

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
NUTRIÇÃO

JULIANA PADILHA RAMOS NEVES

**RELAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO GENE VDR
COM A HIPOVITAMINOSE D E MARCADORES DO PERFIL
GLICÊMICO, LIPÍDICO, INFLAMATÓRIO, ESTRESSE
OXIDATIVO E ANTROPOMÉTRICO EM ADOLESCENTES
DE ESCOLAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE JOÃO
PESSOA-PB**

João Pessoa

2017

JULIANA PADILHA RAMOS NEVES

RELAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO GENE *VDR* COM
A HIPOVITAMINOSE D E MARCADORES DO PERFIL
GLICÊMICO, LIPÍDICO, INFLAMATÓRIO, ESTRESSE
OXIDATIVO E ANTROPOMÉTRICO EM ADOLESCENTES DE
ESCOLAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA-PB

João Pessoa

2017

JULIANA PADILHA RAMOS NEVES

RELAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO GENE VDR COM
A HIPOVITAMINOSE D E MARCADORES DO PERFIL
GLICÊMICO, LIPÍDICO, INFLAMATÓRIO, ESTRESSE
OXIDATIVO E ANTROPOMÉTRICO EM ADOLESCENTES DE
ESCOLAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA-PB

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição.

Área de concentração em Ciências da Nutrição.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

CO-ORIENTADOR: Prof^o Dr. Alcides da Silva Diniz

João Pessoa

2017

Catálogo na publicação
Setor de Catalogação e Classificação

N511r Neves, Juliana Padilha Ramos.

Relação das variantes genéticas do gene / Juliana Padilha Ramos Neves. —
João Pessoa, 2017.
107 f. : il.

Orientadora: Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves.

Coorientadora: Alcides da Silva Dinis

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Nutrigenética. 2. Vitamina D. 3. Polimorfismo. 4. Glicemia. 5. Dislipidemia.
6. Estresse oxidativo. 7. Processo inflamatório. 8. Antropometria. I. Título.

UFPB/BC

CDU -

JULIANA PADILHA RAMOS NEVES

RELAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO GENE *VDR* COM
A HIPOVITAMINOSE D E MARCADORES DO PERFIL
GLICÊMICO, LIPÍDICO, INFLAMATÓRIO, ESTRESSE
OXIDATIVO E ANTROPOMÉTRICO EM ADOLESCENTES DE
ESCOLAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA-PB

Tese Juliana Padilha Ramos Neves em 24 / 11 / 2017

BANCA EXAMINADORA

M^{te} da Conceição R. Gonçalves
Prof^{ta}. Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves
Orientadora e Coordenadora da Banca Examinadora (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof^o Dr. Alcides da Silva Diniz
Co-Orientador e Coordenador da Banca Examinadora (UFPE/ Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Nutrição)

Alexandre Sérgio Silva
Prof^o Dr. Alexandre Sérgio Silva
Examinador Interno- Titular (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof^a. Dra. Darlene Camati Persuhn
Examinador Interno- Titular (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof^a. Dra. Maria José de Carvalho Costa
Examinadora Interna- Suplente (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Nutrição)

Dedico esta Tese ao meu marido Marcus Vinicius
e meus filhos Matheus e Filipe.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre esteve presente em minha vida, grande fonte de inspiração e que mesmo diante das muitas dificuldades não me permitiu desistir.

Pela força da presença espiritual do meu pai **Vitor** e pela mágica admiração que minha mãe **Cloris** tem por mim. Agradeço todo o amor, apoio, incentivo... dedicados por todos estes anos.

Ao meu marido **Marcus Vinicius**, um homem indispensável não só na minha vida pessoal, mas também nessa caminhada de pesquisadora e docente! Nunca deixou de acreditar na minha capacidade, na minha força, até mesmo quando eu achava que não conseguiria... Um verdadeiro incentivador e motivador de minhas conquistas. Se hoje estou aqui realizando mais um sonho, também devo isso a você. Muito obrigada pelo amor e parceria de sempre. E aos meus filhos **Matheus** e **Filipe** por terem me trazido um grande motivo para acreditar que tudo vale à pena. Minhas desculpas pelos momentos de ausência.

Aos meus familiares, pela grande relação de amor e apoio disseminada pelo nosso patriarca **Haroldo Padilha** e matriarca **Adelaide**. Em especial aos meus irmãos **Haroldo**, **Rodrigo** e **João Vitor** pela admiração, carinho e pelas palavras de conforto nos momentos de dificuldades.

A minha querida orientadora Prof^a Dr^a **Maria da Conceição**, a qual sempre me inspirei nesses tantos anos de minha construção profissional. Agradeço por sempre ter acreditado em mim e pelas palavras de encorajamento e força. Uma honra tê-la como orientadora por tantos anos, e nesse desfecho, já tenho um sentimento de profunda saudade. Vou guardá-la no meu coração sempre!!!

Ao meu co-orientador Prof^o Dr **Alcides Diniz** pelo apoio, compreensão, ajuda, disponibilidade e paciência dedicados ao longo deste percurso. Meu eterno obrigada.

Aos professores doutores **Alexandre Sérgio** e **Darlene Persuhn**, pela simplicidade que me acolheram, e seriedade de suas opiniões sempre muito respeitadas e acolhidas. Muitos momentos de conversas e desabafos... aquelas palavras, naqueles momentos, me deram força para acreditar que no final... tudo ia dar certo. As professoras doutoras **Liana Clébia**, **Karina França**, **Maria José de Carvalho**, **Naila Francis** e **Alcione Miranda** pelo carinho, atenção e

contribuição, mesmo em muitos momentos na distância física. Obrigada por terem aceitado compor esta banca examinadora e pela valiosa colaboração. Quero estar perto de vocês sempre.

Um agradecimento mais que especial às amigas e companheiras de pesquisa **Dayanna Joyce** e **Eduarda Pontes**. Começamos como um trio e finalizamos como um time! Olho para trás e enxergo como fomos fortes e corajosas em acreditar nesse estudo... e como fizemos bonito!!! Muita dedicação e competência. Obrigada por hoje fazerem parte de minha vida como grandes amigas. E à Prof^a Dr^a **Alice Teles**, que também embarcou nesse estudo conosco, sempre acreditando que iria dar certo. Meu sincero obrigada!

À todos os pesquisadores que participaram voluntariamente do estudo e que embarcaram nessa aventura que é a pesquisa científica, nas pessoas de **Zayama Santana, Lucas Chianca, Lorena Guerra, Bárbara Veloso, Simone Nicássio, Cláudia Paiva, Ariane Dantas, Marina Dantas, Larissa Lemos, Carolina Holanda, Emily Cordeiro e Lúcia Monteiro**. Esse trabalho não teria sido executado sem a garra e alegria de vocês! Desejo muita felicidade e realização no caminho de cada um. Que Deus os abençoe.

Aos meus queridos amigos **Mussara** e **Rayner** pelo apoio técnico, e mais do que tudo, emocional nas etapas da coleta sanguínea, extração do DNA e análise dos polimorfismos, sem palavras para descrever a importância de vocês na execução desse estudo.

Às colegas de turma do doutorado, **Ana Flávia, Christiane, Kataryne, Luciana, Myrella, Rafaela** e **Raquel**, por uma harmoniosa convivência, tantos ensinamentos e incentivos... Tenho orgulho da nossa caminhada.

Aos funcionários do curso de Pós-graduação em Ciências da Nutrição pela colaboração e prontidão durante todo curso.

À Secretaria Municipal de Saúde de João Pessoa/PB, por consentir a realização deste estudo com adolescentes matriculados nas escolas públicas participantes. E aos adolescentes das escolas envolvidas e aos seus pais por também consentirem a participação de seus filhos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigada!

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes".

Marthin Luther King

RESUMO

A vitamina D é um pré-hormônio com inúmeras funções biológicas ativadas por receptores da vitamina D (VDR), presentes em células do corpo humano. Polimorfismos no gene que codifica esse receptor podem alterar sua concentração ou a resposta celular da vitamina D, influenciando em parâmetros glicêmicos e cardiovasculares como dislipidemias, circunferência da cintura elevada, estresse oxidativo e processo inflamatório. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação dos polimorfismos BsmI e FokI do gene VDR com a hipovitaminose D e marcadores do perfil glicêmico, lipídico, inflamatório, estresse oxidativo e antropométrico em adolescentes de escolas públicas. Trata-se de um estudo epidemiológico transversal, representativo de estudantes entre 15 e 19 anos, envolvendo 208 indivíduos. Foram coletados dados antropométricos e amostra de sangue para: extração do DNA; bioquímica (25-hidroxivitamina D, paratormônio, cálcio, glicose jejum, colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicerídeos); marcadores inflamatórios (PCR- proteína C reativa e AGPA- Alfa-1-glicoproteína ácida); estresse oxidativo (MDA-malonaldeído e CAT-capacidade antioxidante total). As diferenças entre grupos de genótipos foram testadas pela ANOVA one-way ou seu correspondente não paramétrico, teste Kruskal-Wallis, e pós teste Dunn's. Para a associação entre os padrões de genotipagem e os parâmetros bioquímicos e antropométricos, foi utilizado o modelo de regressão logística. Em seguida, as variáveis com $p < 0,20$ foram ajustadas para idade, IMC e CC. Adotou-se significância quando $p\text{-valor} < 0,05$. Análise estatística foi através do STATA 14 (StataCorp; USA). Foram avaliados 78 meninos e 130 meninas com idade média de 17,7 ($\pm 1,14$) anos. Metade da amostra apresentou insuficiência/deficiência de 25-hidroxivitamina D. A frequência alélica foi 39,5% e 66,8% para *B* e *F* respectivamente, e 60,5% e 33,2% para *b* e *f* respectivamente. Observou-se uma relação significativa entre os genótipos do BsmI e valores de glicemia ($p=0,049$), o pós-teste mostrou significância em *BBxbb* ($p=0,012$) e *Bbxbb* ($p=0,037$). Na análise de regressão logística, a glicemia manteve relação significativa com o genótipo *BB* ($p=0,036$; OR=2,15; IC_{95%}=1,05-4,41) e na análise agrupada *BB+Bb* ($p=0,025$; OR=1,89; IC_{95%}=1,08-3,29) quando comparados ao *bb*, apresentaram maior risco de glicemia acima da mediana. Por outro lado, quando analisado *Bb+bb* ($p=0,025$; OR=0,65; IC_{95%}=0,46-0,93) em relação ao *BB*, os adolescentes apresentaram maior chance de ter glicemia abaixo da mediana. Esta relação não ocorreu no polimorfismo FokI. Não houve associação da distribuição dos genótipos dos polimorfismos com variáveis antropométricas e marcadores do perfil lipídico, inflamatório e do estresse oxidativo. Na análise de regressão logística, apenas a variável A1GPA do BsmI, resultou em significância para o genótipo *Bb* ($p=0,039$; OR=1,95; IC_{95%}=1,03-3,66). Posteriormente, as variáveis que resultaram $p < 0,20$ para ambos os polimorfismos foram ajustadas, e a A1GPA permaneceu significativamente influenciadora no grupo heterozigoto *Bb* ($p=0,040$; OR=2,02; IC_{95%}=1,03-3,95), entretanto, este não foi considerado um dado relevante levando em consideração que a outra proteína de fase aguda avaliada não apresentou associação. Este estudo mostrou uma relação significativa da glicemia em relação à distribuição dos genótipos do polimorfismo BsmI, entretanto, apesar de alguns estudos encontrarem associações dos polimorfismos do gene VDR com fatores de risco cardiovasculares em diferentes populações, nosso estudo em jovens saudáveis não observou.

Palavras-chave: Nutrigenética. Vitamina D. Polimorfismo. Glicemia. Dislipidemia. Estresse oxidativo. Processo inflamatório. Antropometria.

ABSTRACT

Vitamin D is a pre-hormone with innumerable biological functions activated by vitamin D receptors (VDR) present in cells of the human body. Polymorphisms in the gene encoding this receptor may alter its concentration or cellular response to vitamin D, influencing glycemic and cardiovascular parameters such as dyslipidemias, high waist circumference, oxidative stress and inflammatory process. The objective of this study was to evaluate the relationship of BsmI and FokI polymorphisms in the *VDR* gene with hypovitaminosis D and markers for glycemic, lipidic, inflammatory, oxidative and anthropometric stress in adolescents of public schools. This is a transversal epidemiological study representative of students between 15 and 19 years, and involving 208 individuals. Anthropometric data and blood samples were collected for: DNA extraction; biochemistry (25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium, fasting glucose, total cholesterol, LDL-c, HDL-c and triglycerides); inflammatory markers (CRP-c-reactive protein and AGP- Alpha-1-acid glycoprotein); oxidative stress (MDA-malonaldehyde and TAC-total antioxidant capacity). Differences between genotype groups were tested by one-way ANOVA or its non-parametric correspondent Kruskal-Wallis test and post-test Dunn's. The logistic regression model was used for association between the genotyping patterns and the biochemical and anthropometric parameters. The variables with $p < 0.20$ were subsequently adjusted for age, BMI and WC. Significance was adopted when p -value < 0.05 . Statistical analyses were carried out using the STATA 14 program (StataCorp; USA). A total of 78 boys and 130 girls with an average age of 17.7 (+1.14) years were evaluated. Half of the sample had insufficiency/deficiency of 25-hydroxyvitamin D. The allele frequency was 39.5% and 66.8% for B and F respectively, and 60.5% and 33.2% for b and f respectively. A significant relationship was observed between BsmI genotypes and blood glucose values ($p = 0.049$), while the post-test showed significance in *BBxbb* ($p = 0.012$) and *Bbxbb* ($p = 0.037$). In the logistic regression analysis, glycaemia had a significant relation with the *BB* genotype ($p = 0.036$; OR=2.15; CI_{95%}=1.05-4.41), and in the cluster analysis *BB+Bb* ($p = 0.025$; OR=1.89; CI_{95%}=1.08-3.29) had a higher risk of glycemia above the median when compared to *bb*. On the other hand, in analyzing *Bb+bb* ($p = 0.025$; OR=0.65; CI_{95%}=0.46-0.93) in relation to *BB*, adolescents had a higher chance of having below-median glycaemia. This relationship did not occur in the FokI polymorphism. There was no association of polymorphism genotype distribution with anthropometric variables and lipid profile, inflammatory and oxidative stress markers. In the logistic regression analysis, only the A1GPA variable of the BsmI resulted in significance for the *Bb* genotype ($p = 0.039$; OR=1.95; CI_{95%}=1.03-3.66). The variables that resulted in $p < 0.20$ for both polymorphisms were subsequently adjusted, and A1GPA remained significantly influential in the *Bb* heterozygote group ($p = 0.040$; OR=2.02; CI_{95%}=1.03-3.95); however, this was not considered relevant data considering that the other evaluated acute phase protein had no association. This study showed a significant relation of glycaemia in relation to the BsmI polymorphism genotype distribution; nevertheless, although some studies have found associations of *VDR* gene polymorphisms with cardiovascular risk factors in different populations, our study in healthy youths did not.

Key-words: Nutrigenetics. Vitamin D. Polymorphism. Glycemia. Dyslipidemia. Oxidative stress. Inflammatory process. Anthropometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES TESE

FIGURAS DA TESE

Figura 1	Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos na síntese da 1,25(OH) ₂ D ₃ .	21
Figura 2	Diagrama que descreve as vias metabólicas da vitamina D com seus genes	32
Figura 3	Posição dos polimorfismos do gene <i>VDR</i>	33
Figura 4	Valores críticos e índices antropométricos para classificação do estado nutricional de adolescentes	40

QUADROS DA TESE

Quadro 1	Conteúdo de vitamina D em alimentos	24
Quadro 2	Níveis séricos de 25(OH)D de acordo com a literatura científica	27
Quadro 3	Prevalência de hipovitaminose D em estudos com a presença de adolescentes no Brasil	28
Quadro 4	Classificação da pressão arterial para crianças e adolescentes	39
Quadro 5	Valores de referencia para as variáveis do perfil lipídico e glicêmico de crianças e adolescentes (SBC, 2007)	42

LISTA ILUSTRAÇÕES ARTIGO

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1	Características demográficas e bioquímicas em adolescentes do Nordeste do Brasil.	80
Tabela 2	Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismo rs1544410 e rs2228570 em adolescentes do Nordeste do Brasil.	80
Tabela 3	Valores em média das variáveis bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410 em adolescentes do Nordeste do Brasil.	80
Tabela 4	Valores em média das variáveis bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs2228570 em adolescentes do Nordeste do Brasil.	80
Tabela 5	Regressão logística dos genótipos rs1544410 em relação às variáveis bioquímicas.	81

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1	Características antropométricas e bioquímicas dos adolescentes.	98
Tabela 2	Valores em média ou mediana das variáveis antropométricas e bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410 dos adolescentes	99
Tabela 3	Valores em média ou mediana das variáveis antropométricas e bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs2228570 dos adolescentes.	99

TABELAS OUTROS RESULTADOS

Tabela 1	Análise de regressão logística dos genótipos do polimorfismo rs1544410 em relação aos parâmetros bioquímicos.	102
Tabela 2	Análise de regressão logística dos genótipos do polimorfismo rs2228570 em relação aos parâmetros bioquímicos.	104
Tabela 3	Análise das variáveis antropométricas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo BsmI e FokI dos adolescentes.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VDR	Receptor da Vitamina D
RXR	Receptor do ácido Retinóico
SNP	<i>Single Nucleotide polymorphisms</i>
DM	Diabetes Mellitus
PCR	Proteína-c Reativa
VHS	Velocidade de Hemo-Sedimentação
AGPA-1	1 Alfa glicoproteína Ácida
CAT	Capacidade Antioxidante
MDA	Malonaldeído
IMC	Índice de Massa Corporal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PROSAD	Programa saúde do Adolescente
PNAISAJ	Política Nacional de Atenção integral a Saúde de Adolescentes e Jovens
PTH	Paratormônio
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DRI	Dietary Reference Intakes
UVB	Raios Ultravioletas
FPS	Fator de Proteção Solar
FSA	<i>Food Standard Agency</i>
HPFS	Health Professionals Follow-up Study
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
RDA	Recommended Dietary Allowance
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SBRT	Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
VDRE	Elementos-Resposta da Vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 ADOLESCÊNCIA NO BRASIL.....	18
2.2 VITAMINA D.....	20
2.2.1 Metabolismo e Funções.....	20
2.2.2 Biodisponibilidade e Fontes da Vitamina D.....	22
2.2.3 Recomendações de Ingestão e Hipovitaminose D.....	26
2.2.4 Hipovitaminose D, Estresse Oxidativo e Inflamação.....	28
2.3 RECEPTOR DA VITAMINA D- VDR.....	31
2.3.1 Gene <i>VDR</i>	31
2.3.2 Polimorfismo do gene <i>VDR</i>	32
2.3.3 Marcadores do processo inflamatório e estresse oxidativo x polimorfismos do gene <i>VDR</i>	34
2.3.4 Perfil glicêmico x polimorfismos do gene <i>VDR</i>	35
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	37
3.1 QUESTÕES ÉTICAS.....	37
3.2 TIPO DE ESTUDO.....	37
3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	37
3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE DA AMOSTRA.....	38
3.4.1 Critérios de exclusão e inclusão.....	38
3.5 COLETA DE DADOS.....	38
3.5.1 Dados Pessoais.....	39
3.5.2 História Clínica.....	39
3.5.3 Avaliação antropométrica.....	39
3.5.4 Coleta e avaliação do material bioquímico.....	41
3.5.4.1 Avaliação do perfil lipídico e glicêmico.....	41
3.5.4.2 Avaliação de atividade de enzimas hepáticas e renais.....	42
3.5.4.3 Vitamina D (25-hidroxivitamina D).....	43
3.5.4.4 Paratormônio (PTH) e Cálcio sérico.....	43
3.5.4.5 Avaliação do estresse oxidativo.....	43
3.5.4.6. Avaliação de marcadores inflamatórios.....	44
3.5.4.7 Análise genética.....	45

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE A.....	58
APÊNDICE B.....	60
APÊNDICE C.....	62
ANEXO A.....	64
ARTIGO 1.....	65
ARTIGO 2.....	82
OUTROS RESULTADOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

A vitamina D (vit D) é classicamente conhecida pelo seu importante papel na regulação dos níveis corporais de cálcio e fósforo e da mineralização óssea (DOBNIG, 2011). Nos últimos anos teve seu status elevado de mera vitamina para uma substância com características de hormônio, tornando-se claro que ela exerce efeitos biológicos que vão além da regulação do metabolismo ósseo (MAEDA et al., 2014). Desde a última década tem havido um reconhecimento crescente da importância clínica em potencial da vit D, tendo em vista que ela regula cerca de 3% do genoma humano (WANG et al., 2005).

Acredita-se que a forma ativa (calcitriol) exerça seus efeitos principais, interagindo com o receptor de alta afinidade da vit D, chamado receptor da vit D (VDR), que é um fator de transcrição ligante-dependente regulando a transcrição gênica e a função celular em diversos tecidos (JOLLIFFE et al., 2015). De maneira mais simples, a vit D opera através deste receptor nuclear VDR, que funciona como um tipo de “interruptor genético”, ativando o seu receptor, que migra para o núcleo da célula e exerce seus efeitos regulatórios ligando-se à sequências específicas do DNA. No núcleo, o VDR é capaz de formar complexos que podem reprimir ou ativar um determinado número de genes implicado nas mais diversas funções biológicas (FELDMAN; PIKE; GLORIEUX, 2005; KIMBALL; FULEIHAN; VIETH, 2008).

Variações genéticas no gene receptor desta vitamina podem ser denominadas de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (VALDIVIELSO; FERNANDES, 2006). O polimorfismo mais frequente encontrado no genoma humano consiste de mutações nas posições de um único nucleotídeo em um cromossomo. Essas mutações são muito observadas na população, sendo motivo para explicar as variações no risco de doenças (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2010). Estudos tem indicado a existência de vários SNPs no gene *VDR*, mas a influência destes polimorfismos e sua função ou sinalização não são totalmente conhecidos (UITTERLINDEN et al., 2004).

Dois dos polimorfismos do gene *VDR* mais estudados são BsmI e FokI. O polimorfismo BsmI (rs1544410) está localizado no intron 8, posição 63980 e resulta da substituição adenina-guanina (A-G), situa-se na região 3' do gene *VDR*, não relacionado à codificação da proteína e sua estrutura, mas envolvido possivelmente na estabilidade do RNAm devido à proximidade da cauda poli A (YIN et al., 2012). O sítio de restrição BsmI está faltando no alelo *B* e está presente no alelo *b* (SPEER et al., 2001). O polimorfismo FokI (rs2228570) resulta da substituição citosina-timina (C-T) na junção do intron 1 com o exon 2, na posição 30920, criando um códon de início adicional (ACG-ATG), 3 códons próximos ao

local do início da transcrição. A presença da variante FokI, definida como *f* (códon ATG), faz com que a proteína do VDR seja produzida de forma completa (427 aminoácidos), enquanto que a variante FokI definida como *F* (códon ACG), inicia a tradução de outro local e sintetiza uma versão levemente truncada da proteína do VDR, com 3 aminoácidos a menos (424 aminoácidos) (GROSS et al., 1996; ARAI et al., 1997).

Estes SNPs foram primeiramente demonstrados estando associados com várias doenças inflamatórias como a artrite reumatóide (GOUGH et al., 1998), doença inflamatória do intestino (HUGHES et al., 2011) e doença de Crohn (SIMMONS et al., 2000). Hoje já é de conhecimento que a vit D pode modular a secreção de insulina e também possui efeitos pleiotrópicos sobre a patogênese da diabetes mellitus (DM). Nos últimos anos, muitos estudos relataram associação entre o perfil da vit D e DM2 em diferentes etnias e localidades (NOSRATABADI; ARABABADI; SALEHABAD, 2011; ZHAO; YI; ZHANG, 2011; BID et al., 2009; BAI et al., 2008; MALECKI et al., 2003).

Apesar desses estudos mostrarem esta associação, Fei et al. (2016a) e de Malecki et al. (2003) não encontraram qualquer relação significativa entre BsmI e FokI com DM2 em indivíduos diabéticos e não diabéticos, em diferentes idades, sexo e subgrupos.

A literatura também mostra relação entre níveis de vit D e marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo. Em estudo realizado com adultos diagnosticados com espondilite, avaliando marcadores séricos do metabolismo ósseo, inflamação e a genotipagem dos polimorfismos FokI e BsmI do VDR, mostrou que valores de PCR (proteína-C reativa) foram significativamente associados com os genótipos FokI (OBERMAYER-PIETSCH et al., 2003). Em outro estudo, a megadose de vit D reduziu marcadores inflamatórios (PCR e AGPA- 1 α -glicoproteína ácida) e aumentou a capacidade antioxidante total (CAT) em mulheres idosas com insuficiência de vit D. As idosas com o genótipo *BB/Bb* responderam melhor à suplementação em comparação àquelas com o genótipo *bb* (CAVALCANTE et al., 2015). Este mesmo resultado da melhor resposta à suplementação da vit D nos indivíduos com genótipos *BB/Bb*, também foi encontrado por Elnenaei et al. (2011) em 36 mulheres pós-menopausadas classificadas com baixa densidade mineral óssea.

