

ESCOLA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

MAURICIO SPRENGER BASSUINO

**POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE VITAMINA D E SUA RELAÇÃO COM O
METABOLISMO ÓSSEO EM MULHERES PÓS-MENOPAUSA**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

MAURICIO SPRENGER BASSUINO

**POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE VITAMINA D E SUA RELAÇÃO COM O
METABOLISMO ÓSSEO EM MULHERES PÓS-MENOPAUSA**

Porto Alegre
2018

MAURICIO SPRENGER BASSUINO

**POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE VITAMINA D E SUA RELAÇÃO COM O
METABOLISMO ÓSSEO EM MULHERES PÓS-MENOPAUSA**

Tese de Doutorado apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica - PUCRS, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado

Linha de pesquisa: Aspectos biológicos no envelhecimento

Co-orientador: Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider

Porto Alegre
2018

Ficha catalográfica

Ficha Catalográfica

B323p Bassuino, Mauricio Sprenger

Polimorfismo do receptor de vitamina D e sua relação com o metabolismo ósseo em mulheres pós-menopausa / Mauricio Sprenger Bassuino . – 2018.

115.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado.
Co-orientador: Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider.

1. Vitamina D. 2. osteoporose. 3. FokI. 4. metabolismo ósseo. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Schneider, Rodolfo Herberto. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

MAURICIO SPRENGER BASSUINO

**POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE VITAMINA D E SUA RELAÇÃO COM O
METABOLISMO ÓSSEO EM MULHERES PÓS-MENOPAUSA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Newton Luiz Terra – GERONBIO/PUCRS

Prof. Dr^a. Patrícia Zambone - HCPA

Prof. Dr. Rodrigo Andrade Binkowski – FSG

Prof^a. Dr^a. Jociane Myskiw - GERONBIO/PUCRS

Porto Alegre
2018

“Para o trabalho que gostamos, levantamo-nos cedo e fazemo-lo com alegria”
– William Shakespeare –

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho”
– Mahatma Gandhi –

Aos meus pais, Lauro e Rosane que sempre estiveram juntos comigo, me apoiando e entendendo, a minha ausência em decorrência dos meus trabalhos;

Ao amor da minha vida, Laís que sempre esteve comigo me apoiando em todos os momentos e tornando essa jornada possível graças ao companheirismo e carinho;

Ao meu outro amor... minha filhinha... que está chegando agora para tornar tudo ainda melhor!

Aos meus amigos que torceram para que mais esse objetivo fosse atingido.

AGRADECIMENTOS

Não há dúvidas que tenho inúmeras pessoas a quem agradecer a concretização desse trabalho.

Obviamente, tenho que agradecer aos meus pais e irmão que me proporcionaram tudo o que necessitava, principalmente a felicidade.

Agradeço também aos meus grandes mestres que tive ao longo de minha formação acadêmica, Prof. Arthur Sacramento que ainda no início da minha graduação me apresentou ao mundo da pesquisa e fisiologia. Aos Professores Eloir Dutra Lourenço, Renato Minozzo, Simone Rossetto e Tiago Santos Carvalho que durante a minha formação acadêmica serviram como exemplo de ótimos profissionais, corretos e extremamente capacitados, e mais adiante como amigos.

Ao Doutor Alberto Salgueiro Molinari que, ainda durante minha graduação, me concedeu meu primeiro estágio e foi o “culpado” por eu seguir a área do estudo relacionado ao metabolismo ósseo. Além de exemplo de grande profissional, um grande amigo que sempre me motivou e acreditou em mim.

À minha orientadora Prof^a. Doutora Denise Cantarelli Machado, que sempre apoiou e incentivou meus projetos. Foi uma referência em conhecimento científico e, além de tudo, uma amiga que com dedicação fez existir esse estudo.

Ao serviço de Densitometria Óssea do Hospital São Lucas da PUCRS que sempre disponibilizaram espaço e atenção para que eu realizasse meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider, que sempre que necessário, se disponibilizava a responder meus questionamentos e auxiliar na avaliação dos exames de densitometria óssea.

À técnica do Laboratório de Biologia Celular e Molecular Rafaela Radomski e aos bolsistas de iniciação científica João Vítor Paim e Paula Gabrielli Santos por me auxiliarem na coleta e realização dos exames, dando tranquilidade para que eu continuasse com o estudo.

Ao amor da minha vida, Laís Oliveira Bassuino, que em absolutamente todos os momentos me apoiou, incentivou e auxiliou no desenvolvimento do estudo. Possibilitou que, com tranquilidade, eu pudesse me dedicar ao estudo e ao trabalho horas e horas.

Aos colegas e amigos do Centro Universitário da Serra Gaúcha – FSG que me apoiaram durante o processo, principalmente aos queridos alunos e, quase colegas, membros do Grupo de Pesquisa em Processos do Envelhecimento – GEPPE.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento e concretização desse estudo e, obviamente, à CAPES pelo auxílio com a bolsa integral.

“A sorte pertence a todos, porém, somente os bem preparados conseguem usufruir. ”

Autor desconhecido

RESUMO

Introdução: Mundialmente, tem sido observado um aumento na população idosa, principalmente com relação à concentração de mulheres. É sabido que a osteoporose pós-menopausa é um problema crônico que afeta a saúde das mulheres desta faixa etária. A vitamina D tem papel importante no metabolismo ósseo e é mediada pelo receptor de vitamina D (VDR), o qual apresenta polimorfismos no gene VDR que, por sua vez, podem alterar as funções biológicas da vitamina D. O principal deles é o polimorfismo *FokI*, no entanto, os estudos relacionando-o com densidade mineral óssea reduzida são controversos e no caso do Brasil, escassos. **Objetivos:** Determinar o polimorfismo *FokI* do receptor de vitamina D, sua relação com a densidade mineral óssea e com os níveis séricos de marcadores do metabolismo ósseo em mulheres pós-menopausa. E ainda, avaliar a exposição solar e a possível relação com os níveis de vitamina D neste grupo de mulheres. **Materiais e métodos:** Estudo transversal observacional com 178 mulheres pós menopausa que realizavam densitometria óssea em um serviço de densitometria óssea. Após concordarem em participar da pesquisa, foi respondido um questionário referente aos dados sociodemográficos, econômicos, hábitos de vida e coletada amostra para dosagem de paratormônio, vitamina D e demais parâmetros bioquímicos. Sobretudo, foi realizada avaliação do polimorfismo *FokI* do gene VDR, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase, seguida da técnica de avaliação dos polimorfismos dos fragmentos de DNA (RFLP). **Resultados:** Os parâmetros bioquímicos avaliados obtiveram resultados dentro da normalidade, em contrapartida, a média de vitamina D foi de $24,85 \pm 9,06$ ng/mL. A distribuição genotípica encontrada para os polimorfismos da *FokI* foi de 54% das mulheres apresentavam fenótipo para FF, 35% para Ff e 11% para ff. Genótipo ff apresentava uma densidade mineral óssea de fêmur reduzida quando comparado aos outros genótipos ($p = 0,028$). Em relação à exposição solar, a maioria relatou exposição diária inferior à 1h e destas, a maioria (67%) eram expostas ao sol em momentos não ideais para síntese de vitamina D. A suplementação de vitamina D se mostrou não efetiva, pois nos grupos classificados como deficientes e insuficientes para vitamina D, a proporção entre quem faz uso e não faz uso foi semelhante. **Conclusão:** A população estudada demonstrou níveis de vitamina D abaixo do recomendável, além de um perfil de fotoexposição não adequado para a obtenção dos níveis ideais dessa substância. Somase a isso, a necessidade em realizar uma avaliação sobre a forma de suplementação de vitamina D para essa população.

Palavras-chaves: Receptor de vitamina D. Vitamina D. Pós menopausa. Polimorfismo FOKI. Densidade mineral óssea.

ABSTRACT

Introduction: Globally, an increase in the elderly population has been observed, mainly in relation to the concentration of women. It is known that postmenopausal osteoporosis is a chronic problem that affects the health of women in this age group. Vitamin D plays an important role in bone metabolism and is mediated by the vitamin D receptor (VDR), which has polymorphisms in the VDR gene, which in turn can alter the biological functions of vitamin D. The main one is the *FokI* polymorphism, however, studies correlating it with reduced bone mineral density are very controversial and in the case of Brazil, scarce. **Objectives:** To determine the *FokI* polymorphism of the vitamin D receptor, its relationship with bone mineral density and serum levels of bone metabolism markers in postmenopausal women. Also, evaluate the sun exposure and the possible relationship with vitamin D levels in this group of women. **Materials and methods:** Observational cross-sectional study with 178 postmenopausal women who performed bone densitometry at a bone densitometry service. After agreeing to participate in the study, a questionnaire regarding socio-demographic, economic and life habits data was collected and a sample was collected for parathyroid hormone, vitamin D and other biochemical parameters. Above all, the *FokI* polymorphism of the VDR gene was evaluated by means of the polymerase chain reaction technique, followed by the DNA fragments polymorphism (RFLP) technique. **Results:** The biochemical parameters evaluated were within normal range, in contrast, the mean vitamin D of 24.85 ± 9.06 ng/mL. The genotypic distribution found for *FokI* polymorphisms was 54% of the females presented *FF* phenotype, 35% for *Ff* and 11% for *ff*. *ff* genotype had a reduced femoral bone mineral density when compared to the other genotypes ($p = 0.028$). In relation to sun exposure, the majority of the individuals reported daily exposure less than 1h per day. From these, most (67%) were exposed during the hours that were not ideal to produce vitamin D. Vitamin D supplementation was shown to be ineffective, since in the groups classified as deficient and insufficient for vitamin D, the proportion between those who use and do not use is similar. **Conclusion:** The studied population demonstrated levels of vitamin D below the recommended levels, besides a photoexposure profile not adequate to obtain the ideal levels of this substance. It adds to this, the need to conduct an assessment on the form of vitamin D supplementation for this population.

Key words: Vitamin D receptor. Vitamin D. Post menopause. FOKI polymorphism. Bone mineral density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Alterações do envelhecimento sobre diferentes valências fisiológicas.....	25
Figura 2- Mecanismo de alterações celulares associadas ao envelhecimento	27
Figura 3- Foto de arranjo de microarquitetura de osso normal (esquerda) e osso acometido por osteoporose (direita)	28
Figura 4 - Síntese de vitamina D e ações fisiológicas	35
Figura 5 - Níveis de vitamina D em indivíduos com idade superior a 18 anos	40
Figura 6 - Representação do eixo Zenith.....	41
Figura 7 - Curva de calibração da vitamina D.....	55
Figura 8 - Identificação do produto de PCR em gel de agarose	56
Figura 9 - Identificação do polimorfismo <i>FokI</i> pela técnica de RFLP	56
Figura 10 - Regressão linear entre cálcio e paratormônio	59
Figura 11 - Regressão linear entre vitamina D e paratormônio.....	60
Figura 12 - Regressão linear entre cálcio e vitamina D.....	60
Figura 13 - Frequência de exposição solar relatada pelas participantes	64
Figura 14 - Momento da exposição solar de indivíduos que relataram <1 hora/dia.....	64
Figura 15 - Momento da exposição solar de indivíduos que relataram entre 1 e 2 horas/dia.....	65
Figura 16 - Momento da exposição solar de indivíduos que relataram mais de 2 horas/dia	66
Figura 17 - Disposição das participantes com relação ao suplemento de Vitamina D, organizados pelo <i>status</i> dessa substância no organismo	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios da Organização Mundial de Saúde para a classificação da osteoporose	29
Tabela 2 - Parâmetros sociodemográficos das participantes do estudo.....	56
Tabela 3 - Frequência genotípica <i>FokI</i>	61
Tabela 4 - Frequências genotípicas encontradas x frequências genotípicas esperadas	62
Tabela 5 - Características da população estudada conforme polimorfismo <i>FokI</i> do receptor da Vitamina D	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-OHase: D-1-alfa-hidroxilase

1,25 (OH)₂vitD: 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol

7-DHC: 7-dehidrocolesterol ou pró vitamina D₃

24,25 (OH)₂vitD: 24,25-dihidroxitamina D

25 OHase: 25 hidroxilase

25 (OH)vitD: 25 hidroxitamina D ou calcidiol ou vitamina D

ACMS: *American College of Sports Medicine*

APCI: ionização química a pressão atmosférica (do inglês: *Atmospheric pressure chemical ionization*)

BMC: conteúdo mineral ósseo (do inglês: *bone mineral content*)

BMD: densidade mineral óssea (do inglês: *bone mineral density*)

bp: par de base (do inglês: *base pair*)

°C: graus Celsius

C: citosina

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLIA: quimioluminescência (do inglês: *chemiluminescent*)

cm: centímetros

DEQAS: Programa de Avaliação de Qualidade Externa de Vitamina D (do inglês: *Vitamin D External Quality Assessment Scheme*)

DBP: proteína carreadora de vitamina D (do inglês: *vitamin D binding protein*)

DMO: densidade mineral óssea

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)

dp: desvio-padrão

DXA: absorção de raios-X de dupla energia (do inglês: *dual energy X-ray absorptiometry*)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético (do inglês: *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA: ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (do inglês: *enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*)

FPS: fator de proteção solar

G: guanina

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC: índice de massa corporal

IOF: Fundação Internacional de Osteoporose (do inglês: *International Osteoporosis Foundation*,)

kb: quilobase

Kg: quilogramas

Kg/cm²: quilogramas por centímetro quadrado

k/v: quilovot

L1: primeira vértebra lombar

L2: segunda vértebra lombar

L3: terceira vértebra lombar

L4: quarta vértebra lombar

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês: *liquid chromatography–mass spectrometry*)

m: metro

M-CFS: fator estimulador de colônia de macrófagos (do inglês: *macrophage colony stimulating factor*)

mg/dL: miligramas por decilitro

MS: *mass spectrometry*, espectrometria de massa

mTorr: millitorr

mRNA: RNA mensageiro (do inglês: *messenger RNA*)

nº: número

ng/mL: nanograma por mililitro

ng/L: nanograma por litro

N: norte

OMS: Organização Mundial da Saúde

OP: osteoporose

OPG: osteoprotegerina

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês: *polymerase chain reaction*)

PTH: hormônio da paratireoide (do inglês: *parathyroid hormone*)

PTHi: hormônio da paratireoide fração intacta (do inglês: *parathyroid hormone intact fraction*)

R²: coeficiente de determinação

RANK: receptor ativador do fator nuclear kapa B (do inglês: *receptor activator of nuclear factor kappa-B*)

RANKL: ligante do receptor do fator nuclear kapa B (do inglês: *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)

RFLP: polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (do inglês: *restriction fragment length polymorphism*)

RIA: radioimunoensaio (do inglês: *radioimmunoassay*)

RNA: ácido ribonucleico (do inglês: *ribonucleic acid*)

S: sul

SM: salário mínimo

SNP: polimorfismo de um único nucleotídeo (do inglês: *single nucleotide polymorphism*)

T: timina

Taq I: enzima de restrição Taq I

TGF-β: fator de crescimento transformação beta (do inglês: *transforming growth factor beta*)

TNF- α: fator de necrose tumoral alfa (do inglês: *tumor necrosis factor alpha*)

μL: microlitros

μa: microampere

μv : microvolt

UI: unidade internacional

UV: ultravioleta

UVB: ultravioleta B

V/V: volume/volume

VDR: receptor de vitamina D (do inglês: *vitamin D receptor*)

VRDE: elemento de resposta de vitamina D (do inglês: *vitamin D responsive element*)

Vitamina D₂: ergocalciferol

Vitamina D₃: colecalciferol

W: oeste (do inglês: *west*)

X^2 : chi-quadrado

SUMÁRIO

2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	ENVELHECIMENTO POPULACIONAL	22
2.2	TEORIAS DO ENVELHECIMENTO	23
2.3	METABOLISMO ÓSSEO.....	24
2.3.1	Osteoporose.....	27
2.3.2	Menopausa e metabolismo ósseo	29
2.3.3.	Exercício físico e metabolismo ósseo	30
2.3.4	Vitamina D, cálcio e PTH e metabolismo ósseo.....	30
2.4	A HISTÓRIA DA VITAMINA D	31
2.4.1	Biossíntese da vitamina D.....	33
2.4.2	Funções da vitamina D.....	35
2.4.3	Epidemiologia e fatores de risco para hipovitaminose D.....	39
2.4.4	Quantificação de vitamina D.....	43
2.4.5	Receptor de vitamina D (VDR).....	43
2.4.6	Polimorfismos do gene VDR	45
3	HIPÓTESES DO ESTUDO	47
4	OBJETIVOS	48
4.1	OBJETIVO GERAL	48
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5	PACIENTES E MÉTODOS	49
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	49
5.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	49

5.3	PARTICIPANTES DE PESQUISA.....	49
5.3.1	Critérios de inclusão.....	49
5.3.2	Critérios de exclusão.....	49
5.4	QUESTIONÁRIO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E ESTILO DE VIDA DOS PARTICIPANTES.....	50
5.5	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	50
5.6	DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO INTACTA PARATORMÔNIO (PTHi).....	50
5.7	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CÁLCIO TOTAL, CREATININA E UREIA.....	51
5.8	DETERMINAÇÃO DA 25OHD.....	51
5.9	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA.....	51
5.10	DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS GENES DO VDR.....	52
5.10.1	Obtenção do DNA genômico.....	52
5.10.2	Genotipagem do gene VDR.....	52
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
6	RESULTADOS.....	55
6.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA 25(OH)VITD.....	55
6.2	AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DE VITAMINA D.....	55
6.3	PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS DAS MULHERES PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	56
7	DISCUSSÃO.....	69
8	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO.....	87
	APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO.....	91
	APÊNDICE 3 - ARTIGO I - PUBLICADO.....	93

APÊNDICE 4 - ARTIGO II- SUBMETIDO	103
ANEXO A – DOCUMENTO SIPESQ	117
ANEXO B – APROVAÇÃO CEP-PUCRS	118
ANEXO C - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO II	121

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença caracterizada pela baixa densidade mineral óssea e microarquitetura danificada, causando uma desorganização da arquitetura do tecido ósseo e, conseqüentemente, aumentando o risco de fraturas. Decorrente disso, essa patologia vem causando grande preocupação nos últimos anos, pois como relatado pela *International Osteoporosis Foundation (IOF)* são afetadas aproximadamente 200 milhões de mulheres em todo o mundo, sendo duas em cada três mulheres acima de 90 anos ou 1 em cada 10 mulheres com 60 anos de idade. Desse modo, pensando na atual situação que o Brasil se encontra, onde há, de uma forma intensa o aumento da população senil, principalmente de mulheres este torna-se um problema de saúde pública. Em 2005, nos Estados Unidos, os gastos relacionados às fraturas osteoporóticas foram de \$17 bilhões de dólares e, estima-se que em 2025 aumente para \$25 bilhões de dólares.

Nesse aspecto, levando em consideração o envelhecimento populacional somado aos hábitos de vida atuais, como a baixa exposição solar e uso de protetor solar, que são fatores que impactam diretamente sobre os níveis séricos de vitamina D, imprescindível para homeostasia do cálcio, pode-se verificar um prognóstico não favorável para a população em termos osteometabólicos.

Por esse motivo, esse estudo foi estruturado com o objetivo de verificar fatores genéticos relacionados com o metabolismo ósseo que possam auxiliar na identificação de indivíduos predispostos à osteoporose e, assim, potencializar a prevenção da osteoporose e, conseqüentemente, evitar fraturas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL

Mundialmente tem sido observado um aumento da taxa de idosos na população. Entre 2015 e 2030, a previsão é de que o número de pessoas com 60 anos ou mais cresça 56% e, em 2050, a população global de idosos atinja quase 2,1 bilhões, equivalente a mais do dobro de idosos em 2015 (UNITED NATIONS, 2015; WORTLEY; AN; HESHMATI, 2017). Além da população idosa, há um outro grupo que está crescendo mais rápido ainda, o grupo de pessoas “mais velhas” (80 anos ou mais), sendo previsto que em 2050 este grupo seja o triplo do número de “mais velhos” em 2015, abrangendo 434 milhões (UNITED NATIONS, 2015). O crescimento da população idosa ocorreu, primeiramente, em países desenvolvidos devido a melhor qualidade de vida e avanços tecnológicos no diagnóstico e tratamento que elevaram a expectativa de vida. Entretanto, atualmente, o crescimento do número de idosos também é observado em países menos desenvolvidos (WORTLEY; AN; HESHMATI, 2017).

Há 40 anos, estudos já apontavam que o Brasil estava em processo de envelhecimento, e que a tendência seria aumentar o número de idosos no futuro próximo e que essa tendência demográfica deveria ser reconhecida para um planejamento adequado para esta população (KALACHE, 1987). Atualmente, de acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a população com 60 anos ou mais, passou de 14,2 milhões em 2000 para 19,6 milhões em 2010 e estima-se que atinja 41,5 milhões em 2030 e 73,5 milhões em 2060, sendo o grupo populacional que mais aumenta no Brasil (ERVATTI; BORGES; JARDIM, 2015). Sendo este aumento causado pela diminuição dos índices de fecundidade, queda da mortalidade em todas as faixas etárias e ainda, pelos fluxos migratórios (ERVATTI; BORGES; JARDIM, 2015; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016).

A maior concentração de mulheres idosas tem sido observada, visto que a razão entre os sexos de indivíduos com 60 anos ou mais na população brasileira é de 0,8, equivalente a aproximadamente 80 homens para cada 100 mulheres, devido às maiores taxas de mortalidade dos homens (ERVATTI; BORGES; JARDIM, 2015). Mundialmente, as mulheres representam 54% da população de 60 anos ou mais, no entanto, nos próximos anos, a taxa de sobrevivência do homem deverá aumentar, mas mesmo assim, em 2050, a previsão é de que as mulheres totalizem 58% da população com 80 anos ou mais (UNITED NATIONS, 2015).

Esse aumento mundial da população idosa tem gerado um crescente interesse sobre a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no envelhecimento (DIEULEVEULT et al., 2017). O

envelhecimento da população traz consigo importantes demandas para a sociedade, sobretudo as questões de saúde relacionadas à proteção e cuidados direcionados aos idosos e, além disso, é relevante compreender o processo do envelhecimento para atender as suas necessidades e investir em ações preventivas no decorrer da vida, visando um bom nível de saúde e independência para este grupo etário (DIEULEVEULT et al., 2017; ERVATTI; BORGES; JARDIM, 2015; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016).

A epidemiologia das doenças no Brasil tem se alterado devido ao envelhecimento populacional. Há anos, a maior causa de morte era por doenças infecciosas agudas e, atualmente, as doenças crônicas tem se destacado entre as causas de morte mais frequentes na população brasileira (BACCARO et al., 2015; SCHMIDT et al., 2011). Dentre estas doenças crônicas que acometem a população, a osteoporose pós-menopausa traz um grande impacto negativo na saúde da mulher, sendo que o tratamento é de fácil acesso e pode alterar o desfecho da doença (BACCARO et al., 2015).

Outro fator importante são os acidentes traumáticos em pacientes idosos. A previsão é de que em 2050, cerca de 39% das internações por trauma sejam em pessoas com mais de 65 anos, o que será um problema mundial, especialmente nos países com maior expectativa de vida (KOZAR et al., 2015; LLOMPART-POU et al., 2017). No envelhecimento, devido ao declínio progressivo da função celular, os mecanismos adaptativos e homeostáticos estão comprometidos levando ao aparecimento de comorbidades devido à incapacidade de resposta às alterações na homeostasia (LLOMPART-POU et al., 2017).

As quedas são as causas mais frequentes de traumas e de mortes por traumas em pacientes geriátricos. Esta morbidade e mortalidade estão associadas com a fragilidade deste grupo de indivíduos e doenças como sarcopenia, artrite e osteoporose, que influenciam no tempo de marcha e reação, predispondo ao risco de quedas (KOZAR et al., 2015; LLOMPART-POU et al., 2017), visto que idosos já apresentam declínio no intervalo de movimento e velocidade de marcha (DIEULEVEULT et al., 2017).

2.2 TEORIAS DO ENVELHECIMENTO

O conceito de envelhecimento é complexo e, por esse motivo, possui diferentes definições; alguns autores o definem como “o processo de envelhecer”, enquanto outros estudiosos na área o classificam como “a deterioração de um sistema ao longo do tempo” e ainda, há como definição de envelhecimento “a perda de funções fisiológicas que levam ao óbito” (MERCADO-SÁENZ et al.,

2010).

Ao longo dos anos, o envelhecimento tem sido objeto de estudo e inúmeras teorias foram desenvolvidas no intuito de compreender este processo. Por falta de evidências, muitas destas teorias foram descartadas e outras, permanecem apresentando conceitos plausíveis, apesar de não serem totalmente satisfatórias por se tratar de um processo multifatorial (CABRERA, 2015; JIN, 2010; MERCADO-SÁENZ et al., 2010).

Há algum tempo, as teorias modernas do envelhecimento eram divididas em duas principais categorias: teorias programadas e de danos ou erros. As teorias programadas sugerem que o envelhecimento segue uma sequência biológica e que alterações genéticas poderiam afetar a regulação de sistemas vitais do organismo, enquanto as teorias de danos ou erros se referem aos danos cumulativos que os fatores ambientais causam nos organismos levando ao envelhecimento (CABRERA, 2015; JIN, 2010). Atualmente, as teorias se dividem em biológicas, onde o envelhecimento é tido como um processo evolutivo controlado por genes e susceptível aos danos físico-químicos e que esses seriam cumulativos; e as teorias psicológicas, as quais buscam explicar as mudanças que ocorrem nesse processo (CABRERA, 2015).

Visto que as teorias do envelhecimento apresentam visões diferentes, os métodos para tratar e prevenir doenças em indivíduos idosos podem ser discrepantes. Nesse sentido, pesquisadores da área gerontológica devem atentar nessa questão que pode ser crucial para o manejo e desfecho destes pacientes (GOLDSMITH, 2013).

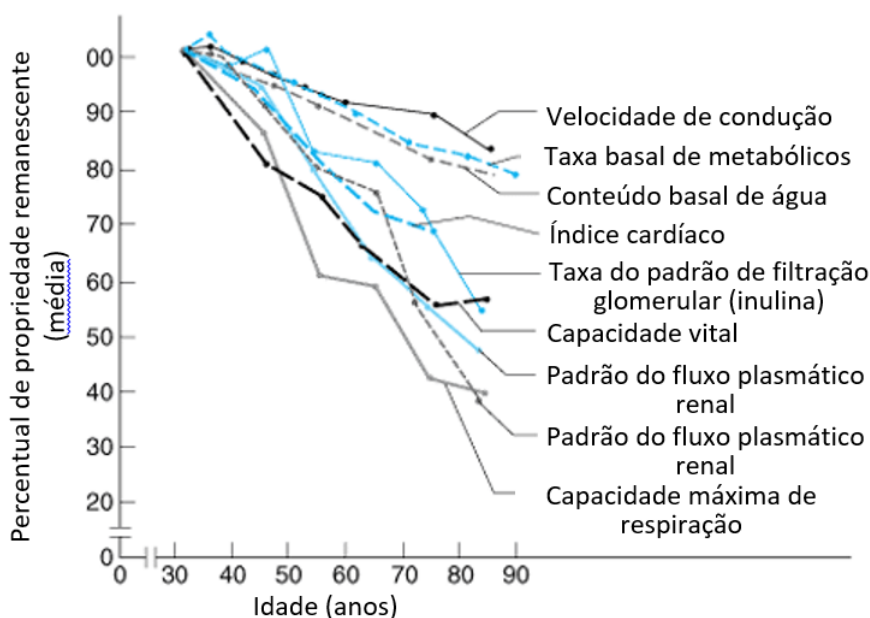
Com o avanço da idade, diferentes condições e alterações fisiológicas como diminuição do débito cardíaco em repouso, capacidade respiratória, taxa de filtração renal, velocidade de condução nervosa e desidratação podem se desenvolver, contribuindo frequentemente no desenvolvimento de doenças típicas de idosos, como osteoporose, diabetes tipo II, cardiopatias, diferentes tipos de câncer e perda óssea e de massa muscular (JAFARINASABIAN et al., 2017). Essas alterações decorrentes do processo de envelhecimento estão exemplificadas na Figura 1.

