and regulation of 1,25 Dihydroxivitamin D₃ receptor activity and byosynthesis of 1,25 Dihydroxivitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest* 1989; 83:1903-1915.

McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, *et al.* Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 1997; 40:971-5.

Miller WL & Portalle AA. Genetic disorders of vitamin D biosynthesis. *Pediatr Endocrinol* 1999; 28(4):825-840.

Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, Pittas AG. Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic β cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes Mellitus (CaDDM) randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 486–94.

Morris KL, Zemel MB. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obes Res* 2005; 13:670-7.

Mosekilde L. Vitamin D and the elderly. *Clin Endocrinol* 2005; 62: 265-281.

Nishii Y, Okano T. History of the development of new vitamin D analogs: Studies on 22-oxacalcitriol (OCT) and 2beta-(3-hydroxypropoxy)calcitriol (ED-71). *Steroids* 2001; 66:137-46.

Norman AW. Receptors for 1alpha, 25(OH) ₂D₃: past, present, and future. *J Bone Miner Res* 1998; 13(9):1360-9.

Norman AW, Henry HL, Bishop JE, Song XD, Bula C, Okamura WH. Different shapes of the steroid hormone 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids* 2001; 66:147-58.

Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah JM, *et al.* Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 2002; 51:2294-300.

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.

Oliveira EP, Souza MLA, Lima MDAL. Prevalência de Síndrome Metabólica em Uma Área Rural do Semi-árido Baian. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50:456-465.

Pereira MA, Jacobs DR, Jr., Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. *JAMA* 2002; 287:2081-9.

Peters BSE, Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of vitamin D insufficiency in brazilian adolescents. *Annals of nutrition & metabolism* 2009; 54(1):15-21.

Peters BS, Verly E Jr, Marchioni DM, Fisberg M, Martini LA. The influence of breakfast and dairy products on dietary calcium and vitamin D intake in postpubertal adolescents and young adults. *J Hum Nutr Diet.* 2011 May 13. doi: 10.1111/j.1365-277X.2011.01166.x. [Epub ahead of print]

Pinheiro MM , Schuch NJ, Genaro PS, Ciconelli RM , Ferraz MB, Martini LA. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women – The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Nutrition Journal* 2009; 8:1-8.

Pittas AG, Stark PC, Harris SS, Dawson-Hughes B. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care* 2007; 30:980–986.

Qiao G, Kong J, Uskokovic M, Li YC. Analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) as novel inhibitors of renin biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 96:59–66.

Rajakumar K, Greenspan SL, Thomas SB, Holick MF. Solar ultraviolet radiation and vitamin D. A historical perspective. *American Journal of Public Health* 2007; 97(10):1746-1754.

Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role the vitamin D endocrine system in health and disease. **N Engl J Med** 1989; 320:980-991.

Rosenbaum P, Gimeno SG, Sanudo A, Franco LJ, Ferreira SR; Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. Analysis of criteria for metabolic syndrome in a population-based study of Japanese-Brazilians. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7(4): 352-9.

Saad MJA, Zanella MT, Ferreira SRG. Síndrome metabólica: Ainda indefinida, mas útil na identificação do alto risco cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(2): 161-162.

Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araújo LMQ, Vieira JGH, Kunii I, Hayashi LF, Corrêa MP and Lazaretti MC. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25 hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of São Paulo (23 o 34`S), Brazil. *Osteoporos Int* 2005; 16:1649-1654.

Scalco R, Premaor MO, Fröhlich PE, Furlanetto TW. High prevalence of hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in elders living in nonprofit homes in South Brazil. *Endocrine* 2008; 33(1): 95-100.

Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53: 625-633.

Silveira VMF, Horta BL, Gigante DP, Azevedo-Junior MR. Metabolic syndrome in the 1982 Pelotas cohort: effect of contemporary lifestyle and socioeconomic status. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54(4): 390-397.

Snidjer MB, van Dam RM, Visser M. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4119-4123.

Suarez F, Zeghoud F, Rossignol C, Walrant O, Garabédian M. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and sexdependent growth during the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2966-70.

Stumpf WE, Sar M, Reid FA, et al. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979; 206:1188–90.

Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a “bone-a-fide” hormone. *Mol Endocrinol* 2003; 17(5): 777-791.

Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 2002; 112:659-662.

Tworowska-Bardzińska U, Lwow F, Kubicka E, Łaczmański Ł, Jedrzejuk D, Dunajska K, Milewicz A. The vitamin D receptor gene BsmI polymorphism is not associated with anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24(9):514-8.

Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338(2):143-56.

Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. Clin Chim Acta 2006; 371(1-2):1-12.

Vieth R, Ladak Y, Walsh PG. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:185-191.

Walters MR. newly identified actions of the vitamin D endocrine system. Endocrine rev 1992; 13:719-64.

Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. J Clin Endocrinol Metab 1988; 67: 373-378.

Wood, RJ .Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. Nutrition Reviews 2007; 66(1):40–46.

Xiang W, Kong J, Chen S, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 288:E125–132.

Ye WZ, Dubois D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. Metabolism 2001; 50:366-9.

Yuan W, Pan W, Kong J, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. J Biol Chem 2007; 282:29821–29830.

Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M. Synthesis of 25-hydroxivitamin D3-1alpha-hydroxylase in the human kidney. J Am Soc Nephrol 1999; 10(12):2465-2473.

9. ANEXOS