No Brasil, apenas dois estudos com polimorfismos do gene VDR foram realizados em adolescentes saudáveis (SANTOS et al., 2012; COBAYASHI; HATZLHOFFER; CARDOSO, 2015). Santos et al. (2012) estudou o polimorfismo BsmI em meninas curitibanas e mostrou que variantentes deste polimorfismo estavam associadas com baixas concentrações da 25-hidroxivitamina D, apresentando significância nos genótipos *Bb+bb* em deficientes da vitamina. O estudo de Cobayashi, Hatzlhofer e Cardoso (2015) analisaram os

polimorfismos BsmI e FokI em menores de 10 anos e além de encontrar associação com as concentrações de 25-hidroxivitamina D, o BsmI também estava associado com glicemias maiores, quando analisado em subamostra. Apesar deste resultado, existem estudos fora do Brasil que não mostram associação das variantes polimórficas do BsmI e do FokI com concentrações de 25-hidroxivitamina D, como o de Valtueña et al. (2013) com adolescentes europeias. Esta inconsistência de resultados pode estar relacionada a grande variação étnica e amostragem que representem as características da população estudada.

Embora existam esses estudos das variantes dos polimorfismos BsmI e FokI em adolescentes no Brasil, são necessárias novas pesquisas em regiões diferentes do país e com amostragem representativa, já que estamos considerando um país de grande miscigenação. Desta forma, permite-se maior discussão e correlação dos resultados para determinar o perfil polimórfico neste país, e então relacionar com variáveis metabólicas. Com um perfil identificado, podemos determinar medidas de prevenção de futuras doenças em indivíduos ainda jovens.

A proposta deste estudo foi avaliar a relação das variantes genéticas dos polimorfismos BsmI e FokI do gene *VDR* com a hipovitaminose D e marcadores metabólicos em adolescentes de escolas públicas no município de João Pessoa-PB, tendo como objetivos específicos: Identificar a suficiência e insuficiência/deficiência da vit D nos adolescentes; Obter marcadores bioquímicos (glicose jejum, ureia, creatinina e perfil lipídico: colesterol total, LDL-c, HDL-c e VLDL-c); Marcadores inflamatórios (PCR-us e AGPA); Marcadores do estresse oxidativo (CAT e MDA); Avaliação antropométrica (peso, altura, IMC, CC e RCA); Avaliar a distribuição do polimorfismo BsmI e FokI do gene *VDR*; Relacionar a distribuição dos polimorfismos com as variáveis de interesse.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 ADOLESCÊNCIA

A palavra adolescência é derivada do verbo latino *adolescere* que significa crescer ou crescer até a maturidade. Compreende a transição entre a infância e a vida adulta e é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o intervalo cronológico que compreende dos 10 aos 19 anos (WHO, 1995). Apesar desta definição etária, os eventos puberais podem ocorrer, em indivíduos normais do mesmo sexo, em idades diferentes, caracterizando desta forma melhor um adolescente do que a idade cronológica (SILVA; MURA, 2011).

Em um sentido amplo, pode-se considerar como fase inicial da adolescência o período que se estende dos 10 aos 14 anos de idade. Em geral, é nessa etapa que começam as mudanças físicas, normalmente com uma aceleração repentina do crescimento, seguida pelo desenvolvimento dos órgãos sexuais e das características sexuais secundárias. A fase final da adolescência, de maneira geral, vai dos 15 aos 19 anos de idade. A essa altura, as principais mudanças físicas normalmente já ocorreram, embora o corpo ainda se encontre em desenvolvimento (UNICEF, 2011).

A puberdade é uma parte da adolescência, ou seja, é o período em que ocorrem todas as transformações físicas e fisiológicas e quando elas terminam, a puberdade chega ao fim. É um período de crescimento e desenvolvimento acelerado durante o qual a criança se transforma fisicamente em adulto e se torna apta à reprodução sexual (EISENSTEIN, 2005). Dessa forma, inicia-se uma maior produção de hormônios reprodutivos como estrogênios, progesterona e testosterona e se estabelece pelo aparecimento externo de características sexuais secundárias, como o desenvolvimento de mamas em mulheres e o aparecimento de pelos faciais em homens. Alterações importantes também ocorrem na composição corporal, caracterizada por depósito maior de gordura em meninas e de massa muscular em meninos (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2013).

Em média, o início da puberdade nas meninas inicia-se entre 12 a 18 meses antes que os meninos; a idade mediana da primeira menstruação das meninas é 12 anos, ao passo que a primeira ejaculação dos meninos ocorre geralmente por volta dos 13 anos de idade. No entanto, as meninas podem apresentar menarca já aos 8 anos de idade (OMS, 2004).

Essas mudanças inerentes da adolescência têm desdobramentos importantes no estilo de vida dos jovens, inclusive sobre seu comportamento alimentar (COSTA; DUARTE; KUSCHNIR, 2010). Sabe-se que, o comportamento social do adolescente propicia o

desenvolvimento de hábitos e estilos de alimentação que podem ser nutricionalmente inadequados. Refeições com ritmos irregulares, mal balanceadas, consumo excessivo de calorias vazias e dietas da moda podem contribuir para a má alimentação e deficiências nutricionais nessa fase, e em certa medida, o aumento das doenças crônicas não transmissíveis tem uma associação importante com o comportamento alimentar (GIANNINI, 2007).

A última Diretriz Brasileira da Obesidade (ABESO, 2016), afirma que a fase puberal é um dos períodos de maior aumento de peso, ocorrendo em maior grau em populações mais pobres e com menor nível educacional. Em estudo representativo realizado no Brasil, o ERICA (Estudo de Risco Cardiovascular em Adolescentes), em adolescentes entre 12 e 17 anos, matriculados em escolas de municípios com amostragem de todas as regiões brasileiras, foi observado sobrepeso/obesidade em 58% de uma amostragem das meninas, conforme publicado recentemente (CUREAU et al., 2017). Em outra publicação do ERICA, observaram que a circunferência da cintura elevada estava associada de forma significativa à PCR, sugerindo que a inflamação, bem como dados antropométricos também podem ser úteis para avaliar risco cardiovascular em adolescentes (GIANNINI et al., 2017).

No Brasil, as políticas públicas de saúde com foco nessa faixa etária aconteceram no início na década de 80 com a criação do PROSAD (Programa Saúde do Adolescente) e das Diretrizes Nacionais para a Atenção Integral à Saúde de Adolescentes (BRASIL, 2010), além da proposta não promulgada da Política Nacional de Atenção Integral à Saúde de Adolescentes e Jovens (PNAISAJ) (LOPES; MOREIRA, 2013). Contudo, essas medidas têm seu núcleo delimitado principalmente à saúde sexual e reprodutiva, deixando à margem questões importantes como o estado nutricional e as carências de micronutrientes da população jovem (MACEDO, 2010).

Em virtude das intensas modificações próprias da faixa etária, faz-se necessária a criação de estratégias que visem o cuidado na saúde nutricional dos adolescentes, pois a população jovem entre 10 e 19 anos de idade já representa no mundo 1,2 bilhão de indivíduos (ONU, 2008). No Brasil, apesar da transição demográfica ser direcionada ao envelhecimento, a geração de adolescentes e jovens de 10 a 24 anos de idade ainda é mais numerosa, expressando um contingente populacional de 51.429.397 pessoas – 30,3% da população total Brasileira, sendo 35.287.882 adolescentes de 10 a 19 anos e 16.141.515 jovens com idades entre 15 a 24 anos (BRASIL, 2010).

De acordo com o último censo demográfico realizado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) no ano de 2010, a Paraíba contava com uma população de 701.442 adolescentes residentes (10-19 anos) e no município de João Pessoa, essa população

encontrava-se em torno de 119.110 indivíduos de ambos os sexos, compreendendo 17% da população de adolescentes do estado (BRASIL, 2010).

Dessa forma, as intensas modificações físicas, emocionais e sociais, e o fato de que comportamentos e estilos de vida podem exercer efeitos sobre a saúde dos adolescentes na fase adulta, torna-os uma população de interesse para estudos científicos na área da saúde.

2.2 VITAMINA D

2.2.1 Metabolismo e Funções

A vit D, embora seja conhecida como vitamina, conceitualmente se trata de um pré-hormônio. Juntamente com o paratormônio (PTH), atua como importantes reguladores da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo (MAEDA et al, 2014). No século XXI, tem havido mais artigos científicos publicados sobre esta vitamina do que sobre qualquer outra, refletindo a expansão maciça do seu campo de pesquisa (MESQUITA; IGREJA; COSTA, 2013). Diversos estudos mostram deficiência de vit D em proporções epidêmicas em várias partes do mundo, atingindo todas as faixas etárias e acompanhada de diversos agravos à saúde, que vão além do comprometimento do metabolismo ósseo (GALVÃO et al., 2014)

O reconhecimento crescente da importância clínica em potencial da vit D tem sido expressivo, tendo em vista que ela regula cerca de 3% do genoma humano (WANG et al., 2005). Para compreensão desta função hormonal, é necessário a princípio o entendimento do metabolismo desta vitamina.

A vit D é sintetizada na pele por via não enzimática, por ação dos raios ultravioleta B (UVB), porém, se a exposição do indivíduo à luz não for adequada, é essencial que a vitamina seja fornecida por fontes alimentares (COZZOLINO, 2016). Entretanto, segundo Pedrosa e Castro (2005), as fontes alimentares contribuem apenas com uma pequena parcela das necessidades diárias.

As formas disponíveis na natureza da vit D são o colecálciferol ou vit D₃ e o ergocalciferol ou vit D₂. Ambas participam dos mesmos processos biológicos e das mesmas vias de metabolização, com potências biológicas equivalentes. A figura 1 sumariza a sequência de eventos envolvidos na síntese da 1,25(OH)₂D (calcitriol), onde se define da seguinte forma: a partir da exposição aos raios ultravioleta B (UVB), o 7-deidrocolesterol presente na derme e epiderme é transformado em vit D₃. Esta forma não metabolicamente ativa é transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma hidroxilação no

carbono 25, tornando-se a 25-hidroxivitamina D ou 25(OH)D, denominada calcidiol. A maioria da 25(OH)D produzida é depositada no tecido gorduroso, seu principal reservatório. A produção da 25(OH)D no fígado, além de rápida, sofre pouca regulação. Deste modo, seus níveis plasmáticos refletem a reserva corporal da vit D. Para se tornar ativa, a vit D necessita ainda de uma última hidroxilação na posição 1, que ocorre nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais do rim, sob a ação da enzima 1- α hidroxilase, transformando-se em 1,25(OH) $_2$ D (PEDROSA; CASTRO, 2005).

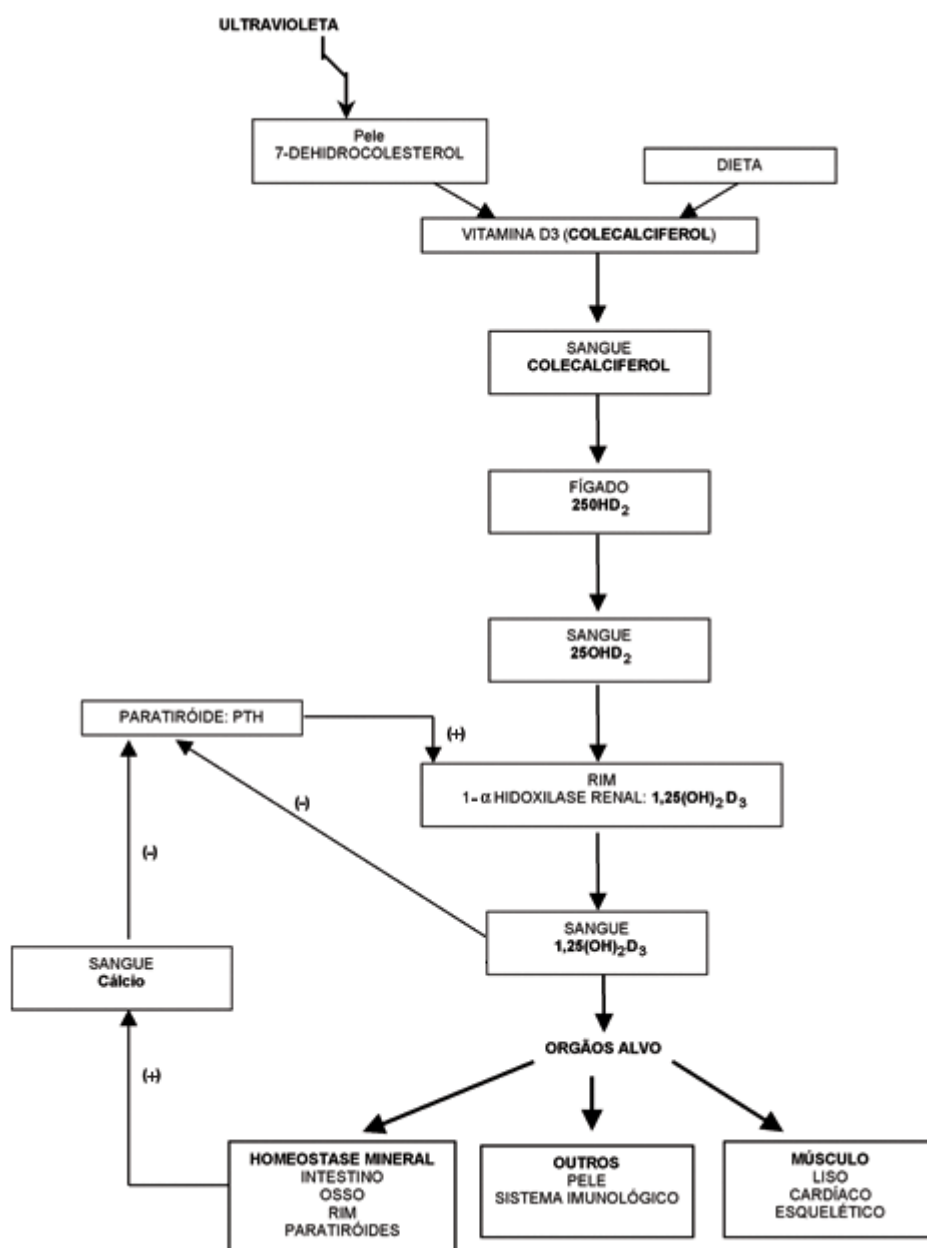


Figura 1 Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos na síntese da 1,25(OH) $_2$ D $_3$.

Fonte: PEDROSA; CASTRO, 2005, p. 03

Esta passagem renal, ao contrário da hepática, é estreitamente regulada por vários fatores. A elevação plasmática do paratormônio (PTH) e a diminuição do fosfato estimulam a atividade da 1- α hidroxilase. A 1,25(OH)₂D retro-regula sua produção, inibindo também a atividade da 1- α hidroxilase, o mesmo ocorrendo com a redução do PTH e a elevação do fosfato. O calcitriol é um hormônio muito potente e circula em concentrações cerca de 1000 vezes inferior ao seu precursor, o calcidiol (PEDROSA; CASTRO, 2005).

A concentração de calcitriol no plasma permanece relativamente constante, variando com a concentração de Ca no organismo. Entretanto, até que a deficiência seja extrema, não ocorrem grandes variações no estado nutricional do indivíduo em relação a essa vitamina, diferentemente, a concentração plasmática de 25(OH)D que cai abruptamente com a deficiência. A vit D é excretada principalmente pela bile e pode ser reabsorvida, embora acredita-se que este não seja um mecanismo importante para sua conservação no organismo. Metabólitos mais solúveis da vitamina são excretados pela via renal (COZZOLINO, 2016).

O calcitriol promove a manutenção das concentrações de Ca (cálcio) e P (fósforo) no soro em uma variação normal, isto se dá pela maior eficiência de absorção destes minerais no intestino delgado e pela regulação da atividade osteoblástica e osteoclástica dos ossos. Portanto, o calcitriol age aumentando a absorção intestinal e reduzindo a excreção de Ca pelo aumento da reabsorção dos túbulos distais dos rins e pela mobilização dos minerais dos ossos (COZZOLINO, 2016), gerando assim a manutenção do esqueleto ao longo da vida. Em todas estas ações, o papel do calcitriol deve estar relacionado à receptores de alta afinidade da vit D, essencialmente, todos os tecidos e células do corpo tem um receptor da vit D, portanto, sua deficiência tem sido associada ao aumento do risco de pré-eclâmpsia, esclerose múltipla, artrite reumatóide, diabetes tipo I e II, doença cardíaca, demência, cânceres mortais, e doenças infecciosas (HOLICK, 2011a).

2.2.2 Biodisponibilidade e Fontes da Vitamina D

Níveis adequados de vit D são mantidos por meio de sua fotossíntese cutânea e ingestão oral, porém, uma série de fatores podem influenciar a fotossíntese e biodisponibilidade de vit D, contribuindo assim para o risco da deficiência. Estes fatores são referentes a variação da exposição ao sol devido à latitude, estação do ano, período do dia, componentes atmosféricos, roupas, uso de filtro solar e pigmentação da pele, bem como idade, obesidade e incidência de várias doenças crônicas (TSIARAS; WEINSTOCK, 2011).

O vestuário pode interferir com a radiação UVB dependendo do tipo do tecido. Por exemplo, um estudo que analisou o efeito de diferentes tecidos brancos e negros sobre a exposição UV, demonstrou que a lã preta reduzia a irradiância UVB em 98,6%, enquanto que a de algodão branco reduziu em apenas 47,7%. No entanto, ambos os tecidos suprimiam completamente a síntese da vit D₃ *in vitro* após 40 min da luz solar simulada, assim como em voluntários submetidos à irradiação de corpo inteiro sob radiação UVB (MATSUOKA et al., 1992).

Sobre a melanina, ela funciona como um protetor solar natural, sendo assim, quanto mais escura for a pele de uma pessoa, maior será sua necessidade de exposição solar para sintetizar a mesma quantidade de vit D que uma pessoa de pele clara (HOLICK, 2004). Quando comparados indivíduos com pele levemente pigmentada àqueles com alta concentração de melanina (por exemplo, a pele escura dos afro-americanos) os de pele mais pigmentada requerem maior tempo de exposição aos raios UV para gerar quantidades equivalentes de vit D₃, como observado por Nesby Q'dell et al. (2002) em estudo com mulheres afro-americanas, onde eram 20x mais propensas do que as brancas de terem níveis de D₃ <25 nmol/L. Um protetor solar com fator de proteção 8 (FPS 8), reduz a capacidade da pele de produzir vit D em 95% e um protetor solar FPS 15, reduz em 99% (HOLICK, 2004).

Fatores relacionados ao trato gastrointestinal também podem influenciar na biodisponibilidade da vitamina. As formas dietéticas da vit D são a D₂ (ergocalciferol) provenientes de plantas e alguns peixes, como cavallinha, salmão, sardinha, óleo de fígado de bacalhau e em menores quantidades na gema do ovo, fígado, carne e queijo (OVESEN; BROT; JAKOBSEN, 2003). E a vit D₃ (colecalfiferol) está presente em alguns alimentos e também é produzida pelo corpo humano através da exposição aos raios solares (HOLICK, 2004; KULIE et al., 2009). Estas vitaminas diferem apenas ligeiramente em sua estrutura química e ambas têm sido usadas para tratar eficazmente o status subótimos da vit D, o raquitismo e a osteomalácia (HOUGHTON; VIETH, 2006; HOLICK et al., 2008), no entanto, existe controvérsias quanto à equivalência biológica dessas duas formas de vit D, sugerindo que elas são metabolizadas de formas diferentes (HORST et al., 1986). Heaney et al. (2011) constataram que em doses equivalentes, a vit D₃ é 87% mais potente que a vit D₂, para o aumento e manutenção da concentração plasmática da 25-hidroxivitamina D.

As duas formas de vitaminas são moléculas relativamente não-polares e devem ser solubilizadas pela incorporação de sais biliares, a fim de serem absorvidas, principalmente no intestino delgado proximal por difusão (LO et al., 1985). Estima-se que cerca de 80% da vit D seja absorvida em indivíduos saudáveis e sem problemas relacionados à ingestão de lipídios,

tais como algumas situações: fibrose cística, doença celíaca, doença de Whipple, doença de Crohn, cirurgia de revascularização, bypass gástrico, remédios para controle do colesterol e ainda outras condições como a obesidade (células de gordura podem não liberar a vit D nelas armazenadas), comprometimento hepático (reduz a síntese de 25-hidroxivitamina D) e renal (redução da síntese de 1,25-hidroxivitamina D) (HOLICK, 2007).

No quadro 1 pode-se observar alguns valores de vit D em alimentos.

Quadro 1. Conteúdo de vit D em alimentos

Fonte	Porção	Quantidade vit D
Salmão fresco	100g	600 – 1.000UI vit. D ₃
Salmão fresco (viveiro)	100g	100 – 250UI vit. D ₃ ou D ₂
Salmão em conserva	100g	300 – 600UI vit. D ₃
Sardinha em lata	100g	300UI vit. D ₃
Atum em lata	100g	230UI vit. D ₃
Óleo de fígado bacalhau	1 col chá	400 – 1.000UI vit. D ₃
Cogumelo shiitake fresco	100g	100UI vit. D ₂
Cogumelo shiitake seco	100g	1.600UI vit. D ₂
Gema de ovo	1 gema	20UI vit. D ₂ ou D ₃
Manteiga*	13g	8UI D ₃
Iogurte*	245mL	4UI D ₃
Queijo cheddar*	28g	3,6UI D ₃
Leite fortificado*	244mL	100UI D ₃
Leite integral**	240mL	6,8UI D ₃

Fonte: Adaptado de Holick (2007); *Adaptado de Cozzolino (2016); **Adaptado Bueno e Czepielewski (2008)

O leite e outros produtos de origem animal também contém a 25(OH)D, sendo este composto absorvido mais rapidamente que os outros vitâmeros D, e é menos dependente de bile e mais bem absorvido (MOURÃO et al., 2005).

Os alimentos enriquecidos fornecem a maior parte da vit D na dieta americana, por exemplo, quase toda a produção de leite nos Estados Unidos é fortificada com 100UI/copo. Em 1930, um programa de fortificação foi implementado nos Estados Unidos para combater o raquitismo, na época um importante problema de saúde pública, sendo esta desordem praticamente eliminada por esta ação. Os alimentos obrigados a serem fortificados com vit D incluem farinhas de cereais e produtos derivados, leite e subprodutos, e sucos de frutas, sendo

os níveis máximos de adição de vit D especificados por lei (CALVO; WHITING; BARTON, 2004; HOLICK, 2006). Esta política de fortificação de alimentos com vit D demonstrou ser eficiente para elevar as concentrações plasmáticas de 25-hidroxivitamina D nos Estados Unidos e em outros países em que a fortificação se tornou obrigatória (SILVA et al., 2008). No Brasil não há esta política de fortificação, limitando ainda mais o consumo de alimentos fonte desta vitamina (SBRT, 2007).

O leite é um alimento crucial ao se tratar de fontes alimentares e biodisponibilidade da vit D, quando ele é ingerido conjuntamente com fontes naturais de vit D pode elevar de três a dez vezes sua absorção, fato explicado, pela presença da lactalbumina como um fator estimulatório da absorção (BUENO; CZEPIELEWSKI, 2008).

Entretanto, Natri et al. (2006) compararam a biodisponibilidade do colecalciferol (D₃) do pão branco e de centeio fortificados com um suplemento farmacológico, todas as fontes forneciam 10µg/dia da vitamina (400UI). Observaram que o aumento nas concentrações séricas da 25-hidroxivitamina D foi promovido por ambos os pães, demonstrando que a preparação dos pães e o conteúdo de fibras do pão de centeio não afetaram a biodisponibilidade do colecalciferol, e que este alimento também pode ser utilizado para fortificação.

A biodisponibilidade da vit D também foi comprovada em indivíduos que consumiram cogumelos *Cantharellus tubaeformis*. Foi oferecido o alimento liofilizado para um grupo e outro grupo suplemento de ergocalciferol (D₂), ambos com 14µg/dia (560UI). Após 3 semanas, o aumento nas concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D foi significativo em relação ao grupo controle e não diferiu entre os grupos que receberam ergocalciferol na forma de suplemento ou com o cogumelo liofilizado, demonstrando boa biodisponibilidade da vitamina neste alimento. É importante destacar que todos os cogumelos comestíveis contêm quantidades significativas de ergocalciferol, o qual quando exposto à radiação UVB é convertido em colecalciferol. Dependendo do tipo de cogumelo e da duração da exposição solar, o conteúdo de colecalciferol pode ser de até 25µg/g (OUTILA et al., 1999).

Apesar de toda esta discussão sobre a biodisponibilidade da vit D, a pesquisa financiada pela *Food Standards Agency* (FSA) no Reino Unido sugeriu que a ingestão diária de alimentos típicos da vit D contribuiu menos do que a exposição média da UVB durante todo o ano (ASHWELL et al., 2010).