2.3 METABOLISMO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo especializado, endurecido por mineralização, o qual apresenta funções mecânicas que proporcionam rigidez, suporte e proteção ao corpo, auxiliando na locomoção e funções homeostáticas, como a manutenção dos níveis adequados de cálcio sérico. Esse processo ocorre continuamente devido a renovação do tecido ósseo, chamado de remodelação óssea, que se

traduz na auto regeneração deste tecido (DATTÀ *et al.*, 2008; DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012; HARADA; RODAN, 2003; KINI, NANDEESH, 2012). A matriz óssea é constituída por uma parte inorgânica, constituída por hidroxiapatita e uma parte orgânica, constituída por proteínas de colágeno. O processo de formação do tecido ósseo basicamente ocorre em 3 etapas: síntese da matriz orgânica extracelular, mineralização da matriz que acarretará na formação do osso e remodelação óssea, que inclui os processos de formação e reabsorção óssea (KINI, NANDEESH, 2012). Em indivíduos adultos hígidos, espera-se que haja um equilíbrio entre a formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção óssea pelos osteoclastos, para manter a massa óssea corporal e dar resistência à deformidade. Com o avanço da idade este equilíbrio não se mantém, ocorrendo uma menor formação óssea e uma maior reabsorção, resultando em osteoporose e fraturas (COSMAN *et al.*, 2014; DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012).

Figura 1- Alterações do envelhecimento sobre diferentes valências fisiológicas



Fonte: Adaptado de Gardner & Shoback, 2011.

A remodelação óssea é um processo contínuo e coordenado que envolve osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Em resposta a micro danos ou cargas mecânicas variadas, os osteoclastos tem como função remover os ossos velhos e os osteoblastos, de repor novo osso (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012; DUQUE; TROEN, 2008; RIVADENEIRA; MAKITIE, 2016). Os osteócitos são

células mecanosensitivas que atuam controlando a ação dos osteoclastos e osteoblastos afim de manter o processo de remodelação óssea equilibrado (RIVADENEIRA; MAKITIE, 2016). A remodelação segue uma sequência, que se inicia com a destruição dos ossos antigos, deposição de osteoide (osso não mineralizado) e por fim, a mineralização da matriz celular orgânica (DUQUE; TROEN, 2008).

Os osteoclastos derivam da linhagem hematopoiética monocítica, possuem o mesmo progenitor dos macrófagos e são as principais células envolvidos na reabsorção óssea. Neste processo ocorre a acidificação do meio extracelular, desmineralização óssea e posterior degradação da matriz orgânica (DUQUE; TROEN, 2008; GIANNOUDIS; KANAKARIS; EINHORN, 2007). A deficiência dos osteoclastos resulta em um estado ósseo fragilizado enquanto que a atividade excessiva dos osteoclastos acarreta na diminuição da massa óssea. Em ambos os casos ocorre a indução à osteoporose (INDO et al., 2013). Em contrapartida, os osteoblastos são células fibroblásticas originadas dos precursores do estroma da medula óssea, os quais formam um novo osteóide e estimulam sua mineralização (DUQUE; TROEN, 2008; GIANNOUDIS; KANAKARIS; EINHORN, 2007), sendo responsáveis pela síntese da matriz óssea e sua posterior mineralização (KINI, NANDEESH, 2012). Além do processo de remodelação óssea necessitar de uma sincronia entre os osteoclastos e osteoblastos, este processo é regulado por diversos fatores como hormônios (estrógeno, paratormônio), vitamina D, interleucinas, citocinas (fator de necrose tumoral alfa) e fatores de crescimento (DUQUE; TROEN, 2008; LIVSHITS, 2006; ROODMAN, 2006).

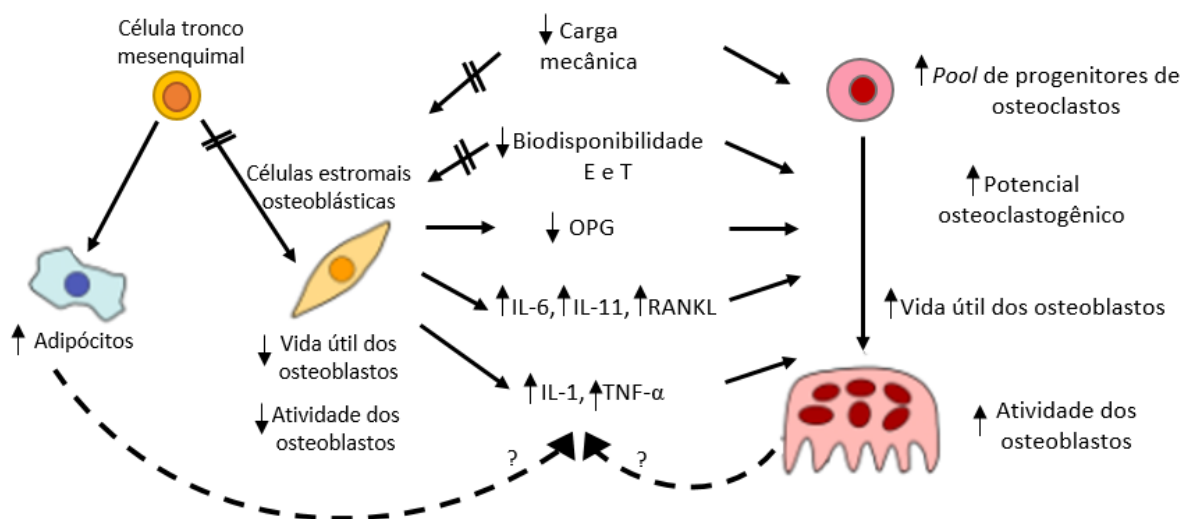
Os osteoblastos respondem a estímulos internos e externos e juntamente com as células estromais produzem fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CFS), ativador de receptores ligados à membrana do ligante NFkB (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), que são fatores que regulam a diferenciação dos osteoclastos (DUQUE; TROEN, 2008; GIANNOUDIS; KANAKARIS; EINHORN, 2007; ROODMAN, 2006).

Os osteoclastos e seus precursores expressam o receptor RANK que interage com o RANKL promovendo a diferenciação e atividade dos osteoclastos, prevenindo a morte destas células e, paralelamente, os osteoblastos produzem o receptor OPG que bloqueia a interação do RANKL com RANK contribuindo para a regulação do processo, evitando o aumento da osteoclastogênese e reabsorção óssea (DUQUE; TROEN, 2008; GIANNOUDIS; KANAKARIS; EINHORN, 2007; ROODMAN, 2006). Fatores como PTH, vitamina D, citocinas e prostaglandinas estimulam a formação dos osteoclastos por meio do aumento da expressão de RANKL na superfície dos precursores dos osteoblastos e de células estromais (DUQUE; TROEN, 2008; ROODMAN, 2006).

A associação do envelhecimento a fatores intrínsecos, como genéticos, hormonais, bioquímicos e alterações celulares e, extrínsecos, no caso de nutrição, exercício físico, comorbidades e drogas acelera a redução da massa óssea que, conseqüentemente, expõe o indivíduo a um maior risco de fraturas (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012; DUQUE; TROEN, 2008; MANOLAGAS; KOUSTENI; JILKA, 2002).

No caso das alterações celulares, ocorrem mudanças na mobilidade e diferenciação de células tronco mesenquimais causando alterações na celularidade óssea (DUQUE; TROEN, 2008). Essas alterações incluem um maior número de adipócitos com conseqüente diminuição do número de osteoblastos e uma maior apoptose, reduzindo a vida útil dos osteoblastos, gerando uma menor taxa de remodelação óssea (CHAN; DUQUE, 2002; DUQUE; TROEN, 2008) (Figura 2).

Figura 2- Mecanismo de alterações celulares associadas ao envelhecimento



Fonte: Adaptado de Duque and Troen (2008).

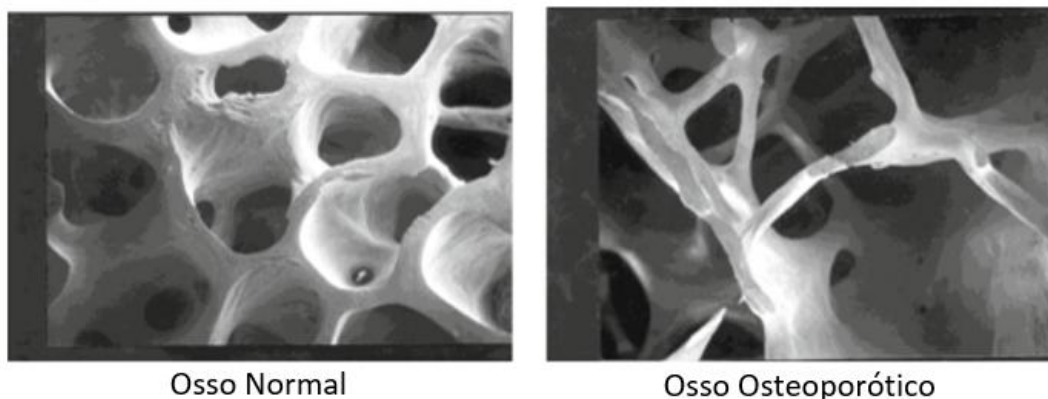
Nota: Alterações celulares ósseas associadas ao envelhecimento: Devido a fatores intrínsecos e extrínsecos citados anteriormente, os osteoblastos têm sua função diminuída, com menor secreção de OPG e aumento da secreção de RANKL, interleucinas e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o que estimula uma maior formação e atividade dos osteoclastos, aumentando a osteoclastogênese e reabsorção.

2.3.1 Osteoporose

A osteoporose (OP) é um importante problema de saúde que atinge significativamente a população com idade mais avançada (DUQUE; TROEN, 2008; TROEN, 2003). É uma doença óssea progressiva, com maior prevalência em mulheres, e é caracterizada por redução da massa óssea e deterioração microestrutural esquelética, o que resulta em um aumento do risco de fraturas

(ENDOCRINE SOCIETY, 2015; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014). A susceptibilidade à osteoporose é uma condição multifatorial (RIVADENEIRA; MAKITIE, 2016), onde os fatores como idade, sexo, peso, IMC (índice de massa corporal), hábitos de vida, alimentação, atividade física e fatores genéticos podem influenciar. No entanto, fatores como envelhecimento e menopausa são os principais responsáveis pela perda óssea (ENDOCRINE SOCIETY, 2015) (Figura 3).

Figura 3- Foto de arranjo de microarquitetura de osso normal (esquerda) e osso acometido por osteoporose (direita)



Fonte: Adaptado de Cosman *et al.* (2014).

A OP afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Indivíduos com esta alteração apresentam maior risco de sofrer fraturas, sendo que, aproximadamente 1 em cada 2 mulheres, e até 1 em cada 4 homens, com idade igual ao superior a 50 anos, sofrerão uma fratura osteoporótica (KERR *et al.*, 2017). A maioria das mulheres com osteoporose é assintomática, dificultando a pesquisa epidemiológica da doença, especialmente no Brasil, onde as características regionais são muito heterogêneas (BACCARO *et al.*, 2015; MARINHO *et al.*, 2014).

Por haver perda óssea com o avanço da idade, a densidade mineral óssea (DMO) irá reduzindo e isso ocorre, em grande parte, decorrente do aumento da reabsorção óssea que potencializa a perda óssea, aumentando o risco de fraturas (DUQUE; TROEN, 2008; JAFARINASABIAN *et al.*, 2017).

A principal ferramenta para diagnosticar e monitorar a osteoporose é a determinação da densidade mineral óssea (DMO) (ENDOCRINE SOCIETY, 2015; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014). A DMO é determinada por um T-score baseado na diferença de desvio padrão da DMO média de uma população adulta saudável com distribuição normal, expressa por um número negativo

(KLING; CLARKE; SANDHU, 2014), sendo os sítios de escolha para a avaliação da DMO por DXA a coluna lombar e colo do fêmur (COSMAN et al., 2014). Segue abaixo Tabela 1 com a classificação da osteoporose com base no T-score da DMO segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

Tabela 1 - Critérios da Organização Mundial de Saúde para a classificação da osteoporose

Classificação	T-score
Normal	0 a 0,99
Osteopenia	-1,0 a -2,49
Osteoporose	$\leq -2,5$
Osteoporose grave ou estabelecida	$< -2,5$ com fratura

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS), 1994.

2.3.2 Menopausa e metabolismo ósseo

A menopausa está relacionada com diversas doenças crônicas devido a cessação da produção do hormônio estrógeno (ARJMANDI et al., 2017). Com a diminuição dos níveis de estrógeno, ocorre um aumento na formação e atividade dos osteoclastos devido à elevação dos níveis de RANKL e diminuição da apoptose dos osteoclastos (DUQUE; TROEN, 2008; FRENKEL et al., 2010; MANOLAGAS; KOUSTENI; JILKA, 2002; SYED; KHOSLA, 2005). Isso leva a um aumento significativo na reabsorção óssea acelerando a perda óssea (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012; SYED; KHOSLA, 2005). Durante 5-10 anos após menopausa, as mulheres podem perder até 20% de tecido ósseo e esta perda continua até 1% por ano nos anos subsequentes e, em casos de doenças ou imobilização, essa taxa pode ser maior (ARJMANDI et al., 2017; JAFARINASABIAN et al., 2017). As fraturas osteoporóticas são grandes responsáveis pela morbidade e mortalidade em mulheres pós-menopausa (BLIUC et al., 2015; SULLIVAN et al., 2017).

A associação da perda óssea com a deficiência de estrógeno é explicada por diversos mecanismos. Em geral, o estrógeno controla os mediadores da reabsorção óssea, inibindo a formação e atividade dos osteoclastos e aumentando a produção de osteoprotegerina (OPG) ou fator de crescimento

e transformação beta (TGF- β), que por sua vez, induz a apoptose dos osteoclastos (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012; TROEN, 2003).

2.3.3. Exercício físico e metabolismo ósseo

Com o avanço da idade há uma diminuição da atividade física e da carga mecânica (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012). A redução da carga mecânica gera diminuição de secreção de OPG, o que causa aumento da expressão e secreção de citocinas, que implicam em uma maior formação e atividade dos osteoclastos, além de permitir uma maior ligação entre do RANKL ao RANK acarretando em aumento da osteoclastogênese e reabsorção óssea (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012; RUBIN, J.; RUBIN C.; JACOBS, 2006).

Os exercícios de levantamento de peso e fortalecimento muscular têm como função melhorar a força, agilidade, postura e equilíbrio, contribuindo para a redução do risco de quedas e prevenção de osteoporose. No entanto, cada paciente deve ser orientado quanto ao tipo e grau de atividade pois em alguns casos o exercício aumenta o risco de quedas e fraturas (COSMAN et al., 2014; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014).

Segundo *American College of Sports Medicine (ACSM)* os exercícios físicos de alta a moderada intensidade e de resistência auxiliam a manter ou aumentar a massa óssea em adultos, no entanto os efeitos da atividade aeróbica na massa óssea em mulheres pós-menopausa ainda não está totalmente esclarecida (WEN et al., 2016).

2.3.4 Vitamina D, cálcio e PTH e metabolismo ósseo

Há um consenso entre os pesquisadores que, a ingestão adequada de vitamina D e cálcio, associados à exercício físico moderado, são úteis na prevenção e tratamento da osteoporose (IOM, 2011; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014). A ingestão de níveis adequados de cálcio e vitamina D auxiliam na formação dos ossos e na manutenção da densidade óssea, bem como, redução da taxa de quedas em idosos e risco de fratura de quadril em pacientes com osteoporose (KLING; CLARKE; SANDHU, 2014).

A manutenção dos níveis adequados de calcemia é um fator contribuinte para a saúde óssea e desempenho muscular a fim de manter o equilíbrio e diminuir o risco de quedas (COSMAN et al.,

2014; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014).

A baixa concentração de 25(OH)vitD tem importante papel no processo de perda óssea, pois acarreta em diminuição dos níveis séricos de 1,25(OH)₂vitD e, conseqüentemente, diminuição da absorção de cálcio que aumenta a secreção do paratormônio (PTH) (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012). Por sua vez, o aumento do PTH intensifica a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea implicando em perda óssea cortical (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012; LIVSHITS, 2006) ao passo que a diminuição dos níveis de PTH parecem aumentar a formação de osteoblastos (KINI; NANDEESH, 2012). Com o avanço da idade associado à baixa ingestão dietética, o cálcio pode estar diminuído independentemente do nível sérico de vitamina D devido à menor absorção de cálcio intestinal, o que pode contribuir para desencadear o hiperparatireoidismo secundário fisiológico (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012). Com isso, o cálcio sérico é o principal sinal de regulação para o PTH, onde o cálcio sérico é inversamente proporcional ao nível de PTH (KINI; NANDEESH, 2012).

A vitamina D também está envolvida nas alterações ósseas relacionadas com a idade. Sabe-se que, devido à redução da exposição solar e menor capacidade de metabolizar vitamina D pela pele e, somado à redução da ingestão de alimentos ricos em vitamina D, há uma deficiência generalizada de vitamina D na população idosa (DUQUE; TROEN, 2008; KIRA; KOBAYASHI; YOSHIKAWA, 2003; LIPS, 2007). Essa deficiência de vitamina D desencadeia hiperparatireoidismo secundário que tem como consequência, uma maior reabsorção óssea pelos osteoclastos (DUQUE; TROEN, 2008; LIPS, 2007).

Durante a fase inicial da perda óssea na pós-menopausa, a secreção de PTH é suprimida e posteriormente a secreção começa a ser aumentada levando consigo o aumento do remodelamento ósseo (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012).

2.4 A HISTÓRIA DA VITAMINA D

Em meados de 1800, durante o período de crescimento industrial que ocorria na Europa, inúmeros casos de raquitismo e doenças relacionadas ao sistema imune foram relatados. A prevalência dessas complicações ósseas era tão elevada que a condição era chamada de “A doença Inglesa” (do inglês the English Disease) e, na época foi relacionada ao modo como as pessoas se alimentavam, mais precisamente, decorrente de algum item em sua alimentação, como idealizado por Sir Mellanby (DELUCA, 2014).

O conceito de vitaminas ainda estava em elaboração e mesmo não sendo totalmente claro, Funk sugeriu que havia, além do balanço entre carboidratos, gorduras, proteínas e sais, algum elemento que ainda não estava descrito e que talvez fosse o agente etiológico das alterações (SIMONI; HILL; VAUGHAN, 2002; DELUCA, 2014).

Nesse sentido, Harry Steenbock, utilizando conceitos trazidos por Funk, descobre um grupo de substâncias que seriam consideradas “Aminas Vitais” ou, mais tarde chamadas, de Vitaminas e classificadas conforme suas características, sendo a vitamina A, a primeira descrita, com características solúveis em gordura, enquanto a Vitamina B, com características solúveis em água, foi descrita posteriormente. Outra importante vitamina descrita na época foi a vitamina C que aparentemente tinha as mesmas características de solubilidade em água, embora apresentasse outras funções no organismo (HOLICK, 2006; DELUCA, 2014).

Ainda que erroneamente, o tratamento para o raquitismo e osteomalácia fosse realizado por meio da suplementação de óleo de fígado de bacalhau, rico em vitamina D, pois até o momento, acreditava-se que a etiologia dessa patologia era a deficiência de vitamina A.

Essa teoria foi contestada e refutada por Sir Mellanby em um estudo publicado no ano de 1919, mostrando que ao oxigenar o composto de óleo de fígado de bacalhau e, conseqüentemente, destruir as moléculas de vitamina A, ainda assim, prevenia e tratava as doenças relacionadas aos ossos (DELUCA, 2014). A percepção de que algo fora responsável pelo tratamento do raquitismo, com as mesmas características lipofílicas, e que não era nenhuma das vitaminas já descobertas é que determinou-se a nomenclatura da Vitamina D (SIMONI; HILL; VAUGHAN, 2002).

Ainda por essa época, na tentativa de tratar as deformidades ósseas características do raquitismo, Sniadecki sugeriu a possibilidade de que as crianças que tinham uma menor exposição solar eram as que mais comumente apresentavam essas alterações (WACKER; HOLICK, 2013). Observações comparativas entre crianças da zona rural que, teoricamente, apresentavam uma maior exposição solar e crianças que viviam na cidade, local onde havia grande área de sombras decorrente da proximidade dos prédios e da poluição que se acumulava sobre as cidades, nortearam a hipótese de que a chave para aquela alteração estava relacionada ao processo de exposição solar.

Anos se passaram para que testes com lâmpadas de mercúrio fossem utilizadas e se percebesse que aquelas crianças que estavam sendo irradiadas apresentavam melhoras importantes no quadro clínico. Huldschinsky, em 1922 realizou a importante observação que mesmo expondo apenas um braço, o efeito do tratamento se estendia até o resto do organismo, melhorando também os outros

membros acometidos pelo raquitismo, dando início ao pensamento de que com a exposição solar, algo acontecia na pele e, de alguma forma, transitava pelo organismo promovendo uma ação protetora (HOLICK, 2016).

Embora já existisse a consciência a respeito da ação sobre a homeostasia calcêmica e a influência do sol sobre esse sistema, a vitamina D foi apenas identificada em meados de 1932, quando (ASKEW et al., 1930), isolaram pela primeira vez a vitamina após irradiar com luz UV um composto de ergosterol.

Nos anos seguintes, com avanço da capacidade analítica, foram identificados o 7-deidrocolesterol, um importante precursor esteroide e, posteriormente a vitamina D₃, sintetizada na pele, nos anos de 1935 e 1937, respectivamente (DELUCA, 2014).

2.4.1 Biossíntese da vitamina D

A vitamina D foi inicialmente reconhecida no início do século 20 como uma vitamina lipossolúvel e, por esse motivo, as descobertas envolvendo seu metabolismo se nortearam por itens relacionados ao sistema precursor esteroide, como anteriormente descrito com a identificação do 7-deidrocolesterol (DELUCA, 2014).

Embora a exposição solar seja a forma mais importante para aquisição de níveis adequados de vitamina D (RIVAS et al., 2017), é importante lembrar que esta é possível de se obter por duas formas. Uma dessas formas precursoras é o ergocalciferol (vitamina D₂) que pode ser obtido por meio de fontes vegetais e, em alguns países, por alimentos enriquecidos ou de suplementos diretos (SCHLÖGL; HOLICK, 2014; WU et. al., 2017).

Os alimentos fortificados como, por exemplo, alguns tipos de leite, sucos e cereais, gema de ovo, peixe de água salgada e fígado também são importantes fontes de vitamina D (COSMAN et al., 2014; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014). Semelhantemente, todos os organismos vegetais apresentam em sua constituição uma quantidade de ergosterol que, invariavelmente, pode apresentar diferenças em sua concentração dependendo da espécie em questão (BAUR et al., 2016). Sob radiação dos raios UV-B's, em um comprimento de onda de 260nm, esse composto sofre uma reação de hidrólise e origina a substância precursora de vitamina D conhecida como pré-vitamina D₂. Após esse arranjo, na presença de calor, ocorre um novo processo de isomerização e a vitamina D₂ é formada (WACKER; HOLICK, 2013).

Outra forma de obtenção de vitamina D é por meio do colecalciferol (vitamina D₃) que,

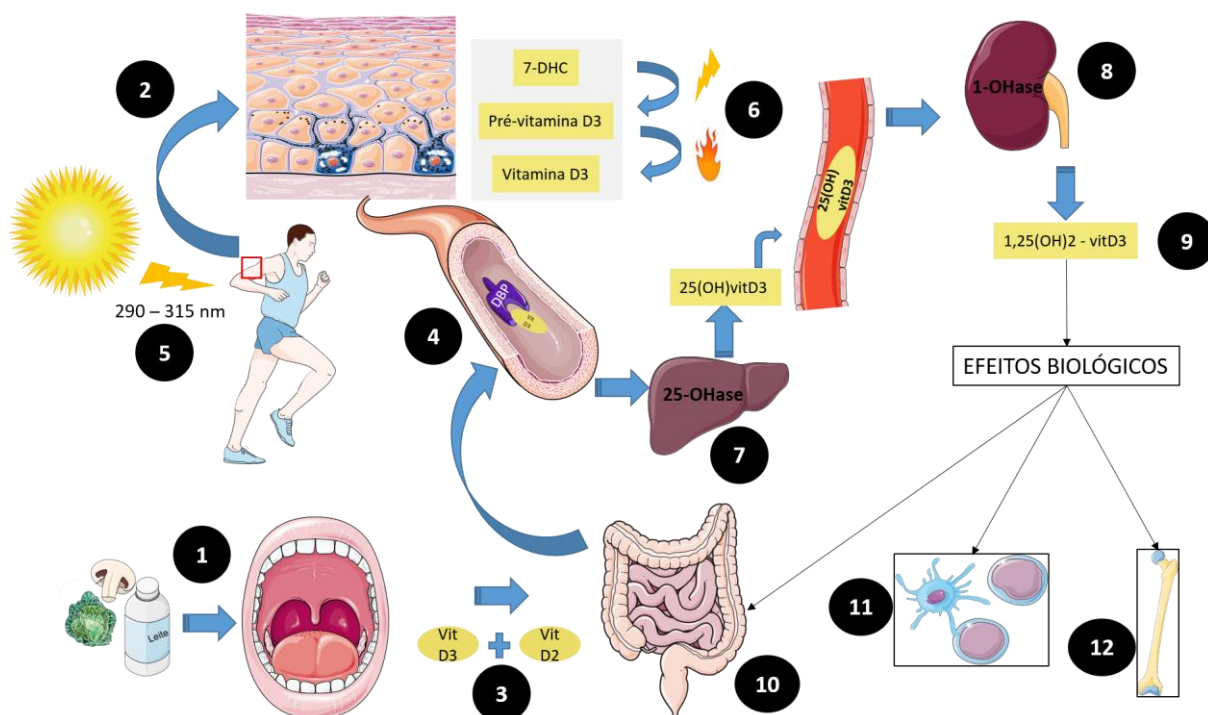
diferentemente da forma D₂, pode ser obtido por meio de óleos de peixes e outras fontes de origem animal e, principalmente, sintetizado no próprio organismo quando ocorre a exposição ao sol em condições apropriadas (GIRGIS et al., 2013; SCHLÖGL; HOLICK, 2014; WACKER; HOLICK, 2013).

Os raios UV-B's em comprimentos de onda de 290 a 315nm, ao irradiarem a pele, iniciam um processo de fotólise do 7-deidrocolesterol (pró-vitamina D₃) que forma a pré-vitamina D₃ na membrana plasmática dos queratócitos da derme. Uma vez formada a pré-vitamina D₃, com o aumento da temperatura da pele, ocorre a conversão para vitamina D₃. Quando absorvidos de forma adequada as vitaminas D₂ e D₃ são incorporadas aos quilomícrons e transportados para o sistema linfático (HOLICK, 2016).

A vitamina D proveniente da síntese cutânea ou ingerida pode ser armazenada e liberada do tecido adiposo. Quando liberada, o transporte desta se dá pela sua proteína carreadora, a proteína ligante de vitamina D, onde em um primeiro momento é transportada ao fígado para através da vitamina-D-25-hidroxilase (25OHase) e, principalmente sob ação das enzimas P450, CYP2R1, ser convertida em 25-hidroxivitamina-D (25(OH)vitD) (PONCHON; KENNAN; DELUCA, 1969) (LI et al., 2017). A participação do fígado, sendo o principal conversor de vitamina D₃ em 25(OH)vitD ficou claro em estudo onde, após a hepatectomia parcial houve diminuição intensa na formação desse composto (PONCHON; KENNAN; DELUCA, 1969).

Decorrente de ser o metabólito formado em maior quantidade e também por apresentar melhores características para identificação, este é considerado o melhor parâmetro dos níveis séricos de vitamina D, já que este é uma soma dos níveis de vitamina D₂ e D₃. Uma vez sintetizado essa porção, a vitamina D é transportada até os rins onde, sob ação da enzima D-1alfa-hidroxilase (1-Ohase), converte a 25-hidroxivitamina-D em 1,25-dihidroxivitamina-D (1,25(OH)₂D), sua forma mais ativa e que exerce as funções fisiológicas conhecidas (Figura 4). A forma ativa da vitamina D se liga ao receptor nuclear e desempenha um importante papel no metabolismo do cálcio influenciando os osteoclastos e osteoblastos (DABIRNIA et al., 2016).

Figura 4 - Síntese de vitamina D e ações fisiológicas



Fonte: O Autor (2017), utilizando o site <http://servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Legenda: Existem duas formas de obtenção de vitamina D: (1) por meio da alimentação e (2) por meio da síntese endógena (pele). (3) As oriundas de vegetais são denominadas ergocalciferol (vitamina D2), enquanto as oriundas de alimentos de origem animal são denominadas de colecalciferol (vitamina D3). (4) Independente de qual a forma é adquirida na alimentação, tanto a porção D2 quanto a D3 são carregadas até o intestino pelos quilomícrons. Uma vez que atinja a porção intestinal, ligam-se à proteína carreadora de vitamina D (DBP). (5) Outra forma de obtenção de vitamina D é por meio da exposição aos raios solares (290 a 315 nm) que ao incidir na pele, estimulam o precursor esteroide 7-deidrocolesterol (7DHC) a formar a pré-vitamina D3. (6) Em uma reação dependente de calor é formada a vitamina D3. (4) A forma D3 irá se ligar à DBP. (7) A DBP irá conduzir a forma precursora da vitamina D até o fígado onde, sob ação da enzima 25-hidroxilase, irá formar a 25-hidroxi-vitamina D (25(OH)vitD), ainda sem atividades fisiológicas. (8) Nos rins, a enzima 1-alfa-hidroxilase (1OHase) metaboliza a 25(OH)D e (9) forma a 1,25 dihidroxi-vitamina D (1,25(OH)2-vitD) com funções biológicas (10) no intestino aumenta a absorção de cálcio proveniente da alimentação, (11) a atividade das células do sistema imune, e (12) no tecido ósseo estimula a diferenciação de osteoclastos.

2.4.2 Funções da vitamina D

Durante os anos após a descoberta da relação da vitamina D com o tratamento do raquitismo e osteomalácia, o processo de conhecimento acerca dessa substância se estagnou. Ainda nesse período tentava-se apenas descobrir como a presença desse produto auxiliava no tratamento e prevenção dessas patologias que envolviam os ossos. Somente no final da década de 50, Schachter and Rosen testaram e comprovaram a participação da vitamina D no transporte ativo do cálcio presente no lúmen intestinal para o compartimento plasmático (DELUCA, 2014; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014) e a capacidade de modulação da função renal, aumentando ou diminuindo a excreção ou reabsorção do

cálcio renal (SUTHERLAND et al., 1992), definindo assim a principal função o papel na homeostasia calcêmica e saúde óssea (CAPRIO et al., 2016a).

Mesmo sendo consolidada essa função primária da vitamina D, a presença de receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$ por quase todo o organismo (CAPRIO et al., 2016a), fomentaram novos estudos para a compreensão de processos extra-ósseos que essa substância poderia estar envolvida (BOUILLON et al., 2008; CAPRIO et al., 2016^a; HOLICK, 2006).

Com o avanço das técnicas de avaliação tanto molecular, quanto histológicas, foi possível identificar a presença dos receptores de vitamina D (VDR), não apenas no intestino, mas em outros tecidos como coração, rins, ossos, tireoide, placenta, fígado, endotélio, músculo liso vascular, cardiomiócitos e cérebro (CAPRIO et al., 2016a; SCHLÖGL; HOLICK, 2014; SUTHERLAND et al., 1992). Utilizando essas evidências como base, estudos começaram a demonstrar a participação da vitamina D em diferentes condições, patologias ou na participação direta de processos fisiológicos como por exemplo, sistema imune, metabolismo da glicose, formação do tecido adiposo, sistema cardiovascular, sistema reprodutivo, funções cognitivas e proliferação celular (CAPRIO et al., 2016^a; PIKE; LEE; MEYER, 2014).

Sutherland et al. (1992) relataram pela primeira vez a presença de receptores de vitamina D (VDR) no cérebro. Em estudos mais detalhados, foi possível verificar que os VDR's localizavam-se desde o córtex pré-frontal, passando pelo giro do cíngulo, prosencéfalo, tálamo, substância negra, hipotálamo e cerebelo (SCHLÖGL; HOLICK, 2014).

A presença desses receptores nas mais variadas áreas do cérebro, levaram os estudiosos a discutirem sobre a participação da vitamina D nesse contexto. Ginde e colegas em 2012, realizaram a avaliação da variação da vitamina D na população e verificaram como isso poderia estar associado a resultados cerebrais adversos, como alterações psiquiátricas ou neurodegenerativas (GINDE; LIU; CAMARGO, 2009).

Outra importante função extra-óssea da vitamina D pode ser observada com relação a função muscular. O músculo esquelético apresenta grande concentração de VDR's e, por esse motivo, pode ser considerado um alvo importante para a porção biologicamente ativa da vitamina D (CAPRIO et al., 2016a).

No tecido muscular a $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$, ao se ligar no receptor de vitamina D, promove a síntese e o aumento da entrada do cálcio no retículo endoplasmático contribuindo para a eficiência da contração muscular (CAPRIO et al., 2016a). Sabe-se também, que os sinais da hipovitaminose D são associados

com mialgia e perda da força muscular, além de, em indivíduos que foram submetidos a biópsias, ser evidenciado a atrofia de fibras musculares do tipo II, com características de contração rápida (DAWSON-HUGHES, 2017a).

Embora a associação direta entre vitamina D e contração muscular ou diferenciação de células musculares ainda seja dependente de mais estudos para melhor entendimento, a sua relação parece estar bastante elucidada, pois, estudos que relacionam a frequência de quedas e níveis séricos de vitamina D parecem ter resultados interessantes. Isso foi bem demonstrado em estudo realizado por Bischoff-Ferrari et al. (2009), quando por meio de uma revisão sistemática publicada em revista de alto fator de impacto, descreveu que a suplementação de vitamina D em doses entre 700 – 1000 UI, eram capazes de atingir níveis ótimos de vitamina D no organismo, reduzindo em até 19% o risco de quedas entre idosos. Por outro lado, aqueles que eram suplementados com doses inferiores a 700 UI de vitamina D, não havia diferença quanto ao risco de quedas (BISCHOFF-FERRARI et al., 2009).

Como citado anteriormente, a forma como isso ocorre ainda não é totalmente elucidada, contudo, acredita-se que a ligação da porção bioativa de vitamina D ao receptor ancorado à célula muscular, desencadeia um processo de sinalização até o núcleo celular que estimula a síntese de fibras musculares, nesse caso de contração rápida, que minimiza a ocorrência de quedas devido ao aumento da capacidade de resposta muscular e ganho de força muscular (BISCHOFF-FERRARI et al., 2009; HOLICK, 2016).

Ainda em relação às ações da vitamina D, tem se destacado a avaliação dos níveis dessa substância e sua relação com processos imunológicos ou dependentes de inflamação (MORY et al., 2009). Essa relação foi primeiramente descrita quando, em 1903, o médico Nils Finsen demonstrou que era capaz de realizar o tratamento da forma epidermóide da tuberculose com a irradiação concentrada de luz UV e, decorrente dessa descoberta, foi condecorado com o prêmio Nobel de Medicina ou Fisiologia (CHUN et al., 2014; (WACKER; HOLICK, 2013).

Embora essa relação ainda esteja sendo exaustivamente testada, a relação causal ainda não é clara e, até o ano de 2016, em revisão da literatura realizada por Caprio et al., não havia nenhum estudo que trouxesse essa informação (CAPRIO et al., 2016a). A presença do VDR é reconhecida tanto em células relacionadas ao processo imune adaptativo, quanto na imunidade inata, sendo identificados em células dendríticas ativadas, macrófagos e linfócitos (HARINARAYAN, 2014; VANHERWEGEN; GYSEMANS; MATHIEU, 2017).

De maneira bastante interessante, essas células relacionadas à defesa do organismo, apresentam,

em algum momento de sua maturação, receptores para a porção bioativa da vitamina D e, da mesma forma que os rins, apresentam a enzima 1- α -hidroxilase, tendo a capacidade de converter a 25(OH)vitD em 1,25(OH)₂vitD no local (CAPRIO et al., 2016a).

A capacidade em interagir e gerar efeitos em diferentes células do sistema imune, faz com que seja observada uma relação entre os níveis séricos de vitamina D e diferentes patologias relacionadas ao sistema imune (VANHERWEGEN; GYSEMANS; MATHIEU, 2017). A rinite alérgica, asma, dermatites, resistência insulínica, entre outros, são exemplos que podem ser relacionados aos casos de hipovitaminose (CHIRUMBOLO et al., 2017; WU et al., 2017).

Com relação ao processo imune inato, novos estudos têm sugerido a participação da vitamina D em contexto complexo, atuando de formas diferentes em locais distintos. Nesse aspecto, parece haver o reconhecimento da vitamina D como uma molécula que atua também de forma anti-inflamatória, ao mesmo tempo que contribui para a síntese de peptídeos que auxiliam na identificação e eliminação de microrganismos (CHIRUMBOLO et al., 2017; CHUN et al., 2014; WU et al., 2017).

De fato, o pleiotropismo da vitamina D, atuando em tantos outros sistemas além do ósseo, pode ser explicado em parte pela presença maciça de receptores por todos os outros tecidos do organismo (CAPRIO et al., 2016a; CHIRUMBOLO et al., 2017). Contudo, o simples acontecimento de existir a presença do receptor não reflete em uma ação intensa com capacidade de modulação e, por esse motivo, estudos direcionados à maneira como a vitamina D atua, tentam explicar essa relação. Os efeitos da ação da vitamina D são classificados em ações genômicas ou não-genômicas (CHIRUMBOLO et al., 2017). Segundo estudo realizado por Bouillon et al, 2008, aproximadamente 3% do genoma de ratos e humanos são modulados pelos níveis de vitamina D (BOUILLON et al., 2008; CAPRIO et al., 2016a).

A resposta genômica desencadeada pode levar de horas a dias para se manifestar (HARINARAYAN, 2014), mas independentemente disso, o que vem despertando curiosidade é como esses efeitos mediados pela porção bioativa da vitamina D desenvolvem esse processo. Até o momento, existe a identificação que a 1,25(OH)₂vitD, quando realiza a ligação com o receptor de vitamina D, desencadeia a formação de um complexo retinóide que irá se ligar ao núcleo e estimular a resposta de determinados íntrons (HARINARAYAN, 2014), semelhante à ação de outros hormônios esteroides (MORRIS, 2014). Nesse sentido, o VDR é entendido como um fator de transcrição nuclear que irá mediar diferentes ação fisiológicas no organismo (LEE et al., 2017).

Em estudo realizado por Afzal et al (2014), foi apresentado que níveis abaixo dos recomendados

de 25(OH)₂vitD estavam relacionados com o aumento de todas as causas de mortalidade, desde câncer até patologias cardiovasculares (AFZAL et al., 2014). A ação desencadeada nos genes responsivos à ação da vitamina D na região reguladora do genoma, são denominados de elemento de resposta de vitamina D (VDRE) que na maioria das vezes se encontram próximo ao local de transcrição do gene (MORRIS, 2014). Quando ocorre a ligação desse complexo, proteínas coativadoras são recrutadas e este complexo gera um rearranjo da cromatina, juntamente com algumas enzimas que adicionam ou removem grupos acetil ou metil das histonas. Após essa reorganização, a RNA polimerase II inicia a transcrição e síntese de mRNA do gene responsivo (CHIRUMBOLO et al., 2017; MORRIS, 2014).

Decorrente da participação da vitamina D em importantes funções orgânicas, como em processos relacionados ao sistema imune, auxiliando no desenvolvimento de uma resposta a um agente patogênico específico, ajudando na eliminação de bactérias e vírus, ou contribuindo para o controle da resposta inflamatória local, faz com que haja a denominação de molécula pró-sobrevivência (CHIRUMBOLO et al., 2017).

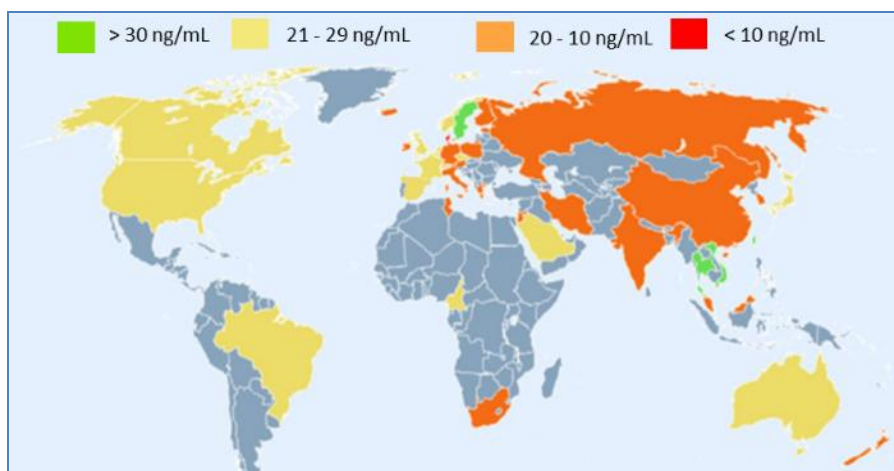
2.4.3 Epidemiologia e fatores de risco para hipovitaminose D

A melhor forma de manter os níveis ótimos de vitamina D é por meio da exposição solar. Isso se deve ao fato que aproximadamente 80% dos níveis dessa substância presentes em nosso corpo, são oriundos da síntese endógena, enquanto, apenas os outros 20% são provenientes da alimentação (CAPRIO et al., 2016b).

Existem diversos fatores que contribuem para níveis inadequados de vitamina D, obviamente, a maioria deles, relacionados ao processo de síntese cutânea e destacam-se a baixa exposição solar ou residência em latitudes superiores a 30°, pigmentação cutânea, obesidade, idade avançada, medicações em uso e dieta pobre em vitamina D (HASSAN-SMITH; HEWISON; GITTOES, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras organizações internacionais como *International Osteoporosis Foundation* (IOF), níveis deficientes e insuficientes, são um problema de saúde pública em todo o mundo, podendo ser atribuído o *status* de pandemia (Figura 5) (HOLICK, 2017; WAHL et al., 2012).

Figura 5 - Níveis de vitamina D em indivíduos com idade superior a 18 anos



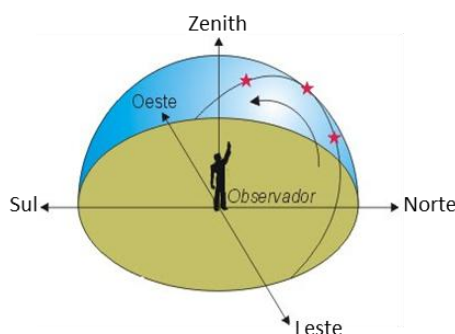
Fonte: Adaptado de www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics/vitamin-d-studies-map, 2017.

Invariavelmente, por ser a exposição solar a principal forma de obtenção de vitamina D, a maior causa de deficiência entre jovens e adultos é decorrente da baixa exposição ao sol (HASSAN-SMITH; HEWISON; GITTOES, 2017; HOLICK, 2016, HOLICK, 2017). Dados apontam que, não mais que 1% do total de radiação UV-B, alcança a superfície da terra durante o verão em regiões situadas na linha do equador (HOLICK, 2017).

O alcance dos raios UV-B até a superfície da Terra sofre uma série de interferências, sendo o mais importante, talvez, a dispersão de Rayleigh ocasionada pela atmosfera, atenuação pelo ar, absorção por moléculas de oxigênio e ozônio e alteração do espectro (HOLICK, 2017; MANICOURT; DEVOGELAER, 2008; WACKER; HOLICK, 2013).

Por ser um dos melhores “filtros” contra os raios ultra violetas, quanto maior a passagem desse espectro por esse filtro, menor será a sua capacidade de incidir sobre a superfície terrestre. Nesse sentido, ao se afastar da linha do equador, ou aumentar o ângulo Zenith (Figura 6), a incidência dos raios solares se torna mais oblíqua e, conseqüentemente, há um maior potencial absorptivo desses raios.

Figura 6 - Representação do eixo Zenith



Fonte: Adaptado de <http://geoconceicao.blogspot.com.br>, 2017.

Em cidades como Porto Alegre e região sul do país, que encontram-se em Latitude: $30^{\circ} 01' 59''$ S, Longitude: $51^{\circ} 13' 48''$ W e Altitude: 3m (ALEGRE-RS, 2017) a inclinação do eixo Zenith aumenta a capacidade de dispersão e absorção dos raios UV's, pelo ozônio e oxigênio. De forma geral, indivíduos residentes de cidades localizadas em latitudes superiores a 33° , durante o inverno, produzem uma quantidade ínfima de vitamina D. A angulação do eixo Zenith também é a explicação para a baixa ou quase nenhuma síntese de vitamina D ocorra antes das 9 da manhã e após as 15 horas da tarde (HOLICK, 2017; MANICOURT; DEVOGELAER, 2008; WEBB; KLINE; HOLICK, 1988).

Outro importante fator, ainda relacionado ao processo de síntese endógena da vitamina D, é a quantidade de pigmentação cutânea. A presença de melanina na epiderme, atua como um protetor solar. Nesse caso, tanto a pigmentação cutânea, quanto a utilização de agentes protetores solares bloqueiam de forma muito efetiva a síntese endógena (KHALID et al., 2017; WACKER; HOLICK, 2013). Uma pessoa negra, tipo VI na escala de Fitzpatrick, necessita ao menos de 5 a 10 vezes mais tempo de exposição do que uma pessoa com a pele clara, tipo II nessa mesma escala, para sintetizar a mesma quantidade de vitamina D (HOLICK, 2017; KIRA; KOBAYASHI; YOSHIKAWA, 2003). Da mesma forma, uma pessoa que realiza a aplicação correta de protetor solar (2 mg/cm^2) fator de protetor solar (FPS) 30, absorve aproximadamente 98% da radiação UV-B, diminuindo em 98% a produção de vitamina D na região da epiderme (HOLICK, 2017; KHALID et al., 2017). Importante ressaltar que a presença de roupa ou vidro, resulta no bloqueio parcial ou alteração do comprimento de onda dos raios UV-B, contribuindo para a diminuição da síntese endógena de vitamina D (WACKER; HOLICK, 2013).

Neste mesmo raciocínio, a altitude também deve ser levada em consideração, uma vez que,

quanto menor a altitude, maior será a barreira atmosférica que os raios solares terão que ultrapassar, dificultando assim, a síntese de vitamina D endógena. Isso foi comprovado em estudo realizado em 3 diferentes localidades que apresentavam altitudes diferentes, mas a mesma longitude (27° N): Agra (169 m), Katmandu (1400 m) e a base de apoio no Monte Everest (5300 m). Como o esperado, foi percebido que em Agra, com o mesmo tempo de exposição que nas demais localidades, ocorreu uma síntese reduzida de pré-vitamina D. Nesse estudo, foi observado uma correlação direta entre o aumento da altitude e níveis de 25(OH)D₃, chegando a uma produção cinco vezes maior na localidade da base do Everest a 5300 metros de altitude (WACKER; HOLICK, 2013).

Somado a todos esses fatores supracitados, deve-se levar em consideração o processo de envelhecimento. É sabido que a concentração do substrato essencial para a formação endógena de vitamina D, o 7-deidrocolesterol (7-DHC), na pele humana, é inversamente proporcional a idade (WACKER; HOLICK, 2013). Essa relação foi demonstrada quando dois grupos de indivíduos, um jovem e outro idoso, foram expostos a mesma quantidade de radiação UV-B em uma cama de bronzeamento artificial. Nesse estudo, foi demonstrado que os indivíduos jovens apresentavam uma síntese 3 vezes superior de 7-DHC que os indivíduos idosos (HOLICK; MATSUOKA; WORTSMAN, 1989). Nesse sentido, o processo de envelhecimento, independente de outros fatores, torna-se fator de risco para a hipovitaminose D.

O Brasil é um país tropical com dimensões continentais. Essa característica de ampla área territorial, permite que parte de sua população resida em zona equatorial, tropical e, ao sul do país, em região subtropical, onde há pouca possibilidade de síntese de vitamina D durante o inverno. Por esse motivo, dados epidemiológicos de níveis de vitamina D referentes ao Brasil, devem ser avaliados quanto a sua localização. De forma curiosa, embora grande parte do país se localize em região propícia ao processo de síntese de vitamina D, grande parte dos estudos apontam níveis inadequados dessa substância. Em estudo realizado por Martins, 2017, foi percebido nos anos de 2011 a 2015 uma média de vitamina D classificada apenas como insuficiente (MARTINS et al., 2017). A população estudada era residente, em grande parte, da região de Belo Horizonte, onde ocorre uma incidência dos raios solares, mais direta que ao sul do país.

Quando são avaliados indivíduos idosos institucionalizados, ocorre praticamente um padrão em qualquer área do país. Em estudo realizado por Lazaretti na cidade de São Paulo, foi observado que em 54% dos indivíduos idosos que estavam institucionalizados e aproximadamente 35% dos idosos classificados como ambulatoriais apresentavam deficiência de vitamina D (PEDROSA; CASTRO,

2005). Da mesma forma, em estudo que tive a oportunidade de participar em um centro de longa permanência na cidade de Novo Hamburgo-RS, foi percebido uma média de 21 ng/mL de 25(OH)D nos indivíduos (KICH et al., 2012).

2.4.4 Quantificação de vitamina D

A melhor forma de se verificar os níveis de vitamina D é fazendo a quantificação da sua forma circulante, a 25-hidroxivitamina D (25OHD) que devido às suas características pode ser uma tarefa complicada. Com esta medida é possível dosar sua maior forma circulante que também reflete a quantidade adquirida através da ingestão alimentar e síntese cutânea. Alguns anos atrás imaginava-se que a deficiência de vitamina D era uma característica apenas de países com alta latitude, contudo, estudos epidemiológicos de diferentes países apontam uma situação preocupante a respeito dos níveis séricos de 25OHD da população mundial (HOLICK, 2011; MAEDA et. al., 2011).

Segundo estudos atuais a deficiência de vitamina D é uma das mais comuns condições médicas não diagnosticadas no mundo, onde grande parte da população apresenta níveis séricos de 25OHD abaixo dos valores recomendados atualmente (< 20ng/mL= deficiente; 21-29ng/mL=insuficiente, >30ng/mL=suficiente), dessa forma, existe uma crescente preocupação acerca da importância clínica da dosagem dessa vitamina. Visando uma adequada quantificação dessa substância foram criados métodos de dosagem que podem incluir as técnicas de quimioluminescência (CLIA), radioimunoensaio (RIA), ELISA e cromatografia de alta eficiência (HOLICK, 2011).

As técnicas que vinham sendo em maior quantidade utilizadas para quantificação da 25OHD, por pesquisadores de diferentes partes do mundo, eram a CLIA e RIA. Entretanto, devido à grande variabilidade nos resultados obtidos por meio dessas técnicas, inicia-se uma preocupação a respeito dos resultados obtidos com o uso dessas metodologias, mostrando a necessidade de se otimizar as técnicas de análise para minimizar a variabilidade dos resultados inter-ensaios e inter-laboratoriais, mesmo quando usando a mesma técnica.

2.4.5 Receptor de vitamina D (VDR)

O receptor da vitamina D (VDR) pertence à família dos receptores esteroides e apresenta 50 KDa (DELUCA, 2004), podendo ser encontrado tanto no meio citoplasmático quanto no núcleo celular

(SPIGNA et al., 2016). A porção bioativa da vitamina D pode modular a expressão de aproximadamente 200 genes e, por esse motivo, continuamente é relacionada aos mais diversos tipos de patologias, mas principalmente, a densidade mineral óssea (SANTOS et al., 2012).

O VDR tem sido encontrado em um vasto número de tipos celulares e tecidos, os quais possuem a enzima que converte a vitamina D na sua forma ativada. Ainda, o VDR tem mostrado papel estabelecido em distúrbios metabólicos, absorção de intestinal de fosfato de cálcio, regulação de processo inflamatório, função de osteoblastos, diferenciação de macrófagos e osteoclastos, catabolismo renal da vitamina D, síntese de hormônios da tireoide e imunomodulação (AHMAD et al., 2017; MAHMOUD; ALI, 2014; SPIGNA et al., 2016).

O gene que codifica o VDR está situado no cromossomo 12, com 11 éxons, abrangendo aproximadamente 75 kb de DNA genômico (BHANUSHALI et al., 2009; WU et al., 2016). A via evolutiva da biologia da vitamina D nos seres humanos possibilitou um polimorfismo genético no receptor de vitamina D (CHIRUMBOLO et al., 2017). Sendo assim, existem quatro polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene VDR humano (SPIGNA et al., 2016; SANTOS et al., 2012).

As endonucleases de restrição ApaI, TaqI, BsmI e FokI atuam nas variantes alélicas do gene VDR e há relatos que demonstram a associação destas com a densidade mineral óssea (AHMAD et al., 2017; BHANUSHALI et al., 2009). Os alelos são A-a, T-t, B-b, F-f, respectivamente, dependendo da presença ou ausência do sítio de ligação (SPIGNA et al., 2016).

O VDR tem um domínio de ligação ligado ao DNA, domínio-C, um domínio de ligação ligado ao ligante, domínio-E e um domínio de ativação, domínio-F. Este receptor age por meio dos VDREs (elementos responsivos à vitamina D) que são sequências repetidas de 6 nucleotídeos separados por 3 bases não específicas (DELUCA, 2004).

A regulação da transcrição gênica através da ligação do VDR com a vitamina D apresenta os seguintes eventos moleculares: após a interação do VDR com o ligante, o receptor altera sua conformação, ocorre a heterodimerização com o receptor X retinóico (RXR) e os VDRE's (*vitamin D response elements*) (DELUCA, 2004; SPIGNA et al., 2016). Paralelamente, outras proteínas se ligam no complexo transcricional. Por fim, a transcrição é iniciada ou suprimida, dependendo do gene (DELUCA, 2004).

Além de regular o processo de transcrição, o VDR atua controlando os genes envolvidos na formação óssea e captação de cálcio (AHMAD et al., 2017; BHANUSHALI et al., 2009).

2.4.6 Polimorfismos do gene VDR

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) do gene VDR tem sido associados à baixa densidade mineral óssea e ao risco de fraturas, embora ainda haja controvérsias na literatura (CASADO-DÍAZ et al., 2013; PÉREZ et al., 2008; WU et al., 2016). Essas controvérsias podem estar associadas ao fato de que relação entre densidade mineral óssea, osteoporose e polimorfismos do gene VDR é influenciada pelo tamanho amostral, etnia e hábitos de vida dos participantes (WU et al., 2016).

O polimorfismo *FokI* ocorre no primeiro de dois possíveis locais de iniciação da tradução do éxon 2, é considerado um polimorfismo de transição T/C (ATG para ACG) e é definido pela enzima de restrição FokI (BHANUSHALI et al., 2009). O nucleotídeo T é definido como alelo f e ao invés disso, o nucleotídeo C é definido como alelo F (SPIGNA et al., 2016). O VDR *FokI* tem um importante papel nos processos pós transcricionais (ZHANG et al., 2018).

TaqI é localizado no éxon 9 do gene VDR e o polimorfismo acarreta em uma alteração no códon 352 no éxon 9 devido a uma variação de nucleotídeos T/C (ATT para ATC). O nucleotídeo T é definido como alelo T e ao invés disso, o nucleotídeo C é definido como alelo t (BHANUSHALI et al., 2009; SPIGNA et al., 2016).

BmsI está localizado no íntron 8 do gene VDR e consiste em uma variação de nucleotídeos A/G. O nucleotídeo A é definido como alelo B e o nucleotídeo G é definido como alelo b (SPIGNA et al., 2016). O VDR *BmsI* está envolvido com a regulação da estabilidade do RNAm (ZHANG et al., 2018).

ApaI é localizado no íntron 8 do gene VDR, apresenta uma variação de nucleotídeos G/T e desencadeia alteração da função biológica da vitamina D (SASSI et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

Embora existam inúmeros estudos que tentem associar a função da vitamina D com o desenvolvimento ou prevenção de importantes patologias e comorbidades, muitas vezes, isso não ocorre ou resulta em dados impactantes que definam a participação dessa substância no processo (CHIRUMBOLO et al., 2017; GIRGIS et al., 2013; HOLICK, 2017) WU et al., 2017). Para que haja a definição desses resultados é necessário a concordância de diferentes aspectos, como genética do indivíduo, dieta, estilo de vida e polimorfismos relacionados ao objeto de estudo (CHIRUMBOLO et al., 2017). O principal polimorfismo do VDR é o FokI, que ocorre no éxon 2 e origina uma transcrição diferenciada do sitio de iniciação, resultando assim, em um receptor com a adição de 3 aminoácidos. Por outro lado, o polimorfismo que apresenta quase ou nenhuma relação com diferentes efeitos é o *BsmI*, localizado entre os éxons 8 e 9, talvez por ainda não conhecermos sua função (MORY et al.,

2009).

A influência dessas variações no DNA podem ser a resposta para entender processos fisiopatológicos importantes, devendo dessa maneira, considerar o VDR como um forte candidato nesse processo de entendimento, uma vez que a frequência dessas variantes genéticas são superiores a 1% na população humana e podem abranger 105 Kb com múltipla possibilidade de transcrições (COLOMBINI et al., 2013; UITTERLINDEN et al., 2004).