2.2.3 Recomendações de Ingestão e Hipovitaminose D

Valores de referência para ingestão de vit D pela *American Academy of Pediatrics*, era para bebês, crianças e adolescentes de 400 UI por dia no mínimo, através da dieta ou suplementos (MISRA et al., 2008). As DRIs (*Dietary Reference Intakes*) são valores de referência de ingestão de nutrientes amplamente utilizadas por agências de governo para estabelecer normas, assim como por profissionais de saúde orientando dietas. Em relação às recomendações de ingestão de vit D, as DRIs publicaram os novos valores de referência baseados em mais estudos e de melhor qualidade, que os disponíveis para valores de ingestão deste nutriente em 1997 (HOLICK et al., 2011b). O Comitê avaliou mais de mil estudos e ouviu depoimentos de cientistas e partes interessadas antes de estabelecer as novas recomendações. As DRIs instituíram recomendação de ingestão diária de 600 UI para indivíduos entre 1 e 70 anos, com uma dose máxima tolerável de UL= 4000 UI para ≥ 9 e < 70 anos (HOLICK et al., 2011b). A ingestão diária de 600 UI corresponde a 20 minutos de exposição diária de 5% da superfície corpórea (SARAIWA et al., 2007; IOM, 2012).

As recomendações podem ser expressas em microgramas (μg) ou em unidades internacionais (UI), considerando estudos realizados com animais, $1\mu\text{g}$ da vit D= 40UI (COZZOLINO, 2016).

A *Endocrine Society* na publicação da Diretriz para Avaliação, Tratamento e Prevenção da Deficiência de Vitamina D, sugere que a deficiência de vit D ocorre quando a 25-hidroxivitamina D apresentar-se ≤ 20 ng/mL e insuficiência quando entre 21-29 ng/mL (HOLICK et al., 2011b). A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia faz esta mesma recomendação em seu Consenso para Diagnóstico e Tratamento da Hipovitaminose D (MAEDA, et al., 2014). Portanto, concentrações séricas de 25(OH)D abaixo de 30 ng/mL (75 nmol/L) são consideradas por muitos como hipovitaminose D (HOLLICK, 2007; HOLLICK et al., 2011; HEANEY, 2013; VIETH et al., 2007; HOLLICK et al., 2012).

O relatório do IOM (*Institute of Medicine*) de novembro de 2012 sobre a DRI's para cálcio e vitamina D, desafiou a opinião generalizada entre muitos nos EUA que defendiam a suficiência da vit D em níveis séricos de 25-hidroxivitamina D > 30 ng/mL. O relatório do IOM concluiu que valores da 25-hidroxivitamina D > 20 ng/mL seria suficiente para 97,5% da população saudável em geral, e recomenda a ingestão de vit D muito menor do que se acreditava, entre muitos especialistas. Apesar deste questionamento, as DRIs continuam sendo utilizadas como referência para status da vit D.

No organismo, a 25-hidroxivitamina D é o metabólito mais abundante e o melhor indicador para a avaliação do status de vit D, classificando-se os indivíduos como: deficientes, insuficientes ou suficientes em vit D (NORMAN; BOUILLON, 2010). No quadro 2 estão listados alguns autores com as indicações sugeridas para diagnóstico da hipovitaminose D nos últimos anos.

Quadro 2. Níveis séricos de 25(OH)D de acordo com a literatura científica.

	Deficiência	Insuficiência	Suficiência
Hollick (2009)	≤ 20 ng /mL (ou 50 nmol /L)	Entre 20 e 30 ng/mL (50 e 75nmol/L)	> 30 ng/mL (75nmol/L)
IOM (2012)	-	-	> 20 ng/dL*
Dobnig (2011)	-	-	> 20 ng/dL
Endocrine Society* (HOLLICK et al, 2011 c) e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (MAEDA, et al., 2014)	< 20 ng/mL (< 50 nmol/L)	Entre 21 e 29 ng/mL (52,5–72,5 nmol/L)	> 30 ng/mL (> 75 nmol/L)

* Para crianças e adultos

Fonte: Própiro autor.

Alguns estudos foram realizados no Brasil para avaliar a condição da concentração da 25-hidroxivitamina D em adolescentes. Abaixo no quadro 3, estão listados alguns desses estudos que mostram uma considerável prevalência da hipovitaminose no Brasil, mesmo considerando ser um país de intensa radiação solar.

A ingestão dietética de vit D foi avaliada em alguns estudos no Brasil em diversas faixas etárias. Em 2009, Peters et al. observaram em 136 adolescentes e adultos jovens, com idade entre 16 e 20 anos, que a média de ingestão foi de 3,5 μ g/d e nenhum participante atingiu a recomendação dietética de consumo. Em adultos de ambos os sexos com mais de 40 anos em amostras de todas as regiões do Brasil, a ingestão média de vit D foi de 1,86 μ g/d (equivalente a 74,4 UI) (PINHEIRO et al., 2009). Desta forma, observa-se que as baixas médias de ingestão são encontradas em faixas etárias diferentes, demonstrando ausência de fontes alimentares como parte da dieta habitual do brasileiro (CABRAL et al., 2013).

Quadro 3. Prevalência de hipovitaminose D em estudos com a presença de adolescentes no Brasil.

Autor, ano	n	População	ponto de corte da 25-hidroxivitamina D (ng/dL)	prevalência (%)
Maeda et al., 2007	121	voluntários (SP) entre 17 a 33 anos	<40,0	75
Silva et al., 2008	180	pacientes ambulatório de endocrinologia (BH) entre 14 e 91	<32	42
Peters et al., 2009	136	adolescentes de e adultos jovens (SP) entre 16 e 20 anos	≤30	62
Santos et al., 2013	234	adolescentes (PR) entre 7 e 18 anos	≤30	90
Oliveira et al., 2013	160	adolescentes (MG) entre 15 a 17 anos	≤30	71
Cobayashi, Hatzlhofer, Cardoso., 2015	974	menores de 10 anos (AM)	≤30	33

Fonte: Próprio autor.

Outra estratégia tem sido o desenvolvimento de programas de fortificação de alimentos, incluindo leites, manteigas, margarinas e certos cereais para aumentar a ingestão da vit D. No Brasil, não há fortificação de alimentos obrigatória e só recentemente alguns produtos, como leite e iogurtes, começaram a ser fortificados com vit D (MARTINI et al., 2013). Além disso, o status da vit D de toda a população brasileira não foi avaliada até agora, e considerando a heterogeneidade étnica, diversas condições de vida e hábitos alimentares, uma política obrigatória não é recomendada (MAEDA et al., 2014). No entanto, alimentos fortificados com um preço acessível pode reverter a prevalência de inadequação da ingestão de vit D e, possivelmente, contribuir para um melhor estado 25-hidroxivitamina D (MARTINI et al., 2013).

2.2.4 Hipovitaminose D, Estresse Oxidativo e Inflamação

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico. Eles são necessários para que todas as funções como a sinalização celular e a defesa contra micro-organismos ocorram de maneira adequada. Durante os processos metabólicos, esses radicais apresentam-se instáveis por possuírem um número ímpar de elétrons, logo, atuam como

mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. A produção excessiva de radicais livres pode conduzir à lesões oxidativas (FRANÇA et al., 2013).

O desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes (moléculas do sistema de defesa) favorecem a geração excessiva de radicais livres, desenvolvendo o processo do estresse oxidativo (SAMPAIO; MORAES, 2010; CODONER-FRANCH et al., 2012). Um aumento excessivo e/ou sustentado na produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) tem sido implicado na patogênese de muitas doenças incluindo diabetes mellitus, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, artrite reumatoide, aterosclerose e inflamação entre outras (DRÖGE, 2002; VALKO et al., 2007).

Os peróxidos lipídicos, derivados de ácidos graxos poliinsaturados, são instáveis e se decompõem para formar uma série de compostos complexos que incluem compostos carbonílicos reativos, como o MDA (YAGI, 1998). Walter et al. (2004), afirmam que os níveis de MDA, frequentemente medido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), apresentam-se elevados quando em associação à fatores de risco cardiovascular como hipertensão, hiperlipidemia e diabetes.

Os fatores de risco cardiovascular citados acima, estão intimamente associados à diminuição das defesas antioxidantes. Diversos grupos de pesquisa têm estudado biomarcadores do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes por meio da mensuração de enzimas antioxidantes como CAT, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) (FERRARI, 2008).

Indivíduos obesos comumente possuem um desequilíbrio entre gordura, peso corporal, lipoproteínas e lipídios, o que interfere na suscetibilidade do organismo a lesões oxidativas (FRANÇA et al., 2013). Estudiosos em sua pesquisa com 225 crianças e adolescentes concluíram que a obesidade esteve associada a altos níveis de estresse oxidativo, inflamação e um risco para eventos cardiovasculares adversos (NORRIS et al., 2011). De acordo com Codoner-Franch et al. (2012), a obesidade está associada com um aumento na expressão de adipocitocinas que promovem uma resposta inflamatória a qual, está relacionado com vários mecanismos, incluindo a sobrecarga metabólica dos nutrientes, disfunção mitocondrial e geração de EROs.

Algumas citocinas e fatores, como Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), apresentam-se como marcadores do processo inflamatório, onde são liberadas pelo endotélio, estimulando moléculas de adesão e assim promovendo risco cardiovascular (SZMITKO et al., 2003).

Outros marcadores da inflamação são as proteínas de fase aguda PCR e AGPA. A PCR está envolvida na patogênese de várias doenças especialmente as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e mostra correlação positiva com estados patológicos associados à nutrição como sobrepeso, obesidade generalizada e central, diabetes e dislipidemias (SILVA; MORESCO, 2011). A AGPA é um biomarcador que vem ganhando espaço na avaliação clínica da atividade inflamatória no organismo, uma proteína também de fase aguda e, como tal, tem a propriedade de aumentar a sua concentração plasmática em resposta ao estado inflamatório (PIERONI, 2003).

Pesquisadores têm demonstrado que a vit D pode ter um papel no estado de inflamação através de diversos efeitos sobre as células inflamatórias (GUILLOT, 2010). Observa-se uma relação negativa e significativa entre vit D e marcadores da inflamação (SHAB-BIDAR et al., 2012) e do estresse oxidativo (SHEA et al., 2008). Em estudo realizado com gestantes, foi observado que após a suplementação da vit D, houve redução dos níveis de PCR e aumento da CAT (ASEMI et al., 2013).

A vit D apresenta um possível papel nas células T mediada por imunidade e reposta inflamatória, e tem efeitos benéficos na melhoria de várias doenças auto-imunes (BORGES; MARTINI; ROGERO, 2011). Em pesquisa realizada por Barker et al. (2015), observou-se que a suplementação de vit D em adultos saudáveis pode aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IFN- γ) mesmo em indivíduos inicialmente com baixos níveis séricos 25-hidroxivitamina D.

A insuficiência/deficiência de vit D nos adolescentes tem sido abordada na literatura como um problema relevante, visto que a inadequação da vitamina nesta fase da vida pode provocar alterações no processo inflamatório e estresse oxidativo, aumentando a susceptibilidade à várias patologias na vida adulta. Estudo realizado com crianças e adolescentes obesas (n=66) entre 7 e 14 anos, encontrou nos insuficientes de 25-hidroxivitamina D, um aumento significativo nos níveis plasmáticos de MDA (marcador de fim de lipoperoxidação) e da mieloperoxidase (um dos principais constituintes dos macrófagos de parede arterial). Os autores concluíram que as jovens obesas e inadequadas da vit D apresentam maior predisposição às DCV devido aumento nos marcadores de estresse oxidativo e ativação endotelial (CODONER-FRANCH et al., 2012).

Em outro estudo realizado com um total de 1488 escolares entre 7 e 11 anos de idade na China, identificaram que 56 % deles apresentaram deficiência da vit D, e essa deficiência foi maior no grupo que tiveram maior peso corporal e concentrações mais baixas de SOD (antioxidante). Concluindo que a deficiência da vit D é comum na idade escolar e está

intimamente associada com adiposidade, inflamação e estresse oxidativo (ZHANG et al., 2014).

No entanto, ainda são escassos os estudos relacionando os níveis de 25-hidroxivitamina D e sua associação com adiposidade, inflamação e estresse oxidativo na população adolescente, especialmente no Brasil.

2.3 RECEPTOR DA VITAMINA D- VDR

2.3.1 Gene *VDR*

Na década de 40, começou-se a perceber que baixos níveis de vit D encontravam-se associados ao aumento do risco à algumas condições clínicas, infecciosas e multifatoriais (BORRADALE; KIMLIN, 2009). Isso abriu os horizontes para que a atuação da vit D fosse interpretada como pleiotrópica em muitas doenças, ou seja, que a vitamina pudesse atuar sobre diferentes tipos celulares, regulando mais de 900 genes (WANG et al., 2005).

Nas últimas décadas, diversos autores descreveram a atividade do gene *VDR* não somente em tecidos clássicos como ossos, rins e intestino, mas também em outros locais não clássicos, tais como células do sistema imune, sistema reprodutivo (útero, ovário, placenta, testículo e próstata), mamas, sistema endócrino (ilhotas pancreáticas, hipófise, tireóide, paratireóide e córtex adrenal), musculatura lisa e esquelética, coração, pele, cérebro e fígado (BRAIDMAN; ANDERSON, 1985).

O VDR é sintetizado a partir de um gene localizado no cromossomo 12, na posição 12q13.11. Este gene consiste basicamente em 9 éxons e 8 íntrons distribuídos entre as regiões 5`promotora e 3`regulatória. Nesta última, existe uma longa região 3` não traduzida envolvida na modulação da expressão genética, especialmente através da regulação da estabilidade do RNAm (DURRIN et al., 1999; DECKER; PARKER, 1995).

Os efeitos biológicos da vit D são mediados pelo VDR. Como representado na figura 2, a forma ativa da vitamina D, a 1,25 hidroxivitamina D, liga-se às proteínas transportadoras de vit D do sangue, penetra na membrana celular e liga-se ao VDR. O complexo formado então se liga ao receptor do ácido retinóico (RXR) formando heterodímeros que atuam nos elementos resposta da vit D (VDREs), iniciando assim, uma cascata de interações moleculares que irão modular a transcrição de genes específicos (KIMBALL et al., 2008).

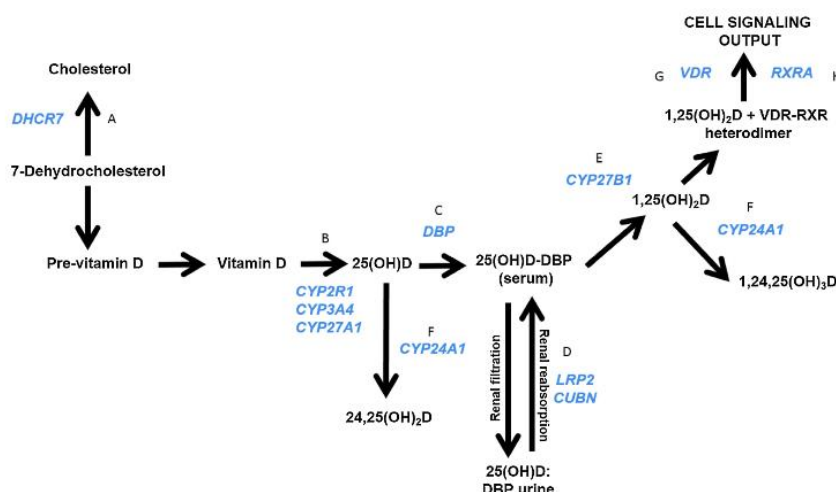


Figura 2. Diagrama dos genes-chaves envolvidos no metabolismo da vit D. O *DHCR7* (A) codifica a redutase 7 dehydrocholesterol enzima, que catalisa a conversão do 7-desidrocolesterol em colesterol; *CYP2R1*, *CYP3A4*, e *CYP27A1* (B) codificam enzimas do citocromo P450 25-hidroxilação; o DBP codifica a proteína transportadora de vit D (C) na corrente sanguínea; *LRP2* e *CUBN* (D) codificam as proteínas megalina e cubilina, respectivamente, envolvido na reabsorção renal de 25(OH)D através de endocitose mediada por receptores; *CYP27B1* (E) codifica a enzima citocromo P450 que 1-alfa-hidroxila 25(OH)D para formar 1,25(OH)₂D; *CYP24A1* (F) codifica a enzima citocromo P450 responsável por 24-hidroxilação de metabólitos da vit D, incluindo 25(OH)D e a 1,25(OH)₂D; *VDR* (L) codifica o receptor da vit D, que se liga a 1,25(OH)₂D e forma um heterodímero com o produto do gene de *RXRA* (H) - receptor de retinóide X - para mediar as ações biológicas da vit D.

Fonte: Jolliffe et al., 2015

2.3.2 Polimorfismo do gene *VDR*

Apesar da sequência de DNA nuclear entre dois indivíduos de uma mesma espécie ser muito semelhante, chegando à quase 99,9 % de similaridade, é justamente a pequena fração restante do DNA que é responsável pela variabilidade geneticamente determinada entre indivíduos, o que nos torna diferentes uns dos outros. Estas variações genéticas surgem por mecanismos de "mutação", que são eventos que alteram a sequência do DNA, essa variação também pode ser referida como polimorfismos, cuja variante rara apresenta uma frequência na população superior a um valor arbitrário (frequentemente 0,01), ou seja, uma nova variante genética surge por um evento mutacional, gerando um novo alelo para um determinado *locus* do genoma, e se esse alelo atingir uma frequência mínima de 1 % na população, diz-se que o *locus* é polimórfico (BOSCO; GENRO, 2014). Essas mutações são muito observadas na população, e são frequentemente investigadas como fatores relacionados ao risco de doenças (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2010).

O tipo de polimorfismo mais comum no genoma humano são os polimorfismos de nucleotídeo único - SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), os quais ocorrem, aproximadamente, a cada 300 pb no genoma. Os SNPs descritos no genoma humano são catalogados em um banco de dados público, e identificados por números iniciais por rs (*reference SNP*) (BOSCO; GENRO, 2014). Eles podem ocorrer em regiões codificadoras do gene – exons: regiões não codificadoras do gene – íntrons: regiões regulatórias que afetam o padrão de expressão de mRNA, sua estabilidade e a sua tradução em proteína (BURTON; TOBIN; HOPPER, 2005).

Diferentes mutações presentes em genes que codificam proteínas relacionadas com o metabolismo da vit D e com sua ação na transcrição gênica interferem na concentração e ação desta vitamina (GANGWAR et al., 2015). Mais de 30 SNPs no gene *VDR* foram descritos, mas há quatro variantes, denominadas de acordo com as enzimas de restrição utilizadas na sua identificação, que têm sido mais extensamente estudadas: FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) e TaqI (rs731236) (KAMEL et al., 2014; AGNELLO et al., 2016).

Os polimorfismos BsmI, ApaI e TaqI estão localizados na extremidade 3'-UTR do gene. BsmI e ApaI estão localizados dentro de íntrons, portanto, não resultam em alterações estruturais da proteína VDR, mas regulam a estabilidade do mRNA. Outra variante localizada próximo à região 5'-UTR no sítio de iniciação da tradução do VDR, o polimorfismo FokI, modifica o códon de iniciação da tradução, influenciando a atividade transcricional do gene (ANGNELLO et al., 2016). A figura 3 ilustra a localização destes polimorfismos.

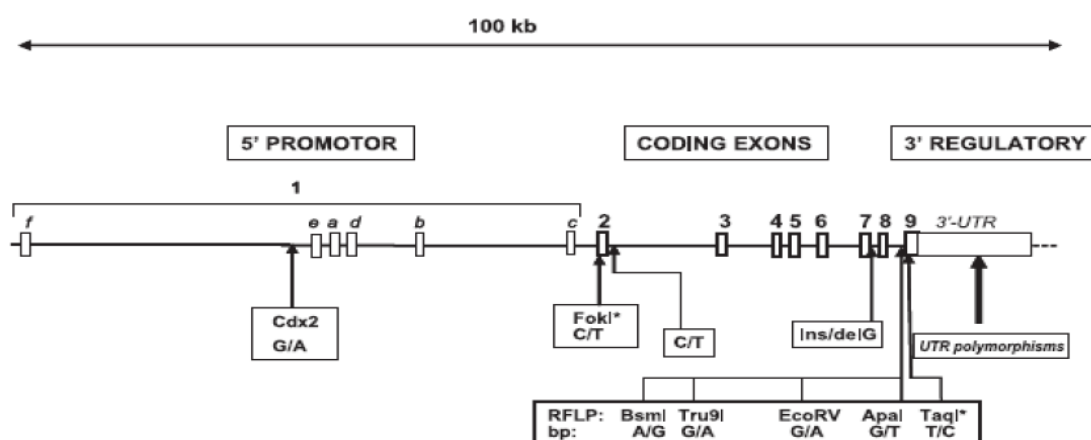


Figura 3. Posição dos polimorfismos do gene *VDR*.

Fonte: Uitterlinden et al., 2004.

O polimorfismo BsmI está localizado no intron 8, posição 63980 e resulta da substituição adenina-guanina (A-G) (YIN et al., 2012). A ausência ou presença de sítios de restrição em cada alelo é denominado com *B* e *b*, e podem ser identificados pela combinação de dois alelos específicos conduzindo a três diferentes possibilidades genóticas: dois genótipos homozigotos (por exemplo, *BB* ou *bb* para o polimorfismo BsmI) e um genótipo heterozigótico (por exemplo, *Bb* para BsmI) (PUNZI et al., 2012). Luo et al. (2012) afirmam em seu estudo que indivíduos que apresentam o alelo *B* tem taxas de expressão do RNAm mais baixas em comparação com os indivíduos sem este alelo.

O polimorfismo FokI resulta da substituição citosina-timina (C-T) na junção do intron 1 com o exon 2, na posição 30920, criando um códon de início adicional (ACG-ATG). A presença da variante FokI, definida como *f* (códon ATG), faz com que a proteína do VDR seja produzida de forma completa (427 aminoácidos), enquanto que a variante FokI (códon ACG), inicia a tradução de outro local e sintetiza uma versão levemente truncada da proteína do VDR, com 3 aminoácidos a menos (424 aminoácidos). A proteína VDR mais curta, parece apresentar maior ativação das células-alvo do que a variante com 427 aminoácidos, resultando numa diferença na modulação dos fatores de transcrição sobre os quais a Vit D atua (ARAI et al., 1997; LANDEL et al., 2016; AGNELLO et al., 2016).

2.3.3 Marcadores do processo inflamatório e estresse oxidativo x polimorfismos do gene VDR

De acordo com publicações anteriores, VDR tem ação em células do sistema imunitário, do sistema renina-angiotensina, endócrino, coração, bem como nas células neoplásicas (influencia proliferação, diferenciação e apoptose). O que justifica uma relação mais forte entre o gene do receptor VDR e doenças como artrite reumatóide, diabetes, hipertensão, obesidade, síndrome metabólica e até mortalidade geral (JAKUBOWSKA-PIETKIEWICZ et al., 2013; SCHÖTTKER et al., 2012).

Pesquisas indicam relação entre polimorfismos do gene *VDR* e marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo. Em estudo realizado em 2003 (OBERMAYER-PIETSCH et al., 2003) em adultos com espondilite, mostrou que valores de PCR foram significativamente associados com os genótipos FokI. Em pacientes caquéticos com câncer, observou-se a hipótese de existir uma associação do polimorfismos BsmI (alelo *b*) com elevados níveis de PCR podendo representar um preditor clínico inicial para o desenvolvimento de uma forma mais agressiva de caquexia (PUNZI et al., 2012).

Filus et al. (2008) mostraram uma influência do BsmI no IMC em adultos poloneses, sugerindo um potencial inflamatório nesses indivíduos. Entretanto, um estudo realizado por Khan et al. (2016) em 3020 participantes do *Jackson Heart Study* não encontraram associação com IMC nem circunferência da cintura em variantes do FokI.

Em idosas insuficientes, a suplementação de megadose de vit D reduziu marcadores inflamatórios (PCR e AGPA) e aumentou CAT. As idosas com o genótipo *BB / Bb* foram mais sensíveis à suplementação em comparação com aquelas com o genótipo *bb* (CAVALCANTE et al., 2015). Este mesmo resultado da maior sensibilidade nos genótipos *BB / Bb* já havia sido observado por Elnenaei et al. (2011), que suplementaram vit D e cálcio em 36 mulheres pós menopausadas e classificadas com baixa densidade mineral óssea.

Estes marcadores de processo inflamatório guardam associação direta com as mais importantes citocinas pró-inflamatórias, uma vez que, a sua secreção é regulada pela interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), importantes mediadores da resposta inflamatória e imune, daí sua relevância em estudos (FOURNIER; MEDJOUBI; PORQUET, 2000).

2.3.4 Perfil glicêmico x polimorfismos do gene VDR

A vit D pode modular a secreção de insulina e também possui efeitos sobre a patogênese da diabetes mellitus. É possível que as variantes genéticas do VDR gene possam contribuir para o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2. Nos últimos anos, muitos estudos relataram as ligações entre o perfil da vit D e DM2 em diferentes etnias e regiões (NOSRATABADI; ARABABADI; SALEHABAD, 2011; ZHAO; YI; ZHANG, 2011; BID et al., 2009; BAI et al., 2008; MALECKI et al., 2003).

As evidência para uma associação entre vit D e homeostase da glicose foi levantada pela primeira vez em relatos de menores concentrações no soro da 1,25-hidroxivitamina D em ratos diabéticos em comparação com animais controle, e posterior restauração da 1,25-hidroxivitamina D para níveis normais após o tratamento com insulina (SHNEIDER et al., 1977). Vários mecanismos biológicos sugerem que a vit D pode contribuir para o desenvolvimento do DM2. Esta evidência inclui a presença de VDR e a expressão de enzimas 1 α -hidroxilase nas células β pancreática, juntamente com a existência de uma vit D elemento de resposta no gene promotor da insulina humana (BLAND et al., 2004; MAESTRO et al., 2003). Com base nesta descoberta, identificou-se uma redução significativa da secreção de

insulina em ratos mutantes do VDR (ZEITZ et al., 2003) e a transcrição desse gene em humanos é ativada pela 1,25- hidroxivitamina D (MAESTRO et al., 2002).

A forma ativada de vit D, 1,25-hidroxivitamina D, pode melhorar a função das células β pancreática, protegê-las do ataque do sistema imunológico, melhorar a sensibilidade do receptor de insulina, e diminuir a resistência à insulina . Para estas funções, a forma ativa da vit D deve ligar-se com o receptor da vit D. Portanto, a expressão do gene *VDR* pode estar envolvida na patogênese e progressão do DM2 (FEI et al., 2016b).

Em meta-análise publicada recentemente por Fei et al. (2016a) a respeito de estudos de associação entre VDR e risco de DM2, a associação significativa foi encontrada para *Bb* vs *bb* e *BB + Bb* vs *bb*, que é semelhante com os resultados de uma outra meta-análise por Wang et al. (2012). Isto implica que o alelo *B* e a variante homozigota *BB* do BsmI foram os fatores de risco para DM2.

Em contraste com polimorfismos BsmI, o polimorfismo FokI está localizada dentro da extremidade 5 'do gene perto da região promotorora. Este polimorfismo não só afeta a função da vit D₃, mas também interrompe a ligação eficiente da vit D com o VDR, prejudicando a função da insulina e levando finalmente ao DM2. Na meta-análise de Wang et al. (2012) e Li et al. (2013), os resultados indicaram que o polimorfismo FokI no gene *VDR* foi significativamente associada com risco de DM2, e o alelo *f* e variante homozigota *ff* podem ser os fatores de risco para DM2.

Apesar de muitos estudos comprovarem esta associação, Fei et al. (2016b) não encontraram qualquer relação significativa entre BsmI ou FokI e DM2 em indivíduos diabéticos e não diabéticos, em diferentes idades, sexo e subgrupos. Estes resultados são semelhantes aos achados nos estudos de Malecki et al. (2003) com diabéticos e não diabéticos poloneses e os resultados não ofereceram evidências da relação entre o polimorfismo BsmI e FokI com variáveis relacionadas ao perfil glicêmico.

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 QUESTÕES ÉTICAS

Inicialmente foi solicitado a autorização da Secretaria Municipal de Saúde de João Pessoa/PB - mediante assinatura de folha de rosto do projeto. Em seguida, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Paraíba (UFPB), atendendo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012), sob número 139/15 (CAAE 43097115.2.0000.5188) (ANEXO A).

Antes de iniciada a coleta dos dados, foi enviada uma carta convite aos pais esclarecendo os propósitos do estudo além do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), para assinatura daqueles que permitiram a participação dos filhos. Os adolescentes convidados que também aceitaram participar, assinaram o Termo de Assentimento (APÊNDICE B).

3.2 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo epidemiológico transversal, envolvendo adolescentes de 15 a 19 anos de idade matriculados em escolas públicas do município de João Pessoa, capital do estado da Paraíba. Segundo Rouquayrol e Almeida Filho (2003), na tipologia aqui proposta, a sua designação precisa é de um estudo observacional-seccional, onde investigações produzem "instantâneos" da situação de saúde de uma população ou comunidade com base na avaliação individual do estado de saúde de cada um dos membros do grupo, possibilitando indicadores globais de saúde para o grupo investigado.

3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

O cálculo amostral considerou 60% (P) de prevalência da insuficiência/deficiência de vit D (PETERS et al., 2009), com uma margem de erro de 10% (D) e um nível de significância de 5% ($Z = 1,96$), utilizando a fórmula $\{[Z^2 \times P \times (100 - P \times C) / D^2]\}$. Perfazendo um total mínimo necessário de 194 adolescentes. No sentido de prever eventuais perdas, foi feito um acréscimo de 10% $[100/(100-10)]$, resultando em 216 unidades amostrais. Ao todo, foram recrutados 229 adolescentes, contudo, completaram todas as etapas do estudo 208 adolescentes. Do universo de 32 escolas públicas da cidade de João Pessoa, e que

atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, a amostra foi selecionada utilizando uma tabela de números aleatórios.

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE DA AMOSTRA

3.4.1 Critérios de exclusão e inclusão

Foram incluídos no estudo os adolescentes que aceitaram participar da pesquisa; que tivessem entre 15 e 19 anos de idade; apresentassem estado cognitivo preservado e não estivessem inseridos em nenhum dos critérios de exclusão citados acima.

Por critério de exclusão, não constituíram à amostra:

- Gestantes ou em amamentação;
- Que fizessem uso de suplementos que continham vit D;
- Uso de medicamentos anticonvulsivantes ou para tratamento de HIV/AIDS;
- Impossibilitados de realizar a avaliação antropométrica;
- Com diagnóstico de doença consuptiva crônica;
- Função hepática ou renal comprometida;
- Etilista ou tabagista crônico.

3.5 COLETA DE DADOS

Para coleta de dados, primeiramente foi realizada aplicação de questionário (APÊNDICE C), onde foram obtidas informações sobre dados pessoais, história clínica e antropometria. Em um segundo momento, foi realizada coleta sanguínea para as devidas análises bioquímicas (bioquímica básica, marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo) e coleta de sangue para obtenção do material genético para posterior análise dos polimorfismos. Na etapa final, os adolescentes participantes receberam o resultado dos exames bioquímicos e da avaliação antropométrica realizada. Os indivíduos que apresentaram alguma anormalidade tanto nos níveis séricos de vitamina D, quanto no estado nutricional receberam orientação para encaminhamento de um serviço especializado para receber o devido tratamento.

3.5.1 Dados Pessoais

Foram coletadas informações como: nome completo do adolescente, sexo, data de nascimento, estado civil e cor da pele auto referida (branca, negra, parda, amarela ou indígena).

3.5.2 História Clínica

A história clínica foi analisada através dos antecedentes patológicos familiares e pessoais, uso de medicamentos e suplementos vitamínicos.

A aferição da pressão arterial diastólica e sistólica foi realizada através do método indireto, com técnica auscultatória com uso do esfigmomanômetro aneróide devidamente calibrado, de acordo com os protocolos estabelecidos pela VII Diretriz de Hipertensão Arterial (SBC, SBH, SBN, 2016). Foi realizada em duas aferições para cada adolescente no braço direito, com intervalo entre cinco e 10 minutos entre elas, estando os mesmos sentados, em posição relaxada. Tomando-se como valores tensionais finais, a média das medidas como a pressão arterial do indivíduo (SBC, SBH; SBN, 2016). A interpretação dos valores de PA obtidos dos adolescentes, levou em consideração a classificação do quadro 4.

Quadro 4. Classificação da pressão arterial para crianças e adolescentes*

Classificação**	Percentil para PAS e PAD
Normal	PA < percentil 90
Limítrofe	PA entre percentis 90 e 95 ou se a PA exceder 120/80 mmHg sempre < percentil 90 até < percentil 95
Hipertensão estágio 1	Percentil 95 a 99 + 5 mmHg
Hipertensão estágio 2	PA > percentil 99 +5 mmHg

*Modificada do *The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents*. **Para idade, sexo e percentil de estatura. PA: pressão arterial; PAS: pressão arterial sistólica. PAD: pressão arterial diastólica.

Fonte: SBC, SBH, SBN, 2016.

3.5.3 Avaliação antropométrica

Os dados antropométricos de peso e estatura foram coletados de acordo com procedimentos descritos no *Anthropometric Standardization Reference Manual*, de Lohman,

Roche e Martorell (1991) e nas recomendações da Organização Mundial da saúde (WHO, 1995). Todas as medidas foram realizadas por examinadores treinados e em duplicata.

O peso foi verificado a partir de balança digital (modelo Techline® BAL-20 PM com capacidade para 150 kg e intervalo de 100g), com o adolescente descalço, apenas com o uniforme escolar, sendo colocado ereto, com os braços esticados ao longo do corpo e o mais imóvel possível na região central da balança, sem nenhum tipo de apoio, olhando para frente.

A altura foi aferida por estadiômetro vertical com haste metálica com capacidade de 2,10m e sensibilidade de 0,5cm (modelo Wiso® 210), com o adolescente ereto, com a cabeça livre de adereços, descalço, com os pés juntos, calcanhares, ombros e nádegas encostados na haste vertical, com os braços pendentes ao longo do corpo e o olhar dirigido para o horizonte, no momento da aferição.

Para classificação do estudo nutricional antropométrico foram utilizadas como referência as curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006), cujo público abrange crianças e adolescentes (dos 10 aos 19 anos). Foram utilizadas as curvas de estatura/ idade e IMC/ idade considerando os pontos de corte preconizados pela OMS (2006) (Figura 4).

Figura 4. Valores críticos e índices antropométricos para classificação do estado nutricional de adolescentes

VALORES CRÍTICOS		ÍNDICES ANTROPOMÉTRICOS PARA ADOLESCENTES	
		IMC-para-idade	Estatura-para-idade
< Percentil 0,1	< Escore-z -3	Magreza Acentuada ¹	Muito baixa estatura para a idade
≥ Percentil 0,1 e < Percentil 3	≥ Escore-z -3 e < Escore-z -2	Magreza	Baixa estatura para a idade
≥ Percentil 3 e < Percentil 15	≥ Escore-z -2 e < Escore-z -1	Eutrofia	Estatura adequada para a idade ^{2,3}
≥ Percentil 15 e ≤ Percentil 85	≥ Escore-z -1 e ≤ Escore-z +1		
> Percentil 85 e ≤ Percentil 97	> Escore-z +1 e ≤ Escore-z +2	Sobrepeso	
> Percentil 97 e ≤ Percentil 99,9	> Escore-z +2 e ≤ Escore-z +3	Obesidade	
> Percentil 99,9	> Escore-z +3	Obesidade grave	

Fonte: Adaptado de Organización de la Salud. Curso de Capacitación sobre la evaluación del crecimiento del niño versión 1 – Noviembre 2006. Ginebra, OMS, 2006.

FONTE: OMS (2006).

As medidas das circunferências da cintura (CC) foram realizadas com o indivíduo em pé, em posição ereta, sob as roupas e no final de uma expiração normal com o auxílio de uma fita métrica não elástica e flexível de 200 cm com precisão de 0,1 mm (modelo Cescorf®),

utilizando-se a média para o valor final. O ponto de mensuração utilizado foi o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para obtenção dos valores das circunferências, circundou-se com a fita o local do corpo que se desejava medir, sendo a mesma colocada com firmeza, sem esticar excessivamente, evitando-se assim a compressão do tecido subcutâneo (CALLAWAY et al., 1988). Para classificação da CC, ainda são escassos estudos que associem a variação do crescimento físico em cada faixa etária. Portanto, foram consideradas condições de risco os pontos de corte acima do percentil 80, propostos por Fernández et al (2004) para todas as etnias.

3.5.4 Coleta e avaliação do material bioquímico

Todos os participantes foram informados sobre a necessidade do jejum de 12h e as coletas sanguíneas foram realizadas nas escolas em datas pré-agendadas. As amostras de sangue foram coletadas por equipe devidamente capacitada e os tubos acondicionados em caixas térmicas durante o período da coleta de sangue, com permanência do material coletado por no máximo duas horas. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e Saúde (LETFADS- UFPB), para avaliação das funções renal e hepática, através das análises de uréia e creatinina, e ALT (alanina amino transferase) e AST (aspartato amino transferase) respectivamente; e avaliação complementar através da análise de glicemia, perfil lipídico (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos), ácido úrico, marcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR) e alfa 1 glicoproteína ácida (AGPA). Todas as análises foram realizadas através de kits comerciais da marca Labtest® (Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Em parceria com o LETFADS- UFPB, foram avaliados também os parâmetros para atividade oxidante por meio do malondialdeído (MDA) e capacidade antioxidante total (CAT).

Análises de 25-hidroxivitamina D, paratormônio (PTH) e cálcio sérico (Ca) foram realizadas em laboratório contratado.

3.5.4.1 Avaliação do perfil lipídico e glicêmico

A determinação das concentrações de colesterol total, triglicerídeos e glicose foram realizadas pelo método enzimático proposto por Trinder (1969) e as absorbâncias obtidas no comprimento de onda de 500, 505 e 505 nm, respectivamente. O HDL-c foi quantificado por método manual. Para este procedimento, um volume de 0,25 mL de substância precipitante

foi adicionado a 0,25 mL de amostra de soro contidas em microtubos e misturadas vigorosamente por 30 segundos. Em seguida, foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante retirado e colocado em alíquotas contendo 1 mL do reagente 1 do kit Colesterol Liquiform®, e posto em banho-maria por 10 minutos. Por fim, foi feita a leitura em espectrofotômetro ultravioleta (Biospectro, modelo SP-220/Brasil), a 500nm.

Os valores de triglicérides foram determinados através do modelo enzimático proposto por Trinder (1969), e a absorbância foi obtida no comprimento de onda de 505 nm. Os valores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) foram obtidos pela equação de Friedwald: $[LDL-c = (CT - HDL-c) - (TG/5)]$ (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

Os valores de referência para as variáveis do perfil lipídico e glicêmico de adolescentes está apresentado no quadro 5.

Quadro 5. Valores de referência para as variáveis do perfil lipídico e glicêmico de crianças e adolescentes (SBC, 2007).

Baixo	Desejável	Limítrofe	Elevado
CT (mg/dL)	< 150	150-169	≥ 170
HDL-c (mg/dL)	≥ 45		
LDL-c (mg/dL)	< 100	100-129	≥ 130
TG (mg/dL)	< 100	100-129	≥ 130
Glicose (mg/dL)	< 100		

FONTE: SBC (2007).

3.5.4.2 Avaliação de atividade de enzimas hepáticas e renais

Para fins de seleção dos indivíduos dentro dos critérios de inclusão também foram avaliadas as funções renais e hepáticas (ureia, creatinina, ácido úrico, ALT e AST).

As atividades da ALT e da AST foram quantificadas em modo cinético, em soro, por meio dos Kits comerciais ALT Liquiform e AST Liquiform (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações foram determinadas no analisador Labmax 240 premuim (Lagoa Santa – MG, Brasil), no comprimento de onda de 340 nm.

As concentrações de creatinina foram quantificadas em soro, por meio do kit comercial Creatinina K, conforme instruções do fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brasil) em comprimento de onda de 510 nm. Em relação às concentrações de uréia, as mesmas foram quantificadas em soro por meio do kit comercial Uréia UV Liquiform, conforme orientação

do fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), a absorbância foi obtida no comprimento de onda de 340 nm. As concentrações de ácido úrico foram quantificadas em soro pelo método enzimático-Trinder, por meio do kit comercial Ácido Úrico Liquiform (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), conforme orientações do fabricante. A absorbância foi obtida no comprimento de onda de 520 nm.

Foi adotado como referência de normalidade, valores entre <40 U/L para AST e <55 U/L para ALT (THAPA; WALIA, 2007).

3.5.4.3 Vitamina D (25-hidroxivitamina D)

A análise sérica de 25-hidroxivitamina D foi determinada por meio do imunoensaio quimioluminescente (UniCel DxI 800 – Beckman Coulter). A classificação do status da vitamina D foi com base nos valores de referência usados pela *Endocrine Society* (HOLLICK, 2011b), que considera como níveis deficientes quando a 25-hidroxivitamina D <20 ng/mL; insuficiente, quando a 25-hidroxivitamina D $\geq$ 20 e <30 ng/mL; e suficiente quando a 25-hidroxivitamina D $\geq$ 30 e <100 ng/mL.

3.5.4.4 Paratormônio (PTH) e Cálcio sérico (Ca)

A análise de PTH foi realizada por laboratório particular através do imunoensaio quimioluminescente (UniCel DxI 800 – Beckman Coulter), sendo utilizado como valores de referência 7 a 53 pg/mL, segundo Silva et al. (2008).

O exame de cálcio sérico também foi realizado em laboratório particular pela técnica colorimétrica automatizada por meio dos kits comerciais de Cálcio Arzenato (Bioclin®). Os valores de referência para a normalidade foram estabelecidos entre 8,4 e 10,2 mg/dL (DUARTE et al., 2005).

3.5.4.5 Avaliação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado por meio da determinação de um marcador oxidante, produto final da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) e um marcador de atividade antioxidante, a capacidade antioxidante total (CAT).

A atividade oxidante foi quantificada por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Para isto, 250 µl de amostra do plasma foi adicionado ao cloreto de potássio (KCl) onde foi incubado em banho-maria a 37° C por 60 minutos. Em seguida, a mistura foi precipitada com ácido perclórico AA 35% e centrifugado a 1400 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e adicionado 400 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado a 100° C por 60 minutos. Após o resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro ultravioleta (Biospectro, modelo SP-220/Brasil), a um comprimento de onda de 532 nm, em temperatura ambiente.

A determinação da capacidade antioxidante do plasma foi realizada por meio do método do DPPH. O procedimento foi baseado no método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) na qual uma alíquota de 1,25 mg de DPPH que foi diluída em 100 mL de etanol, mantida sob refrigeração e protegida da luz (com papel alumínio ou vidro âmbar). Em tubos apropriados para centrífuga foram adicionados 3,9 mL da solução de DPPH e em seguida acrescentou-se 100 µL do plasma. Os tubos foram agitados no vórtex e deixados em repouso por 30 minutos. Em seguida foram centrifugados a 10.000 rpm à temperatura de 20°C por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para a realização da leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante (%), onde:

$$AOA = 100 - [DPPH \cdot R]_t / [DPPH \cdot R]_B \cdot 100$$

Sendo $[DPPH \cdot R]_t$ e $[DPPH \cdot R]_B$ a concentração de DPPH• remanescente após 30 minutos, avaliadas na amostra (t) e no branco (B) preparado com água destilada.

3.5.4.6. Avaliação de marcadores inflamatórios

Para a análise da PCR foi utilizado o método imunonefelométrico, sendo considerados valores de referência para PCR entre 1 e 3 mg/L com base na IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemia e prevenção da aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2007), que considera fator de risco para DCV proteína C reativa de alta sensibilidade > 3 mg/L (na ausência de etiologia não esclerótica).

Para a análise de AGPA foi utilizado o método imunonefelométrico, sendo adotado como referência de normalidade, valores entre 40 a 150 mg/dl (FERREIRA; PAIVA; ANDRADE, 2006).

3.5.4.7 Análise genética

O DNA cromossomal foi obtido de leucócitos. Para isso, foram coletados 4ml de sangue mediante punção venosa, em tubos estéreis contendo 7,2mg de K3EDTA. As amostras foram enviadas ao laboratório de análise e na impossibilidade de realizar a extração do DNA no mesmo dia, as amostras eram estocadas sob -20°C, por um período máximo de 1 mês. Para extração do DNA seguiu-se o seguinte protocolo: as amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10mM Tris-HCl pH 8, 5mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 1% afim de provocar a hemólise das hemácias deixando, no entanto, os leucócitos permanecerem íntegros. Em seguida, procedeu-se a centrifugação à 3.200 rpm para descarte do sobrenadante. Esse processo foi repetido por 3 vezes no intuito de obter um precipitado de leucócitos livres de resquícios de hemoglobina.

O precipitado foi então ressuscitado em solução de lise contendo 10mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em banho-maria. Após 7 horas de incubação foram adicionados 500µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 11.471rpm a 4°C e 700µl do sobrenadante foram transferidos para novo tubo onde se obteve a precipitação do DNA com 540µl de isopropanol. Posteriormente, o precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (10.620 rpm por 5min), seco e ressuscitado em tampão Tris-EDTA pH 8,0 (Adaptado de MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).

Análise dos polimorfismos BsmI (rs1544410) e FokI (rs2228570)

Os genótipos foram determinados por Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Tamanho de Restrição (PCR-RFLP). Para a variante rs1544410 os primers: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) e 5'-AACCAGCGGGAA GTCAAGGG-3' (antisense) (PANI et al., 2000). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (10 minutos), 30 ciclos de desnaturação (1 minuto à 94°C), anelamento (1 minuto à 58°C) e extensão (3 minutos à 72°C), com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 825 pb foi digerido com *BsmI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico *b* gerando dois fragmentos (650 pb e outro de 175 pb) enquanto o alelo ancestral *B* permanece com 825 pb.

Para a variante rs2228570, os primers: 5'-

AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3_' (sense) e 5_-
 ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3_' (antisense) (CHIU; CHUANG; YOON, 2001). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (5 minutos), 35 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 60°C) e extensão (30 segundos à 72°C), com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 265 pb foi digerido com *FokI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico *f* gerando dois fragmentos (196 pb e outro de 69 pb), enquanto o alelo ancestral *F* permanece com 265 pb.

Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata 0,5%.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que apresentaram distribuição não Gauseana foram transformadas em logarítimo natural e retestadas. Na distribuição dos genótipos, as variáveis que apresentaram distribuição normal, foram apresentadas sob a forma de média e desvio padrão (DP) e para as variáveis não-normais foram descritas sob a forma de mediana e intervalo interquartil (IQ). As diferenças entre grupos de genótipos foram testadas pela ANOVA one-way ou seu correspondente não paramétrico, teste de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's. Para a associação entre os padrões de genotipagem e os parâmetros bioquímicos, foi utilizado o modelo de regressão logística. Em seguida, as variáveis do perfil lipídico, estresse oxidativo e inflamatório que apresentaram $p\text{-valor} < 0,20$ foram ajustadas para idade, IMC e CC. Adotou-se um nível de significância quando $p\text{-valor} < 0,05$. A análise estatística foi desenvolvida através do Software STATA 14 (StataCorp®; USA).

REFERÊNCIAS

- ABESO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes Brasileiras da Obesidade**. 4a Edição, 2016. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/92/57fccc403e5da.pdf> . Acesso em: 16 de setembro de 2014.
- AGNELLO L. et al. Vitamin D receptor polymorphisms and 25- hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. **Neurol Sci**. v. 37, n. 2, p. 261-7, 2016.
- ARAI, H. et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. **J Bone Miner**, v. 12, n. 6, p. 915-21, 1997.
- ASEMI, Z. et al. Vitamin D Supplementation Affects Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein, Insulin Resistance, and Biomarkers of Oxidative Stress in Pregnant Women. **The J. of Nutr**, v. 143, n. 9, p. 1432-1438, 2013.
- ASHWELL, M. et al. UK Food Standards Agency Workshop Report: an investigation of the relative contributions of diet and sunlight to vitamin D status. **Br J Nutr**, v. 104, n. 4, p. 603-11, 2010.
- BAI, R. et al. Relationship of vitamin D receptor (VDR) FokI gene polymorphism with type 2 diabetes and the combined type 2 diabetes and atherosclerosis. **Chinese J Diabetes**, v.17, p. 892-4, 2008.
- BARKER, T. et al. Supplemental vitamin D increases serum cytokines in those with Initially low 25-hydroxyvitamin D: A randomized, double blind, placebo-controlled study. **Cytokine**, v. 71, n. 1, p. 132-138, 2015.
- BID, H. K. et al. vitamin d receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a north Indian study. **J Med Sci**, v. 63, n. 5, p. 187-94, 2009.
- BLAND R. et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 89-90, n. 1-5, p. 121-5, 2004.
- BORGES, M.C; MARTINI, L.A; ROGERO, M.M. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. **Nutrition**. v. 27, n.1, p. 399-404, 2011.
- BORRADALE, D.; KIMLIN, L. Vitamin D in health and disease: an insight into traditional functions and new roles for the 'sunshine vitamin'. **Nutr Res Rev**, v. 22, n. 2, p. 118-36, 2009.
- BOSCO, S. M. D.; GENRO, J. P. **Nutrigenética e Implicações na Saúde Humana**. Editora Atheneu. 1a Edição. São Paulo, 2014.