3 HIPÓTESES DO ESTUDO

H_0 = não existe relação entre marcadores séricos e os polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo ósseo e a DMO de mulheres pós-menopausa.

H_1 = os polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo ósseo estão relacionados com a DMO de mulheres pós-menopausa.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o polimorfismo VDR, sua relação com a densidade mineral óssea com os níveis séricos de marcadores do metabolismo ósseo em mulheres pós-menopausa.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar os níveis séricos de cálcio, paratormônio (PTH) e 25OHD₃;
- b) Descrever as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes do VDR (*FokI*)
- c) Verificar a relação entre o polimorfismo (*FokI*) e a densidade mineral óssea;
- d) Verificar a relação entre o polimorfismo e os marcadores séricos do metabolismo ósseo.
- e) Avaliar a exposição solar e a possível relação com os níveis de vitamina D.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo é caracterizado como um estudo transversal observacional.

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas após aprovação pela Comissão Científica da Faculdade de Medicina e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CAAE: 31346014.2.0000.5336). Esta pesquisa seguiu os princípios éticos estabelecidos de acordo com a Resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e encontra-se aprovada sob o número de registro 674.750 (Anexo B).

5.3 PARTICIPANTES DE PESQUISA

Foram convidadas a participar apenas mulheres que estivessem realizando exames densitométricos no serviço de densitometria óssea do Hospital São Lucas.

5.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo mulheres que estivessem realizando exames densitométricos e que estivessem em período menopáusicos.

5.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as participantes que apresentassem qualquer dificuldade cognitiva relatado que inviabilizasse a resposta aos questionamentos. Também foram excluídas do estudo as mulheres que relatassem doenças ou parâmetros que sabidamente pudessem alterar os marcadores que estavam sendo avaliados.

Por fim, após análise das amostras, foram excluídas do estudo, aquelas que estivessem com valores condizentes com alterações patológicas que pudessem também interferir nas avaliações referentes ao estudo.

5.4 QUESTIONÁRIO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E ESTILO DE VIDA DOS PARTICIPANTES

Para a coleta das informações sobre estilo de vida, parâmetros sociodemográficos e econômicos foi aplicado um breve questionário desenvolvido pelo autor (Apêndice 1).

Os parâmetros sociodemográficos foram utilizados para verificar se havia alguma relação entre os níveis séricos dos marcadores do metabolismo ósseo e fatores socioeconômicos e sociodemográficos, bem como caracterizar o perfil das participantes.

A escolha pela criação de um questionário para avaliação das características do perfil de exposição ao sol, foi decorrente da necessidade em se obter uma ferramenta para avaliar não apenas quanto tempo, mas também, em quais momentos do dia ocorrem a fotoexposição. O desenvolvimento desse material, por não ser identificado nenhuma ferramenta com essas características, ocorreu com base nos estudos utilizados para confecção deste trabalho.

5.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Após aplicação do questionário, foram coletados dois tubos de sangue de cada paciente (um tubo com o anticoagulante EDTA e um tubo com fator pró coagulante para obtenção do soro). As amostras foram imediatamente levadas ao laboratório para processamento e armazenamento do soro e plasma à -80 °C, sendo avaliadas em um período de até 60 dias após coleta.

5.6 DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO INTACTA PARATORMÔNIO (PTH_i)

As dosagens do paratormônio foram realizadas no equipamento Cobas® modelo e411 por meio da técnica de eletroquimioluminescência da Roche® com anticorpo de captura monoclonal amino-terminal específico biotinilado, e o anticorpo secundário marcado com rutênio. O processo de separação emprega partículas magnéticas recobertas com estreptavidina. A sensibilidade do método analítico é de 1,2 ng/L sendo que os valores de referência aceitos são entre 15 e 65 ng/L.

5.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CÁLCIO TOTAL, CREATININA E UREIA

As dosagens bioquímicas foram realizadas no equipamento Vitros[®]950 Johnson & Johnson por meio da técnica de química seca. Para as quantificações dos níveis séricos foram adotados os valores de referência: 8,4–10,2 mg/dL para o cálcio total, 0,65–1,25 mg/dL para a creatinina e 19–43 mg/dL para a ureia.

5.8 DETERMINAÇÃO DA 25OHD

A dosagem de 25(OH)D₃ foi realizada a partir de técnica de precipitação de proteínas plasmáticas. Para tal, 200 µL de plasma foram adicionados à 400 µL de acetonitrila contendo padrão interno (D6-25-hidroxivitamina D3 20 ng/mL). Após homogeneização e centrifugação, uma alíquota de 25 µL do sobrenadante foi injetado em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência associado a espectrometria de massas em sequencial (LC-MS/MS).

A 25-(OH)D₃ foi detectada em um espectrômetro TSQ Quantum Access MAX triplo quadruplo equipado com fonte de ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI), controlado por *software* Xcalibur, proveniente da Thermo Scientific. A análise empregou uma coluna C18 (150 x 4,60 mm, dp 2,6 µm) da Phenomenex (Allcrom, Estados Unidos), mantida a 60°C.

A fase móvel foi composta por mistura de água e metanol (10:90, v/v), com eluição isocrática e fluxo de 0,5 mL/min. As condições da espectrometria de massa (MS) foram: ionização no modo positivo, voltagem corona 7 kV, gás nebulizador nitrogênio com fluxo de 40 µA, gás auxiliar nitrogênio com fluxo de 5 µV, gás de colisão argônio 1,5 mTorr, temperatura de vaporizador 394 °C e temperatura de capilar 202 °C.

A aquisição foi realizada no modo MRM através das transições m/z 401 → 365,2 + 401 → 158,9 (quantificação) e 401 → 105,1 (qualificação) para 25-OHD₃ e m/z 407 → 371 + 407 → 371 105 (quantificação) e 407 → 91 (qualificação) para o padrão interno. A cada lote de amostras foram inseridas amostras de calibradores no intervalo de 5 a 100 ng/mL e controle comercial Chromsystem[®] 25(OH)D₃ nível I e nível II.

5.9 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA

As análises densitométricas foram realizadas utilizando o aparelho da marca Hologic WI que tem como técnica a Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA). Foram utilizados campos anatômicos que o serviço emprega normalmente, sendo corpo total, coluna Lombar total (L1-L4), vértebras lombares individualmente (L1, L2, L3 e L4) e fêmur proximal (regiões do Fêmur Total, Colo, Trocanter e zona Intertrocantérica).

A classificação quanto ao status da qualidade óssea em relação à massa óssea seguiu diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo: idade inferior a 50 anos - massa óssea dentro do previsto para faixa etária Z-score $>$ de -2,0 de desvio- padrão (dp) e baixa massa óssea para a faixa 40 etária de idade inferior a 50 anos Z-score $<$ ou = a -2,0 dp. Para faixa etária igual ou superior a 50 anos o critério adotado é o T-score, sendo: normal T-score $>$ ou = a -1,0, osteopenia entre -1,0 e -2,5 e osteoporose $>$ ou = a -2,5 dp (BLAKE; FOGELMAN, 2010).

O método utilizado *Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA)* é uma técnica quantitativa que se baseia na atenuação de um feixe de radiação gerado por uma fonte de raio X com dois níveis de energia. Este atravessa os diferentes tecidos corporais e, ao atingir o detector posicionado na porção oposta à fonte emissora, geral um sinal. O programa interpreta os dados conforme a intensidade de energia que chega ao detector liberando picos.

Conforme o tamanho desses picos o programa calcula a densidade da amostra, sendo que tecidos moles como gordura, água, músculos e órgãos tendem a reter menos quantidade de energia quando comparados com tecidos ósseos, formando assim uma imagem densitometria do indivíduo ou da região de interesse (LENTLE *et al.*, 2016).

5.10 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS GENES DO VDR

5.10.1 Obtenção do DNA genômico

O DNA dos leucócitos foi extraído pelo método de fenol/clorofórmio (Brazol™) e, após precipitação, ressuspenso com 50 μ L de água MilliQ e armazenado a -20 °C até a genotipagem.

5.10.2 Genotipagem do gene VDR

O polimorfismo do gene do receptor de vitamina D *FokI* foi determinado pela técnica da PCR (*polymerase chain reaction*) (265 pb) seguido da técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) das alterações C->T. As condições da PCR foram as seguintes: 95°C por 2 min., seguido de 35 ciclos (95°C, 30 sec.; 66°C, 30 sec.; 72°C 80 sec.) seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos com os seguintes oligonucleotídeos: direto = 5' - AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT -3' e reverso = 5' - ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC -3'. Para a realização da clivagem foi utilizada a enzima de restrição FokI da marca New England Biolabs seguindo o protocolo determinado pelo fabricante. A clivagem ocorreu na sequência 5'...GGATG (N)..3' e 3'...CCTAC (N)...5', durante incubação à 37°C por 5 minutos que, por sua vez, gerava, quando existentes, os fragmentos para identificação dos genótipos: ff (169 e 96 pb), FF (265 pb) ou Ff (265 e 169, 96 pb). Os produtos da PCR e da clivagem foram analisados em gel de agarose 2% contendo 2 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM pH 8,0) a 100 volts por 30 minutos (SANTOS *et al.*, 2012).

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A determinação das frequências gênicas e genotípicas das amostras estudadas, foram calculadas a partir da equação $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Para tanto, designou-se p = alelo C e q = alelo T. Para o cálculo das frequências gênicas (ou alélicas) foi utilizada a equação: $p+q=1$. Após o cálculo das respectivas frequências, foi verificado se as mesmas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências genotípicas observadas e as frequências genotípicas esperadas foram avaliadas por meio do teste estatístico do chi-quadrado (χ^2). A comparação das amostras foi realizada avaliando média, mediana, variância, desvio padrão e erro padrão. Para a análise foram utilizados os softwares Excel e SPSS versão 20.0.

Para a avaliação estatística foram utilizados os valores de PTHi, cálcio e Vitamina D. Os dados obtidos desses elementos foram descritos através de média, porcentagem e desvio-padrão. Para complementação das análises dos dados foi realizado a correlação linear e o teste do chi-quadrado. Para as variáveis dependentes foram consideradas os polimorfismos e valores séricos dos marcadores do metabolismo ósseo. Como variáveis independentes DMO.

As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ com um intervalo de confiança de 95%.

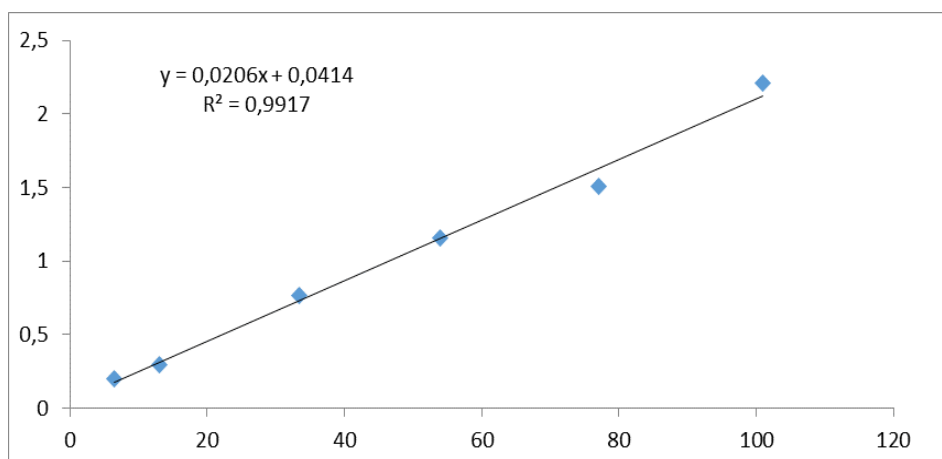
ACRESCENTAR TESTE T (PAG 63)

6 RESULTADOS

6.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA 25(OH)VITD

Inicialmente, foi realizada a curva de calibração para garantir a qualidade analítica e verificar possíveis vieses do procedimento, foram adicionados 4 controles intercalados com as amostras a serem analisadas. O valor de R^2 foi de 0,9917, como mostra a figura 7.

Figura 7 - Curva de calibração da vitamina D



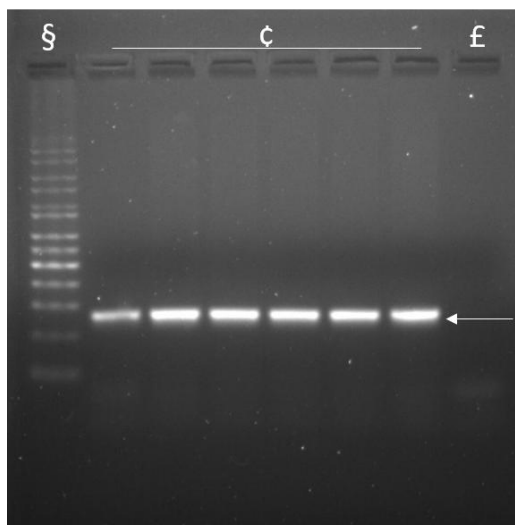
Fonte: O Autor (2017).

6.2 AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DE VITAMINA D

Após a realização dos PCR's, foram realizadas as clivagens dos produtos das PCR's para determinação dos polimorfismos. Na Figura 8 está demonstrado um gel de agarose 2% com os produtos da PCR para identificação do polimorfismo *FokI*.

Com a confirmação da replicação do fragmento genético desejado, uma amostra foi utilizada para realização da clivagem e, caso presente, identificação do polimorfismo (Figura 9).

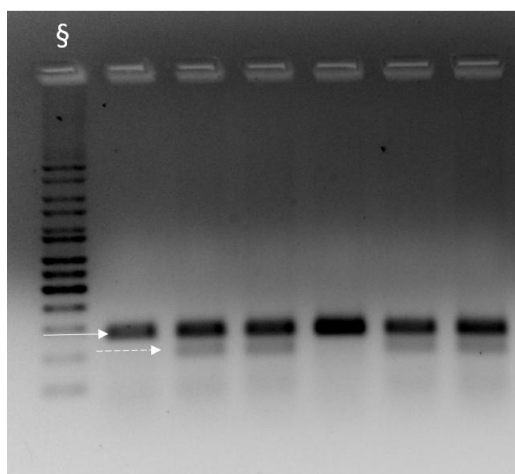
Figura 8 - Identificação do produto de PCR em gel de agarose



Fonte: O autor (2018).

Legenda: § = marcador peso molecular (1kb); ç = amostras analisadas; £ = mix da PCR.

Figura 9 - Identificação do polimorfismo *FokI* pela técnica de RFLP



Fonte: O autor (2018).

Legenda: § = marcador peso molecular (1kb); a flecha tracejada indica banda com 96 pb; a flecha contínua indica banda com 256 pb.

6.3 PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS DAS MULHERES PARTICIPANTES DO ESTUDO

Inicialmente foram entrevistadas e posteriormente colhido amostra sanguínea de 205 mulheres no Serviço de Densitometria Óssea do Hospital São Lucas da PUC. Destas, três foram excluídas do estudo por apresentarem valores de cálcio e PTH compatíveis com hiperparatireoidismo primário, oito

por apresentarem alterações nos níveis de ureia, creatinina, PTHi ou cálcio discrepantes das demais, (hipercalcemia) e dezesseis por apresentarem dados de densitometria óssea alterados em função de próteses ou alterações anatômicas que comprometeram a avaliação dos resultados.

Desse modo, a população do estudo foi composta por 178 mulheres que participaram do estudo entre os períodos de dezembro de 2015 a março de 2017. As características estão demonstradas na Tabela 2. A idade média das participantes do estudo foi de $64,39 \pm 9,62$ anos, sendo a idade mínima 42 e a máxima 97 anos. O tempo médio de menopausa foi de $17,2 \pm 10,36$ anos. Com relação aos dados antropométricos das participantes, foi observado uma altura média de $156,76 \pm 7,09$ centímetros (cm) e peso $68,31 \pm 13,65$ quilogramas (Kg), constituindo um Índice de Massa Corporal (IMC) médio de $27,94 \pm 5,02$ Kg/m². Com relação ao IMC, foi encontrado um valor mínimo de 17,57 e máximo de 46,58 Kg/cm².

Com relação aos níveis de escolaridade, foi identificado que 2 (1%) participantes não haviam frequentado a escola, enquanto a maioria 57 (32%) relatou ter cursado de forma incompleta o primeiro grau. Outro dado socioeconômico avaliado foi com relação à renda familiar. Nesse parâmetro foi identificado que a maioria das participantes relataram ter até 2 salários mínimos, 56 (31,5%), e de 2 a 4 salários mínimos, 56 (31,5%) como renda familiar, enquanto, 3 (1,7%) participantes desejaram não declarar a renda.

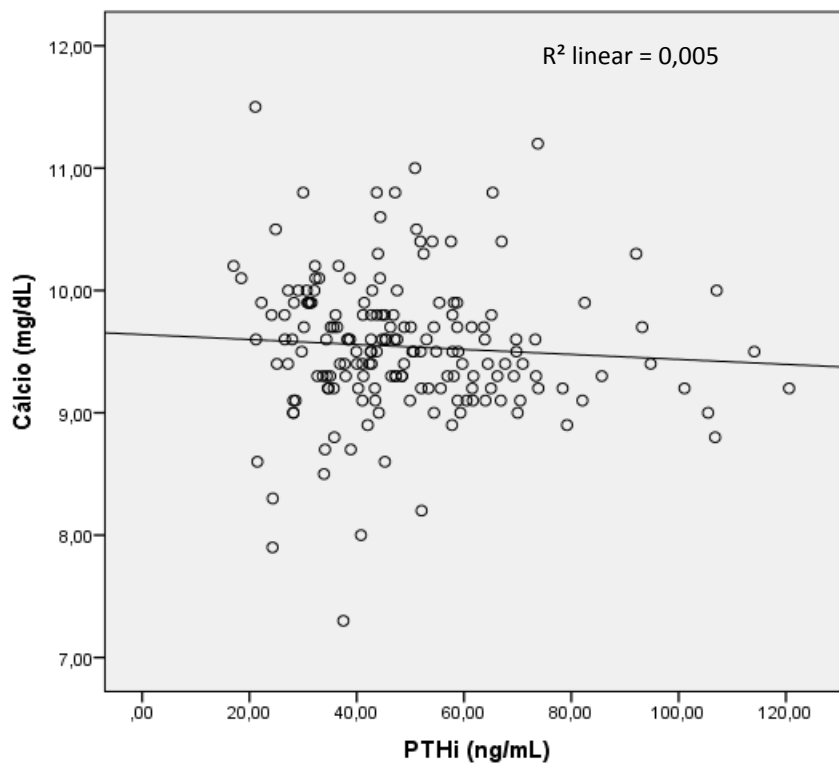
Todos os parâmetros bioquímicos avaliados apresentaram resposta fisiológica esperada. Na avaliação geral, foi constatada calcemia de $9,53 \pm 0,57$ mg/dL, níveis de paratormônio $49,19 \pm 19,37$ ng/mL e 25OHD $24,85 \pm 9,06$ ng/mL. Quando avaliados em regressão linear foram obtidas as seguintes relações demonstradas nas Figuras 10, 11 e 12.

Tabela 2 - Parâmetros sociodemográficos das participantes do estudo

Variável	Total n=178
Idade (anos)	64,39 ± 9,62
Tempo de menopausa (anos)	17,2 ± 10,36
Peso (Kg)	68,31 ± 13,65
Altura (cm)	156,76 ± 7,09
IMC (Kg/m²)	27,94 ± 5,02
Renda (SM)	
0 – 2	56 (31,5%)
2 – 4	56 (31,5%)
4 – 10	37 (20,8%)
10 – 20	20 (11,2%)
>20	6 (3,4%)
Não declarado	3 (1,7%)
Escolaridade	
Primeiro grau incompleto	57 (32%)
Primeiro grau completo	23 (12,9%)
Segundo grau incompleto	7 (3,9%)
Segundo grau completo	45 (25,3%)
Superior incompleto	9 (5,1%)
Superior completo	35 (19,7%)
Não frequentou a escola	2 (1,1%)

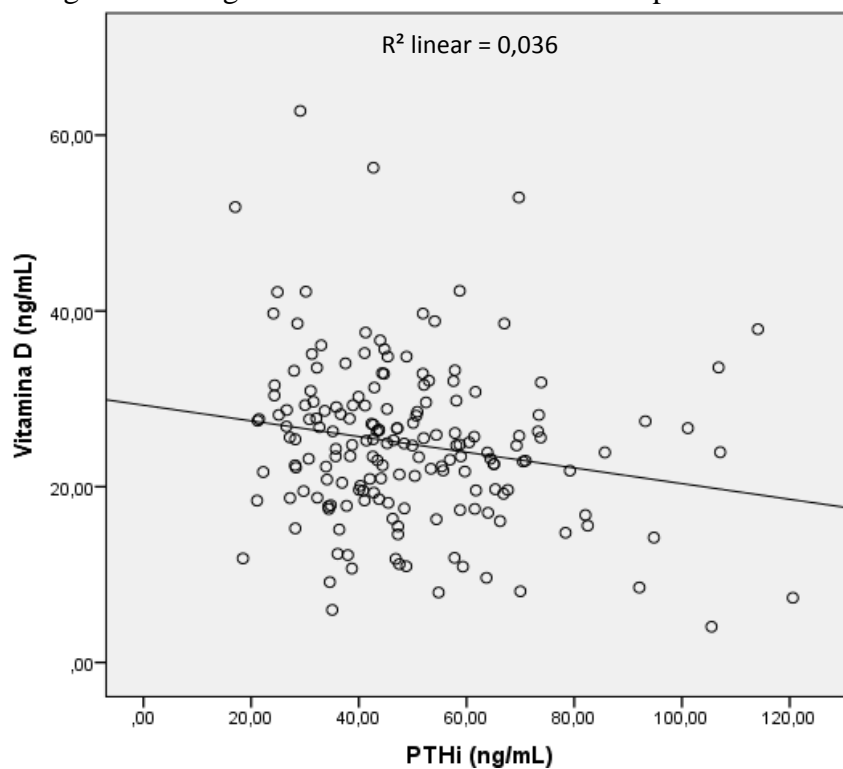
Fonte: O Autor (2017). Média ± desvio padrão estão descritas para idade, tempo de menopausa, peso, altura e IMC; SM = salário mínimo.

Figura 10 - Regressão linear entre cálcio e paratormônio



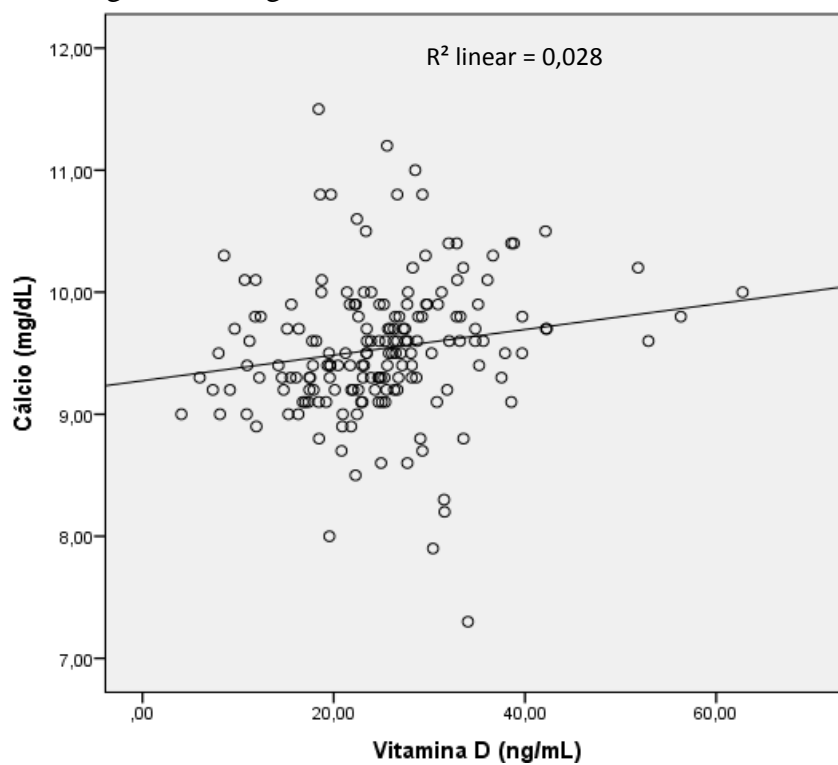
Fonte: O autor (2017).

Figura 11 - Regressão linear entre vitamina D e paratormônio



Fonte: O autor (2017).

Figura 12 - Regressão linear entre cálcio e vitamina D



Fonte: O autor (2017).

6.1 PERFIL DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE VITAMINA D (*FokI*)

A frequência de distribuição dos polimorfismos do receptor de vitamina D *FokI*, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência genotípica *FokI*

		n	%
	<i>FF</i>	63	54
<i>FOK</i>	<i>Ff</i>	41	35
	<i>ff</i>	12	11
	Total	116	100

Fonte: O autor (2017).

A distribuição genotípica encontrada para os polimorfismos da *FokI* em um total de 116 mulheres foi de: 54% das mulheres apresentavam fenótipo para *FF*, 35% para *Ff* e 11% para *ff*, conforme a tabela 4:

$$FF = 63/116$$

$$Ff = 41/116$$

$$ff = 12/116$$

Quanto a frequência alélica, foi encontrado 72% para F e 28% para f, conforme cálculo:

$$F = 63 + 63 / 2 \times 116 = 167/232 = 0,72 F$$

$$f = 41 + 12 + 12 / 2 \times 116 = 65/232 = 0,28 f$$

Quando foi avaliado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando a equação $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, as frequências esperadas seriam:

$$FF = (0,71)^2 = 0,504 (51\%)$$

$$Ff = 2 \times 0,71 \times 0,29 = 0,411 \text{ (41\%)}$$

$$ff = (0,29)^2 = 0,08 \text{ (8\%)}$$

Tabela 4 - Frequências genotípicas encontradas x frequências genotípicas esperadas

	Frequências genotípicas	
	Observada	Esperada
<i>FF</i>	54%	51%
<i>Ff</i>	35%	41%
<i>ff</i>	11%	8%

Fonte: O autor (2017).

Com base nesses dados, observa-se que a população não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 2,17$) adotando-se o grau de liberdade 1.

Quando avaliado características da população estudada conforme distribuição entre os polimorfismos do receptor de vitamina D *FokI*, foi verificado as seguintes características descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características da população estudada conforme polimorfismo *FokI* do receptor da Vitamina D

	<i>FF</i> n = 63 média±dp	<i>Ff</i> n = 41 média ± dp	<i>ff</i> n = 12 média ± dp	<i>p</i>
Idade	63,51 ± 8,86	64,66 ± 8,83	64 ± 7,11	NS
IMC	28,72 ± 5,63	27 ± 4,31	28,6 ± 4,91	NS
Número de medicamentos	4,14 ± 2,7	3,73 ± 2,13	5,58 ± 2,96	NS

T-score lombar	-1,52 ± 1,34	-1,5 ± 1,04	1,22 ± 1,38	NS
Z-score lombar	-0,3 ± 1,17	0,02 ± 0,97	-0,4 ± 0,74	NS
T-score fêmur	-0,76 ± 0,96	-0,94 ± 0,93	-0,37 ± 1,2*	0,041
Z-score fêmur	0,01 ± 0,90	0,04 ± 0,9	0,46 ± 1,14	NS
Cálcio	9,44 ± 0,66	9,64 ± 0,59	9,8 ± 0,54*	0,043
Vitamina D	25,94 ± 8,09	26,31 ± 11,2	30,02 ± 9,66	NS
PTHi	51,83 ± 27,92	49,53 ± 19,18	45,86 ± 21,23	NS

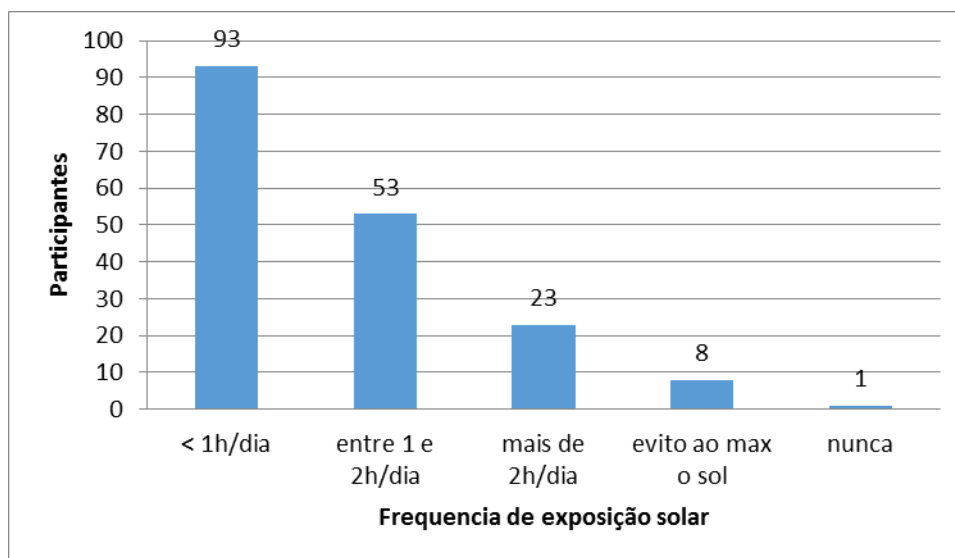
Fonte: O autor (2017).