BRAIDMAN, I. P.; ANDERSON, D. C. Extra-endocrine functions of vitamin D. **Clin Endocrinol**, v.23, n.4, p. 445-60, 1985.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. **Censo Demográfico, 2010**. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/>. Acesso em: 16 de setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Atenção Integral à Saúde de Adolescentes e Jovens na Promoção, Proteção e Recuperação da Saúde**. 1ª edição. Brasília, DF, 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_atencao_saude_adolescentes_jovens_promocao_saude.pdf. Acesso em: 31 de agosto de 2016.

BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. A importância do consumo dietético de cálcio e vitamina D no crescimento. **J. Pediatr**, v. 84, n. 5, 2008.

BURTON, D. J.; ENION, D.; SHAW, D. L. Pyomyositis of the piriformis muscle in a juvenile. **Ann R Coll Surg Engl**, V.87, n. 1, p. 9-12, 2005.

CABRAL, M. A. et al. Prevalence of vitamin D deficiency during the summer and its relationship with sun exposure and skin phototype in elderly men living in the tropics. **Clin. Interv. Aging**, v. 8, n. 1, p. 1347-1351, 2013.

CALLAWAY, C. W. et al. Circumferences. in: lohmantg, rocheaf, martorell r, editors. anthropometric standardization reference manual. **Champaign: Human Kinetics Books**, p. 39-54, 1988.

CALVO, M. S.; WHITING, S. J.; BARTON, C. N. Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1710-6, Dec 2004.

CAVALVANTE, I. G.M. et al. Effect of vitamin D₃ supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D₃ megadose reduces inflammatory markers. **Exp Gerontol**, v. 66, p. 6-10, 2015.

CHIU, K. C.; CHUANG, L. M.; YOON, C. The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. **Med Genet**, v. 2, 2001.

COBAYASHI, F.; HATZLHOFFER, L.; CARDOSO, M. A. 25-hidroxivitamin D₃ levels, BsmI polymorphism and insulin resistance in Brazilian Amazonian Children. **Int J Mol Sci**, v. 16, p. 12531-12546, 2015.

CODONER-FRANCH, P. et al. Vitamin D Status is Linked to Biomarkers of Oxidative Stress, Inflammation, and Endothelial Activation in Obese Children. **Pediatr**, v.161, n.1, p. 848-854, 2012.

COSTA, A. L. F.; DUARTE, D. E.; KUSCHNIR, M. C. C. A família e o comportamento alimentar na adolescência. **Adolesc Saúde**, v.7, n.3, p.52-8, 2010.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 5 ed. São Paulo: Manole, 2016.

CUREAU, F. V. et al. Does body mass index modify the association between physical activity and screen time with cardiometabolic risk factors in adolescents? Findings from a country-wide survey. **Int J Obes**, v. 41, n. 4, p. 551-559, 2017.

DECKER, C. J.; PARKER, R. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. **Curr Opin Cell Biol**, v.7, n.3, p. 386-92, 1995.

DOBNIG, H. A review of the health consequences of the vitamin D deficiency pandemic. **J. Neurol. Sci**, v. 311, n. 1-2, p. 15–18, 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n.1, p. 47–95, 2002.

DUARTE, P. S. et al. Relação entre os níveis séricos de cálcio e paratormônio e a positividade da cintilografia das paratiróides com sestamibi: análise de 194 pacientes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 49, n. 6, p. 930-937, 2005.

DURRIN, L. K. et al. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. **Biochim Biophys Acta**, v.1453, n.3, p. 311-20, 1999.

EISENSTEIN, E. Adolescência: definições, conceitos e critérios. **Adolesc. Saúde**, v. 2, n. 2, p. 1-2, 2005.

ELNENAEI, M. O. et al. Genomic and metabolic patterns segregate with responses to calcium and vitamin D supplementation. **Br J Nutr**, v. 105, p. 71-9, 2011.

FEI, Y. M. et al. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta analysis. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 25, n. 3, p. 614-624, 2016a.

FEI, Y. U.; CHONGJIAN, W. A. N. G.; LING, W. A. N. G. et al. Study and evaluation the impact of vitamin D receptor variants on the risk of type 2 diabetes mellitus in Han Chinese. **J Diabetes**, v. 9, n. 3, p.275-284, 2016b.

FELDMAN, D.; PIKE, J.W.; GLORIEUX, F.H. **Vitamin D**. Academic Press, 2ª Ed p. 1892, 2005.

FERNÁNDEZ, J.R. et al. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. **J. Pediatr**, v.145, n. 4, p. 439-444, 2004.

FERRARI, C. K. B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional

studies. **J Cell Mol Biol**, v.7, n. 1, p.1-15, 2008.

FERREIRA, B. M.; PAIVA, L. V.; ANDRADE, A. Validação do reagente alfa-1-glicoproteína ácida turbidimétrico, 2006.

FILUS, A. et al. Relationship between vitamin D receptor BsmI and Fok I polymorphism and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. **The aging Male**, v. 11, n. 3, p. 134-139, 2008.

FOURNIER T.; MEDJOUBI-N N.; PROQUET D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochim Biophys Acta**, v.71, p. 1482-157, 2000.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE J Port Gastreterol**, v. 20, n. 5. p. 199-206, 2013.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GALVÃO, L. O. et al. Considerações atuais sobre a vitamina D. **Brasília Med**, v. 50, n. 4, p. 324-332, 2014.

GANGWAR A. K. et al. Role of Vitamin-D in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. **Indian J Physiol Pharmacol**, v.59, n.1, p. 94-9, 2015.

GIANNINI, D.T. Recomendações nutricionais do Adolescente. **Adolesc. Saúde**, v. 4, n. 1, p. 12-18, 2007.

GIANNINI, D. T. C-reactive protein in Brazilian adolescents: distribution and association with metabolic syndrome in ERICA survey. **Eur J Clin Nutr**, v. 71, n. 10, p. 1206-1211, 2017.

GOUGH, A. et al. Effect of vitamin D receptor gene alleles on bone loss in early rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 25, n. 5, p. 864-8, 1998.

GROSS, C. et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. **J Bone Miner Res**, v.11, n. 12, p. 1850-5, 1996.

GUILLOT, X. et al. Vitamin D and Inflammation. **Join Bon Spine**, v. 77, n. 6, p. 552-557, 2010.

HEANEY, R.P. What is vitamin D insufficiency? And does it matter? **Calcif Tissue Int**, v. 92, n. 2, p. 177-183, 2013.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, 2011a.

HOLICK, M. F. et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. **J Cim Endocrinol Metab**, v. 96, n. 4, p. 1153-1158, 2012.

HOLICK, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **J Clin Invest**, v. 116, n. 8, p. 2062–2072, 2006.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune disease, cancers, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6, p. 1678S-88S, 2004.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N. Enge. J. Med.**, v. 357, n. 3, p. 266-281, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D: A D-Lightful Solution for Health, **J. Investig Med**, v. 59, n. 6, p. 872-80, 2011.

HOLICK, M.F.; CHEN, T.C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 87, n. 4, p. 1080-1086, 2008.

HORST, R. L. et al. 24-Hydroxylation of 1,25-dihydroxyergocalciferol. An unambiguous deactivation process. **J Biol Chem**, v. 261, n. 20, p. 9250-6, 1986.

HOUGHTON, L. A.; VIETH, R. The case against ergocalciferol, vitamin D₂, as a vitamin supplement. **Am J Clin Nutr**, v. 84, p. 694-697, 2006.

HUGHES, D. J. et al. Common variation in the vitamin D receptor gene and risk of inflammatory bowel disease in an Irish case-control study. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 9, p. 807-12, 2011.

IOM- COMMITTEE ON DIETARY REFERENCE INTAKES FOR VITAMIN D AND CALCIUM. Vitamin D dose requirements for fracture prevention. **N Engl J Med**, v.4, n.367, p. 1368-14, 2012.

JAKUBOWSKA-PIETKIEWICZ, E. et al. Effect of vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism on body height in children- own experience. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 23, n. 67, p. 873-8, 2013.

JOLLIFFE, D. A. et al. Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: Review of genetic association studies. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 15, p.30153-9, 2015.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. Variação Genética: sua Origem e Detecção. **Genética Médica**. Seattle, Washington: Ed Elsevier, p. 26-55, 2010.

KAMEL, M. M. et al. Impact of vitamin D receptor gene polymorphisms in pathogenesis of Type-1 diabetes mellitus. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 12, p. 5505-10, 2014.

KHAN, R. J. et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Abdominal Visceral Adipose Tissue Volume and Serum Adipokine Concentrations but Not with Body Mass Index or Waist Circumference in African Americans: The Jackson Heart Study. **J Nutr**, v. 146, n. 8, p. 1476-82, 2016.

KIMBALL, S.; FULEIHAN, G. H.; VIETH, R. Vitamin D: a growing perspective. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 45, n. 4, p. 339-414, 2008.

KULIE, et al. Vitamin D: An Evidence-Based Review. **J Am Board Fam Med**, v. 22, p. 698-706, 2009.

LI, L. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: A meta-analysis. **Arch Med Res**, v. 44, p. 235-241, 2013.

LO, C. W. et al. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. **Am J Clin Nutr**, v. 42, n. 4, p. 644-9, 1985.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. **Anthropometric standardization reference manual**. Ed. Champaign, Ill. : Human Kinetics Books, 1991.

LOPES, S.B.; MOREIRA, M.C.N. Políticas Nacionais de Atenção Integral à Saúde de Adolescentes e Jovens e à Saúde do Homem: interlocuções políticas e masculinidade. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 18, n. 3, p. 743-752, 2013.

LUO, X. Y.,. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. **Lupus**, v. 21, n. 1, p. 53-9, 2012.

MACEDO, M.R.C. **Políticas Públicas e Promoção da Saúde dos Adolescentes e Jovens do Sexo Masculino**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

MAEDA, S. S.,. The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 12, p. 1653-9, 2007.

MAEDA, S. S. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, n. 5, p. 411-433, 2014.

MAESTRO, B. et al. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 84, n. 2-3, p. 223-30, 2003.

MAESTRO, B. et al. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). **Cell Biochem Funct**, v. 20, n. 3, p. 227-32, 2002.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J.L. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 13ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MALECKI et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 111, n. 8, p. 505-9, 2003.

MARTINI LA et al. Prevalence and correlates of calcium and vitamin D status adequacy in adolescents, adults, and elderly from the Health Survey-São Paulo. **Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 845-50, 2013.

MATSUOKA, L. Y. et al. Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D₃. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 75, n. 4, p. 1099-103, Oct 1992.

MESQUITA, K. C.; IGREJA, A. C. S. M; COSTA, I. M. C. Dermatite atópica e vitamina D: fatos e controvérsias. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 6, p. 945-53, 2013.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MISRA, M. et al. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. **Pediatrics**, v. 122, n. 2, p. 398-417, 2008.

MOURÃO, D. M. et al. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Rev Nutr**, v 18, n. 4, p. 529-539, 2005.

NATRI, A. M. et al. Bread fortified with cholecalciferol increases the serum 25-hydroxyvitamin D concentration in women as effectively as a cholecalciferol supplement. **J. Nutr**, v. 136, p. 123-7, 2006.

NESBY Q'DELL, S. et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am J Clin Nutr**, v.76, n.1, p. 87-92, 2002.

NORMAN, A.W.; BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Exp. Biol. Med**, v. 235, n. 9, p. 1034-1045, 2010.

NORRIS, A. L. et al. Circulating Oxidized LDL and Inflammation in Extreme Pediatric Obesity. **Obesity**, v 19, n. 7, p. 1415-1419, 2011.

NOSRATABADI, R.; ARABADI, M. K.; SALEHABAD, V. A. Vitamin D receptor polymorphisms in type 2 diabetes in southeastern Iranian patients. **Lab Med**, v. 42, n 32-34, 2011.

OBERMAYER-PIETSCH et al. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism, bone density and inflammatory activity of patients with ankylosing spondylitis. **Osteoporos Int**, v. 14, p. 995–1000, 2003.

OHKAWA, H; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analyt Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, R. M. et al. Association of vitamin D insufficiency with adiposity and metabolic disorders in Brazilian adolescents. **Public Health Nutr**, v. 17, n. 4, p.1-8, 2013.

OMS- Organização Mundial da Saúde, Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. **World Health Organization**, Geneve, 2006.

OMS- Organização Mundial da Saúde, Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids e Fundo de População das Nações Unidas. **Seen but Not Heard: Very young adolescents aged 10-14 years**. Genebra: UNAIDS, 2004.

ONU- Organização das Nações Unidas, Departamento de Assuntos Sociais e Econômicos, Divisão de População. **World Population Prospects**. 2008. Disponível em: www.esa.un.org/unpd/wpp2008/index.htm. Acesso: 15 out. 2016.

OUTILA, T. A. et al. Bioavailability of vitamin D from wild edible mushrooms (*Cantharellus tubaeformis*) as measured with a human bioassay. **Am J Clin Nutr**, v. 69, p. 95-8, 1999.

OVESEN L.; BRAT C.; JAKOBSEN L. Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin metabolite to be reckoned with? **Ann Nutr Metab**, v. 47, n. 34, p.107-113, 2003.

PANI, M. A. et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. **Diabetes**, v. 49, n. 3, p. 504-7, 2000.

PEDROSA, M. A. C.; CASTRO, M. L. Role of vitamin D in the neuro-muscular function. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 4, p. 495-502, 2005.

PETERS, B.S.E. et al. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. **Ann Nutr Metab**, v. 54, n. 1, p. 15-21, 2009.

PIERONI, I. Níveis de proteína C reativa circulante em adultos e relação com o índice de massa corporal. **Rev Nut**, v. 29,n. 1, p. 133, 2003.

PINHEIRO, M. M. et al. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women – The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutr J**, v. 8, n. 6, p. 1-8, 2009.

PUNZI, T. et al. C-reactive protein levels and vitamin d receptor polymorphisms as markers in predicting cachectic syndrome in cancer patients. **Mol Diagn Ther**, v. 16, n. 2, p. 115-24, 2012.

ROUQUAYROL, M. Z.; FILHO, N. A. **Epidemiologia e Saúde**. Ed. Medsi, 6ª Ed. Rio de Janeiro, 2003.

SAMPAIO, R.C; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. Motriz: **Rev. de Educ. Física**, v. 16,n. 2, p. 506-526, 2010.

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 Pediatr**, v. 12, n. 62, p. 1-7, 2012.

SARAIVA, G.L. et al. Prevalence of vitamin D deficiency, insufficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly inpatients and living in the community of the city of São Paulo, Brazil. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 51, n. 3, p. 437-442, 2007.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia Departamento de Aterosclerose.IV diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v. 88(1 supl.1), p. 2-29, 2007.

SBC/SBH/SBN. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 107(3 supl.3), p. 1-83, 2016.

SBRT/ Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **Dossiê Técnico Fortificação de Alimentos**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, Abril 2007.

SCHÖTTKER, B. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and overall mortality. A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **Ageing Res Rev**. v. 12, p. 708-18, 2013.

SHAB-BIDAR, S. et al. Improvement of vitamin D status resulted in amelioration of biomarkers of systemic inflammation in the subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 28, n. 5, p. 424-430, 2012.

SHEA, M. K. et al. Vitamin K and Vitamin D Status: Associations with Inflammatory Markers in the Framingham Offspring Study. **Am J Epidemiology**, v. 167, n. 3, p. 313–320, 2008.

SILVA, B. C. C. Prevalence of vitamin D deficiency and its correlation with PTH, biochemical bone turnover markers and bone mineral density, among patients from ambulatories. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 3, p. 482-8, 2008.

SILVA, S. H.; MORESCO, R. N. Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda. **Scientia Medica**, v. 21, n. 3, p. 132-142, 2011.

SILVA, S. M.C.S.; MURA, J.D.P. **Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia**. 2ª edição. São Paulo: Roca, 2011.

SIMMONS, J. D. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms: association with Crohn's disease susceptibility. **Gut**, v. 47, n. 2, p. 211-4, 2000.

SPEER, G. et al. Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and in android type obesity. **Eur J Endocrinol**, v. 144, n. 4, p. 385-9, 2001.

SZMITKO, P. E. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. **Circulation**, v. 108, p. 1 917-1923, 2003.

THAPA, B. R.; WALIA, A. Liver function tests and their interpretation. **Indin journal of pediatrics**, v. 74, n. 7, p. 663-671, 2007.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. **Annals of Clin. Bioc**, v. 6, n. 1, p. 24-27, 1969.

TSIARAS, W. G. WEINSTOCK, M. A. Factors influencing vitamin D status. **Acta Derm Venereol**, v. 91, n. 2, p. 115-24, 2011.

UITTERLINDEN, A. G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v. 338, n. 2, p. 143-156, 2004.

UNICEF- Fundo das Nações Unidas para Infância. **Situação mundial da infância - 2011**. Brasília (DF): Escritório da Representação do UNICEF no Brasil; 2011. Disponível em: http://www.unicef.org/brazil/pt/br_sowcr11web.pdf. Acesso em: 15 out. 2016.

VALDIVIELSON, J. M.; FERNANDEZ, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. **Clin Chim Acta**, v. 1, n. 2, p. 1-12, 2006.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALTUEÑA, J. et al. Factors associated with vitamin D deficiency in European adolescents: The Helena study. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 59, p. 161-171, 2013.

VIETH, R. et al. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. **Am J Clin Nutr**, v.85, n.3, p. 649-650, 2007.

WALTER, M.F. et al. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the prevent study. **J Am Coll Cardiol**. v.44, p. 1996-2002, 2004.

WANG, T.T. et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes. **Mol Endocrinol**, v. 19, p. 2685-95, 2005.

WANG, Q. et al. Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (*FokI*, *ApaI*, *BsmI*, *TaqI*) of vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 10, p. 9405-14, 2012.

WHO. World Health Organization. Physical status: **The use and interpretation of anthropometry**. Geneva: WHO, 1995.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods Mol Biol**, v.108, p.101-6, 1998.

YIN, X. et al. Serum 25(OH)D is inversely associated with metabolic syndrome risk profile among urban middle-aged Chinese population. **Nutr J**, v.9, p 11-68, 2012.

ZHANG, H. et al. Vitamin D status and its association with adiposity and oxidative stress in school children. **Nutrit**, v. 30, p. 1040-1044, 2014.

ZHAO, Y.; YI, B.; ZHANG, H. Vitamin D receptor gene polymorphism and the susceptibility of type 2 diabetes mellitus. **J Clin Research**, v. 28, p. 668-70, 2011.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa: POLIMORFISMO BsmI, ApaI, TaqI e FokI DO GENE VDR: ASSOCIAÇÃO COM A HIPOVITAMINOSE D, ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ADOLESCENTES DE ESCOLAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA.

O objetivo do estudo é estimar a prevalência de insuficiência/deficiência da vitamina D assim como sua associação com estresse oxidativo, processo inflamatório e polimorfismos BsmI, ApaI, TaqI e FokI em adolescentes escolares da rede pública municipal de João Pessoa-PB.

Será desenvolvida pela Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição – Clínica e epidemiologia aplicada a Nutrição – UFPB, sob a orientação da Profa. Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves.

Solicitamos sua autorização para que seu filho (a) possa participar dos procedimentos necessários para realização do estudo. Durante a pesquisa será realizada o preenchimento de um questionário com questões pessoais, aferição e análise da pressão arterial, coleta sanguínea para a realização de exames bioquímicos (glicemia, colesterol total, HDL, LDL, hemograma, uréia, creatinina, ácido úrico, PTH, vitamina D, ALT, AST, PCR, AGPA, MDA e CAT) e coleta de material genético por meio de amostra sanguínea.

Serão três encontros, o primeiro no dia da triagem (recebimento dos Termos assinados), o segundo no dia da coleta sanguínea e o terceiro no dia da entrega dos exames. Estes procedimentos não trarão riscos previsíveis para os participantes, tendo como benefícios prover um diagnóstico da hipovitaminose D e suas consequências, além do encaminhamento à prescrição de uma dieta adequada por nutricionistas qualificados.

A participação do adolescente é voluntária e você pode recusar sua participação nesta pesquisa. Para isto, basta que não assine o termo de consentimento, devolvendo ao pesquisador.

A participação do seu filho (a) é de fundamental importância, pois contribuirá muito para a realização do nosso trabalho. Os resultados desta pesquisa podem ser publicados em artigos, congressos e em outros eventos científicos, onde sua identidade permanecerá anônima.

Toda as informações serão mantidas em sigilo. Além disso, a qualquer momento, seu filho terá o direito de recusar-se a participar da pesquisa, sem prejuízo ou ônus.

Tendo sido esclarecido (a) sobre os objetivos do estudo, aceito que meu filho (a) _____ participe desta pesquisa.

Assinatura do Responsável

Assinatura de Testemunha

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

Contato da Pesquisadora Responsável: Juliana Padilha Ramos Neves

Telefones: (83) 9829 0123

Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPB:

(83) 32167791

APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: POLIMORFISMO BsmI, ApaI, TaqI e FokI DO GENE VDR: ASSOCIAÇÃO COM A HIPOVITAMINOSE D, ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ADOLESCENTES DE ESCOLAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA.

Seus pais permitiram que você participe. Queremos estimar a prevalência de insuficiência/deficiência da vitamina D assim como sua associação com estresse oxidativo, processo inflamatório e polimorfismos BsmI, ApaI, TaqI e FokI em adolescentes escolares da rede pública municipal de João Pessoa-PB.

Os adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm de 15 a 19 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

Serão necessários alguns procedimentos para realização do estudo: preenchimento de um questionário com dados pessoais, aferição e análise da pressão arterial, realização de exames bioquímicos (glicemia, colesterol total, HDL, LDL, hemograma, uréia, creatinina, ácido úrico, PTH, vitamina D, ALT, AST, PCR, AGPA, MDA e CAT) e coleta de material genético por meio de amostra sanguínea.

Serão três encontros, o primeiro no dia da triagem (recebimento dos Termos assinados), o segundo no dia da coleta sanguínea e o terceiro no dia da entrega dos exames. Estes procedimentos não trarão riscos previsíveis, tendo como benefícios prover um diagnóstico da hipovitaminose D e suas consequências, além do encaminhamento à prescrição de uma dieta adequada por nutricionistas qualificados.

Caso aconteça algo errado, você pode procurar a responsável pela pesquisa, Juliana Padilha Ramos Neves, telefone: (83) 9829 0123.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos suas informações. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar os adolescentes que participaram da pesquisa.

Eu _____ entendi os benefícios e riscos que podem acontecer e aceito participar desta pesquisa. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Contato da Pesquisadora Responsável: Juliana Padilha Ramos Neves

Telefones: (83) 9829 0123

Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPB:

(83) 32167791

APÊNDICE C
INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

COLÉGIO/ESCOLA: _____/_____/_____		CÓDIGO: _____
NOME: _____	DATA DE NASCIMENTO: _____/_____/_____	
IDADE: _____	SÉRIE: _____	
HISTÓRICO SOCIODEMÓGRAFICO		
COR REFERIDA: () Branca () Negra () Parda () Amarela () Indígena		
ESTADO CIVIL: () Solteiro () Casado () Mora junto () Separado/divorciado () Viúvo () Outros: _____		
POSSUI FILHOS : N () S (), QUANTOS ?		
QUANTAS PESSOAS MORAM NA SUA CASA INCLUINDO VOCÊ?		
QUANTOS TÊM: até 5 anos? _____ Entre 6 e 14 anos _____ Entre 15 e 24 anos _____ Entre 25 e 60 anos _____ Acima de 60 anos _____		
QUEM SÃO AS PESSOAS QUE MAIS CONTRIBUEM PARA O SUSTENTO NA SUA CASA? () Você mesmo () Outros. Quem? _____		
VOCÊ MORA EM CASA: () ALUGADA () PRÓPRIA		
VOCÊ OU SUA FAMÍLIA RECEBE ALGUM TIPO DE BOLSA OU AUXÍLIO (BOLSA ESCOLA, BOLSA ALIMENTAÇÃO, ETC)? () S () N , SE SIM , QUE TIPO : () Bolsa Família () Bolsa estudo () Pró-Jovem () PETI () Outra _____		
QUAL O GRAU DE INSTRUÇÃO DE SEU PAI E SUA MÃE?		
PAI: Analfabeto: () Sabe ler, mas não foi a escola: () Fundamental incompleto (1º grau): () Fundamental completo (1º grau): () Médio incompleto (2º grau): () Médio completo (2º grau): () Superior incompleto (universitário): () Superior completo (universitário): () Pós-graduação: () Não sabe: ()	Mãe: Analfabeto: () Sabe ler, mas não foi a escola: () Fundamental incompleto (1º grau): () Fundamental completo (1º grau): () Médio incompleto (2º grau): () Médio completo (2º grau): () Superior incompleto (universitário): () Superior completo (universitário): () Pós-graduação: () Não sabe: ()	
VOCÊ POSSUI ALGUMA OCUPAÇÃO ALÉM DE ESTUDAR? () S () N Qual? _____ É remunerada? () Não () Sim. Quanto? _____ Se Expõe Ao Sol Durante Esta Atividade? () S () N Quanto Tempo Aproximadamente por Dia? () () N		
REALIZA ALGUMA ATIVIDADE FÍSICA : S () N () Exposta ao sol? () S () N QUAL MODALIDADE: _____ QUANTAS HORAS POR DIA : _____ QUANTAS VEZES POR SEMANA: _____		
VOCÊ TEM ACESSO A ALGUM SERVIÇO DE SAÚDE PRÓXIMO A SUA CASA? () S () N Qual? () SUS () Particular VOCÊ COSTUMA FREQUENTAR ESSE SERVIÇO DE SAÚDE?		

() RARAMENTE () AS VEZES () FREQUENTEMENTE		
FOTOTIPO DA PELE E EXPOSIÇÃO SOLAR		
Fototipo	Descrição	Sensibilidade ao sol
I- Branca ()	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II- Branca ()	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III- Morena clara ()	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV- Morena mod ()	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V- Morena escura ()	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI- Negra ()	Nunca queima, totalmente pigmentada	Sensível
VOCÊ SE EXPÕE AO SOL POR PELO MENOS MEIA HORA POR DIA OU PELO MENOS 3 A 4H POR SEMANA? () S () N		
VOCÊ PERMANECE DENTRO DE CASA NA MAIORIA DOS DIAS? () S () N		
COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ VAI A PRAIA? () 1 vez por semana () 1 vez a cada 15 dias () 1 vez por mês () 1 vez a cada seis meses () 1 vez por ano outro: _____		

ANEXO A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 4ª Reunião realizada no dia 21/05/2015, o Projeto de pesquisa intitulado: **“PREVALÊNCIA DA INSUFICIÊNCIA/DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D EM ADOLESCENTES ESCOLARES: ASSOCIAÇÃO COM ESTRESSE OXIDATIVO, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E POLIMORFISMOS BSM1, APAL, TAQ1 E FOK1”**, da pesquisadora Juliana Padilha Ramos Neves. Protocolo 0139/15. CAAE: 43097115.2.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andrea Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP/CCS-UFPB

ARTIGO 1

Variantes rs1544410 e rs2228570 do gene receptor da vitamina D e níveis glicêmicos em adolescentes do Nordeste do Brasil.

Juliana Padilha Ramos Neves^{1*}, Dayanna Joyce Marques Queiroz¹, Eduarda Pontes dos Santos Araújo¹, Lavoisiana Lacerda de Lucena¹, Rayner Anderson Ferreira do Nascimento², Alice Teles de Carvalho¹, Liana Clébia de Moraes Pordeus³, Darlene Camati Persuhn¹, Alexandre Sérgio Silva¹, Alcides da Silva Diniz⁴, Maria Da Conceição Rodrigues Gonçalves¹

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba- João Pessoa- Brasil.

² Graduação em Biomedicina, Faculdade UNINASSAU, Grupo Ser Educacional- João Pessoa/ Paraíba- Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba- João Pessoa/ Paraíba- Brasil.

⁴ Programa de Pós Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Pernambuco- Recife- Brasil.

* Autor responsável por correspondências: Juliana Padilha Ramos Neves. Rua Manoel Bezerra Cavalcante, n31, apto 201, Manaíra, João Pessoa-PB, CEP:58038-500, Brasil. e-mail: juliana.prn@ig.com.br. Telefone: +55-83-998290123/ 30312569

Revista: Archives of Endocrinology and Metabolism

ISSN: 1677-9487

Qualis Nutrição: B1

RESUMO

Objetivo: verificar a existência de associação das concentrações séricas da 25-hidroxivitamina D e níveis glicêmicos com as variantes genéticas rs1544410 e rs2228570 do gene *VDR* em adolescentes da região Nordeste do Brasil. **Materiais e Métodos:** estudo epidemiológico transversal com 208 adolescentes de escolas públicas na cidade de João Pessoa, Paraíba/Brasil, entre 15 e 19 anos de idade. Foram realizadas coletas de sangue para extração de DNA e análise dos polimorfismos rs1544410 e rs2228570, além das análises bioquímicas (25-hidroxivitamina D, paratormônio, cálcio e glicemia). **Resultados:** a média de idade foi 17,7 ($\pm 1,14$) anos; metade dos adolescentes estavam com níveis séricos suficientes da 25-hidroxivitamina D, e a outra metade insuficiente/ deficiente da vitamina; a distribuição genotípica de maior frequência foram o *bb* e *Ff* e de menor frequência o *BB* e *ff*; ocorreu uma relação significativa entre os genótipos do rs1544410 e valores de glicemia ($p=0,049$) nas relações entre os genótipos *BBxbb* ($p=0,012$) e *Bbb* ($p=0,037$); na análise de regressão logística, a glicemia manteve a relação significativa nos adolescentes com genótipo *BB* ($p=0,036$; OR=2,15; IC_{95%}=1,05-4,41) e na análise agrupada *BB+Bb* quando comparados ao *bb* ($p=0,025$; OR=1,89; IC_{95%}=1,08-3,29) apresentaram maior risco de glicemia acima da mediana, por outro lado, quando analisado *Bb+bb* em relação ao *BB*, os adolescentes apresentaram maior chance de ter glicemia abaixo da mediana ($p=0,025$; OR=0,66; IC=0,47-0,95). **Conclusão:** este estudo mostrou uma relação significativa da glicemia em relação à distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410.

Palavras - Chave: gene; receptor de vitamina D; polimorfismo; glicose; adolescentes.

ABSTRACT

Objective: To verify the association of serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and glycemic levels with the genetic variants rs1544410 and rs2228570 of the *VDR* gene in adolescents from the Northeast region of Brazil. **Materials and Methods:** A cross-sectional epidemiological study with 208 adolescents from public schools in the city of João Pessoa, Paraíba/Brazil, between 15 and 19 years of age. Blood samples were collected for DNA extraction and analysis of rs1544410 and rs2228570 polymorphisms, as well as biochemical analyzes (25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium and glycemia). **Results:** The mean age was 17.7 (± 1.14) years; half of the adolescents had sufficient serum levels of 25-hydroxyvitamin D, and the other half insufficient/deficient vitamin D; the most frequent genotypic distribution was *bb* and *Ff* and of lesser frequency *BB* and *ff*; there was a significant relationship between the genotypes of rs1544410 and glycemia values ($p = 0.049$) in the relationships between the genotypes *BBxbb* ($p = 0.012$) and *Bbb* ($p = 0.037$); ($p = 0.036$, OR = 2.15, 95% CI = 1.05-4.41), and the *BB+Bb* group analysis when compared to the *bb* ($p = 0.025$, OR = 1.89, 95% CI = 1.08-3.29) presented higher risk of glycemia above the median; on the other hand, when *Bb+bb* was analyzed in relation to *BB*, adolescents had a greater chance of blood glucose below the median ($p = 0.025$, OR = 0.66, CI = 0.47-0.95). **Conclusion:** This study showed a significant relation of glycemia to the distribution of rs1544410 polymorphism genotypes.

Keywords: Gene; vitamin D receptor; polymorphism; glucose; adolescents.

Introdução

A vitamina D ganhou destaque quando se descobriu que sua deficiência estava associada à patogênese de raquitismo nas crianças e osteomalácia em adultos (1). Investigações subsequentes revelaram que a 25-hidroxivitamina D também tinha ação biológica não só nas doenças ósseas, mas também nas doenças auto-imunes, doença inflamatória do intestino, infecções, imunodeficiências, câncer, distúrbios neurocognitivos, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), conforme revisão realizada por Grober, Reichrath e Holick (2).

Evidências demonstram que a vitamina D influencia na expressão da enzima 1α -hidroxilase das células β -pancreáticas através da interação com um receptor de vitamina D nuclear (VDR) (3). O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares (4) e existe em diversos tecidos, o que explica a atuação biológica da vitamina D em algumas condições clínicas, como por exemplo, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (5).

Diferentes polimorfismos presentes no gene *VDR* podem interferir na concentração e, principalmente na ação da vitamina D (6). Até o presente, rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs7975232 (ApaI) e rs731236 (TaqI) são os polimorfismos do gene *VDR* que têm sido amplamente investigados sob várias condições clínicas, inclusive no comportamento glicêmico. Nesse sentido, já foi encontrada associação de polimorfismos no gene *VDR* com médias glicêmicas mais altas, resistência à insulina e DM2 em diferentes populações étnicas (7).

Fei et al. (8) entretanto, alertam que existem limitações nos estudos que demonstram esta associação de polimorfismos no VDR com glicemia. Dentre estas limitações, eles referem o poder estatístico dos estudos, condições clínicas diversas, idade, além da grande diversidade étnica. Isso pode justificar revisões de literatura mostrarem associação do VDR com glicemia, entretanto, existe uma variedade de outros estudos onde esta associação não foi demonstrada.

O Brasil tem dimensões continentais e com histórico de exploração étnica diferente entre as regiões. Com a população brasileira, por exemplo, e se tratando de adolescente saudáveis, apenas dois estudos foram realizados, um por Santos et al. (9), com meninas curitibanas entre 7 e 18 anos, que investigaram a relação dos polimorfismos do gene *VDR* com níveis de 25-hidroxivitamina D, e outro por Cobayashi, Lourenço e Cardoso (10), em crianças menores de 10 anos da Amazônia, com polimorfismos do gene *VDR* e parâmetros bioquímicos como a 25-hidroxivitamina D e glicemia. Na região nordeste Brasil, não existem

ainda estudos que avaliam a relação de polimorfismos do gene VDR com perfil glicêmico em adolescentes saudáveis.

Logo, o objetivo deste estudo foi verificar a existência de associação das concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D e níveis glicêmicos com as variantes genéticas rs1544410 e rs2228570 do gene VDR em adolescentes da região Nordeste do Brasil.

Materiais e Métodos

Amostra

Tratou-se de um estudo transversal, envolvendo uma amostragem aleatória de 208 adolescentes, de ambos os sexos, com idade entre 15 a 19 anos de escolas públicas da cidade de João Pessoa-PB, Nordeste do Brasil. O cálculo amostral considerou 60 % (P) de prevalência da insuficiência/deficiência de vitamina D (11), com uma margem de erro de 10 % (D) e um nível de significância de 5 % ($z = 1,96$), perfazendo um total mínimo necessário de 194 adolescentes. No sentido de corrigir eventuais perdas, foi feito um acréscimo de 10% [$100/(100-10)$], resultando em 216 unidades amostrais. Do universo de escolas públicas da cidade de João Pessoa, e que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, a amostra foi selecionada utilizando uma tabela de números aleatórios.

Os critérios de inclusão da pesquisa foram: adolescentes entre 15 e 19 anos de idade com estado cognitivo preservado, adolescentes não gestantes ou lactantes, estado nutricional de magreza, não usuárias de suplementos de vitamina D e de medicamentos anticonvulsivantes ou para tratamento de HIV/AIDS, e que não apresentassem doença renal e hepática ou qualquer outra doença consumptiva crônica. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB) pelo protocolo 0139/15, atendendo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Os adolescentes com insuficiência/deficiência da 25-hidroxivitamina D foram encaminhados para o serviço de atendimento nutricional para orientação dietética e/ou suplementação.

Análises bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada nas escolas. Os adolescentes foram orientados quanto ao dia e horário do exame, bem como da necessidade do jejum de 12 horas. Durante a coleta de sangue foram utilizados tubos à vácuo para análise. Os tubos foram acondicionados em caixas térmicas durante o período da coleta de sangue, com permanência do material coletado por no máximo duas horas. Posteriormente, foram encaminhados para laboratório particular

onde foram realizadas as análises da 25-hidroxivitamina D, paratormônio (PTH) e cálcio (Ca), e para o Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desenvolvimento e Saúde na Universidade Federal da Paraíba, onde foi analisada a glicemia.

A análise sérica de 25-hidroxivitamina D e PTH foram determinadas por meio do imunoensaio quimioluminescente (UniCel DxI 800 – Beckman Coulter), e a classificação do status da vitamina D foi com base nos valores de referência usados pela Endocrine Society que considera como níveis deficiente quando a 25-hidroxivitamina D <20ng/mL; insuficiente, quando a 25-hidroxivitamina D ≥ 20 e <30 ng/mL; e suficiente quando a 25-hidroxivitamina D ≥ 30 e <100 ng/mL (12). As concentrações de Ca e glicose de jejum foram realizadas em analisador automático Labmax 240 premium (Lagoa Santa - MG, Brasil), usando kits comerciais da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

Genotipagem

DNA Isolado

O DNA cromossomal foi obtido de leucócitos. Para isso, foram coletados 4ml de sangue mediante punção venosa, em tubos estéreis contendo 7,2mg de K3EDTA. As amostras foram enviadas ao laboratório de análise e na impossibilidade de realizar a extração do DNA no mesmo dia, as amostras eram estocadas sob -20°C, por um período máximo de 1 mês. Para extração do DNA seguiu-se o seguinte protocolo: as amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10mM Tris-HCl pH 8, 5mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 1% afim de provocar a hemólise das hemácias deixando, no entanto, os leucócitos permanecerem íntegros. Em seguida, procedeu-se a centrifugação à 3.200 rpm para descarte do sobrenadante. Esse processo foi repetido por 3 vezes no intuito de obter um precipitado de leucócitos livres de resquícios de hemoglobina.

O precipitado foi então ressuscitado em solução de lise contendo 10mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em banho-maria. Após 7 horas de incubação foram adicionados 500µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 11.471rpm a 4°C e 700µl do sobrenadante foram transferidos para novo tubo onde se obteve a precipitação do DNA com 540µl de isopropanol. Posteriormente, o precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (10.620 rpm por 5min), seco e ressuscitado em tampão Tris-EDTA pH 8,0 (13).

Polimorfismos VDR

Os genótipos foram determinados por Reação em Cadeia da Polimerase-

Polimorfismo de Tamanho de Restrição (PCR-RFLP). Para a variante rs1544410 os primers: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) e 5'-AACCAGCGGGAA GTCAAGGG-3' (antisense) (14). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (10 minutos), 30 ciclos de desnaturação (1 minuto à 94°C), anelamento (1 minuto à 58°C) e extensão (3 minutos à 72°C), com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 825 pb foi digerido com *BsmI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico *b* gerando dois fragmentos (650 pb e outro de 175 pb) enquanto o alelo ancestral *B* permanece com 825 pb.

Para a variante rs2228570, os primers: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' (sense) e 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (antisense) (15). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (5 minutos), 35 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 60°C) e extensão (30 segundos à 72°C), com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 265 pb foi digerido com *FokI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico *f* gerando dois fragmentos (196 pb e outro de 69 pb), enquanto o alelo ancestral *F* permanece com 265 pb.

Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata 0,5%.

Análise de Dados

As variáveis contínuas foram testadas quanto a normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que apresentaram distribuição não Gauseana foram transformadas em logarítimo natural e retestadas. Os dados foram apresentados em média e desvio padrão (DP). As diferenças entre grupos de genótipo foram testadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's. Para a associação entre os padrões de genotipagem e os parâmetros bioquímicos, foi utilizado o modelo de regressão logística. Adotou-se um nível de significância quando $p\text{-valor} < 0,05$. A análise estatística foi desenvolvida através do Software STATA 14 (StataCorp®; USA).

Resultados

Os dados sobre as características demográficas e bioquímica dos adolescentes estão apresentados na Tabela 1. A amostra total foi constituída predominantemente por adolescentes do sexo feminino, com média geral de idade de 17,7 ($\pm 1,14$) anos, sendo os meninos 17,9 ($\pm 1,22$) anos e meninas 17,95 ($\pm 1,06$) anos. A respeito dos parâmetros bioquímicos, metade da amostra apresentou-se suficiente e a outra metade insuficiente/

deficiente da 25-hidroxivitamina D. Levando em consideração os pontos de corte para adolescentes de Ca, PTH e glicemia, as médias destas análises bioquímicas encontraram-se normais. Os valores em mediana da 25-hidroxivitamina D= 28,0 (28,4-30,7) ng/mL; para suficientes da vitamina= 33,0 (35,1-38,3) ng/mL e insuficientes/ deficientes= 25,0 (23,9-25,1) ng/mL; Ca= 10,1 (10,0-10,2) mg/dL; PTH= 27,0 (27,1-31,3) pg/mL; e glicemia 83,0 (83,5-86,0)mg/dL.

A distribuição dos genótipos de ambos os polimorfismos do gene *VDR* estudados, bem como a frequência alélica, estão apresentados na Tabela 2. Para o genótipo rs1544410, *bb* foi o mais frequente e *BB* o menos frequente, resultando em distribuição alélica mais prevalente de *b*. Já a distribuição do polimorfismo rs2228570, segue a maior frequência do genótipo *Ff* e menor frequência de *ff*, sendo o alelo *F* o mais frequente da amostra.

A Tabela 3 mostra os valores das variáveis bioquímicas estudadas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410. Observa-se que existe relação significativa entre os genótipos de rs1544410 e valores de glicemia ($p=0,049$), observou-se significância nas relações entre os genótipos *BBxbb* ($p=0,012$) e *Bbbxbb* ($p=0,037$). Os adolescentes que apresentaram genótipo *bb* parecem estar mais protegidos quanto a glicemia. A Tabela 4 mostra que não existe relação significativa entre as variáveis bioquímicas com os genótipos do polimorfismo rs2228570.

Procedeu-se a estratificação da amostra em 2 grupos, de suficiente e insuficiente/deficiente da 25-hidroxivitamina D, entretanto, não foi encontrada diferenças nos valores das variáveis bioquímicas estudadas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo (dados não apresentados em tabela).

Na análise do modelo de regressão logística, as concentrações de 25-hidroxivitamina D, PTH, Ca e glicemia foram relacionadas com a distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410, e a glicemia mostrou relação significativa. Os adolescentes com genótipo *BB* (OR=2,15; IC_{95%}=1,05-4,41) e na análise agrupada *BB+Bb* (OR=1,89; IC_{95%}=1,08-3,29) quando comparados ao *bb* apresentaram maior risco de glicemia acima da mediana. Por outro lado, quando analisado *Bb+bb* (OR=0,65; IC_{95%}=0,46-0,93) em relação ao *BB*, os adolescentes apresentaram maior chance de ter glicemia abaixo da mediana (Tabela 5).

Discussão

Este estudo se propôs a investigar a relação entre 25-hidroxivitamina D e glicemia com as variantes genotípicas dos polimorfismos rs1544410 e rs2228570. A glicemia apresentou relação com a distribuição dos genótipos do rs1544410.

Na literatura, existem divergências quanto aos resultados de estudos com variantes do gene *VDR* e concentrações da 25-hidroxivitamina D (10). Santos et al. (9), estudaram meninas brasileiras da região sul com idade entre 7-18 anos, e observaram que variantes do rs1544410 do gene *VDR* estavam associadas com níveis baixos de 25-hidroxivitamina D ($p < 0,001$), apresentando significância nos genótipos *Bb+bb* ($p = 0,014$) em deficientes da vitamina. Cobayashi et al. (10), em estudo com crianças da região norte do Brasil, menores de 10 anos, encontraram associação significativa das variantes do polimorfismo rs1544410 com concentração da 25-hidroxivitamina D, mas não encontraram com as variantes do rs2228570. Por outro lado, os nossos achados corroboram com estudo prévio realizado por pesquisadores do nosso grupo (16), que não encontraram esta associação do polimorfismo rs1544410 com 25-hidroxivitamina D sérica em uma população de idosos nos mesmos padrões étnicos e condições de latitude e clima. De modo semelhante, Valtueña et al. (17) que estudaram adolescentes européias, também não encontraram qualquer associação entre polimorfismo genético rs1544410 e níveis séricos de 25-hidroxivitamina D. Diante do exposto, parece que a diversidade étnica resulta em comportamentos diferentes para este fenótipo relacionado ao gene *VDR*, conforme já sugerido por Fei et al. (8).

Alguns fatores podem influenciar as baixas concentrações da 25-hidroxivitamina D, a exemplo de idade, raça, condição socioeconômica, estações do ano, exposição à luz solar e hábitos alimentares (18; 19). Sobre a relação concentração da vitamina versus polimorfismos do gene *VDR*, Jolliffe et al. (20) publicaram um resumo de todos os genes envolvidos no metabolismo da vitamina D e demonstraram que o gene *VDR* está presente já na sinalização celular, quando esta se liga à forma ativa da vitamina. Nessas condições, pode-se gerar a hipótese de que polimorfismo deste gene receptor, não influenciaria nas concentrações da 25-hidroxivitamina D, mas sim na resposta celular.

Quanto a distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410 encontrada neste estudo, o resultado difere de outros realizados com adolescentes brasileiras, onde Santos et al. (9) na região sul encontraram uma maior frequência no *BB* (47,0%) e do alelo *B* (68%) e Cobayashi et al. (10) na região norte, uma maior frequência do genótipo *Bb* (63%) e alelo *B* (59%). Entretanto, em estudo realizado no mesmo espaço geográfico mas com população idosa, corrobora com nossos achados com uma maior frequência do genótipo *bb* (38%) e alelo *b* (55%) (16). Estes dados apontam para diferenças genotípicas em função das regiões do Brasil. Para o polimorfismo rs2228570, os resultados do presente estudo corroboram com os achados de Cobayashi et al. (10), com uma maior prevalência do alelo *F*.

A vitamina D parece melhorar a função das células β pancreática, protegê-las do ataque do sistema imunológico, elevar à sensibilidade do receptor de insulina, e consequentemente, diminuir a resistência à insulina (3; 21) . Para essas funções, a forma ativa da vitamina D deve ligar-se com seu receptor, de maneira que a expressão do gene poderia estar envolvida na patogênese da hiperglicemia, hiperinsulinemia e progressão do DM2 (8).

Neste sentido, os valores de glicemia de jejum no presente estudo, mostraram-se significativamente associada com o polimorfismo rs1544410, onde o genótipo *BB* apresentou maior média glicêmica ($p=0,049$). Resultados realizados com uma subamostra de crianças saudáveis estudadas por Cobayashi et al. (10), reexaminadas dois anos mais tarde, também mostraram influência do polimorfismo rs1544410 nas concentrações de glicose de jejum. Luo et al. (22) demonstraram que indivíduos com o alelo *b* têm uma maior taxa de expressão VDR do que os indivíduos com a presença do alelo *B*, indicando que o efeito observado na nossa casuística pode ser consequência de uma maior expressão nos adolescentes com genótipos *Bb* ou *bb*, com significância nas relações *BBxbb* ($p=0,01$) e *Bbb* ($p=0,03$), entretanto, na relação *BBxBb* ($p=0,26$) o efeito do *b* é nulo.

Estudos conduzidos por Shuch et al. (23) realizado em São Paulo- Brasil em indivíduos adultos com e sem síndrome metabólica, não foram observadas associações do polimorfismo rs1544410 com resistência à insulina e glicemia de jejum. A heterogeneidade entre as populações estudadas pode explicar as divergência dos resultados quanto ao genótipo e alelo de risco neste contexto (24).

No modelo de regressão logística, a glicemia permaneceu relacionada com os genótipos do rs1544410 ($p < 0,05$). Foi observado que os adolescentes estudados que possuíam genótipo *BB*, tinham um risco de 115% de apresentarem glicemia acima da mediana, e quando os genótipos foram analisados conjuntamente *BB+Bb*, o risco foi de 89%, demonstrando que possivelmente a presença do alelo *B* aumenta a chance dos adolescentes apresentarem glicemia mais elevada. Nossos dados corroboram com metanálises publicadas recentemente por Fei et al. (8), com adultos chineses e caucasianos, com diabetes tipo 2 e outras doenças como as cardiovasculares, e por Wang et al. (7) asiáticos saudáveis como sujeitos controle e com diabetes tipo 1 e 2. Em ambas metanálises, a associação entre VDR e risco de diabetes mellitus tipo 2 foi encontrada para o alelo *B* e genótipo *BB* do polimorfismo rs1544410. Apesar de robustas, estas metanálises não incluíram estudos com populações brasileiras. Portanto, o presente estudo vem a ampliar os resultados já estabelecidos para esta população do hemisfério sul ocidental.

Por outro lado, *Bb+bb*, mostrou-se protetor, com risco 34% menor de ter glicemia acima da mediana ($p=0,025$). Apesar dos achados descritos, Oh e Barrett-Connor (25) apresentaram resultados divergentes. Estes autores avaliaram caucasianos saudáveis não diabéticos e observaram que portadores do genótipo *bb* do polimorfismo rs1544410, em relação ao *BB* e *Bb*, tinham níveis significativamente mais elevados nos marcadores de resistência à insulina. Ressalta-se que estes marcadores utilizam a glicose de jejum como variável.

Os polimorfismos foram também analisados separadamente por status da vitamina D como suficientes e insuficientes/deficientes, e não houve associação significativa dos genótipos rs1544410 com a glicemia de jejum e os outros parâmetros bioquímicos investigados. Issa et al. (16) avaliaram as variantes do polimorfismo rs1544410, separando por status da vitamina D, em grupos de suficientes e insuficientes/deficientes, e também não observaram associação da glicemia de jejum entre os grupos.