Legenda: Dp= desvio-padrão; n=número de participantes; * = significativo estaticamente; NS = não significativo estatisticamente.

Quando realizada a avaliação para os fenótipos do receptor de vitamina D e características gerais da população estudada por chi-quadrado, foi possível verificar que indivíduos que apresentavam o polimorfismo ff apresentavam uma densidade mineral óssea de fêmur reduzida quando comparadas aos outros genótipos ($p = 0,028$). Outro achado com relação aos fenótipos estudados foi a diferença, também do fenótipo ff, com relação aos outros grupos dos níveis calcêmicos ($p = 0,043$). Quando avaliado os mesmos parâmetros pelo método de ANOVA seguido pelo teste de Kruskal Wallis, foi possível verificar que a DMO do fêmur se apresentou menor no grupo ff em relação aos outros fenótipos ($p = 0,032$).

A avaliação da exposição solar foi empregada para verificarmos a possível existência de alguma relação quanto aos níveis de 25OHD e exposição solar. De um modo geral, foi percebido que 93 (52%) das participantes realizava uma exposição diária inferior à 1 hora e que apenas 53 (30%) realizava a exposição ao sol entre 1 e 2 horas por dia (Figura 13).

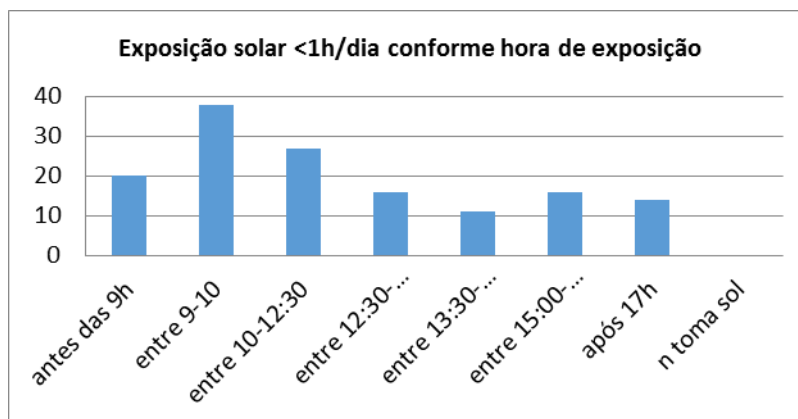
Figura 13 - Frequência de exposição solar relatada pelas participantes



Fonte: O autor (2017).

Quando realizada a avaliação dos momentos em que mais se expunham ao sol dividido por cada frequência de exposição, foi possível verificar a característica comportamental de exposição solar. Avaliando os indivíduos que relataram se expor até uma hora por dia ao sol, foi evidenciado que apenas 38% se expunham nos momentos de maior eficiência para a síntese de vitamina D, enquanto o resto das participantes realizavam a exposição nos momentos menos favoráveis (Figura 14).

Figura 14 - Momento da exposição solar de indivíduos que relataram <1hora/dia

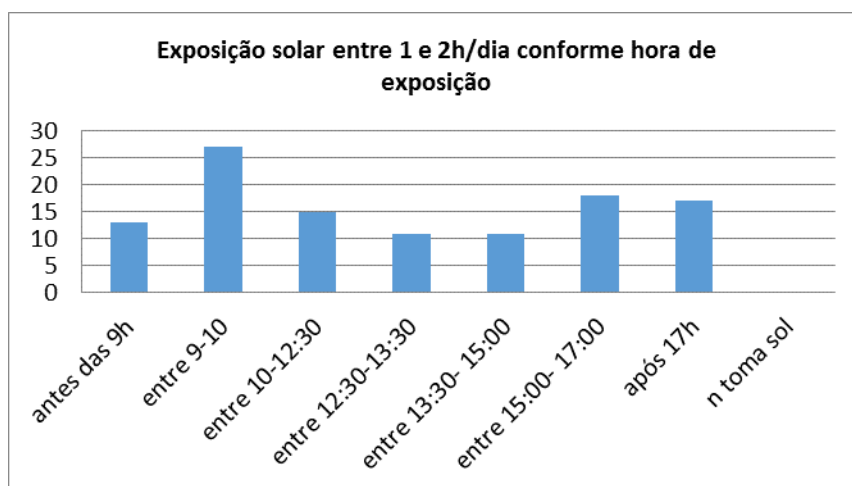


Fonte: O autor (2017).

Ao fazer a mesma avaliação nas participantes que relataram exposição entre uma e duas horas, o

padrão comportamental foi semelhante. Nesse grupo, 33% das participantes realizavam alguma exposição durante os momentos mais importantes para a síntese de vitamina D e, da mesma forma, a maioria, apresentava exposição em momentos não ideais para obtenção de níveis desejados de vitamina D (Figura 15).

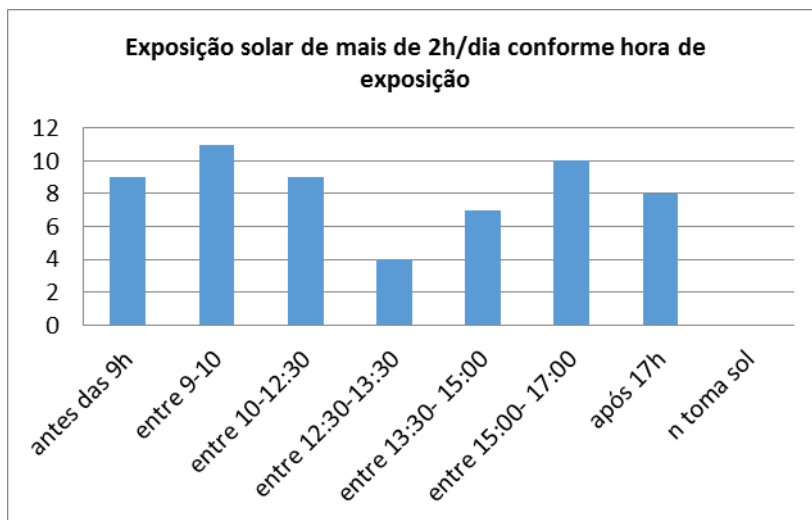
Figura 15 - Momento da exposição solar de indivíduos que relataram entre 1 e 2 horas/dia



Fonte: O autor (2017).

Por último, na avaliação dos momentos de exposição de quem relatou mais de 2 horas por dia, foi percebido uma frequência ainda menor de exposição ao sol nos momentos favoráveis à síntese de vitamina D. Nesse grupo, foi constatado que apenas 34% das participantes se expunham nas horas ideais, enquanto o restante realizava a exposição nos horários menos adequados à síntese deste hormônio (Figura 16).

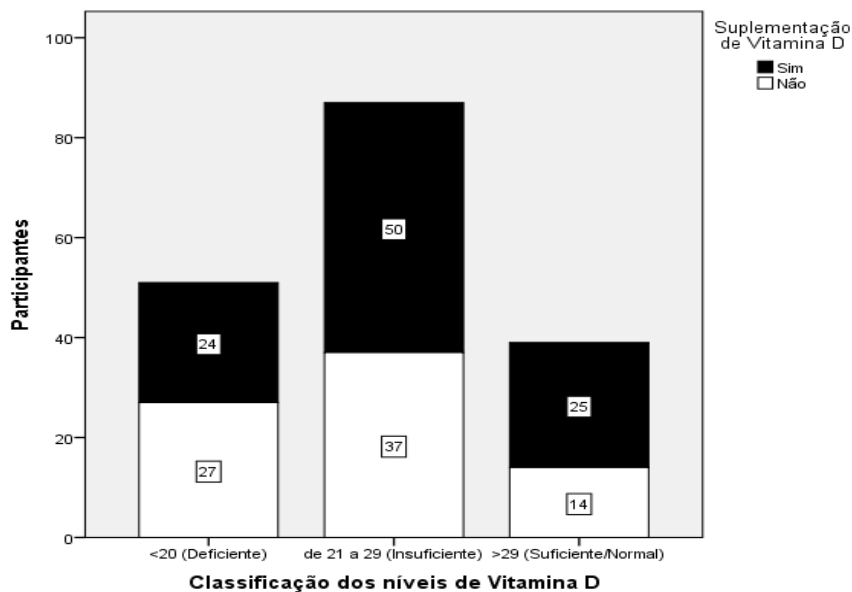
Figura 16 - Momento da exposição solar de indivíduos que relataram mais de 2 horas/dia



Fonte: O autor (2017).

Outro dado de grande importância que pôde ser verificado foram os níveis de 25OHD e a relação com a suplementação desse composto. De maneira interessante e, até certo ponto preocupante, foi a frequência de suplementação e como a suplementação interferiria em outros parâmetros. A figura 17 demonstra a relação entre cada grupo e o *status* dessa vitamina no organismo. Realizando a comparação da média dos níveis de vitamina D entre os grupos suplementados e não suplementados não foi observada diferença significativa ($p = 0,066$).

Figura 17 - Disposição das participantes com relação ao suplemento de Vitamina D, organizados pelo *status* dessa substância no organismo



Fonte: O autor (2017).

Observando a figura 17 pode-se perceber que, nos grupos classificados como deficientes e insuficientes, a proporção entre quem faz uso e não faz uso é semelhante. De modo geral, foi verificado que apenas 56% realiza a suplementação de vitamina D. Desses, classificados como deficientes ou insuficientes, percebe-se que 54% realizam a suplementação, enquanto 46% não realizam suplementação. De modo satisfatório, dos 39 indivíduos que são classificados com níveis suficientes de vitamina D, 64% são suplementados.

Quando realizado o *teste-t* para análise da população dividida em suplementadas ou não suplementadas, foi encontrando significância apenas para valor do T-score lombar ($p = 0,027$), densidade total (BMD) da coluna lombar ($p = 0,037$), conteúdo mineral ósseo (BMC) da coluna lombar ($p = 0,031$) e se utiliza algum tipo de medicação ($p = < 0,001$). Outros parâmetros avaliados seguindo essa comparação, não apresentaram diferença estatística significativa, como níveis séricos de cálcio ($p=0,052$), vitamina D ($p = 0,066$), PTHi ($p= 0,71$) e IMC ($p = 0,38$).

Avaliando diferentes parâmetros utilizando-se como base a classificação do status dos níveis de vitamina D no organismo pelo método de *Kruskal Wallis*, foram encontrados significância com relação a “presença de doença” ($p < 0,01$), suplementação de cálcio ($p < 0,001$), escolaridade ($p = 0,02$), *T-score* lombar ($p < 0,01$), BMD lombar ($p = 0,01$), BMC lombar ($p = 0,02$), *T-score* femoral ($p = 0,03$). Ainda nessa avaliação, utilizando o teste de *Kruskal Wallis*, foram encontrados valores não-

significativos para outros parâmetros considerados importantes como para o IMC ($p = 0,34$), utilização de bloqueador solar ($p = 0,40$), tipo de pele ($p = 0,25$), renda familiar ($p = 0,38$), prática de exercício físico ($p = 0,09$), *T-score* femoral ($p = 0,23$), PTHi ($p = 0,61$) e cálcio ($p = 0,16$).

A avaliação dos níveis de exposição solar com relação à diferentes variáveis pelo teste de ANOVA *Kruskal Wallis*, não apresentou nenhum resultado com diferença estatística significativa.

7 DISCUSSÃO

Este estudo teve como proposta a avaliação das características de uma população de mulheres em relação aos possíveis fenótipos do receptor de vitamina D. O hiato científico acerca dessas características, principalmente, na região sul do Brasil, somado aos poucos estudos caracterizando a população feminina brasileira que utiliza serviços de densitometria óssea, serviu de fomento para o desenvolvimento desse estudo.

Na avaliação realizada no presente estudo, com relação aos níveis de escolaridade, foi identificado que 1% participantes não haviam frequentado a escola, enquanto a maioria 57 (32%) relatou ter cursado de forma incompleta o primeiro grau. Outro dado socioeconômico avaliado foi com relação à renda familiar. Nesse parâmetro, foi identificado que a maioria das participantes relataram ter até 2 salários mínimos, 31,5%, ou de 2 a 4 salários mínimos, 31,5% como renda familiar, enquanto, 1,7% participantes desejaram não declarar a renda. Contrário ao estudo realizado na Suécia, no presente estudo, foi obtida correlação significativa entre níveis de vitamina D e escolaridade ($p = 0,02$), (SHIRAZI et al., 2013). Esse dado corrobora com estudo realizado na África, em que os autores afirmam haver uma correlação entre níveis socioeconômicos e índices de vitamina D (WEAVER et al., 2010).

A hipovitaminose D é uma constatação frequente que tornou-se pandêmica em todas as faixas etárias em diversos países do mundo (VUKSANOVIC et al., 2016). Inúmeros estudos têm buscado verificar se há associação dos níveis de vitamina D com as mais diversas condições e patologias. Neste estudo, foi identificado uma correlação significativa entre a presença de doença e níveis de vitamina D ($p = 0,01$).

Essas associações são continuamente citadas e podem ser verificadas em estudos clássicos como os realizados por (HOLICK, 2017), onde o autor afirma haver relação entre a hipovitaminose e osteomalácia e raquitismo (essas consolidadas pela literatura), número relacionados à mortalidade de uma forma em geral ou, em outro estudo, como o realizado por Caprio (2016), onde reiteram a possibilidade de haver relação entre níveis de 25(OH)D e doenças autoimunes, musculoesqueléticas, metabolismo da glicose, alterações cutâneas, cardiovasculares, do sistema reprodutivo, proliferação celular e capacidade neurocognitivas.

De certa forma, um possível motivo para o debate de quando ou o quanto esses fatores estão

associados à hipovitaminose D, pode ser o método utilizado para realizar a avaliação deste analito (TANG et al., 2017). A análise da vitamina D requer cuidados e procedimentos bem controlados, dado a natureza desse composto, sendo esse outro fator importante desse estudo, já que o método utilizado para avaliação da vitamina D é considerado padrão ouro.

A própria via de formação, composta por inúmeros metabólitos com características analíticas semelhantes, seguido pelas formas circulantes de colecalciferol e ergocalciferol que se ligam a proteína carreadora de vitamina D (DBP) para, no fígado, sofrer o primeiro processo metabólico que formará não apenas a forma definida para avaliar o *status* desse composto em nosso organismo, a 25OHvitD, mas também outros metabólitos como 24,25-dihidroxitamina D (24,25(OH)₂vitD), entre outros (COUCHMAN; MONIZ, 2017; FRASER; MILAN, 2013), pode colaborar para a dificuldade em avaliar corretamente esse composto por imunoenaios. Embora esse último composto seja considerado ainda sem função biológica definida, este pode servir como fator interferente nas determinações da 25OHD.

Em estudo realizado anteriormente (KICH et al., 2012), foi realizada a validação da vitamina D pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao sistema de detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em uma população de idosos de um centro de longa permanência da região metropolitana de Porto Alegre. Embora a técnica tenha apresentado desempenho analítico adequado e boa capacidade para ser aplicado em condições clínicas, o tempo de preparo era relativamente elevado, uma vez que necessitava primeiramente ocorrer a extração do plasma com hexano e a adição de um padrão interno para comparação durante a corrida analítica.

Essas técnicas baseadas em ensaios imunoquimioluminescentes foram amplamente difundidas entre grandes laboratórios devido ao baixo tempo de realização dos testes e eficiência (FRASER; MILAN, 2013; TANG et al., 2017). Embora existam vantagens anteriormente citadas, as técnicas baseadas em ensaios imunológicos podem apresentar elevada reatividade cruzada com os inúmeros metabólitos da vitamina D, como a forma D3 ou D2 (TANG et al., 2017). Por esse motivo, no presente estudo, foi utilizado a metodologia padrão ouro, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à identificação de massas (LC-MS/MS), como apontado por (HOLICK, 2011; MAEDA et al., 2014).

Neste estudo foi obtido uma idade média de $64,39 \pm 9,62$ anos, tempo médio de menopausa de $17,2 \pm 10,36$ anos, altura média de $156,76 \pm 7,09$ centímetros (cm) e peso $68,31 \pm 13,65$ quilogramas (Kg), constituindo um Índice de Massa Corporal (IMC) médio de $27,94 \pm 5,02$ Kg/m².

Embora todos esses fatores possam interferir nos níveis de vitamina D, aparentemente, a

variável com efeito mais importante é a exposição solar e, de forma bastante interessante, foi possível avaliar nesse estudo o comportamento das participantes frente a exposição solar, fato que se torna fundamental para obtenção de níveis ótimos de vitamina D, uma vez que a maior parte dessa substância é proveniente da síntese endógena que ocorre por meio da exposição ao sol (HOLICK, 2017).

Quando avaliada a exposição solar de todas as participantes do estudo, foi percebido que 52% das participantes realizavam uma exposição solar inferior à 1 hora e, apenas 30% realizavam a exposição ao sol entre 1 e 2 horas por dia. Embora possa parecer tempo suficiente, estas exposições eram realizadas, em parte, com protetor solar e ficando apenas o tempo mínimo necessário para realizar suas atividades. Aparentemente, a avaliação realizada nesse estudo possibilita uma melhor relação de tempo de exposição e o momento da exposição. Diferentemente, em estudo realizado por Ruiz (2014), a avaliação da exposição solar foi verificada por meio de um questionário que buscava quantificar, em minutos, o tempo em que a pessoa esteve exposta ao sol, desde que, em momentos adequados para a síntese de vitamina D (RUIZ et al., 2014).

Nesse sentido, a forma como ocorre a avaliação da fotoexposição se torna importante, uma vez que, o desenvolvimento da hipovitaminose, está associado a baixa exposição solar. Comportamento semelhante ao relatado nesse estudo por Unger (2010). No caso, o autor afirma que esse comportamento de baixa exposição solar pode ser decorrente do hábito de evitar a fotoexposição solar de forma direta ou, no momento em que ocorrer a exposição, estar utilizando protetor solar dos mais diferentes fatores, em parte, devido as campanhas disseminadas na grande mídia e por algumas especialidades médicas como os dermatologistas (UNGER et al., 2010).

Ainda sobre a avaliação do perfil de fotoexposição, foi possível rastrear de forma direta quais os momentos as participantes haviam se exposto ao sol, independentemente do momento do dia. Isso se torna importante, uma vez que, quando ocorre a exposição em horários menos eficientes, pode haver a compensação pelo aumento do tempo de exposição.

Nesse estudo, foi possível verificar que os indivíduos que relataram se expor até uma hora por dia ao sol, apenas 33% se expunham nos momentos de maior eficiência para a síntese de vitamina D, enquanto as demais, realizavam a exposição nos momentos menos favoráveis.

Para que a síntese de vitamina D ocorra de forma adequada é necessário que ocorra a exposição solar em momentos que incidam ondas entre 290 e 315 nanômetros, normalmente entre 11 e 15h, dependendo da época do ano (HOLICK, 2016; DAWSON-HUGHES, 2017b). Da mesma forma, foi relatado por Unger, 2010 em estudo realizado em São Paulo, que as participantes também

apresentavam baixa exposição ao sol, (UNGER et al., 2010) embora não tenha sido avaliado quais os momentos de exposição mais frequente dos participantes.

Em todos os modelos avaliados nesse estudo, obtivemos o mesmo padrão comportamental, onde as participantes sempre evitavam a exposição solar nos momentos mais propícios a síntese de vitamina D.

Outro fator a ser considerado sobre a avaliação da fotoexposição desenvolvido e empregado nesse estudo é a relação de tempo em faixas de exposição e os momentos em que ocorreram essa exposição. Diferentemente do estudo (RUIZ et al., 2014) em que houve uma avaliação da fotoexposição de 304 indivíduos em Cascavel, Paraná e foram categorizados em exposição adequada, quando superior a 20 minutos por dia, independentemente da pigmentação cutânea, no presente estudo realizamos a avaliação categórica, tampouco a classificação da exposição solar. Essa informação é importante, pois a recomendação para uma síntese adequada de vitamina D é de uma dose eritematosa mínima (HOLLICK, 2017).

Com relação aos valores obtidos de vitamina D em nosso estudo, destaca-se a média geral encontrada de 25OHD: $24,85 \pm 9,06$ ng/mL. Por se tratar de uma população feminina, em período pós-menopáusicas e em acompanhamento médico, era hipotetizado que esses níveis seriam mais elevados. Isso também ficou evidente quando avaliados de forma categórica, foi possível observar que a maior parte desse grupo se encontrava em situação de hipovitaminose D. Do total de mulheres que participaram do estudo, apenas 22% apresentavam valores desejados de vitamina D, enquanto 49% estava com valores insuficientes e 29% era deficientes.

Comparando os resultados obtidos nesse estudo com estudo realizado por (VUKSANOVIC et al., 2016) em que foram avaliados os valores de vitamina D em mulheres em período pós-menopáusicas com idade entre 45 e 70 anos e IMC médio de $28,03$ Kg/m², com os dados obtidos neste estudo, características semelhantes às relatadas, foi possível perceber que a frequência de hipovitaminose se aplica aquela população da mesma forma que foi encontrado neste estudo. Por se tratarem de populações residentes em uma zona mais distante da linha do Equador e, apresentarem características climáticas semelhantes, pode-se assumir que esse dado relacionado aos níveis de vitamina D eram esperados. Soma-se ainda o fato de que da mesma forma, foi verificado neste estudo uma correlação negativa, porém sem significância ($p = 0,344$) entre IMC e valores de vitamina D, como relatado por (SHIRAZI et al., 2013).

Em artigo publicado pela Sociedade Americana de Endocrinologia Clínica, (HOLLICK et al.,

2011) os autores relatam a prevalência de 20 a 100% de indivíduos em idade elevada com níveis de 25OHD abaixo do recomendado. Esses dados podem ser corroborados por diferentes estudos realizados em diversos países, como em estudo realizado na China por (LI *et al.*, 2017), onde aproximadamente 1.000 mulheres pós-menopáusicas possuíam níveis abaixo do recomendado de vitamina D (17,9 ng/mL) e, também no presente estudo, em que 76% das participantes do estudo estavam com índices de deficiência ou insuficiência.

A média de vitamina D encontrada neste estudo (24,8 ng/mL) pode ter sido maior do que relatado no estudo anterior, por termos realizado uma avaliação em uma população que, teoricamente, encontrava-se em acompanhamento médico, uma vez que estavam realizando avaliação de densitometria óssea.

Diferentemente dos estudos citados, no presente estudo as participantes estavam suplementando de alguma forma a vitamina D e não foram excluídas. Ao contrário das investigações descritas na literatura, em que indivíduos que fazem uso de suplementação de vitamina D são excluídas, essa decisão foi tomada justamente para verificar a real situação desses indivíduos e, com isso, formar um perfil para que, caso necessário, seja criado uma melhor conduta ou acompanhamento.

Nesse estudo foi encontrado quase 80% das participantes com níveis indesejáveis de vitamina D. Em uma categorização geral da amostra, obtivemos 28,7% com níveis abaixo de 20 ng/mL, 48,9 com valores entre 21 e 29 ng/mL e somente 21,9% com valores acima de 30 ng/mL.

Os fatores envolvidos na hipovitaminose D são complexos, passando por características pessoais, até fatores ambientais. Mesmo assim, em artigo recentemente publicado por (HOLICK, 2017), o autor afirma que a principal causa da pandemia de hipovitaminose ocorre pela baixa apreciação da exposição solar. Ainda, segundo o autor, a exposição é a principal forma de aquisição de vitamina D, uma vez que poucos alimentos contém níveis significativos de vitamina D (HOLICK, 2017; HOLICK *et al.*, 2011). Seguindo o raciocínio de que a exposição solar é a principal forma de aquisição de níveis adequados de vitamina D, somado aos dados previamente discutidos sobre fotoexposição, podemos ter uma possível justificativa para os níveis encontrados em nosso estudo.

De fato, levando-se em consideração que para a síntese adequada de vitamina D são necessários uma dose mínima eritematosa (GRÖBER *et al.*, 2013), geralmente atingida com uma exposição não maior do que 15 minutos, para aqueles que apresentam a pele do tipo I ao tipo III na escala de Fitzpatrick, fica evidente essa relação encontrada no presente estudo, onde além da baixa exposição, esta ocorria em momentos menos propícios para a síntese.

Ainda, avaliando separadamente cada frequência de exposição solar relatada, é possível verificar nos gráficos de período de exposição que existe uma “fuga” do horário estabelecido entre 10:30 e 15h, justamente os horários em que ocorre a maior incidência de raios UVB em comprimento de onda favorável à síntese (MCCARTY, 2008).

Com relação ao IMC, encontramos um grupo não muito homogêneo. Variando da classificação de peso abaixo do recomendável até obesidade grau III e para as participantes idosas sobrepeso. Segundo estudo de Vuksanovic (2016), elevados índices de massa corporal estão diretamente relacionados a níveis inadequados de vitamina D, além de estarem também relacionados ao desenvolvimento de diversas patologias como diabetes, dislipidemia, hipertensão, cardiopatias, doenças vasculares, acidente vascular cerebral e câncer (FERRARI; LOMBARDI; BANFI, 2017; VUKSANOVIC et al., 2016).

Embora não se saiba exatamente a relação da causa e consequência entre o aumento do IMC e níveis inadequados de VitD, é sabido que mulheres com hipovitaminose D, apresentam até 45% mais acúmulo de gordura visceral, quando comparadas a mulheres com níveis adequados dessa substância (MATYJASZEK-MATUSZEK; LENART-LIPIŃSKA; WOŹNIAKOWSKA, 2015).

Com relação ao entendimento da causa que contribui para a diminuição da vitamina D circulante em indivíduos com IMC elevado, entende-se que ocorre em virtude das propriedades físico-químicas dessa substância, uma vez que por ser lipofílica apresenta alta afinidade pelas moléculas de gordura ocorrendo um “sequestro” da vitamina D (HOLICK, 2017; VUKSANOVIC et al., 2016). Da mesma forma que é relatado na literatura, foi verificado nesse estudo, uma correlação negativa entre níveis de vitamina D e IMC, porém sem significância.

Embora não tenhamos localizado outro estudo que tenha realizado avaliação semelhante a utilizada nesse estudo, os dados sobre a suplementação nos permitem fazer observações interessantes, principalmente com relação acompanhamento e cuidados com a saúde. No presente estudo foi verificado que 54% das participantes realizavam a suplementação com alguma forma de vitamina D. De modo satisfatório, das 39 participantes que foram classificadas com níveis suficientes de vitamina D, 64% faziam uso da suplementação. Assim como relatado por Unger (2010), encontramos uma baixa frequência de reposição de vitamina D na população (UNGER et al., 2010).

Diferentemente do que pudemos observar neste estudo, em pesquisa realizada por Selvarajan (2017) durante uma avaliação de níveis de vitamina D e a relação com a capacidade antioxidativa, foi observado que com uma suplementação oral de 60000 UI de vitamina D/semana durante 8 semanas as

participantes apresentaram um aumento significativo dos níveis de 25OHD (ANANDABASKAR et al., 2017).

Ainda, em outro estudo realizado por Rawson em 2018, são relatados algumas dificuldades em associar o efeito da suplementação com os objetivos dos estudos. Por exemplo, na suplementação de vitamina D e efeitos sobre o tecido muscular os resultados encontrados foram diferentes do que a literatura sugere, não atingindo os níveis esperados e também melhora nos índices observados. O autor atribuiu as diferenças entre os valores basais de vitamina D como fator importante para atingir o alvo terapêutico, de forma semelhante ao relatado por Owens et al., 2014 ao realizar a suplementação em indivíduos jovens do sexo masculino (OWENS et al., 2014).

Neste estudo, a informação referente a suplementação que mais se destacou, foi com relação a classificação dos níveis de vitamina D e a realização da suplementação. Importante ressaltar que das participantes do estudo classificadas como deficiente e insuficiente, total de 138 participantes, aproximadamente 50% delas realizam a suplementação de vitamina D. Embora não tivesse sido possível avaliar a dose de reposição de vitamina D, o período de consumo, tempo de tratamento e a frequência da reposição, esse dado pôde inferir de forma contundente que quase metade das mulheres que participaram do estudo, mesmo realizando tratamento para reposição de vitamina D, não estavam atingindo a faixa terapêutica preconizada.