Embora o genótipo *BB* tenha apresentado maior glicemia, estes valores parecem não ser preocupantes porque ainda estão dentro dos limites normoglicêmicos. Entretanto, existem evidências que indicam que maiores valores de diversas variáveis clínicas em adolescente, já são um fator predisponentes para o desenvolvimento de uma condição clínica patológica na idade adulta. Um exemplo destas variáveis clínicas é a obesidade abdominal infantil que já é declaradamente associada como fator de risco para resistência à insulina e DM2 na vida adulta, como recentemente enfatizado em estudo realizado por Alías-Hernández et al. (26). Os nossos resultados contribuem para um melhor conhecimento nessa literatura de investigação reforçando o aspecto genético também como marcador precoce, como referido por Li et al. (27) onde afirmam que a presença desses polimorfismos, mesmo em indivíduos saudáveis pode levar a um risco aumentado para o DM2.

A despeito da relação do polimorfismo rs1544410 com a glicemia, no presente estudo, o mesmo não ocorreu para o polimorfismo rs2228570. Em estudo de metanálise, Fei et al. (8) relatam que o polimorfismo rs2228570 situa-se próximo à região promotora do gene e não afeta somente a função da vitamina D, mas também interrompe o funcionamento da insulina, interferindo nos níveis plasmáticos de glicose e levando ao DM2. Outras metanálises indicaram que esse polimorfismo foi significativamente associado com maior glicemia e risco de DM2, e o alelo *f* e variante homozigota *ff* podem ser fatores de risco para DM2 (7; 27). Apesar de estudos indicarem esta associação, Yu et al. (28) não encontraram qualquer relação significativa entre rs2228570 e DM2 em indivíduos chineses diabéticos e não diabéticos, de diferentes idades, sexo e subgrupos. Estes resultados são semelhantes aos achados no estudo

de Malecki et al. (29), com diabéticos e não diabéticos poloneses, onde os resultados não ofereciam evidências da relação entre o polimorfismo rs2228570 com variáveis relacionadas ao perfil glicêmico. Do mesmo modo, Jia et al. (30), em chineses, e Wehr (31), em mulheres diagnosticadas com ovário policístico, também não encontraram associação dos polimorfismos rs2228570 com padrões endócrinos ou metabólicos. Recentemente, Bertocchini et al. (32) também não encontraram evidências da relação desse polimorfismo com perfil glicêmico.

Este é o primeiro estudo em adolescentes saudáveis no Nordeste brasileiro. A relevância deste estudo está na ampliação das relações do polimorfismo do gene *VDR* já encontradas em populações europeias e da raça caucasiana para a região do hemisfério ocidental. Nossos dados confirmaram a relação do rs1544410, mas não do rs2228570, demonstrando que regiões e etnias parecem ser um fator influenciador do genótipo, particularmente para o caso da glicemia em adolescentes.

Limitações: não foi possível realizar as análises de outros marcadores bioquímicos como insulina de jejum e HOMA para predisposição à resistência à insulina.

Agradecimentos: à Secretaria Municipal de Saúde de João Pessoa/PB, por consentir a realização deste estudo com adolescentes matriculados nas escolas públicas participantes e aos próprios adolescentes por aceitarem participar.

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

Referências

1. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016; 8(3):13.
2. Grober L, Reichrath J, Holick MF. Live longer with vitamin D? *Nutrients*. 2015; 7(3):1871-80.
3. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV, Chan SL, Squires PE, Hewison M. Expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89-90(1-5):121-5.

4. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008 ; 45(4):339-414.
5. Danescu LG, Levy S, Levy, J. Vitamin D and Diabetes Mellitus. *Endocr.* 2009; 35(1):11-7.
6. Cieślińska A, Kostyra E, Chwała B, Moszyńska-Dumara M, Fiedorowicz E, Teodorowicz M, Savelkoul HFJ. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Associated with Childhood Autism. *Brain Sci.* 2017; 7(9).
7. Wang Q, Xi B, Reilly KH, Liu M, Fu M. Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (FokI, ApaI, BsmI, TaqI) of vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(10):9405-14.
8. Fei Yu, LingLing Cui, Xing Li, ChongJian Wang, Yue Ba, Ling Wang, Jing Li, Chao Li, LiPing Dai, WenJie Li. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta analysis. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2016; 25(3):614-24.
9. Santos BR, Mascarenhas LP, Satler F, Boguszewski MC, 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; 12:62.
10. Cobayashi F, Hatzlhofer L, Cardoso MA. 25-hydroxivitamin D₃ levels, BsmI polymorphism and insulin resistance in Brazilian Amazonian Children. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(6):12531-46.
11. Peters BS, dos Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. *Ann. Nutr. Metab.* 2009; 54(1):15-21.
12. 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.
13. Miller Sa, Dykes Dd, Polesky Hf. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3):1215.
14. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes.* 2000; 49(3):504-7.

15. Chiu, K. C.; Chuang, L. M.; Yoon, C. The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. *BMC Med Genet.* 2001; 2:2.
16. Issa CT, Silva AS, Toscano LT, Medeiros MS, Persuhn DC, da Silva Diniz A, de Carvalho Costa MJ, Rodrigues Gonçalves Mda C. Cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. *Exp Gerontol.* 2016; 81:56-64.
17. Valtueña J, González-Gross M, Huybrechts I, Breidenassel C, Ferrari M, Mouratidou T, Gottrand F, Dallongeville J, Azzini E, Sioen I. Factors associated with vitamin D deficiency in European adolescents: The Helena study. *J Nutr Sci Vitaminol* 2013; 59:61–171.
18. Vierucci F, del Pistoia M, Fanos M, Gori M, Carlone G, Erba P, Massimetti G, Federico G, Saggese G. Vitamin D status and predictors of hypovitaminosis D in Italian children and adolescents: A cross-sectional study. *Eur J Pediatr.* 2013; 172(12):1607-17.
19. Angurana SK, Angurana RS, Mahajan G, Kumar N, Mahajan V. Prevalence of vitamin D deficiency in apparently healthy children in north India. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014; 27(11-12):1151-6.
20. Jolliffe D A, Walton RT, Griffiths CJ, Martineau AR. Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: Review of genetic association studies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016; 164:18-29.
21. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Feb;84(2-3):223-30.
22. Luo XY, Yang MH, Wu FX, Wu LJ, Chen L, Tang Z, Liu NT, Zeng XF, Guan JL, Yuan GH. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Lupus.* 2012; 21(1):53-9.
23. Shuch, N.J.; Garcia, V.C.; Vívolo, S.R.G.F.; Martini, L.A. Relationships between vitamin D receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. *Nutr J.* 2013;12:1–7.

24. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alkharfy KM, Khan N, Mohammed AK, Vinodson B, Ansari MG, Alenad A, Alokail MS. Association of VDR-gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency. *Gene*. 2014; 542(2):129-33.
25. Oh, J.Y.; Barrett-Connor, E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: The Rancho Bernardo Study. *Metabolism*. 2002; 51(3):356-9.
26. Alías-Hernández I, Galera-Martínez R, García-García E, Muñoz-Vico FJ, Vázquez Lopez MA, Olvera-Porcel MC, Bonillo Perales A. Insulinaemia and insulin resistance in Caucasian general paediatric population aged 2 to 10 years: Associated risk factors. *Pediatr Diabetes*. 2017; doi: 10.1111/pedi.12533.
27. Li L, Wu B, Liu J, Yang LB. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Arch. Med. Res*. 2013 Apr;44(3):235-41.
28. Yu F, Wang C, Wang L, Jiang H, Ba Y, Cui L, Wang Y, Yu S, Li W. Study and evaluation the impact of vitamin D receptor variants on the risk of type 2 diabetes mellitus in Han Chinese. *J Diabetes*. 2017; 9(3):275-284.
29. Malecki MT, Frey J, Moczulski D, Klupa T, Kozek E, Sieradzki J. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003; 111(8):505-9.
30. Jia, J, Ding D, Yang K, Mao L, Shao H, Zhan Y, Shen C. Vitamin D receptor genetic polymorphism is significantly associated with risk of type 2 diabetes mellitus in chinese han population. *Arch Med Res*. 2015; 46(7):572-9.
31. Wehr E, Trummer O, Giuliani A, Gruber HJ, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2011; 164(5):741-9.
32. Bertocchini L, Sentinelli F, Leonetti F, Bailetti D, Capoccia D, Cimini FA, Barchetta I, Incani M, Lenzi A, Cossu E, Cavallo MG, Baroni MG. The vitamin D receptor functional variant rs2228570 (C>T) does not associate with type 2 diabetes mellitus. *Endocr Res*. 2017; 1-5.

TABELAS

Tabela 1. Características demográficas e bioquímicas em adolescentes do Nordeste do Brasil.

		Média	DP	N (%)
Sexo	Masculino			78 (37,5)
	Feminino			130 (62,5)
Idade	15-19 anos	17,7	1,14	208 (100)
Bioquímicas	Suficientes da 25-hidroxivitamina D (ng/mL)	36,7	7,42	104 (50%)
	Insuficientes/ Deficientes da 25-hidroxivitamina D (ng/mL)	24,5	3,46	104 (50%)
	Ca (mg/dL)	10,1	0,36	
	PTH (pg/mL)	29,2	15,30	
	Glicemia (mg/dL)	84,7	9,19	

Os dados são expressos em média e desvio padrão (DP).

Tabela 2. Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismo rs1544410 e rs2228570 em adolescentes do Nordeste do Brasil.

rs1544410	n (%)	rs2228570	n (%)
BB	47 (22,6)	FF	92 (44,2)
Bb	70 (33,6)	Ff	94 (45,2)
bb	91 (43,8)	ff	22 (10,6)
B	164 (39,5)	F	278 (66,8)
b	252 (60,5)	f	138 (33,2)

Os dados são expressos em número de adolescentes (n) e percentual (%).

Tabela 3. Valores em média das variáveis bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410 em adolescentes do Nordeste do Brasil.

	BB n=47	Bb n=70	bb n=91	p-valor
25-hidroxivitamina D (ng/mL)	31,23(9,35)	29,12(7,8)	29,01(7,9)	0,281
Ca (mg/dL)	10,08(0,38)	10,1(0,36)	10,15(0,34)	0,486
PTH (pg/mL)	28,95(13,80)	31,21(20,1)	27,78(11,18)	0,517
Glicemia (mg/dL)	86,59(9,66) ^a	85,52(9,74) ^a	83,24(8,32) ^b	0,049*

Os dados são expressos em média e desvio padrão (DP). Ca = cálcio; PTH= paratormônio.

*p<0,05 para Kruskal Wallis. ^{a,b} letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas pelo pós teste de Dunn's.

Tabela 4. Valores em média das variáveis bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs2228570 em adolescentes do Nordeste do Brasil.

Variáveis	FF n=92	Ff n=94	ff n=22	p-valor
25-hidroxivitamina D (ng/mL)	29,23(7,76)	30,03(9,06)	28,81(6,9)	0,84
Ca (mg/dL)	10,09(0,38)	10,14(0,33)	10,14(0,39)	0,59
PTH (pg/mL)	28,75(13,75)	29,56(28,0)	29,54(10,35)	0,79
Glicemia (mg/dL)	84,37(9,36)	85,71(9,45)	82,4(6,89)	0,30

Os dados são expressos em média e desvio padrão (DP). Ca = cálcio; PTH= paratormônio.

Tabela 5. Regressão logística dos genótipos do polimorfismo rs1544410 em relação às variáveis bioquímicas.

	OR	p-valor	IC _{95%}
25-hidroxivitamina D			
bb	1,00		
Bb	1,01	0,967	0,54-1,90
BB	1,72	0,134	0,84-3,50
bb	1,00		
Bb+BB	1,25	0,421	0,72-2,17
BB	1,00		
Bb+bb	0,78	0,173	0,55-1,11
PTH			
bb	1,00		
Bb	1,60	0,140	0,86-3,00
BB	1,12	0,750	0,55-2,27
bb	1,00		
Bb+BB	1,39	0,242	0,80-2,41
BB	1,00		
Bb+bb	0,90	0,553	0,64-1,27
Cálcio			
bb	1,00		
Bb	0,71	0,288	0,38-1,33
BB	0,72	0,370	0,36-0,47
bb	1,00		
Bb+BB	0,72	0,235	0,41-1,24
BB	1,00		
Bb+bb	1,20	0,303	0,85-1,70
Glicemia			
bb	1,00		
Bb	1,73	0,087	0,92-3,25
BB	2,15	0,036*	1,05-4,41
bb	1,00		
BB+Bb	1,89	0,025*	1,08-3,29
BB	1,00		
Bb+bb	0,66	0,025*	0,47-0,95

OR – odds ratio e IC – Intervalo de Confiança de 95%. Valores da mediana: 25-hidroxivitamina D = 28mcg; Cálcio = 10.1mg; PTH =27pg/ml; Glicemia= 83mg/dl. *p< 0,05.

ARTIGO 2

Marcadores do perfil lipídico, inflamatório, estresse oxidativo e antropométricos não apresentam associação com polimorfismos em adolescentes do Nordeste do Brasil.

Juliana Padilha Ramos Neves^{1*}, Dayanna Joyce Marques Queiroz¹, Eduarda Pontes dos Santos Araújo¹, Rayner Anderson Ferreira do Nascimento², Alice Teles de Carvalho¹, Maria José de Carvalho Costa¹, Ana Karina Teixeira da Cunha França³, Darlene Camati Persuhn¹, Alexandre Sérgio Silva¹, Alcides da Silva Diniz⁴, Maria Da Conceição Rodrigues Gonçalves¹

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

² Graduação em Biomedicina, Faculdade UNINASSAU, Grupo Ser Educacional- João Pessoa/ Paraíba- Brasil.

³ Programa de Pós Graduação em Saúde Coletiva, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

⁴ Programa de Pós Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

* Autor responsável por correspondências: Juliana Padilha Ramos Neves. Rua Manoel Bezerra Cavalcante, n31, apto 201, Manaíra, João Pessoa-PB, CEP:58038-500, Brasil. e-mail: juliana.prn@ig.com.br. Telefone: +55-83-998290123/ 30312569

Revista: PlosOne

ISSN: 1932-6203

Qualis Nutrição: A2

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos polimorfismos rs1544410 e rs2228570 nos marcadores do perfil lipídico, inflamatório, estresse oxidativo e antropométrico descritos na literatura como fatores de risco cardiovascular em adolescentes aparentemente saudáveis. Foi um estudo transversal, realizado com 208 adolescentes, onde foram realizadas análises antropométricas (IMC, circunferência da cintura e relação cintura altura), marcadores bioquímicos lipídicos (triglicerídeo, colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c), marcadores bioquímicos do estresse oxidativo (malondialdeído-MDA e capacidade antioxidante total-CAT), marcadores bioquímicos do processo inflamatório (Proteína C Reativa ultrasensível - PCR-us e Alfa 1 Glicoproteína Ácida-A1GPA), além da extração do O DNA cromossomal obtido de leucócitos para genotipagem dos polimorfismos. Os dados foram analisados pelo programa estatístico STATA, onde as diferenças entre grupos de genótipos foram testadas pela ANOVA one-way ou seu correspondente não paramétrico, teste Kruskal-Wallis e para a associação entre os padrões de genotipagem e os parâmetros bioquímicos, foi utilizado o modelo de regressão logística, em seguida, as variáveis com $p < 0,20$ foram ajustadas para idade, IMC e CC. Os genótipo mais frequentes foram 43,7% (n=91) *bb* e 45,2% (n=94) *Ff*, e alelos *b* (60%) e *F* (66%). Não houve associação da distribuição dos genótipo dos polimorfismos com variáveis antropométricas e bioquímicas. Na análise de regressão logística, apenas a variável A1GPA do rs1544410, resultou em significância para o genótipo *Bb* ($p=0,039$; OR=1,95; IC= 1,03-3,66). Posteriormente, as variáveis que resultaram em $p < 0,20$ para ambos os polimorfismos foram ajustadas e a A1GPA permaneceu significativamente influenciadora no grupo heterozigoto *Bb* ($p=0,040$; OR=2,02; IC= 1,03-3,95), entretanto, este não foi considerado um dado relevante levando em consideração que a outra proteína de fase aguda avaliada não apresentou associação. Apesar de alguns estudos encontrarem associações dos polimorfismos do gene VDR com fatores de risco cardiovasculares em diferentes populações, nosso estudo em jovens saudáveis não observou.

Palavras-chave: gene receptor da vitamina D, polimorfismo BsmI do VDR, polimorfismo FokI do VDR, risco cardiovascular, indivíduos saudáveis.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the influence of polymorphisms rs1544410 and rs2228570 on lipid, inflammatory, oxidative stress and anthropometric markers described in the literature as cardiovascular risk factors in apparently healthy adolescents. A cross-sectional study was carried out with 208 adolescents, who performed anthropometric analyzes (BMI, waist circumference and waist height), lipid biochemical markers (triglycerides, total cholesterol, LDL-c, HDL-c, VLDL-c) biochemical markers of the inflammatory process (C-reactive Protein-CRP, and Alpha 1 Glycoprotein Acid-A1GPA), as well as extraction of chromosomal DNA extraction obtained from leukocytes for genotyping polymorphisms. The data were analyzed by the STATA statistical program, where differences between genotype groups were tested by one-way ANOVA or its non-parametric correspondent the Kruskal-Wallis test, and a logistic regression model for association between genotyping patterns and biochemical parameters. Next, variables with $p < 0.20$ were adjusted for age, BMI and WC. The most frequent genotypes were 43.7% (n = 91) *bb* and 45.2% (n = 94) *Ff*, and alleles *b* (60%) and *F* (66%). There was no association of genotype distribution of polymorphisms

with anthropometric or biochemical variables. In the logistic regression analysis, only the A1GPA variable of rs1544410 resulted in significance for the *Bb* genotype ($p = 0.039$, OR = 1.95, CI = 1.03-3.66). Variables that resulted in $p < 0.20$ for both polymorphisms were subsequently adjusted and A1GPA remained significantly influential in the heterozygote group *Bb* ($p = 0.040$, OR = 2.02, CI = 1.03-3.95); however, this was not considered relevant data considering that the other evaluated acute phase protein had no association. Although some studies have found associations of VDR gene polymorphisms with cardiovascular risk factors in different populations, our study in healthy young did not find.

Keywords: Vitamin D receptor gene, BsmI VDR polymorphism, FokI VDR polymorphism cardiovascular risk, healthy subjects.

Introdução

A vitamina D conceitualmente conhecida como um pré-hormônio, atua regulando a homeostase do cálcio e metabolismo ósseo [1]. Estudos mostram que a deficiência da vitamina D vai além do comprometimento do metabolismo ósseo [2], estando associada à fatores de risco cardiovascular (FRCV), síndrome metabólica e até mesmo com mortalidade geral [3]. Essa crescente importância clínica pode ser explicada por esta vitamina regular cerca de 3% do genoma humano [4].

A forma ativa da vitamina D (1,25-hidroxivitamina D) penetra na membrana celular e liga-se a um receptor de vitamina D (VDR) que funciona como um interruptor genético, esta ligação dá início a uma cascata de interações moleculares que irão modular a transcrição de genes específicos que podem reprimir ou ativar diversas funções biológicas [5]. Variações genéticas no gene receptor VDR são denominados polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs) [6].

O gene que codifica o VDR está localizado no braço longo do cromossomo 12 (locus 12q13.11). Um grande número de polimorfismos no VDR foram descritos até agora, sendo os mais estudados: Cdx2, FokI, BsmI, ApaI e TaqI [7].

Pesquisas associando polimorfismos do gene *VDR* e fatores de risco cardiovascular (FRCV) têm sido realizadas, em particular os polimorfismos rs1544410 (BsmI) e rs2228570 (FokI) [8]. Geralmente estes estudos relacionam os polimorfismos com diabetes mellitus tipo 2 [9], resistência à insulina e síndrome metabólica [9,10], pressão arterial, obesidade, mortalidade e inflamação [11,12,3].

Até o momento, sob nosso conhecimento, poucos estudos com estas associações foram realizados em populações saudáveis. Particularmente no Líbano [13,14], Arábia Saudita [12] Jordânia [15], no estado de Mississippi nos Estados Unidos [16], China [14] e em idosos

poloneses [17]. No Brasil, um estudo realizado por Cobayashi et al. (2015) [18], em menores de 10 anos, utilizou a associação do rs1544410 com alguns FRCV.

A procura de marcadores genéticos para identificar pacientes saudáveis com risco para o desenvolvimento da doença cardiovascular é importante, pois poderia possibilitar uma adequação do tratamento à predisposição genética, com intensificação das medidas terapêuticas naqueles pacientes com maior risco.

Estudos desta natureza ajudam a determinar o perfil da população brasileira quanto as características genotípicas e alélicas destes polimorfismos, visto que existe uma grande variação de resultados de acordo com a etnia, tipo de estudo e perfil da amostra. Em particular, até o momento, apenas um estudo avaliou FRCV como antropometria e perfil lipídico em jovens brasileiros, mas sem investigar variáveis de estresse oxidativo e processo inflamatório, e esta associação foi realizada apenas com o polimorfismo rs1544410. O objetivo deste estudo é investigar a influencia dos polimorfismos rs1544410 e rs2228570 em marcadores do perfil lipídico, inflamatório, estresse oxidativo e antropométrico descritos na literatura como FRCV, em adolescentes aparentemente saudáveis de escolas públicas da cidade de João Pessoa no Nordeste do Brasil.

Materiais e Métodos

Amostra

Tratou-se de um estudo transversal, realizado com 208 adolescentes, de ambos os sexos, com idade entre 15 a 19 anos de escolas públicas da cidade de João Pessoa-PB, Nordeste do Brasil. O cálculo amostral considerou 60 % (P) de prevalência da insuficiência/deficiência de vitamina D [19], com uma margem de erro de 10 % (D) e um nível de significância de 5 % ($z= 1,96$), perfazendo um total mínimo necessário de 194 adolescentes. No sentido de corrigir eventuais perdas, foi feito um acréscimo de 10% [$100/(100-10)$], resultando em 216 unidades amostrais. Do universo de escolas públicas da cidade de João Pessoa e que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, a amostra foi selecionada utilizando uma tabela de números aleatórios.

Os critérios de inclusão da pesquisa foram: adolescentes entre 15 e 19 anos de idade com estado cognitivo preservado, adolescentes não gestantes ou lactantes, estado nutricional de magreza, não usuárias de suplementos de vitamina D e de medicamentos anticonvulsivantes ou para tratamento de HIV/AIDS, e que não apresentassem doença renal e hepática ou qualquer outra doença consumptiva crônica. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade

Federal da Paraíba (CCS/UFPB) pelo protocolo 0139/15, atendendo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Os adolescentes com insuficiência/deficiência da 25-hidroxivitamina D foram encaminhados para o serviço de atendimento nutricional para orientação dietética e/ou suplementação.

Análises bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada nas escolas. Os adolescentes foram orientados quanto ao dia e horário do exame, bem como da necessidade do jejum de 12 horas. Durante a coleta de sangue foram utilizados tubos à vácuo para análise de soro e de plasma.

Os tubos foram acondicionados em caixas térmicas durante o período da coleta de sangue, com permanência do material coletado por no máximo duas horas. Posteriormente, foram encaminhados para o Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desenvolvimento e Saúde na Universidade Federal da Paraíba, onde foram analisadas colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), triglicerídeos (TG), por amostras do soro utilizando kits comerciais da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante, em analisador automático Labmax 240 premium (Lagoa Santa - MG, Brasil). As lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) foram obtidas pela equação de Friedwald [$LDL-c = (CT - HDL-c) - (TG/5)$] [20].

Os Níveis séricos de Proteína C Reativa ultrasensível (PCR-us) e Alfa 1 Glicoproteína Ácida (A1GPA) foram avaliados pelo método imunonefelométrico. A atividade oxidante foi determinada pela análise do malondialdeído (MDA) no plasma, através da reação de ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi [21]. A capacidade antioxidante total (CAT) foi analisada através do método DPPH no plasma, conforme descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset [22].

Perfil antropométrico

Os dados antropométricos de peso e estatura foram coletados de acordo com procedimentos descritos no Anthropometric Standardization Reference Manual, de Lohman, Roche e Martorell [23] e nas recomendações da Organização Mundial da saúde [24]. Todas as medidas foram realizadas por examinadores treinados e em duplicata.

Para classificação do estudo nutricional antropométrico foram utilizadas como referência as curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde, cujo público abrange

crianças e adolescentes (dos 10 aos 19 anos). Foram utilizadas as curvas de estatura/ idade e IMC/ idade considerando os pontos de corte preconizados pela OMS [25].

As medidas da circunferência da cintura(CC) foi realizada com o indivíduo em pé com o auxílio de uma fita métrica não elástica no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para classificação do risco pela CC foi utilizado percentil > 80 como risco para doenças metabólicas [26]. A relação cintura/altura (RCA) obtida pelo quociente destas medidas foi classificada utilizando o ponto de corte único de 0,5 [27].