Diversos estudos comparam a eficiência da suplementação de vitamina D para diminuição do risco de fraturas. Isso pode ser observado em estudo realizado por Zhao, 2017, em meta-análise que avaliou essa questão. O autor relata que não foi verificada associação significativa entre vitamina D e fratura de quadril (RR, 1,21 [95% CI, 0,99 a 1,47]; ou fraturas não vertebrais (RR, 1,10 [95% CI, 1,00 a 1,21]; quando comparado ao tratamento com placebo (ZHAO et al., 2017).

O fato de diversos estudos relatarem resultados divergentes entre níveis de vitamina D e qualquer que seja a avaliação que estejam buscando averiguar, pode ser, em parte, decorrente das diferenças sutis entre os receptores de vitamina D. Justamente pensando nisso, este estudo buscou avaliar o polimorfismo envolvido nos receptores de vitamina D.

No presente estudo as frequências genóticas de *FokI* encontradas foram de 54% FF, 35% Ff e 11% ff, sendo que as frequências esperadas eram de 51%, 41% e 8%, respectivamente. Nesse caso, observa-se que a população não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. De forma semelhante, em estudo realizado por Mansour et al., foi verificada as frequências de 68%, 18% e 14%, respectivamente (MANSOUR et al., 2010).

A frequência alélica encontrada neste estudo foi de 72% de F e 28% de f, o que se assemelha, também, ao resultado de Mansour et al., que encontrou a variante F em 72,9% em osteoporóticas (MANSOUR et al., 2010).

Quando realizada a avaliação da relação entre o polimorfismo com parâmetros como IMC e número de medicamentos, não foi observado significância.

As pacientes que possuíam o polimorfismo ff apresentavam uma densidade mineral óssea de fêmur reduzida quando comparadas aos outros fenótipos ($p = 0,028$). Um estudo prospectivo avaliando os polimorfismos do gene VDR realizado com mulheres na pós menopausa no Egito verificou uma significativa diminuição no T score femoral ($p = 0,3$) e uma maior diminuição na densidade mineral óssea femoral ($p < 0,001$) no genótipo Ff +ff (MANSOUR et al., 2010), dado que corroboram com os achados do presente estudo. Em contrapartida, em estudo proposto por Liang Zhang *et al.* (2018), realizando uma meta-análise, verificou que o genótipo Ff do *FokI*, estava significativamente associado com diminuição da densidade mineral óssea do colo do fêmur em uma população caucasiana (ZHANG et al., 2018).

Quando avaliados as densidades minerais ósseas da coluna lombar, quadril, colo do fêmur e antebraço, em estudo realizado por Ahmad et al. (2017), foi percebido que o polimorfismo ff estava associado à diminuição da DMO (AHMAD et al., 2017), dado semelhante ao encontrado no presente estudo.

A z score lombar foi menor em ff mas não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,329$). Em estudo realizado com mulheres egípcias na pós menopausa, foi relatado pelo autor que o genótipo ff foi relacionado com osteoporose e que o genótipo FF foi o mais encontrado nas mulheres pós menopausa (MANSOUR et al., 2010), similar ao descrito nesse estudo. Em contrapartida, estudos afirmam que não há associação entre o polimorfismo em *FokI* e o risco de osteoporose (CASADO-DÍAZ et al., 2013; WANG et al., 2013).

Essas controvérsias podem estar associadas ao fato de que relação entre densidade mineral óssea, osteoporose e polimorfismos do gene VDR é influenciada pelo tamanho amostral, etnia e hábitos de vida dos participantes (WU et al., 2016).

É sabido que os polimorfismos estão relacionados com a etnia (BHANUSHALI et al., 2009), no entanto não foi possível realizar esta análise no estudo devido a predominância da etnia caucasiana da população estudada (89%).

8 CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo foi possível concluir que:

- a média dos níveis séricos de cálcio foi de 9,53 mg/dL, de paratormônio foi de 49,19 ng/mL e de 25OHD foi 24,85 ng/mL;
- a frequência do genótipo *FF* foi 54%, *Ff* foi 35% e do *ff* 11%;
- as mulheres com fenótipo *ff* apresentaram menor densidade mineral óssea de colo de fêmur ($p=0,028$) e fêmur total ($p=0,032$);
- as mulheres com fenótipo *ff* apresentaram maiores níveis séricos de cálcio ($p=0,043$) quando comparadas com os outros fenótipos. Não houve diferença significativa entre os níveis séricos
- mais de 50% das participantes do estudo apresentavam exposição solar inferior a uma hora e em horários menos eficiente para a síntese de vitamina D.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, S. *et al.* Genetically low vitamin D concentrations and increased mortality: mendelian randomisation analysis in three large cohorts. **Bmj**, v. 349, n. 6330, p. 1-12, nov. 2014.
- AHMAD, I. *et al.* Association of Vitamin D Receptor (FokI and BsmI) Gene Polymorphism with Bone Mineral Density and Their Effect on 25-Hydroxyvitamin D Level in North Indian Postmenopausal Women with Osteoporosis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 2017.
- ANANDABASKAR, N. *et al.* Effect of Vitamin D supplementation on vascular functions and oxidative stress in type 2 diabetic patients with Vitamin D deficiency. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 21, p. 555–563, 2017.
- ARJMANDI, B. H. *et al.* Bone-Protective Effects of Dried Plum in Postmenopausal Women: Efficacy and Possible Mechanisms. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 496, 2017.
- ASKEW, F. A. *et al.* The Distillation of Vitamin D. **Royal Society**, v. 107, n. 748, p. 76 – 90, 1930.
- BACCARO, L. F. *et al.* The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: A viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583–591, 2015.
- BAUR, A. C. *et al.* Plant Oils as Potential Sources of Vitamin D. **Frontiers in Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 29, ago. 2016.
- BHANUSHALI, A. A. *et al.* Frequency of fokI and taqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25-hydroxyvitamin D levels. **Indian journal of human genetics**, v. 15, n. 3, p. 108–113, 2009.
- BISCHOFF-FERRARI, H. A. *et al.* Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Bmj**, v. 339, n. 3692, p. 1-11, 2009.
- BLAKE, G. M.; FOGELMAN, I. An Update on Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 40, n. 1, p. 62–73, 2010.
- BLIUC, D. *et al.* Risk of subsequent fractures and mortality in elderly women and men with fragility fractures with and without osteoporotic bone density: The dubbo osteoporosis epidemiology study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 4, p. 637–646, 2015.
- BOUILLON, R. *et al.* Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 6, p. 726–776, 2008.
- CABRERA, Á. J. R. Theories of human aging of molecules to society. **MOJ Immunol**, v. 2, n. 2, 2015.

- CAPRIO, M. *et al.* Vitamin D: not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extraskeletal effects. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, p. 1–15, 2016.
- CASADO-DÍAZ, A. *et al.* Vitamin D status and the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene are determining factors of bone mineral density in young healthy postmenopausal women. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 1, p. 187–189, 2013.
- CHAN, G. K.; DUQUE, G. Age-related bone loss: old bone, new facts. **Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 62–71, 2002.
- CHIRUMBOLO, S. *et al.* The Role of Vitamin D in the Immune System as a Pro-Survival Molecule. **Clinical Therapeutics**, v. 39, n. 5, p. 894–916, 2017.
- CHUN, R. F. *et al.* Impact of vitamin D on immune function: Lessons learned from genome-wide analysis. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. 151, p. 1–16, 2014.
- COLOMBINI, A. *et al.* Relationship between vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms, vitamin D status, osteoarthritis and intervertebral disc degeneration. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, p. 24–40, 2013.
- COSMAN, F. *et al.* R. Clinician`s Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359–2381, 2014.
- COUCHMAN, L.; MONIZ, C. F. Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. **Therapeutic Advances iin Musculoskeletal Disease**, v. 9, n. 4, p. 97 –104, 2017.
- DABIRNIA, R. *et al.* The relationship between vitamin D receptor (VDR) polymorfism and the occurrence of osteoporosis in menopausal Iranian women. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 13, n. 3, p. 190-194, 2016.
- DATTA, H. K. *et al.* The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008.
- DAWSON-HUGHES, B. Vitamin D and muscle function. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, p 0-3, 2017a.
- DE DIEULEVEULT, A. L. *et al.* Effects of Aging in Multisensory Integration: A Systematic Review. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. 80, p. 1–14, 2017.
- DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1689–1696, 2004.
- DELUCA, H. F. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. **BoneKEy reports**, v. 3, n. 479, p. 1-8, jan. 2014.
- DEMONTIERO, O.; VIDAL, C.; DUQUE, G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 4, n. 2, p. 61–76, 2012.

DUQUE, G.; TROEN, B. R. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: New facts for a major geriatric syndrome. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 56, n. 5, p. 935–941, 2008.

ENDOCRINE SOCIETY. Endocrine Facts and Figures: Bone and Mineral. n.1, p. 93-109, 2015.

ERVATTI, L. R.; BORGES, G. M.; JARDIM, A. P. Mudança demográfica no Brasil no início do século XXI, p. 1-156, 2015.

FERRARI, D.; LOMBARDI, G.; BANFI, G. Concerning the vitamin D reference range: Pre-analytical and analytical variability of vitamin D measurement. **Biochemia Medica**, v. 27, n. 3, p. 1–14, 2017.

FRASER, W. D.; MILAN, A. M. Vitamin D assays: Past and present debates, difficulties, and developments. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 2, p. 118–127, 2013.

FRENKEL, B. et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, p. 305-310, 2010.

GIANNOUDIS, P. V.; KANAKARIS, N. K.; EINHORN, T. A. Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: Review of the existing evidence. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 12, p. 1565–1581, 2007.

GINDE, A. A.; MPH, M. C. L.; CAMARGO, C. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population. **Arch Intern Med**, v. 169, n. 6, p. 626–632, 2012.

GIRGIS, C. M. et al. The roles of vitamin D in skeletal muscle: Form, function, and metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 1, p. 33–83, 2013.

GOLDSMITH, T. C. Arguments against non-programmed aging theories. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 9, p. 971–978, 2013.

GRÖBER, U. et al. Vitamin D: Update 2013- From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. **Dermato-endocrinology**, v. 5, n. 3, p. 331–347, 2013.

HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, p. 349-355, 2003.

HARINARAYAN, C. V. Vitamin D and diabetes mellitus. **Hormones (Athens, Greece)**, v. 13, n. 2, p. 163–181, abr. 2014.

HASSAN-SMITH, Z. K.; HEWISON, M.; GITTOES, N. J. Effect of vitamin D deficiency in developed countries. **British Medical Bulletin**, v. 1, p. 1–11, 2017.

HOLICK, M. F. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 3, p. 353–373, 2006.

HOLICK, M. F. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation

and Vitamin D for Health. **Anticancer Res**, v. 36, n. 3, p. 1345–1356, 2016.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 25, n. 3, 2017.

HOLICK, M. F. *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, jul. 2011.

HOLICK, M.; MATSUOKA, L.; WORTSMAN, J. Age, Vitamin D, and Solar Ultraviolet. **The Lancet**, v. 334, n. 8671, p. 1104–1105, 1989.

INDO, Y. *et al.* Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 11, p. 2392–2399, 2013.

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

JAFARINASABIAN, P. *et al.* Aging Human Body: Changes in Bone, Muscle and Body Fat with Consequent Changes in Nutrient Intake. **Journal Endocrinol.**, v. 234, n. 1, p. 1-41, 2017.

JIN, K. Modern Biological Theories of Aging. **Aging and Disease**, v. 1, n.2, p. 72-74, 2010.

KALACHE, A. Envelhecimento populacional no Brasil: uma realidade nova. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 3, n. 3, p. 217-220, 1987.

KERR, C. *et al.* The importance of physical function to people with osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 5, p. 1597–1607, 2017.

KHALID, A. T. *et al.* Utility of sun-reactive skin typing and melanin index for discerning vitamin D deficiency. **Pediatric Research**, p. 1–27, 2017.

KICH, D. M. *et al.* Determinação de 25-hidroxivitamina D2 e D3 em plasma por CLAE-DAD. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 329–336, 2012.

KINI, U.; NANDEESH, B. N. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. **Radionuclide and Hybrid Bone Imaging**, p. 29-55, 2012.

KIRA, M.; KOBAYASHI, T.; YOSHIKAWA, K. Vitamin D and the skin. **The Journal of Dermatology**, v. 30, p. 429-437, 2003.

KLING, J. M.; CLARKE, B. L.; SANDHU, N. P. Osteoporosis Prevention, Screening, and Treatment: A Review. **Journal of Women's Health**, v. 23, n. 7, p. 563–572, 2014.

KOZAR, R. A. *et al.* Injury in the aged: Geriatric trauma care at the crossroads. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 78, p. 1197-1209, 2015.

LEE, S. M. *et al.* The impact of VDR expression and regulation in vivo. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2017.

LENTLE, B. *et al.* A Qualitative Examination of the Ward Region of Interest as Imaged on Dual-Energy X-ray Absorptiometry Examinations: The “Wandering Ward Sign”. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 19, n. 4, p. 515-521, 2016.

LI, C. *et al.* Bioavailable 25(OH)D but Not Total 25(OH)D Is an Independent Determinant for Bone Mineral Density in Chinese Postmenopausal Women. **EBioMedicine**, 2017.

LIPS, P. Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, p. 620–625, 2007.

LIVSHITS, G. Quantitative genetics of circulating molecules associated with bone metabolism: A review. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 6, n. 1, p. 47-61, 2006.

LLOMPART-POU, J. A. *et al.* Severe trauma in the geriatric population. **World J Crit Care Med**, v. 6, n. 2, 2017.

MAHMOUD, A. A.; ALI, A. H. K. Vitamin D receptor gene polymorphism and 25 hydroxy vitamin D levels in Egyptian patients with pulmonary tuberculosis. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 63, p. 651–655, 2014.

MANOLAGAS, S. C. ; KOUSTENI, S. ; JILKA, R. L. Sex steroids and bone. **Recent Prog Horm Res.**, v. 57, p. 385–409, 2002.

MANSOUR, L. *et al.* The role of vitamin D receptor genes (FOKI and BSMI) polymorphism in osteoporosis. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 15, p. 79–83, 2010.

MARINHO, B. C. G. *et al.* The burden of osteoporosis in Brazil. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 58, n. 5, p. 434-443, 2014.

MARTINS, J. S. *et al.* Vitamin D Status and Its Association with Parathyroid Hormone Concentration in Brazilians. **Journal of Nutrition and Metabolism**, 2017.

MATYJASZEK-MATUSZEK, B.; LENART-LIPIŃSKA, M.; WOŹNIAKOWSKA, E. Featured paper Clinical implications of vitamin D deficiency. **Menopausal Review**, v. 14, n. 2, p. 75–81, 2015.

MCCARTY, C. A. Sunlight exposure assessment: can we accurately assess vitamin D exposure from sunlight questionnaires? **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 4, abr. 2008.

MERCADO-SÁENZ, S. *et al.* Cellular aging: Theories and technological influence. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1319–1332, 2010.

MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. C. G.; SILVA, A. L. A. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n.

3, p. 507-519, 2016.

MORRIS, H. A. Vitamin D Activities for Health Outcomes. **Annals of laboratory medicine**, v. 34, n. 3, p. 181–186, maio 2014.

MORY, D. B. *et al.* Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to beta-cell autoimmunity and to remaining beta-cell function. **Human immunology**, v. 70, n. 6, p. 447–51, jun. 2009.

OWENS, D. J. *et al.* Vitamin D supplementation does not improve human skeletal muscle contractile properties in insufficient young males. **European Journal of Applied Physiology**, 2014.

PEDROSA, M. A. C.; CASTRO, M. L. Papel da vitamina D na função neuro-muscular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 4, p. 495–502, 2005.

PÉREZ, A. *et al.* Genotypes and clinical aspects associated with bone mineral density in Argentine postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, p. 358–365, 2008.

PIKE, J. W.; LEE, S. M.; MEYER, M. B. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in bone cells: exploiting new approaches and defining new mechanisms. **Bone**, v. 3, p. 482, jan. 2014.

PONCHON, G.; KENNAN, A. L.; DELUCA, H. F. “Activation” of vitamin D by the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2032–2037, 1969.

RIVADENEIRA, F.; MAKITIE, O. Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 262–281, 2016.

PORTO ALEGRE. Prefeitura de Porto Alegre-RS. **Turismo: A cidade: Apresentação**. Disponível em: <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/turismo/default.php?p_secao=256>. Acesso em: 17 jun. 2017.

RIVAS, M. *et al.* Association between non-melanoma and melanoma skin cancer rates, vitamin D and latitude. **Oncology Letters**, v. 13, n. 5, p. 3787–3792, 2017.

ROODMAN, G. D. Regulation of osteoclast differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1068, p. 100–109, 2006.

RUBIN, J.; RUBIN, C.; JACOBS, C. R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. **Gene**, v. 367, p. 1–16, 2006.

RUIZ, F. S. *et al.* Associação entre deficiência de vitamina D, adiposidade e exposição solar em participantes do sistema de hipertensão arterial e diabetes melito. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 103-114, 2014.

SANTOS, B. R. *et al.* Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. **BMC pediatrics**, v. 12, n. 62, p. 1-7, jan. 2012.

- SASSI, R. *et al.* Polymorphisms in VDR gene in Tunisian postmenopausal women are associated with osteopenia phenotype. **Climacteric**, v. 18, n. 4, p. 624–630, 2015.
- SCHLÖGL, M.; HOLICK, M. F. Vitamin D and neurocognitive function. **Clinical Interventions in Aging**, v. 9, p. 559–568, 2014.
- SCHMIDT, M. I. *et al.* Chronic non-communicable diseases in Brazil: Burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, p. 1949-1961, 2011.
- SHIRAZI, L. *et al.* Determinants of serum levels of vitamin D: A study of life-style, menopausal status, dietary intake, serum calcium, and PTH. **BMC Women's Health**, v. 13, n. 33, 2013.
- SIMONI, R. D.; HILL, R. L.; VAUGHAN, M. Nutritional Biochemistry and the Discovery of Vitamins: the Work of Elmer Verner McCollum. **Biochemistry**, v. 277, 2002.
- SPIGNA, G. D. I. *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms as tool for early screening of severe bone loss in women patients with rheumatoid arthritis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 4664–4669, 2016.
- SULLIVAN, S. D. *et al.* Age of menopause and fracture risk in postmenopausal women randomized to calcium þ vitamin D, hormone therapy, or the combination: results from the Women's Health Initiative Clinical Trials. **Menopause**, v. 24, n. 4, p. 371-378, 2017.
- SUTHERLAND, M. K. *et al.* Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. **Molecular Brain Research**, v. 13, p. 239-250, 1992.
- SYED, F.; KHOSLA, S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, p. 688-696, 2005.
- TANG, J. C. Y. *et al.* Reference intervals for serum 24,25-dihydroxyvitamin D and the ratio with 25-hydroxyvitamin D established using a newly developed LC-MS/MS method. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 46, p. 21–29, 2017.
- WU, H. Y. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D inversely associated with blood eosinophils in patients with persistent allergic rhinitis. **Asia Pacific Allergy**, v. 7, p. 213-220, 2017.
- TROEN, B. R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 605-614, 2003.
- UITTERLINDEN, A. G. *et al.* Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v. 338, p. 143–156, 2004.
- UNGER, M. D. *et al.* Vitamin D status in a sunny country: Where has the sun gone? **Clinical Nutrition**, v. 29, p. 784–788, 2010.
- UNITED NATIONS, **Department of Economic and Social Affairs, Population Division** (2015).

World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A/390)

VANHERWEGEN, A.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C. Vitamin D endocrinology on the cross-road between immunity and metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2017.

VUKSANOVIC, M. *et al.* Cross-talk between muscle and bone in postmenopausal women with hypovitaminosis D. **Climacteric**, 2016.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. **Dermato-endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 51–108, jan. 2013.

WAHL, D. A. *et al.* A global representation of vitamin D status in healthy populations. **Archives of Osteoporosis**, v. 7, p. 155–172, 2012.

WANG, D. *et al.* Vitamin D receptor Fok i polymorphism is associated with low bone mineral density in postmenopausal women: A meta-analysis focused on populations in Asian countries. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 169, p. 380–386, 2013.

WEAVER, S. P. *et al.* Vitamin D, sunlight exposure, and bone density in elderly African American females of low socioeconomic status. **Family Medicine**, v. 42, n. 1, p. 47–51, 2010.

WEBB, A. R.; KLINE, L.; HOLICK, M. F. 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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, n. 2, p. 373–378, 1988.

WEN, H. J. *et al.* Effects of short-term step aerobics exercise on bone metabolism and functional fitness in postmenopausal women with low bone mass. **Osteoporosis International**, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessment of Fracture Risk and Its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. 1994.

WORTLEY, D.; AN, J.; HESHMATI, A. Tackling the Challenge of the Aging Society : Detecting and Preventing Cognitive and Physical Decline through Games and Consumer Technologies. **Healthcare Informatics Research**, v. 23, n. 2, p. 87–93, 2017.

WU, J. *et al.* Association between the vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis. **Biomedical Reports**, v. 5, p. 233–236, 2016.

ZHANG, L. *et al.* Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 981, p. 1–16, 2018.

ZHAO, J. *et al.* Association Between Calcium or Vitamin D Supplementation and Fracture Incidence in Community-Dwelling Older Adults. **Jama**, v. 318, n. 24, p. 2466-2482, 2017.

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO

Questionário estruturado

*Obrigatório

1. Nome *

2. Data:

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

3. Idade: *

4. Peso:

5. Altura:

6. Encontra-se na menopausa? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

7. Se "sim", informe há quantos anos: *

8. Você apresenta alguma dessas doenças listadas abaixo?

Marque todas que se aplicam.

Disfunção da tireóide

Problema nos rins

Algum tipo de câncer

Problema no coração

Osteoporose

Pressão alta (HAS)

Artrite reumatóide

Outro: _____

9. Com que frequência você costuma se expor?

Tente quantificar quantas horas por dia você costuma ficar exposta ao sol diretamente.

Marque todas que se aplicam.

- Menos de uma hora por dia
- Entre uma e duas horas por dia
- Mais de duas horas por dia
- Realmente evito ao máximo o sol
- Nunca

10. Marque os momentos em que mais costuma se expor ao sol:

Essa exposição pode ser caracterizada por uma ida ao supermercado ou alguma outra atividade onde exista exposição ao sol

Marque todas que se aplicam.

- Antes das 09:00h
- Das 09:00h até 11:00h
- Das 11:00h até 13:00h
- Das 13:00h até as 15:00h
- Das 15:00h até as 17:00h
- Após as 17:00h

11. Você tem o costume de utilizar algum tipo de protetor solar?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

12. Qual o fator de proteção?

13. Se sim, você costuma reaplicar ele ao longo do dia?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

14. Quantas aplicações realiza durante o dia?

15. Quais as áreas em que você aplica o protetor solar?

Marque todas que se aplicam.

- Rosto
- Braços
- Pernas
- Corpo inteiro

16. Você pratica algum exercício?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

17. Quais exercícios você costuma praticar?

Deve-se levar em consideração apenas os últimos 6 meses.

Marque todas que se aplicam.

- Corrida
- Caminhada
- Musculação
- Pilates
- Ioga
- Natação
- Hidroginástica
- Ciclismo
- Arte marcial/luta
- Outro: _____

18. Você costumava praticar exercícios quando tinha entre 15 - 30 anos?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

19. Você faz uso contínuo de alguma medicação?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

20. No último ano, quais medicamentos você utilizou?

Marque todas que se aplicam.

- Diuréticos
- Antidepressivos
- Hormônios (estrogênio)
- Hormônios (anticoncepcional)
- Puran T4
- Reposição de cálcio
- Reposição de vitamina D
- Corticóides
- Outro: _____

21. Qual o seu nível de escolaridade?

Marcar apenas uma oval.

- Primeiro grau incompleto
- Primeiro grau completo
- Segundo grau incompleto
- Segundo grau completo
- Superior incompleto
- Superior completo
- Outro: _____

22. Qual a sua profissão?

23. Qual a sua renda familiar aproximada?

Marcar apenas uma oval.

- Até 2 salários mínimos
- De 2 a 4 salários mínimos
- De 4 a 10 salários mínimos
- De 10 a 20 salários mínimos
- Acima de 20 salários mínimos

APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar de um estudo cujo título é “Polimorfismo de genes envolvidos com a densidade mineral óssea e sua relação com metabolismo ósseo em mulheres pós-menopausa”.

O objetivo principal desse estudo é o de verificar fatores genéticos que possam influenciar no desenvolvimento de doenças ou condições que afetem o tecido ósseo, como a osteoporose.

A importância desse estudo se justifica pelo fato de que mulheres, principalmente mulheres após a menopausa, podem desenvolver uma perda acentuada da densidade mineral óssea, sendo possível desenvolverem doenças como a osteoporose. Desse modo, a realização de estudos sobre esse assunto pode trazer maiores conhecimentos a respeito de como ocorre essa perda do osso e, assim, buscar através desses dados melhores formas de prevenção para esta situação.

Para a realização desse estudo você irá responder a algumas perguntas sobre hábitos de vida (fumo, exposição solar, prática de exercícios, etc.), hábitos alimentares e conhecimento de alguma doença no passado ou presente que possa interferir na saúde dos seus ossos. O tempo estimado para a realização destes questionários é de aproximadamente 15 minutos. Após responder essas perguntas será realizada uma coleta de sangue de aproximadamente 5 mL (1 colher de sopa) de sangue que pode deixar apenas um pequeno hematoma (roxo) no local da coleta. A senhora não terá nenhum custo e poderá entrar em contato com o pesquisador Mauricio Sprenger Bassuino pelo telefone 51 99160708 ou pelo email mauricio.bassuino@acad.pucrs.br ou o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS pelo telefone 3320 3345 para esclarecer eventuais dúvidas.

Eu _____ fui informado dos objetivos desta pesquisa de forma clara. Declaro que recebi todas informações a respeito do estudo e das avaliações a que serei submetido e esclareci as minhas dúvidas. Declaro também que sei a respeito da possibilidade de abandonar a pesquisa a qualquer momento, se assim o quiser, bem como, solicitar novas explicações a respeito do que está sendo realizado na pesquisa e o andamento. Fui informado que os dados obtidos para esta pesquisa são de caráter sigiloso e serão apresentados em revistas especializadas, congressos ou meios de divulgação sempre através de códigos, nunca revelando identidade.

Desse modo, se você possui alguma dúvida sobre os seus direitos ou questões éticas como participantes de pesquisa, você pode entrar em contato com:

Comitê de Ética em pesquisa da PUCRS, Hospital São Lucas da PUCRS. Av. Ipiranga, 6690, 3º andar, sala 314, CEP 90610-000. Porto Alegre/RS. Telefone: (51) 3320-3345. Horário: De segunda à sexta-feira, das 08h00 às 12h00 e das 13h 30min às 17h 00min.

Desse modo, concordo em fazer parte da referida pesquisa.

Nome do participante

____/____/_____
Data


Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador



Factors related to decreased vitamin D levels in men with spinal cord injury living in a subtropical region

Fatores relacionados a níveis reduzidos de vitamina D em homens com lesão da medula espinhal vivendo em uma região subtropical

Mauricio Sprenger Bassuino¹ , Elisa Lettnin Kaminski², Laís Oliveira Garcia³, Rafael Linden⁴, Marina Venzon Antunes⁴, Rodolfo Herberto Schneider⁵, Denise Cantarelli Machado⁵

¹ Faculdade de Biomedicina, Centro Universitário da Serra Gaúcha. Porto Alegre, RS, Brazil.

² Faculdade de Fisioterapia, Universidade Católica de Pelotas (UCPEL). Pelotas, RS, Brazil.

³ Departamento de Hemoterapia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Grupo de Pesquisas em Bioanálises, Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brazil.

⁵ Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

How to cite this article:

Bassuino MS, Kaminski EL, Garcia LO, Linden R, Antunes MV, Schneider RH, Machado DC. Factors related to decreased vitamin D levels in men with spinal cord injury living in a subtropical region. *Sci Med.* 2018;28(2):ID28381. <http://doi.org/10.15448/1980-6108.2018.2.28381>

ABSTRACT

AIMS: To evaluate the levels of vitamin D, parathyroid hormone and calcium in individuals with spinal cord injury and to identify related factors. **METHODS:** A cross-sectional study included men with spinal cord injury, living in the South Region of Brazil. A questionnaire was applied to evaluate socioeconomic data, life habits and health. The time elapsed since the spinal cord injury was considered. Vitamin D was evaluated in plasma via liquid chromatography; calcium and PTH were measured in serum by a colorimetric method and electrochemiluminescence respectively. For data analysis, linear regression and chi-square test were utilized. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS: The study included 39 paraplegic or tetraplegic men with spinal cord injury. The mean age was 35.52 ± 9.78 years, and the mean time since injury was 6.09 ± 5.55 years. The mean biochemical levels were: 19.0 ± 6.98 ng/mL for vitamin D; 9.54 ± 0.52 mg/dL for total calcium; and 34.81 ± 10.84 pg/mL for parathyroid hormone. Individuals with sun exposure for more than two

hours daily had higher vitamin D levels than those exposed up to one hour per day ($p=0.001$). Linear regression identified an inverse relationship between lesion time and vitamin D levels (regression coefficient: -0.424 ; $p=0.029$), while the other parameters did not show significant differences regarding the time elapsed since the lesion. Subjects with income above four minimum wages had higher vitamin D values (mean 25.67 ± 5.45 ng/mL) when compared to those with income up to four minimum wages (mean 18.43 ± 6.79 ng/mL) ($p=0.021$).

CONCLUSIONS: Levels of vitamin D were inversely correlated to the time elapsed since the spinal cord injury, probably due to insufficient sun exposure resulting from prolonged limitation of mobility. In addition, lower levels of vitamin D were associated to lower income. These factors may aggravate bone loss associated with decreased mobility resulting from spinal cord injury.

KEYWORDS: Vitamin D; parathyroid hormone; spinal cord injury; paraplegia; monthly income; socioeconomic status.

RESUMO

OBJETIVOS: Avaliar os níveis de vitamina D, hormônio paratireoide e cálcio em indivíduos com lesão medular e identificar fatores relacionados.

MÉTODOS: Estudo transversal incluiu homens com lesão da medula espinhal, vivendo na Região Sul do Brasil. Foi aplicado um questionário para avaliar dados socioeconômicos, hábitos de vida e saúde. Foi investigado o tempo transcorrido após a lesão medular. A vitamina D foi avaliada no plasma por meio de cromatografia líquida; o cálcio e o hormônio paratireoide foram dosados no soro por um método colorimétrico e eletroquimioluminescência respectivamente. Para a análise de dados, foram utilizadas regressão linear e teste do qui-quadrado. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS: O estudo incluiu 39 homens paraplégicos ou tetraplégicos com lesão da medula espinhal. A média de idade foi de $35,52\pm 9,78$ anos e o tempo médio de lesão foi de $6,09\pm 5,55$ anos. As médias dos níveis bioquímicos foram: $19,0\pm 6,98$ ng/mL para vitamina D, $9,54\pm 0,52$ mg/dL para cálcio total e $34,81\pm 10,84$ pg/mL para hormônio paratireoide. Indivíduos com exposição ao sol por mais de duas horas por dia apresentaram maiores níveis de vitamina D do que os expostos até uma hora por dia ($p=0,001$). A regressão linear identificou uma relação inversa entre o tempo de lesão e os níveis de vitamina D (coeficiente de regressão: $-0,424$; $p=0,029$), enquanto os outros parâmetros não apresentaram diferença significativa em relação ao tempo decorrido desde a lesão. Os indivíduos com renda acima de quatro salários mínimos apresentaram maiores valores de vitamina D (média de $25,67\pm 5,45$ ng/mL) quando comparados com aqueles com renda até quatro salários mínimos (média $18,43\pm 6,79$ ng/mL) ($p=0,021$).

CONCLUSÕES: Os níveis de vitamina D foram inversamente correlacionados com o tempo decorrido desde a lesão da medula espinhal, provavelmente devido à exposição insuficiente ao sol resultante da limitação prolongada da mobilidade. Níveis mais baixos de vitamina D foram associados a menor renda. Estes fatores podem agravar a perda óssea associada à diminuição da mobilidade resultante da lesão da medula espinhal.

Abbreviations: HPLC, high performance liquid chromatography; PTH, parathyroid hormone; PTHi, intact parathyroid hormone;

SCI, spinal cord injury.

INTRODUCTION

DESCRITORES: vitamina D; hormônio paratireoide; traumatismos da medula espinhal; paraplegia; renda mensal; situação socioeconômica.

Received: 2017/08/27

Accepted: 2017/12/29

Published: 2018/01/07

✉ Correspondence: mauricio@bassuino.com

Av. Ipiranga 6690, prédio 60, 2º andar
CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil



This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original publication is properly cited.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Worldwide incidence of spinal cord injury (SCI) is 3.6 to 95.4 patients per million [1] and in Brazil, although it is underreported, 6.000 to 8.000 cases are estimated per year [2]. SCI is predominantly caused by automobile accidents, falls, practice of different sports, and acts of violence [2].

Spinal trauma has been determined as an important factor to bone loss immediately after injury due to changes generated by immobility and reduced impact activity [3, 4]. These changes include increased bone resorption, hypercalciuria and suppression of parathyroid hormone (PTH) [5]. It is estimated that 21 to 81% of individuals with this lesion will be diagnosed with osteoporosis [3] and have a 5 to 23% greater chance to present fractures when compared to individuals without physical limitations [6]. Fractures after spinal trauma also present additional complications, such as pain, pressure ulcers, and spasticity, among others [6]. They also lead to decreased quality of life and prolonged hospitalization. However, there are no protocols to detect, prevent or treat bone loss after spinal trauma [6, 7].

Although immobilization due to SCI is the main triggering factor for bone loss, neural lesions, circulatory problems and hormonal changes are also implicated in the pathogenesis of osteoporosis [8]. Vitamin D plays an important role in calcium homeostasis [9], and when in low concentrations it is associated with myalgia and muscle weakness [10]. Factors such as low sun exposure, advanced age, dietary habits, genetic changes, skin color, use of sunscreens and geographic location influence the serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D (25OHD), a portion that reflects the status of this element in the organism [11, 12]. PTH, another hormone related to calcium metabolism, is

important to balance bone remodeling because it maintains adequate levels of circulating calcium [4].

Individuals with SCI may have an inadequate or severely deficient level of vitamin D, which can result mainly in secondary hyperparathyroidism, decreased bone mineral density, osteoporosis and increased risk of fractures [13, 14]. Secondary hyperparathyroidism and vitamin D deficiency also play an important role in the development of post SCI osteoporosis [13]. Complete lesions, low body mass index, age, history of previous fracture, alcohol use, paraplegia, and longer time elapsed from the injury are considered risk factors for developing osteoporosis in individuals with SCI [1].

The association of secondary hyperparathyroidism with vitamin D deficiency may represent a modifiable risk factor for bone loss and fractures in individuals with SCI [13]. The prevention and treatment of postinjury bone loss also has a major impact on quality of life and prognosis for these patients. Therefore, evaluation of bone metabolism markers in order to identify the profile of individuals with SCI may contribute to the establishment of a strategy for the prevention and/or treatment of bone loss.

The purpose of this study was to verify the serum levels of vitamin D, PTH and calcium in individuals with SCI and their relationships with the time elapsed since the injury, time of sun exposure and socioeconomic level. To our knowledge, this is the first study that includes individuals with SCI from the southern region of Brazil in order to evaluate parameters related to bone metabolism.

METHODS

The study was approved by the Research Ethics

Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul under the protocol of number 11/05716. All participants signed an informed consent term, in compliance with the guidelines and standards for research on human beings of the Resolution 466/2012 of the National Health Council of Brazil and of the Helsinki Declaration.

The study included male individuals with SCI, attended in institutions of support or rehabilitation from the metropolitan region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul state, which is located in the South Region of Brazil, within a subtropical area. Unlike most of Brazil, the southern region has a temperate climate, with welldefined seasons and many sunless days.

Individuals were invited by the coordinators of the supporting or rehabilitation centers to participate in the study. Those who met the inclusion criteria and who accepted to participate were then contacted by the researchers, and interviews and sample collection were scheduled.

A structured questionnaire composed by 17 questions, elaborated by the authors, was applied. The questionnaire included information such as age, injury time, cause of injury, general lifestyle habits (exercise practice, use of tobacco, and time of sun exposure), income, general health, medications in use, and food. The questionnaire was applied by two of the authors, in a standardized manner. Application of the questionnaire was performed in the institutions facilities frequented by the volunteers.

Determination of intact PTH serum levels (PTH_i) was done by electrochemiluminescence (ECLIA) (Roche[®]), with reference values between 15 and 65 pg/mL. Total calcium, creatinine, urea and albumin were measured in serum by dry chemistry on Vitros[®] 950 Johnson & Johnson

equipment, using the reference values of 8.4-10.2 mg/dL for total calcium, 3.5-5.0 g/dL for albumin, 19-43 mg/dL for urea and 0.65-1.25 mg/dL for creatinine.

Plasma levels of 25-OH-vitamin D₃ were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) adapted from the Kandár and Záková method. After plasma deproteinization with ethanol, the metabolite was isolated from the matrix by solid phase extraction in octysilic cartridges containing 500 mg stationary phase. In this procedure, the extraction cartridges were conditioned with methanol and water, washed with ultrapure water and a mixture of methanol and water and finally eluted with methanol, which was evaporated to dryness. The dried extract was taken up with a methanolic solution of the internal standard (dodecanophenone). The resulting solution was injected onto a Lichrospher C18 (Merck[®]) column which was maintained at 52°C. The elution was performed with mobile phase consisting of acetonitrile and ultra-purified water (77:23, v/v), with a flow of 1.2 ml/min⁻¹ and chromatographic monitoring at 264 nm. Under these conditions, the total time of chromatographic analysis was 20 min, eluting 25-OH-vitamin D₃ in 7.6 min and dodecanophenone in 15.1 min. The method is linear between 5 ng/mL and 100 ng/mL. For each batch of 12 clinical samples commercial controls provided by Chromsystems (Munich, Germany) were processed.

The levels of PTH_i, calcium, and vitamin D levels were demonstrated by percentage, mean and standard deviation. Linear regression and the Chi-square test were performed in the IBM SPSS 18.0 program to evaluate correlation and association between the variables of interest. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Forty individuals were evaluated and one was excluded from the analyses because renal function markers and PTH levels were consistent with disorders that could interfere with bone metabolism. The general characteristics of the included subjects are shown in **Table 1**.

Table 1. General characterization of the sample and according to the type of paralysis in men with spinal cord injury.

Variable	Total 39 (100%) mean±SD	Paraplegic 30 (78%) mean±SD	Tetraplegic 9 (22%) mean±SD
Age (years)	35.52±9.78	34.41±9.82	39.33±9.15
Weight (kg)	74.71±15.92	73.53±13.85	78.78±22.16
Drug use (units per day)	2.55±2.19	2.35±1.88	3.22±3.07
Calcium (mg/dL)	9.54±0.52	9.53±0.51	9.60±0.57
Vitamin D (ng/mL)	19.04±6.98	20.13±7.18	15.27±4.92
PTH (pg/mL)	34.81±10.84	33.43±8.61	39.59±16.19
Injury time (years)	6.09±5.55	6.07±5.87	6.17±4.55

SD, standard deviation.

nine (23%) were tetraplegic. The youngest tetraplegic had 25 and the oldest 55 years. The shortest time elapsed since injury among the paraplegic group was 11 months and the longest was 25 years. In the tetraplegic group, the shortest time was 14 months and the longest 13 years. Regarding medications, 34 subjects (87%) used some type of medicine of continuous use.

When assessed for vitamin D levels, individuals with a time of sun exposure greater than two hours per day had higher levels of vitamin D (mean 31.77±9.78) than those exposed up to one hour per day (mean 16.95±4.98) (p=0.001).

From all the evaluated patients, 33 (85%) had an income up to four minimum wages, three (7.5%) between five and 10 minimum wages, and three (7.5%) greater than 10 minimum wages. Subjects with income above four minimum wages had higher vitamin D levels (mean 25.67±5.45 ng/mL) when compared to those with income up to 4 minimum wages (mean 18.43±6.79 ng/mL) (p=0.021).

In the linear regression analysis corrected for hours of sun exposure, a negative relation was found between vitamin D values and time of SCI. The longer time from the injury, the lower vitamin D values (p=0.029) (**Figure 1**).

Regarding the time of SCI and PTH levels, there was a positive regression coefficient without statistical significance (p=0.070) (**Figure 2**).

When evaluated by type of injury (complete or incomplete) the biochemical parameters did not present significant difference (**Table 2**).

The age of the 39 participants varied between 18 and 58 years. Thirty (78%) were paraplegic and

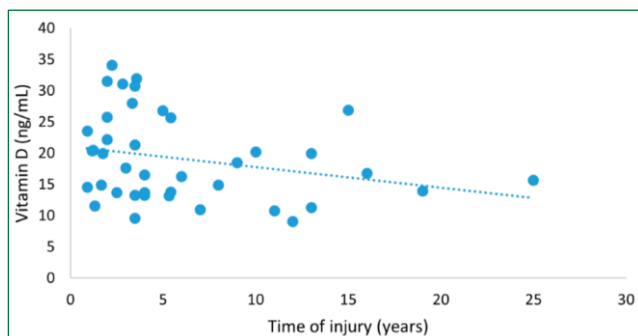


Figure 1. Linear regression of values of vitamin D and time elapsed since the lesion in men with spinal cord injury, corrected for hours of sun exposure. Univariate model; regression coefficient: -0.424 , $p=0.029$.

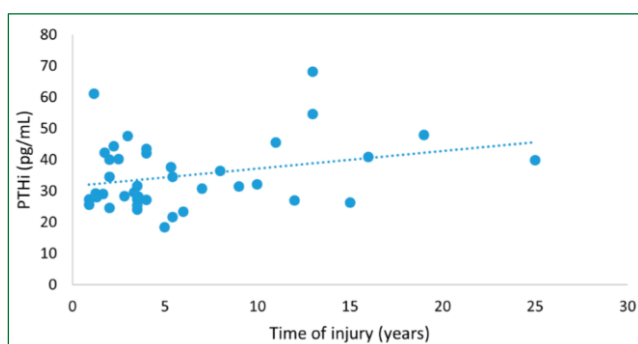


Figure 2. Linear regression of values of intact parathyroid hormone (PTHi) and time elapsed since the lesion in men with spinal cord injury. Univariate model; regression coefficient: 0.253 , $p=0.381$.

Table 2. Vitamin D, parathyroid hormone and total calcium levels according to complete or incomplete spinal cord injury.

Variable	p	Complete injury	Incomplete injury
		n=23	n=16
		mean±SD	mean±SD
Vitamin D (ng/mL)		20.0±6.54	17.5±7.58
			0.276
PTHi (pg/mL)		34.3±10.39	35.47±11.80
		0.756	
Total calcium (mg/dL)		9.47±0.50	9.65±0.54
			0.316

SD, standard deviation; PTHi, intact parathyroid hormone.

DISCUSSION

According to published literature, a large proportion of people suffering from SCI are young adults, which was confirmed in this sample, whose mean age was 35 years. Nogueira et al. [15], in a study conducted with 59 subjects in the city of São Paulo, showed that the participants had an average age of 37 years. Opperman et al. [16] observed similar results in relation to the mean age of individuals with SCI.

A mean of 2.5 drugs taken per day was found in this sample. A study conducted in Minas Gerais, which evaluated hospitalized patients with SCI, found that the daily average of drug use was greater, approximately 10 [2]. One possible cause for this difference is that the subjects in the present study were outpatients, while the other were inpatients. Pharmacological therapy should be carefully monitored, since it involves risk of adverse reactions and longer hospital stay [2].

The mean levels of vitamin D were 19.04 ng/mL, which, according to a guideline published by Hollick et al. [11], are considered as deficient. It's important to emphasize that this study was performed in a subtropical region, what could contribute with the low vitamin D levels. This finding is similar to the data published by Bauman et al. [17] that also evaluated subjects with SCI. These authors detected a mean concentration of vitamin D of 14 ng/mL in the assessed group. Likewise, Gifre et al. [3] also found a high incidence of hypovitaminosis D, reaching 60% in individuals with SCI.

An important and somewhat expected result was

that the time elapsed since injury was inversely proportional to the vitamin D levels. This finding is probably related to the shorter time of sun exposure due to limited mobility. SCI is a complex condition that leads to biopsychosocial and lifestyle changes [15, 17].

This low solar exposure in patients with SCI could be related with longstanding hospitalization, immobilization, as well as the lack of financial conditions, which entails the impossibility of hiring a professional who could assist the patient's locomotion, in order to increase the time of sun exposition [18]. The association between low income and vitamin D deficiency found in this study is relevant because intervention of public policies could assist these patients in providing them with more outdoor living opportunities. As far as we know, there are no studies that found relationship between vitamin D levels and low income, which may represent another risk factor for hypovitaminosis D.

Synthesis and metabolism of vitamin D largely depends on exposure to short wave ultraviolet B (UVB) rays, which will initiate the entire process of activation of 25-OH-vitamin D in 1,25(OH)₂vitamin D, also known as calcitriol, via its substrate 7-dehydrocholesterol, into the epidermis [11]. In addition to a negative-acting on bone tissue, hypo- vitaminosis D may impair other aspects such as muscle strength, and cause complications related to different organs [19]. According to a study by Nemunaitis et al. [14], people with tetraplegia and those with pressure ulcer had severely decreased vitamin D values, with a mean below 10 ng/mL.

In the comparison between serum levels of PTH and time of injury we can observe a tendency for a positive correlation, which might indicate that the longer the injury time, the higher levels of

PTH were found, although this finding was not statistically significant. A possible explanation for the lack of significance could be the short average injury time of the study sample. Compared to the mean baseline PTH parameters obtained by Bauman [12] (mean of 70.0 pg/mL), lower levels (mean of 34.81 pg/mL) were found in the present study. In contrast, in another study by Bauman et al. [20], mean PTH values were 38.0 pg/mL. The average injury time of the participants in our study was 6.09 years, lower than the average of 20 years found by Bauman et al. [20]. A study by Mechanick et al. [21], showed a lower mean PTH in individuals with complete lesion when compared to those with incomplete lesion, a relationship not found in the present study.

The suppression of the PTH-vitamin D axis is due to prolonged immobilization, when a process of accelerated bone demineralization occurs, increasing the calcemia and consequently reducing the secretion of PTH and conversion of the bioactive portion of vitamin D [17]. However, Karapolat et al. [8] highlight that in the acute period after the injury there is suppression of the PTH-vitamin D axis, while during the chronic phase, a reverse activity of PTH can be observed. PTH values gradually increased from the first days until 36 months after the SCI [22]. This may have possibly influenced the PTH values found in the present study.

Albumin, creatinine and urea were evaluated because renal function may be affected by variations in total calcium concentrations. No changes in albumin concentrations were identified, as occurred in the study by Bauman et al [20]. It is worth mentioning that ionized calcium is the one that best demonstrates the calcemic status [23], but we chose to use the total calcium dosage because it presents greater

stability, is widely used in clinical practice, and provides a good information [23].

The technique used for measure the serum vitamin D is one of the most precise. The technique of 25-hydroxyvitamin D by HPLC-DAD, based on the study of Kich et al. [24], showed to be precise and accurate with adequate sensitivity. There are several commercial vitamin D dosing methods cited in the literature, more specifically 25-hydroxyvitamin D [25], presenting pros and cons. However, studies have shown a high variability between these techniques, which may lead to misinterpretations [26]. Although there are publications with divergent opinions about the most appropriate method, in most of them efficiency liquid chromatography is defined as one of the best methods, because it presents a high accuracy [26]. Some other methods, such as competitive binding protein assays, may overestimate the values [27].

The comorbidities of the acute phase of SCI have been reduced due to advances in care, however there is still much to progress in preventing sequels in the chronic phase of SCI. One of these sequels is osteoporosis, which currently lacks specific protocols for rehabilitation therapies [28]. Understanding the complications of SCI allows the development of therapeutic approaches that can reduce comorbidities and improve quality of life of the patients.

We can conclude that the levels of vitamin D in paraplegic or tetraplegic individuals with SCI were inversely correlated to the time elapsed since the injury. This may be due to insufficient sun exposure resulting from prolonged limitation of mobility. In addition, lower levels of vitamin D were associated to lower income. These factors may aggravate bone loss associated with decreased mobility and low impact activity

resulting from SCI.

Information should be given to persons with reduced mobility about the benefits of sun exposure and how sun exposure should be practiced as a prevention for vitamin D deficiency, since it doesn't have costs and because the literature demonstrates that normal levels of vitamin D prevent the complications described above and improve quality of life.

This the first study carried out in a group of individuals with SCI in the south region of Brazil that evaluates parameters related to bone metabolism. Follow-up of the studied sample including evaluation of bone mineral density should be performed.

NOTES

Funding

This study received financial support from the Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES).

Conflicts of interest disclosure

The authors declare no competing interests relevant to the content of this study.

Authors' contributions

All the authors declare to have made substantial contributions to the conception, or design, or acquisition, or analysis, or interpretation of data; and drafting the work or revising it critically for important intellectual content; and to approve the version to be published.

Availability of data

The authors declare to have had access to all available data and assume full responsibility for the integrity of these results.

REFERENCES

1. Soleyman-Jahi S, Yousefian A, Maheronnaghsh R, Shokraneh F, Zadegan SA, Soltani A, Hosseini SM, Vaccaro AR, Rahimi-Movaghar V. Evidence-based prevention and treatment of osteoporosis after spinal cord injury: a systematic review. *Eur Spine J*. 2017;1-17. <https://doi.org/10.1007/s00586-017-5114-7>
2. Viúdes M de AA, Costa JM da, Nunes CMP. Profile of patients admitted for spinal cord injury in public teaching hospital. *Rev Médica Minas Gerais*. 2015;25(3):380-6. <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20150074>
3. Gifre L, Vidal J, Carrasco JL, Muxi A, Portell E, Monegal A, Gua-abens N, Peris P. Risk factors for the development of osteoporosis after spinal cord injury. A 12-month follow-up study. *Osteoporos Int*. 2015;26(9):2273-80. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3150-x>
4. Harlow L, Sahbani K, Nyman JS, Cardozo CP, Bauman WA, Tawfeek HA. Daily parathyroid hormone administration enhances bone turnover and preserves bone structure after severe immobilization-induced bone loss. *Physiol Rep*. 2017;5(18):e13446. <https://doi.org/10.14814/phy2.13446>
5. Imamura M, Takami M da P, Barbosa SBB, Silva AR, Pinheiro CM, Guerra LMC, Rosa CDP, Bernardo WM, Battistella LR. Osteoporosis in spinal cord injury: rehabilitation. *Acta Fisiatrica*. 2013;20(2):112-7. <https://doi.org/10.5935/01047795.20130018>
6. Troy KL, Morse LR. Measurement of Bone: Diagnosis of SCI-induced osteoporosis and fracture risk prediction. *Top Spinal Cord Inj Rehabil*. 2015;21(4):267-74. <https://doi.org/10.1310/sci2104-267>
7. Lobos S, Cooke A, Simonett G, Ho C, Boyd SK, Edwards WB. Assessment of bone mineral density at the distal femur and the proximal tibia by dual-energy x-ray absorptiometry in individuals with spinal cord injury: precision of protocol and relation to injury duration. *J Clin Densitom*. 2017;1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2017.05.006>
8. Karapolat I, Karapolat HU, Kirazli Y, Capaci K, Akkoc Y, Kumanlioglu K. Longitudinal study of bone loss in chronic spinal cord injury patients. *J Phys Ther Sci*. 2015;27(5):1429-33. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.1429>
9. Martins JS, Palhares MDO, Teixeira OCM, Gontijo Ramos M. Vitamin D status and its association with parathyroid hormone concentration in Brazilians. *J Nutr Metab*. 2017;ID9056470. <https://doi.org/10.1155/2017/9056470>
10. Dawson-Hughes B. Vitamin D and muscle function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;173:313-6. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.018>
11. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0385>
12. Bauman WA, Zhang R, Morrison N, Spungen AM. Acute Suppression of Bone Turnover With Calcium Infusion in Persons With Spinal Cord Injury. *J Spinal Cord Med*. 2009;32(4):398-403. <https://doi.org/10.1080/10790268.2009.11754393>
13. Hummel K, Craven C, Giangregorio L. Serum 25(OH)D, PTH and Correlates of Suboptimal 25(OH)D Levels in Persons with Chronic Spinal Cord Injury. *Spinal Cord*. 2016;50(11):812-6. <https://doi.org/10.1038/sc.2012.67>

14. Nemunaitis GA, Mejia M, Nagy JA, Johnson T, Chae J, Roach MJ. A Descriptive Study on Vitamin D Levels in Individuals With Spinal Cord Injury in an Acute Inpatient Rehabilitation Setting. *PMR*. 2010;2(3):202-8. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2010.01.010>
15. Nogueira PC, Rabeh SAN, Caliri MHL, Dantas RAS, Haas VJ. Burden of care and its impact on health-related quality of life of caregivers of individuals with spinal cord injury. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2012;20(6):1048-56. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692012000600006>
16. Opperman EA, Buchholz AC, Darlington GA, Martin Ginis KA. Dietary supplement use in the spinal cord injury population. *Spinal Cord*. 2010;48(1):60-4. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.86>
17. Bauman WA, Emmons RR, Ciriigliaro CM, Kirshblum SC, Spungen AM. An effective oral vitamin D replacement therapy in persons with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2011;34(5):455-60. <https://doi.org/10.1179/2045772311Y.0000000032>
18. Özgirgin N, Koyuncu E, Yüzer GFN, Taşoğlu O, Yenigün DY. Is spinal cord injury a risk factor for vitamin D deficiency? *Turk J Phys Med Rehab* 2016;1(62):57-63. <https://doi.org/10.5606/tftrd.2016.39260>
19. Pearce SH, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *Br Med J*. 2010;340:142-7. <https://doi.org/10.1136/bmj.b5664>
20. Bauman WA, Zhong YG, Schwartz E. Vitamin D deficiency in veterans with chronic spinal cord injury. *Metabolism*. 1995;44(12):1612-6. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(95\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90083-7)
21. Mechanick JI, Pomerantz F, Flanagan S, Stein A, Gordon WA, Ragnarsson KT. Parathyroid hormone suppression in spinal cord injury patients is associated with the degree of neurologic impairment and not the level of injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997;78:692-6. [https://doi.org/10.1016/S0003-9993\(97\)90075-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9993(97)90075-7)
22. Flueck JL, Perret C. Vitamin D deficiency in individuals with a spinal cord injury: A literature review. *Spinal Cord*. 2016;55(5):428-34. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.155>
23. Khan AH, Jafri L. Ionized calcium cannot predict vitamin D deficiency. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26(4):428-9. <https://doi.org/10.1007/s12291-011-0157-8>
24. Kich DM, Vieira FA de S, Bassuino M, Linden R. Determinação de 25-hidroxivitamina D2 e D3 em plasma por CLAE-DAD. *J Bras Patol Med Lab*. 2012:329-36.
25. Lai JKC, Lucas RM, Clements MS, Harrison SL, Banks E. Assessing vitamin D status: Pitfalls for the unwary. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1062-71. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900468>
26. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MCT, Sasaki AL, Reis LM, Jorgetti V, Moysés RMA. Vitamin D status in a sunny country: Where has the sun gone? *Clin Nutr*. 2010;29(6):784-8. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.06.009>
27. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: Comparison with contemporary assays. *Clin Chem*. 2006;52(6):1120-6. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.064956>
28. Tan CO, Battaglino RA, Morse LR. Spinal Cord Injury and Osteoporosis: Causes, mechanisms, and rehabilitation strategies. *Int J Phys Med Rehabil*. 2013;1:1-10. □

APÊNDICE 4 - ARTIGO II- SUBMETIDO

Evaluation of vitamin D levels related to polymorphisms of vitamin D receptors in postmenopausal women

Mauricio Sprenger Bassuino; Laís Oliveira Garcia; Rodolfo Herberto Schneider; Denise Cantarelli Machado

Mauricio Sprenger Bassuino: Doctorate in Biomedical Gerontology of Pontifícia Universidade Católica / RS

Address: Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Laboratório 16

Av. Ipiranga 6690 – prédio 60 – 2º andar

CEP 90610-000 – Porto Alegre-RS, Brasil

E-mail: mauricio@bassuino.com

Laís Oliveira Garcia: Biomedic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Address: Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP: 90035-903- Porto Alegre-RS, Brasil

E-mail: logarcia@hcpa.edu.br

Denise Cantarelli Machado: Coordinator of the Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Full Professor of the School of Medicine and the Graduate Program in Biomedical Gerontology of the Geriatrics and Gerontology Institute of the Pontifícia Universidade Católica / RS

Address: Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Laboratório 16

Av. Ipiranga 6690 – prédio 60 – 2º andar

CEP 90610-000 – Porto Alegre-RS, Brasil

E-mail: dcm@pucrs.br

Rodolfo Herberto Schneider: Coordinator of the Laboratory of Bone Densitometry, Full Professor of the Postgraduate Program in Biomedical Gerontology of the Geriatrics and Gerontology Institute of the Pontifícia Universidade Católica/ RS

Address: Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Laboratório 16

Av. Ipiranga 6690 – prédio 60 – 2º andar

CEP 90610-000 – Porto Alegre-RS, Brasil

E-mail: Rodolfo.schneider@puccrs.br

Mailing address corresponding author:

Mauricio Sprenger Bassuino

Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Laboratório 16

Av. Ipiranga 6690 – prédio 60 – 2º andar

CEP 90610-000 – Porto Alegre-RS

e-mail: mauricio@bassuino.com

Abstract

Background: It is well known that aging and menopause are the most responsible for bone loss although the susceptibility to osteoporosis is a multifactorial condition, including genetic factors. The VDR gene is related to various chronic diseases and directly involved in the maintenance of calcium and vitamin D. Polymorphisms localized in this gene have been strongly implicated in bone mineral density. The objective was to evaluate the possible association of the *FokI* polymorphism of the VDR gene with vitamin D levels and bone densitometry in postmenopausal women. A study with 178 postmenopausal women attended at a bone densitometry service. A questionnaire was conducted with life style data, socio-demographic and economic parameters, dosages of vitamin D by HPLC, bone densitometry by the method of *Dual energy X-ray Absorptiometry* (DXA), genotyping of VDR gene for research of *FokI* polymorphism using the RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) technique. **Results:** The average age of the subjects participating in the study was $64,39 \pm 9,62$ years, an average Body Mass Index (BMI) of $27,94 \pm 5,02$ Kg/m² with an average vitamin D of $24,85 \pm 9,06$ ng/mL. A reduced bone mineral density of the femur was found in

patients who presented the ff polymorphism ($p=0,028$). The 25(OH)D values showed no difference between the polymorphisms studied; however, calcemy was higher in the ff polymorphism. **Conclusions:** The studied population showed levels of vitamin D below the recommended level, besides a profile of photoexposure not adequate to obtain the better levels of this substance. It adds to this, the need to conduct an assessment on the form of vitamin D supplementation for this population. The FF genotypic profile, in this study, showed a relation with a low bone mineral density of the femur.

Key Words: vitamin D, vitamin D receptor, *FokI* polymorphism, bone densitometry, postmenopausal.

Introduction

Menopause is related to several chronic diseases due to cessation of production of the hormone estrogen (1). With decreasing estrogen levels there is an increase in the formation and activity of osteoclasts due to elevated RANKL levels and decreased apoptosis of osteoclasts (2)(3)(4), leading to a significant increase in bone reabsorption triggering accelerated bone loss (5).

Osteoporosis is a process due to the imbalance between bone formation by osteoblasts and bone reabsorption by osteoclasts (6). In addition to the process of bone remodeling, it needs a synchronization between osteoclasts and osteoblasts, this process is regulated by several factors such as hormones (estrogen, parathyroid hormone (PTH)), vitamin D, interleukins, cytokines (tumor necrosis factor alpha) and growth factors (3).

The low concentration of 25(OH)D plays an important role in the bone loss process, because it leads to a decrease in serum levels of 1,25(OH)₂D and, consequently, a decrease in calcium absorption that increases the secretion of parathyroid hormone (PTH) (5). On the other hand, the increase of the PTH intensifies the osteoclastic activity and the bone reabsorption implying in cortical bone loss (5)(7), while decreases in PTH levels appear to increase the formation of osteoblasts (8).

With the advancement of both molecular and histological evaluation techniques, it was possible to identify the presence of vitamin D receptors (VDR), not only in the intestine, but in other tissues such as heart, kidneys, bones, thyroid, placenta, liver, endothelium, vascular smooth muscle, cardiomyocytes, and brain (9)(10). VDR is understood as a nuclear transcription factor that will mediate different physiological actions in the body (11). The bioactive portion of vitamin D (1,25(OH)₂D) can modulate the expression approximately 200 genes and, for this reason, is continually related to the most diverse types of pathologies, but mainly, bone mineral density (12).

Allelic variants of the gene encoding the VDR gene as ApaI (allele A / a), BsmI (allele B / b), FokI (allele F / f) and TaqI (allele T / t) were related to bone mineral density and also to bone loss in the elderly (13), being FokI of greater relevance for being the most frequent (14). In view of this relation between VRD and bone mineral density, this study aims to perform a

comparison between the VDR gene polymorphisms and the bone densitometry test, evaluating whether there is any association with vitamin D levels.

Methodology

Subjects

Were invited to participate women who were performing densitometry examinations in the Department of Bone Densitometry of Hospital São Lucas. After the signing of the Term of Free and Informed Consent, the research was explained.

For collecting lifestyle information, socio-demographic parameters, socioeconomic parameters and pertinent informations to the study was applied a brief questionnaire developed by the author. After application of the questionnaire, had been collected a tube containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and another containing procoagulant factor and separator gel of each patient to obtain plasma and serum, respectively. The samples were immediately taken to the laboratory for processing and storage of serum, plasma and leukocyte carpet at -80 °C, being evaluated in a period of up to 60 days after the blood collection.

25(OH)D Determination

The dosage of 25(OH)D₃ was performed using a plasma protein precipitation technique. To this, 200 µL of plasma was added to 400 µL of acetonitrile containing internal standard (D6-25-hidroxitamin D₃ 20 ng/mL). After homogenization and centrifugation, an aliquot of 25 µL of the supernatant was injected into a high performance liquid chromatography system associated with sequential mass spectrometry (LC-MS/MS). The 25-(OH)D₃ was detected on a spectrometer TSQ Quantum Access MAX triple quadruple equipped with a source of Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), controlled by software Xcalibur, from the Thermo Scientific.

The analysis used the column C18 (150 x 4,60 mm, dp 2,6 µm) of Phenomenex (Allcrom, United States), maintained at 60°C. The mobile phase was composed of water and methanol mixture (10:90, v/v), with isocratic elution and flow of 0,5 mL/min. The MS conditions were: ionization in positive mode, crown voltage of 7 kV, nitrogen gas nebulizer with flow of 40 µA, nitrogen auxiliary gas with flow of 5 µV, argon collision gas 1,5 mTorr, vaporizer temperature of 394 °C and capillary temperature of 202 °C. The acquisition was performed in the MRM mode through transitions m/z 401 → 365,2 + 401 → 158,9 (quantification) and 401 → 105,1 (qualification) for the 25-OHD₃, and m/z 407 → 371 + 407 → 371 105 (quantification) and 407 → 91 (qualification) for the internal standard. Samples of calibrators were inserted into each batch of samples in the range of 5 a 100 ng/mL and commercial control Chromsystem® 25(OH)D₃ level I and level II.

Bone Densitometry

The densitometry analyzes were performed using the device of the Hologic WI brand, which has the technique of Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA). Anatomic fields were used, which the service uses normally, being total body, total lumbar spine (L1-L4), individual lumbar vertebrae (L1, L2, L3 e L4) and proximal femur (regions of Total Femur, Femoral Neck, Trochanter and Intertrochanteric zone).

Polymorphisms

For the determination of VDR gene polymorphism were realized a DNA extraction and genotyping of the VDR gene, in which the polymorphism *FokI* (New England Biolabs, USA) determined by the PCR (*Polymerase Chain Reaction*) technique (265 bp) followed by the RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technique of changes C->T.

The conditions of the PCRs were as follows: 95°C for 2 min., followed by 35 cycles (95°C, 30 sec.; 66°C, 30 sec.; 72°C 80 sec.) and then a final extension by 72°C 5 minutes with the with the following oligonucleotides: direct= 5'- AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT -3' e reverso= 5'- ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC -3'. The restriction enzyme *FokI* was of the New England Biolabs brand and it was following the protocol determined by the manufacturer. The cleavage occurred in the sequence 5'GGATG (N) ... 3'and 3' ... CCTAC (N) ... 5', during incubation at 37 ° C for 5 minutes which, in turn, generated fragments to identify genotypes: ff (169 and 96 bp), FF (265 bp) or Ff (265 and 169, 96 bp). PCR and cleavage products were analyzed on 2% agarose gel containing 2 µg / ml ethidium bromide in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0) at 100 volts for 30 minutes.

Statistical Analysis

For categorical variables the percentage and frequency and for the quantitative variables a descriptive analysis was done obtaining the average and standard deviation. Hardy-Weinberg equilibrium test was used to calculate allelic frequencies, which were evaluated through the chi-square statistical test (χ^2). Statistical differences shall be considered significant when $p < 0,05$ with a confidence interval of 95%.

Results

Initially, 205 women were interviewed and subsequently sampled in the Department of Bone Densitometry of Hospital São Lucas of PUC. Of these, 3 participants were excluded from the study because they presented values of calcium and PTH compatible with primary hyperparathyroidism; 8 because they presented alterations in levels of urea, creatinine, PTHi or calcium differing from the others, being considered “outliers”; and 16 because they presented altered bone

densitometry data due to prostheses or anatomical alterations that compromised the evaluation of these results.

Thus, the constituent population of the study was composed of 178 women who participated in the study between the periods from December 2015 to March 2017. The average age of the subjects of the study was $64,39 \pm 9,62$ years, being the minimum age 42 and the maximum age 97 years. The average time of menopause was $17,2 \pm 10,36$ years. Regarding the anthropometric data of the participants, was observed an average height of $156,76 \pm 7,09$ centimeters (cm) and an average weight of 68,31 ($\pm 13,65$) kilograms (Kg), constituting an average Body Mass Index (BMI) of 27,94 ($\pm 5,02$) Kg/m². Regarding BMI, it was found a minimum value of 17.57 and a maximum of 46.58Kg/cm².

With respect to educational attainment, it was identified that two (1%) participants had not attended school, while most 57 (32%) reported having attended incompletely the first degree. Another socioeconomic data evaluated was related to family income. In this parameter it was identified that the majority of participants reported having up to 2 minimum wages, 56 (31,5%), or 2 to 4 minimum wages, 56 (31,5%) as family income. While, 3 (1,7%) participants wished not to declare income (Table 1).

Table 1- General characterization of the sample

Variable	Total
	178 (100%)
Age (years)	64,39 ($\pm 9,62$)
Time of menopause (years)	17,2 ($\pm 10,36$)
Weight (Kg)	68,31 ($\pm 13,65$)
Height (cm)	156,76 ($\pm 7,09$)
BMI (Kg/m²)	27,94 ($\pm 5,02$)
Income (MW)	
0 – 2	56 (31,5%)
2 – 4	56 (31,5%)
4 – 10	37 (20,8%)
10 – 20	20 (11,2%)
>20	6 (3,4%)
Not declared	3 (1,7%)
Education	
Incomplete first degree	57 (32%)
Complete first degree	23 (12,9%)
Incomplete second degree	7 (3,9%)
Complete second degree	45 (25,3%)
Incomplete higher education	9 (5,1%)
Complete higher education	35 (19,7%)
Not attend school	2 (1,1%)

Source: The author, 2017

Average \pm standard deviation are described for age, time of menopause, weight, height and BMI; MW = minimum wage

All the biochemical parameters evaluated showed an expected physiological response. In the general evaluation was found, calcemy $9,53 \pm 0,57$ mg/dL, levels of parathyroid hormone $49,19 \pm 19,37$ ng/mL and 25(OH)D $24,85 \pm 9,06$ ng/mL.

Of the 178 women evaluated, it was possible to determine the vitamin D receptor polymorphism in 116 participants. The frequency of distribution of the FokI polymorphisms of the vitamin D receptor, are described in the Table 2.

Table 2- Polymorphisms FokI of the Vitamin D receptor

	N	%	
FOK	FF	63	54
	Ff	41	35
	ff	12	11
	Total	116	65,2

Source: The author, 2017

Table 3- Genotypic frequencies found Vs expected genotype frequencies

Genotypic frequency	Frequency found	Expected frequency
FF	54%	51%
Ff	35%	41%
ff	11%	8%

Source: The author, 2017

Based on these data, it was observed that the population is not in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 3).

When evaluated characteristics of the studied population according to distribution between the FokI polymorphisms of the vitamin D receptor, the following characteristics were verified in the Table 4.

Table 4- Characteristics of the studied population according to FOKI polymorphism of the Vitamin D receptor

	<i>FF</i>		<i>Ff</i>		<i>ff</i>	
	n= 63		n=41		n=12	
	Average	sd	Average	sd	Average	sd
<i>Age</i>	63,51	8,86	64,66	8,83	64	7,11
<i>BMI</i>	28,72	5,63	27	4,31	28,6	4,91
<i>Number of medicines</i>	4,14	2,7	3,73	2,13	5,58	2,96
<i>Lumbar T-score</i>	-1,52	1,34	-1,5	1,04	1,22	1,38
<i>Lumbar Z-score</i>	-0,3	1,17	0,02	0,97	-0,4	0,74
<i>Femur T-score</i>	-0,76	0,96	-0,94	0,93	-0,37	1,2
<i>Femur Z-score</i>	0,01	0,9	0,04	0,9	0,46	1,14
<i>Calcium</i>	9,44	0,66	9,64	0,59	9,8	0,54
<i>Vitamin D</i>	25,94	8,09	26,31	11,22	30,02	9,66
<i>PTHi</i>	51,83	27,92	49,53	19,18	45,86	21,23

sd= standard deviation; n= number of participants. Source: The author, 2017.

When performed for the assessment of the vitamin D receptor phenotypes and general characteristics of the population studied by chi-square, it was possible to verify that individuals with the presence of the *ff* polymorphism had a reduced femoral bone mineral density when compared to the other phenotypes ($p=0,028$). Another finding with respect to the studied phenotypes was the difference, also of the *ff* phenotype, in relation to the other groups of calcemy levels ($p=0,043$). When the same parameters were evaluated by the ANOVA method followed by the *Kruskal Wallis* test, it was possible to verify that the BMD of the femur was smaller in the *ff* group in relation to the other phenotypes ($p=0,032$).

Evaluating different parameters based on the classification of vitamin D levels in the body by the *Kruskal Wallis* method, was found to be significant in relation to the "presence of disease" ($p<0,01$), calcium supplementation ($p<0,001$), education ($p=0,02$), lumbar *T-score* ($p<0,01$), lumbar BMD ($p=0,01$), lumbar BMC ($p=0,02$), *T-score* femoral ($p=0,03$). Still in this evaluation, using the *Kruskal Wallis* test, non-significant values were found for other parameters considered important as for BMI ($p=0,34$), use of sunscreen ($p=0,40$), skin type ($p=0,25$), family income ($p=0,38$), practice of physical exercise ($p=0,09$), femoral *T-score* ($p=0,23$), PTHi ($p=0,61$) and calcium ($p=0,16$).

Discussion

The aging process can bring different changes to human organisms. Among these changes, the decrease in bone mineral density, which in women, can be seen at menopause, being a triggering factor for the development of osteoporosis. Considering the supposed role of environmental and genetic factors, coupled with the high frequency of cases of osteoporosis among women, this study it was necessary to check the behavior of our population to these criteria. It has been well studied about the relation between polymorphisms of the vitamin D receptors and bone disorders, however there is much discrepancy between the results found(15). Thus, the present study evaluated the vitamin D receptor phenotypes and general characteristics of the participants.

In a study carried out in Spain by Casado-Díaz et al. in 2013, in which a high prevalence of vitamin D deficiency was observed in the studied population, although the average was consistent with insufficiency. This group consisted of postmenopausal women with an average age of 57 years and an average value of vitamin D of 21,79 ($\pm 8,6$) ng/dL (16). Similarly, in our study we found a higher prevalence of vitamin D insufficiency levels, 24,85 ($\pm 9,06$) ng/mL and an average age of 64,39 ($\pm 9,62$) years. Similarly, in a study of Indian postmenopausal women, country that has similar climatic characteristics to Brazil, even when performing division between groups due to the presence or not of osteoporosis, low levels of vitamin D were observed, being the average in the control group of 26,39 ($\pm 9,00$) (17).

In the present study, the genotypic frequencies of *FOKI* found were 54% FF, 35% Ff e 11% ff, being that the expected frequencies were 51%, 41% e 8%, respectively. In this case, it was observed that the population is not in equilibrium of Hardy-Weinberg. Similarly, in a study by Mansour et al., were verified the frequencies of 68%, 18% e 14%, respectively (18).

The allelic frequency found in this study was 72% of F and 28% of f, which resembles the result of Mansour et al., who found the variant F in 72,9% in osteoporotic (18).

Patients who had the ff polymorphism had a reduced femoral bone mineral density when compared to the other phenotypes ($p=0,028$). A prospective study evaluating VDR gene polymorphisms performed with postmenopausal women, in Egypt, found a significant decrease in the femoral T-score ($p=0,3$) and a greater decrease in femoral bone mineral density ($p=0,000$) in genotype Ff + ff (18), data that corroborate with the findings of the present study. On the other hand, in a study carried out, in 2018, by Liang Zhang et al., through a meta-analysis, verified that the Ff genotype of FokI, was significantly associated with decreased bone mineral density of the femoral neck in a Caucasian population (19).

When the bone mineral densities of the lumbar spine, hip, femoral neck and forearm were evaluated in a study performed by Ahmad et al., in 2017, it was observed that ff polymorphisms were associated with decreased BMD (17), similar to that found in our study.

The lumbar Z-score was lower in (ff) but did not present a statistically significant difference. In a study carried out with postmenopausal Egyptian women, it was reported that the ff genotype was related to osteoporosis and that the FF genotype was the most found in

postmenopausal women (18).

It is known that polymorphisms are related to ethnicity (13), however it was not possible to perform this analysis in the study in question due to the predominance of the white ethnic group studied (89%).

In contrast, several studies affirm that there is no association between the FokI polymorphism and the risk of osteoporosis (15) (16).

It is important to emphasize that this study presented as a limiting factor the quality of information provided by the participants, since they were obtained through a questionnaire. When evaluating, in a general way, the results referring to the studies related to vitamin D receptor polymorphisms and their relation with possible alterations in bone mineral density it should be taken into account that the inconsistency of the data obtained may be due to the difficulty in obtaining a homogeneous, or simply because osteoporosis is a complex pathology. As suggested by Vidal et al., future studies should be directed to the understanding of environmental factors in the genetic component related to BMD (20).

Conclusions

In conclusion, it was possible to verify in our study that the FokI polymorphism with ff genotype is related to lower femoral BMD in postmenopausal women and that women with this same genotype presented higher calcemia levels when compared with the other genotypes. It is suggested, however, future studies with more homogenous populations to better understand the relation of the environment to the factors associated with the development of osteoporosis and the genetic profile.

Declarations:

Ethics approval and consent to participate: The project was developed in the Laboratory of Cellular and Molecular Biology of the Institute of Biomedical Research after approval by the Scientific Committee of the Faculty of Medicine and the Research Ethics Committee (CEP) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (CAAE: 31346014.2.0000.5336). This research followed the ethical principles established in accordance with Resolution No. 466 of the National Health Council of December 12, 2012 and is approved under registration number 674,750.

Consent for publication: Free and Informed Consent Form was applied to the study participants.

Availability of data and material: The authors declare to have had access to all available data and assume full responsibility for the integrity of these results.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: This study received financial support from the Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES).

Authors' contributions: All the authors declare to have made substantial contributions to the conception, or design, or acquisition, or analysis, or interpretation of data; and drafting the work or revising it critically for important intellectual content; and to approve the version to be published.

Acknowledgements: We would like to thank the team of the Laboratory of Cellular and Molecular Biology of the Pontifical Catholic University (PUCRS) and the team of the Bone Densitometry service of the Hospital São Lucas.

References

1. Arjmandi BH, Johnson SA, Pourafshar S, Navaei N, George KS, Hooshmand S, et al. Bone-Protective Effects of Dried Plum in Postmenopausal Women: Efficacy and Possible Mechanisms. *Nutrients* [Internet]. 2017;9(5):496. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/5/496>
2. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:385–409.
3. Duque G, Troen BR. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: New facts for a major geriatric syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(5):935–41.
4. Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol.* 2010;224(2):305–10.
5. Demontiero O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis* [Internet]. 2012;4(2):61–76. Available from: <http://tab.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1759720X11430858>
6. Indo Y, Takeshita S, Ishii K-A, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, et al. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2013;28(11):2392–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbmr.1976>
7. Livshits G. Quantitative genetics of circulating molecules associated with bone metabolism: A review. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6(1):47–61.
8. Fogelman I, Van Der Wall H, Gnanasegaran G. Radionuclide and hybrid bone imaging. *Radionucl Hybrid Bone Imaging.* 2012;9783642024:1–1046.
9. Sutherland MK, Somerville MJ, Yoong LKK, Bergeron C, Haussler MR, McLachlan DRC. Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. *Neurobiol Aging.* 1992;13(2):301–12.

10. Caprio M, Infante M, Calanchini M, Mammi C, Fabbri A. Vitamin D: not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extraskeletal effects. *Eat Weight Disord - Stud Anorexia, Bulim Obes* [Internet]. Springer International Publishing; 2016;1–15. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40519-016-0312-6>
11. Lee SM, Meyer MB, Benkusky NA, O'Brien CA, Pike JW. The impact of VDR expression and regulation in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096007601730153X>
12. Santos BR, Mascarenhas LPG, Satler F, Boguszewski MCS, Spritzer PM. Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatr*. 2012 Jan;12(1):62.
13. Bhanushali AA, Lajpal N, Kulkarni SS, Chavan SS, Bagadi SS, Das BR. Frequency of fokI and taqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25-hydroxyvitamin D levels. *Indian J Hum Genet* [Internet]. 2009;15(3):108–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2922626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Dimitriadou M, Christoforidis A, Fidani L, Economou M, Vlachaki E, Athanassiou-Metaxa M, et al. A 2-year prospective densitometric study on the influence of Fok-I gene polymorphism in young patients with thalassaemia major. *Osteoporos Int*. 2016;27(2):781–8.
15. Wang D, Liu R, Zhu H, Zhou D, Mei Q, Xu G. Vitamin D receptor FokI polymorphism is associated with low bone mineral density in postmenopausal women: A meta-analysis focused on populations in Asian countries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;169(2):380–6.
16. Casado-Díaz A, Cuenca-Acevedo R, Navarro-Valverde C, Díaz-Molina C, Caballero-Villarraso J, Santiago-Mora R, et al. Vitamin D status and the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene are determining factors of bone mineral density in young healthy postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;136(1):187–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.026>
17. Ahmad I, Jafar T, Mahdi F, Arshad M, Das SK, Waliullah S, et al. Association of Vitamin D Receptor (FokI and BsmI) Gene Polymorphism with Bone Mineral Density and Their Effect on 25-Hydroxyvitamin D Level in North Indian Postmenopausal Women with Osteoporosis. *Indian J Clin Biochem*. Springer India; 2017;
18. Mansour L, Sedky M, AbdelKhader M, Sabry R, Kamal M, El-Sawah H. The role of vitamin D receptor genes (FOKI and BSMI) polymorphism in osteoporosis. *Middle East Fertil Soc J* [Internet]. Middle East Fertility Society; 2010;15(2):79–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mefs.2010.05.002>
19. Zhang L, Yin X, Wang J, Xu D, Wang Y, Yang J, et al. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal

Women: A systematic review and Meta-Analysis. *Sci Rep* [Internet]. Springer US; 2018;8(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18670-7>

20. Vidal C, Grima C, Brincat M, Megally N, Xuereb-Anastasi a. Associations of polymorphisms in the vitamin D receptor gene (BsmI and FokI) with bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Osteoporos Int*. 2003;14(11):923–8.

ANEXOS

ANEXO A – DOCUMENTO SIPESQ



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 5423

Porto Alegre, 2 de junho de 2014.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Identificação dos fatores genéticos e metabólicos envolvidos na alteração da densidade mineral óssea em mulheres pós-menopausa" coordenado por DENISE CANTARELLI MACHADO. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA

ANEXO B – APROVAÇÃO CEP-PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo de genes envolvidos com a densidade mineral óssea e sua relação com o metabolismo ósseo em mulheres pós-menopausa

Pesquisador: Denise Cantarelli Machado

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 31346014.2.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 674.750

Data da Relatoria: 06/06/2014

Apresentação do Projeto:

O remodelamento ósseo é um processo contínuo que ocorre desde o período embrionário, coordenado por mecanismos celulares, para adaptação das alterações decorrentes do crescimento, atividade física e estímulos humorais, como por exemplo, hormônios e citocinas. A menopausa é um processo fisiológico que ocorre em todas as mulheres e é caracterizada, principalmente, pelo encerramento das menstruações espontâneas, por no mínimo um ano. Devido à baixa produção de estrógenos, o organismo da mulher tem que se adaptar à condição de hipostrogenismo, na qual existe um aumento do processo de reabsorção óssea. Este déficit de estrogênio, seguido por perda óssea, tende a piorar quanto mais precoce for o início da menopausa. Em

Endereço: Av. Ipiranga, 6690, prédio 80, sala 314
Bairro: Partenon **CEP:** 90.610-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

Continuação do Parecer: 674.750

muitos casos, essa indução precoce ao hipoestrogenismo pode levar ao desenvolvimento de osteopenia e osteoporose. Na população americana acima de 50 anos de idade, a frequência de osteoporose chega a 50%, sendo que 80% deles são mulheres. No Japão, 49% dos indivíduos acometidos por esta patologia são mulheres. Na China, há uma estimativa de que cerca de 88 milhões de pacientes possuem osteoporose. Considerando que a osteoporose é uma patologia que acomete grande parte da população idosa, especialmente as mulheres pós-menopausa, custos adicionais às políticas públicas de saúde e baixa qualidade de vida das idosas são decorrentes destas patologias. Assim, a avaliação de fatores envolvidos no desenvolvimento dessa patologia em nossa população poderá contribuir de maneira significativa na futura prevenção e manejo da osteopenia e osteoporose nas mulheres pós-menopausa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar o polimorfismo de genes envolvidos com a densidade mineral óssea e verificar sua relação com os níveis séricos de marcadores do metabolismo ósseo em mulheres pós-menopausa.

Objetivo Secundário:

a) Quantificar os níveis séricos de cálcio, paratormônio (PTH), 25OHD e estrogênio; b) Descrever as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismo dos genes do VDR, PTH, PTHR, ESRI, CASR e P2X7; c) Verificar se existe relação entre os marcadores séricos e a densidade mineral óssea; d) Verificar se há relação entre o polimorfismo e a densidade mineral óssea; e) Verificar se há relação entre o polimorfismo e os marcadores

Endereço: Av. Ipiranga, 6690, prédio 80, sala 314
Bairro: Partenon CEP: 90.610-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@puors.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 674.750

séricos do metabolismo ósseo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Somente os riscos inerentes ao processo de colheita sanguínea estão entre os riscos previstos às voluntárias. Podendo ser citadas a chance de um pequeno edema e o desconforto.

Benefícios: Por meio desse estudo poderá ser identificado um fator de risco para o desenvolvimento de osteopenia e osteoporose, contribuindo para uma melhor prevenção dessa patologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de muita relevância social pelo alto índice de mulheres afetadas por essa degeneração óssea, acarretando transtornos de mobilidade, que, como consequência podem influenciar física e psicologicamente a vida de milhares de pessoas. Além de sérias implicações econômicas e sociais. Porém, gostaríamos de um esclarecimento quanto à fonte viabilizadora dos recursos, pois, como colocado no orçamento, será custeado apenas pela pesquisadora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Obrigada pelas recomendações atendidas.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer.

Endereço: Av. Ipiranga, 6690, prédio 60, sala 314
Bairro: Partenon CEP: 90.610-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@puors.br

ANEXO C - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO II



Mauricio Bassuino <mauricio@bassuino.com>

A manuscript number has been assigned: MCE-D-18-00540

1 mensagem

Molecular and Cellular Endocrinology <eesserver@eesmail.elsevier.com>

16 de setembro de 2018 15:09

Responder a: Molecular and Cellular Endocrinology <mce@elsevier.com>

Para: mauricio@bassuino.com, mauricio.bassuino@fsg.br

*** Automated email sent by the system ***

Ms. Ref. No.: MCE-D-18-00540

Title: Evaluation of vitamin D levels related to polymorphisms of vitamin D receptors in postmenopausal women
Molecular and Cellular Endocrinology

Dear Mauricio,

Your submission entitled "Evaluation of vitamin D levels related to polymorphisms of vitamin D receptors in postmenopausal women" has been assigned the following manuscript number: MCE-D-18-00540.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/mce/>.Your username is: mauricio@bassuino.comIf you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/mce/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Molecular and Cellular Endocrinology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.