Genotipagem

DNA Isolado

O DNA cromossomal foi obtido de leucócitos. Para isso, foram coletados 4ml de sangue mediante punção venosa, em tubos estéreis contendo 7,2mg de K3EDTA. As amostras foram enviadas ao laboratório de análise e na impossibilidade de realizar a extração do DNA no mesmo dia, as amostras eram estocadas sob -20°C, por um período máximo de 1 mês. Para extração do DNA seguiu-se o seguinte protocolo: as amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10mM Tris-HCl pH 8, 5mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 1% afim de provocar a hemólise das hemácias deixando, no entanto, os leucócitos permanecerem íntegros. Em seguida, procedeu-se a centrifugação à 3.200 rpm para descarte do sobrenadante. Esse processo foi repetido por 3 vezes no intuito de obter um precipitado de leucócitos livres de resquícios de hemoglobina.

O precipitado foi então ressuspensionado em solução de lise contendo 10mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em banho-maria. Após 7 horas de incubação foram adicionados 500µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 11.471 rpm a 4°C e 700µl do sobrenadante foram transferidos para novo tubo onde se obteve a precipitação do DNA com 540µl de isopropanol. Posteriormente, o precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (10.620 rpm por 5min), seco e ressuspensionado em tampão Tris-EDTA pH 8,0 [28].

Polimorfismos VDR

Os genótipos foram determinados por Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Tamanho de fragmentação de Restrição (PCR-RFLP). Para a variante rs1544410 os primers: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) e 5'-

AACCAGCGGGAA GTCAAGGG-3' (antisense) [29]. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (10 minutos), 30 ciclos de desnaturação (1 minuto à 94°C), anelamento (1 minuto à 58°C) e extensão (3 minutos à 72°C), com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 825 pb foi digerido com *BsmI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico *b* gerando dois fragmentos (650 pb e outro de 175 pb) enquanto o alelo ancestral *B* permanece com 825 pb.

Para rs2228570, os primers: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' (sense) e 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (antisense) [30]. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (5 minutos), 35 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 60°C) e extensão (30 segundos à 72°C), com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 265 pb foi digerido com *FokI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico *f* gerando dois fragmentos (196 pb e outro de 69 pb), enquanto o alelo ancestral *F* permanece com 265 pb.

Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata 0,5%.

Análise de Dados

As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que apresentaram distribuição não Gauseana foram transformadas em logarítimo natural e retestadas. Na distribuição dos genótipos, as variáveis que apresentaram distribuição normal, foram apresentadas sob a forma de média e desvio padrão (DP) e para as variáveis não-normais foram descritas sob a forma de mediana e intervalo interquartilico (IQ). As diferenças entre grupos de genótipos foram testadas pela ANOVA one-way ou seu correspondente não paramétrico, teste de Kruskal-Wallis. Para a associação entre os padrões de genotipagem e os parâmetros bioquímicos, foi utilizado o modelo de regressão logística, em seguida, as variáveis com $p < 0,20$ foram ajustadas para idade, IMC e CC. Adotou-se um nível de significância quando $p\text{-valor} < 0,05$. A análise estatística foi desenvolvida através do Software STATA 14 (StataCorp®; USA).

Resultados

Foram selecionados 130 adolescentes do sexo feminino e 78 do sexo masculino com idade média de $17,7 \pm 1,14$ anos. Na avaliação antropométrica pela classificação do IMC, 4,9% ($n = 10$) da amostra apresentavam-se com baixo peso, 71,1% ($n = 148$) eutróficos, 13,4%

(n=28) com sobrepeso e 10,6% (n=22) obesos. Pela classificação da circunferência da cintura, 83,2% (n=173) não apresentavam uma circunferência de risco para eventos cardiovasculares e 16,8% (n= 35) apresentavam uma circunferência de risco. Na relação cintura altura, 82,7% (n=172) tinham uma relação sem risco para eventos cardiovasculares e 17,3% (n=36) mostravam-se com risco. Estes dados não estão descritos em tabelas. Os dados a respeito da características antropométricas e bioquímicas dos adolescentes estão apresentados na tabela 1 em média (DP) e mediana (p25 - p75).

As tabelas 2 e 3 mostram a distribuição dos polimorfismos rs1544410 e rs2228570 respectivamente, com o perfil de cada genótipo em relação às variáveis antropométricas e bioquímicas estudadas, observa-se que não houve associações significativas. A frequência alélica ficou 40% *B* e 60% *b* para rs1544410 e 66% *F* e 34% *f* para rs2228570.

Foi realizada análise de regressão logística para todas as variáveis bioquímicas em relação aos genótipos dos polimorfismos. Na primeira análise, considerando o polimorfismo rs1544410, a A1GPA resultou em significância para o genótipo *Bb* ($p=0,039$; $OR=1,95$; $IC_{95\%}= 1,03-3,66$). Posteriormente, as variáveis que resultaram em $p<0,20$ (CT, VLDL-c, TG, PCR e A1GPA) foram ajustadas e a A1GPA permaneceu significativamente influenciadora no grupo heterozigoto ($p= 0,040$; $OR=2,02$; $IC_{95\%}= 1,03-3,95$). Enquanto isso, para o polimorfismo rs2228570, não resultou em significância após primeira análise e quando ajustadas as variáveis com $p<0,20$ (CT, HDL-c e PCR) também não alteraram o desfecho. Estes dados não estão descritos em tabelas.

DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que os genótipos dos polimorfismos rs1544410 e rs2228570 não influenciam nos marcadores do perfil lipídico, inflamatório, estresse oxidativo e antropométrico. Uma exceção foi a A1GPA, cujos dados estatísticos mostraram que a condição de heterozigoto do polimorfismo rs1544410 aumentava em 102% a chance de apresentarem este marcador alterado. Ainda assim, na análise da PCR, uma outra proteína também de fase aguda produzida pelo fígado tal como a A1GPA, não se encontrou associação estatística.

Influência dos polimorfismos na Antropometria

A literatura é controversa nessa relação entre polimorfismos e marcadores antropométricos. Santos et al. [31] que estudaram meninas saudáveis do Sul do Brasil não observaram relação entre IMC e genótipos do rs1544410. Do mesmo modo, em adultos

saudáveis no Mississippi nos Estados Unidos, também não foram observadas relações entre o rs1544410 e IMC e CC [16].

Estudos realizados em outras etnias como Filus et al. [32] que investigaram homens adultos saudáveis poloneses, encontraram associação significativa do genótipo *BB* do polimorfismo rs1544410 com maiores valores de IMC quando comparados ao *bb*. Do mesmo modo, o estudo de Zhao et al. [10] em indivíduos chineses com e sem síndrome metabólica, encontraram associação significativa do *BB* com maiores médias de CC quando comparados ao *Bb+bb* e *Ff* e *ff* com maiores médias de IMC nos indivíduos com a síndrome. Hajj et al. [33] que estudaram libaneses adultos jovens e saudáveis, encontraram associação significativa para polimorfismo rs1544410 com IMC e CC, porém, apenas nos homens com genótipo *bb*. Apesar destes achados, Tworowska-Bardzinska et al. [34] não encontraram associação dos polimorfismos rs1544410 com IMC em mulheres polonesas pós-menopausadas. Nos estudos de Hajj et al. [33] e Filus et al. [32], também investigaram o polimorfismo rs2228570 da mesma forma que no presente estudo, e também não mostraram associação com IMC e CC em suas amostras de indivíduos saudáveis.

Influência dos polimorfismos no perfil lipídico

Um estudo prévio realizado na mesma cidade do presente estudo, mas em população de idosos não institucionalizados, o polimorfismo rs1544410 influenciou o CT ($p = 0,029$) e níveis de LDL-c ($p = 0,004$), com maiores valores no genótipo *Bb* e mais baixos no grupo do genótipo *bb* [35]. O mesmo não aconteceu no presente estudo, onde maiores valores destas variáveis estavam no *bb*.

Outro estudo também achou associação do rs1544410 com o perfil lipídico, em amostras de mulheres pós-menopausadas saudáveis, mostrando o genótipo *BB* estava relacionado a um perfil lipídico desfavorável [34]. Assim, sugerindo que os portadores de *bb* são favorecidos por terem maior disponibilidade do receptor e benefícios dos efeitos redutores sobre os níveis de lipídicos, enquanto na presença do alelo *B*, pode haver uma expressão diminuída de VDR, tornando a vitamina D menos disponível para exercer seus efeitos moduladores.

Dados de Al-Daghri et al. [36] apresentam controversias à esta teoria. Eles suplementaram com vitamina D por 12 meses em indivíduos com DM2, observando melhora no perfil lipídico nos indivíduos *BB*, eles levantam a hipótese do alelo *B* poder proporcionar uma melhor estabilidade e meia-vida do mRNA do gene *VDR*, resultando em um maior

número de VDR expressados por um tempo maior nas células alvo. Al-Daghri et al. não encontraram melhora significativa do perfil lipídico para o polimorfismo rs2228570.

Estes estudos que apontam direções contrárias têm um importante ponto de discussão, nem todos realizaram análises de regressão logística multivariada, o que gera uma controvérsia sobre a influência do polimorfismo. Nossos dados mostram através da análise multivariada, de maneira mais consistente, que esta influencia parece não existir.

Em estudos realizado por Filus et al. [32] encontraram maiores valores de HDL no genótipo *ff* do polimorfismo rs2228570, mas não observaram associação significativa com o polimorfismo rs1544410 em homens poloneses saudáveis. Em indivíduos libaneses adultos saudáveis, também não houve associação significativa do polimorfismo rs1544410 com o perfil lipídico estudado, entretanto, para o polimorfismo rs2228570, esta associação foi observada entre triglicerídeo com valores maiores no genótipo *FF* e este mesmo genótipo apresentou menores valores de HDL nos homens, a associação também ocorreu nas mulheres com maiores valores de colesterol total para o genótipo *ff* e de LDL no *Ff* [33]. Um estudo em população chinesa, também foram investigados este dois polimorfismos em indivíduos com e sem síndrome metabólica e não houve associação com triglicerídeo e HDL [10].

Observa-se divergências em estudos de diferentes etnias a respeito de qual genótipo ou alelo destes polimorfismos seria o protetor ou risco sobre o perfil lipídico.

Influência dos polimorfismos no estresse oxidativo

O presente estudo não observou valores significativos de MDA e CAT na amostra de adolescentes estudada. Vale ressaltar que são jovens aparentemente saudáveis e com média de IMC dentro dos parâmetros de normalidade, o que pode ser um fator protetor para alteração destas variáveis bioquímicas.

Em estudo realizado na mesma cidade, entretanto com população idosa, também não foi observado associação com MDA, mas apresentou maiores médias no genótipo *Bb* para o polimorfismo rs1544410 [35], da mesma forma que no presente estudo.

O estresse oxidativo também foi investigado com Iranianos com DM2 e foi observada um aumento significativo do marcador de estresse oxidativo TBARS (substâncias tiobarbitúricas reativas) nos indivíduos com alelo *F* para o polimorfismo rs2228570 [37]. Achado contrário foi observado em estudo de intervenção com vitamina D em indivíduos diabéticos tipo 2, não encontrando associação significativa entre os genótipos do polimorfismo rs2228570 e os marcadores de estresse oxidativo superóxido dismutase

glutathiona (GSH), capacidade antioxidante total (TAC) e malondialdeído (MDA), mas ressaltou que o genótipo *ff* foi o que mostrou menor resposta após suplementação [38].

Os resultados são divergentes quanto a presença do estresse oxidativo, bem como sua associação com os polimorfismos rs1544410 e rs2228570. Ressaltando ainda que as populações estudadas em indivíduos saudáveis têm características de estresse oxidativo diferentes quando comparada à indivíduos enfermos.

Influência dos polimorfismos no processo Inflamatório

O VDR é expresso em células envolvidas no sistema imunológico e inflamatório no corpo humano, fornecendo a base biológica para o papel da vitamina D em doenças inflamatórias [39].

O presente estudo mostrou influência do polimorfismo rs1544410 com A1GPA no genótipo *Bb* após análise de regressão logística, mas vale ressaltar que a outra proteína de fase aguda também avaliada PCR, não apresentou relação, o que pode ser um resultado questionável. Estudo prévio realizado na mesma cidade também não observou a relação destas duas PFA com genótipos do polimorfismo rs1555510 em idosos não institucionalizados [35].

Estudo realizado em pacientes com câncer de etnia caucasiana recrutados em um hospital da Itália, também investigaram estes dois polimorfismos associados com o marcador inflamatório PCR e não observou associação significativa quando investigados os indivíduos com câncer/ caquéticos e com câncer/ não caquéticos para rs2228570. Entretanto, para o polimorfismo rs1544410, os pesquisadores encontraram diferença significativa entre os genótipos com maior média de PCR no *bb* [40], diferentemente do presente estudo que apresentou menor média neste genótipo, apesar de não significativa.

O polimorfismo rs2228570 também foi investigado em estudo realizado com indivíduos adultos diabéticos no Irã, e mostrou que a suplementação de 250ml de uma bebida láctea duas vezes ao dia contendo 500UI de vitamina D/ 250ml durante 12 semanas, reduziu os valores bioquímicos da PCR em todos os genótipos, porém, diminuiu mais nos indivíduos com genótipo *FF* e menos responsivos os com genótipo *ff* [41].

Para nossos resultados, era esperado que para amostras de indivíduos aparentemente saudáveis, onde 71,1% deles apresentavam-se eutróficos, que os valores dos marcadores do processo inflamatório não se mostrassem significativamente elevados.

Conclusão

Apesar de alguns estudos encontrarem associações dos polimorfismos do gene VDR com FRCV em diferentes populações, o nosso não observou. Publicações prévias, até o momento e sob nosso conhecimento, não foram exploradas utilizando no mesmo estudo marcadores antropométricos, do perfil lipídico, do estresse oxidativo e do processo inflamatório em população brasileira de adolescentes aparentemente saudáveis. A inconsistência nos resultados existentes na literatura, reforça a necessidade de mais estudos desta natureza em indivíduos jovens saudáveis de mesma etnia e com amostras representativas. Este esclarecimento é de forte relevância na tentativa de discutir os achados e identificar se de fato existe influência destes polimorfismos nos marcadores de risco de doenças cardiovasculares.

Limitações: Outras variáveis estudadas na literatura que podem estar atribuídas como fatores de risco para doenças cardiovasculares e possivelmente influenciadas por estes polimorfismos aqui estudados, não foram avaliadas. Entre elas: interleucinas, medidas de composição corpórea e variáveis de estilo de vida. Nosso estudo não avaliou de forma prospectiva estes adolescentes, o que determinaria um resultado mais fidedigno.

Agradecimentos: à Secretaria Municipal de Saúde de João Pessoa/PB, por consentir a realização deste estudo com adolescentes matriculados nas escolas públicas participantes.

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

Referências

1. Maeda SS, Borba VZ, Camargo MB, Silva DM, Borges JL, Bandeira F, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014; 58: 411-433.
2. Galvão LO, Galvão MF, Reis CMS, Batista CMA, Casulari LA. Current considerations about vitamin D. *Brasília Med.* 2014; 50: 324-332.
3. Schöttker B, Ball D, Gellert C, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and overall mortality. A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Ageing Res Rev.* 2013; 12: 708-18.

4. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19:2685-95.
5. Feldman D, Pike, JW, Glorieux FH. Vitamin D. Academic Press. 2005; 1892.
6. Jorde LB, Carey JC, Bamshad M. Genetic Variation: Its Origin and Detection. In *Genética Médica*. Seattle, Washington: Ed Elsevier; 2010, pp. 26-55.
7. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004; 338: 143-156.
8. Ferrarezi DA, Bellili-Muñoz N, Dubois-Laforgue D, Cheurfa N, Lamri A, Reis AF, et al. Allelic variations of the vitamin D receptor (VDR) gene are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetics: the DIABHYCAR prospective study.. *Diabetes Metab.* 2013; 39:263-70.
9. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alkharfy KM, Khan N, Mohammed AK, Vinodson B, et al. Association of VDR-gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency. *Gene.* 2014; 54:129-33.
10. Zhao Y, Liao S, He J, Jin Y, Fu H, Chen X, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with metabolic syndrome: a case-control design of population-based cross-sectional study in North China. *Lipids Health Dis.* 2014; 13:129.
11. de Jongh RT, Lips P, Rijs KJ, Van Schoor NM, Kramer MH, Vandenbroucke JP, et al. Associations between vitamin D receptor genotypes and mortality in a cohort of older Dutch individuals. *Eur J Endocrinol.* 2011; 164:75-82.
12. Al-Daghri NM, Guerini FR, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Draz HM, ,et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity and inflammosome activity.. *PLoS One.* 2014; 9: e102141.
13. Arabi A¹, Mahfoud Z, Zahed L, El-Onsi L, El-Hajj Fuleihan G. Effect of age, gender and calciotropic hormones on the relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64:383-91.
14. Arabi A, Zahed L, Mahfoud Z, El-Onsi L, Nabulsi M, Maalouf J, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms modulate the skeletal response to vitamin D supplementation in health girls. *Bone.* 2009; 45:1091-7.
15. Kana RM. The effect of FokI vitamin D receptor polymorphism on bone mineral density in Jordanian perimenopausal women. *Indian J Hum Genet.* 2013; 19:233-8.

16. Khan RJ, Riestra P, Gebreab SY, Wilson JG, Gaye A, Xu R, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Abdominal Visceral Adipose Tissue Volume and Serum Adipokine Concentrations but Not with Body Mass Index or Waist Circumference in African Americans: The Jackson Heart Study. *J Nutr.* 2016; 146:1476-82.
17. Laczmanski L, Milewicz A, Lwow F, Puzianowska-Kuznicka M, Pawlak M, Kolackov K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and cardiovascular risk variables in elderly Polish subjects. *Gynecol Endocrinol.* 2013; 29:268-72.
18. Cobayashi F, Hatzlhofer L, Cardoso MA. 25-hydroxivitamin D₃ levels, BsmI polymorphism and insulin resistance in Brazilian Amazonian Children. *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 12531-46.
19. Peters BS, dos Santos LC, Fisberg M, Wood RJ, Martini LA. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. *Ann. Nutr. Metab.* 2009; 54:15-21.
20. Friedewald WT, Levy, R. I.; Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chemistry.* 1972;18: 499-502.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem.* 1979; 95: 351-58.
22. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Scienc Tech Lebensmittel-Wissenschaft & Tech.* 1995; 28:25-30.
23. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign III: Human Kinetics Books; 1991.
24. WHO World Health Organization. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization; 1995.
25. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006.
26. Taylor RW, Williams SM, Goulding A. Evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio, and the conicity index as screening tools or high trunk fat mass, as

- measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3-19 y. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 490-5.
27. Ho SY, Lam TH, Janus E D. Waist to stature ratio is more strongly associated. with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. *Ann. Epidemiol.* 2003; 13: 683-91.
 28. Miller Sa, Dykes Dd, Polesky Hf. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:1215.
 29. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur J, Usadel KH, et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes.* 2000; 49:504-7.
 30. Chiu KC, Chuang LM, Yoon C. The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. *Med Genet. Med Genet.* 2001; 2:2.
 31. Santos BR , Mascarenhas LP , Satler F , Boguszewski MC , 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; 12:62.
 32. Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Płaksej J, Tworowska U, Jedrzejuk D, et al. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male .* 2008; 11: 134-9.
 33. Hajj A, Chedid R, Chouery E, Megarbané A, Gannagé-Yared MH. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms, cardiovascular risk factors and adiponectin in a healthy young population. *Pharmacogenomics.* 2016; 17:1675-1686.
 34. Tworowska-Bardzińska U, Lwow F, Kubicka E, Łaczmański Ł, Jedrzejuk D, Dunajska K, et al. The vitamin D receptor gene BsmI polymorphism is not associated with anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2008;24:514-8.
 35. Issa CT, Silva AS, Toscano LT, Medeiros MS, Persuhn DC, da Silva Diniz A, et al. Relationship between cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects: Cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. *Exp Gerontol.* 2016;81:56-64.

36. Al-Daghri NM, Mohammed AK, Al-Attas OS, Ansari MGA, Wani K, Hussain SD, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Modify Cardiometabolic Response to Vitamin D Supplementation in T2DM Patients. *Sci Rep.* 2017; 7: 8280.
37. Soroush N, Radfar M, Hamidi AK, Abdollahi M, Qorbani M, Razi F, et al. Vitamin D receptor gene FokI variant in diabetic foot ulcer and its relation with oxidative stress. *Gene.* 2017; 599:87-91.
38. Shab-Bidar S, Neyestani TR, Diazavery A. The interactive effect of improvement of vitamin D status and VDR FokI variants on oxidative stress in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2015; 69: 216-22.
39. Brennan A, Katz DR, Nunn JD, Barker S, Hewison M, Fraher LJ. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D₃ metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology.* 1987; 61: 457-61.
40. Punzi T, Fabris A, Morucci G, Biagioni P, Gulisano M, Ruggiero M, et al. C-Reactive Protein Levels and Vitamin D Receptor Polymorphisms as Markers in Predicting Cachectic Syndrome in Cancer Patients. *Mol Diagn Ther* 2012; 16: 115-124.
41. Neyestani TR, Djazayeri Um, Shab-Bidar S, Eshraghian MR, Kalayi Um, Shariátzadeh N, et al. Vitamin D Receptor *Fok-I* Polymorphism Modulates Diabetic Host Response to Vitamin D Intake: Need for a nutrigenetic approach. *Diabetes Care.* 2013; 36: 550–556

TABELAS

Tabela 1. Características antropométricas e bioquímicas dos adolescentes.

Variável	Média	DP	Mediana	p25- p75
IMC (Kg/m ²)	22,7	4,7	22,0	19,3-24,8
CC (cm)	74,5	10,9	73,0	67,5-78,0
RCA	0,45	0,06	0,44	0,41-0,48
TG (mg/dL)	80,3	38,5	71,0	54,5-93,0
CT (mg/dL)	155,9	27,7	153,0	138,0-170,0
LDL-c (mg/dL)	93,6	23,4	91,4	78,1-106,4
VLDL-c (mg/dL)	16,0	7,7	14,2	10,9-18,6
HDL-c (mg/dL)	46,3	9,9	46,5	39,0-52,0
PCR (%)	1,77	2,34	0,96	0,57-1,82
A1GPA (mg/dL)	88,9	21,8	83,0	71,0-96,0
MDA	3,52	1,11	3,60	2,85-4,15
CAT (mg/dL)	31,3	8,2	32,0	26,5-38,0

Os dados são expressos em média (desvio padrão) e mediana (p25 - 075). TG - Triglicerídeos; CT-c - Colesterol Total; LDL-c - Low Density Lipoprotein; VLDL-c - Very Low Density Lipoprotein; HDL-c - High Density Lipoprotein; PCR - Proteína C Reativa; A1GPA - 1 Alfa Glicoproteína Ácida; MDA - Malonaldeído; CAT - Capacidade Antioxidante; IMC - Índice de Massa Corporal; CC - Circunferência da Cintura; RCA - Relação Cintura/Altura.

Tabela 2. Valores em média ou mediana das variáveis antropométricas e bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs1544410 dos adolescentes.

Variáveis	rs1544410			
	BB n=47 (22,6%)	Bb n=70 (33,7%)	bb n=91 (43,7%)	p-valor
TG (mg/dL)	70,0 (53,0-92,0)	70,0 (55,0-91,0)	75,0 (58,0-95,0)	0,548
CT (mg/dL)	152,0(29,1)	155,7(28,3)	158,1(26,3)	0,466
LDL-c (mg/dL)	90,0 (76,1-104,8)	90,0 (75,8-105,4)	92,6 (79,8-108,0)	0,759
VLDL -c (mg/dL)	14,0 (10,6-18,4)	14,0 (11,0-18,2)	15,0 (11,6-19,0)	0,548
HDL-c (mg/dL)	45,6(9,6)	45,4(9,5)	47,4(10,3)	0,385
PCR (mg/dL)	0,97 (0,60-1,81)	0,97 (0,61-1,81)	0,94 (0,56-1,85)	0,602
A1GPA (mg/dL)	83,0 (73,5-99,5)	86,0 (78,0-95,0)	81,0 (69,0-94,0)	0,286
MDA	3,55(1,05)	3,62(1,05)	3,44(1,20)	0,600
CAT (%)	32,5 (26,0-36,5)	32,5 (27,0-38,0)	32,0 (26,0-38,0)	0,861
IMC (Kg/m ²)	22,3 (19,7-25,6)	22,1 (19,1-24,4)	21,8 (19,3-24,4)	0,764
CC (cm)	72,7 (68,0-79,1)	73,0 (67,5-78,0)	72,5 (67,0-77,5)	0,737
RCA	0,44 (0,42-0,49)	0,44 (0,41-0,47)	0,44 (0,41-0,48)	0,765

Os dados com distribuição normal são descritos como média (DP) no Teste ANOVA one-way e para dados não-normais, usado mediana (p25 - p75) no Teste Kruskal-Wallis. TG - Triglicerídeos; CT-c - Colesterol Total; LDL-c - Low Density Lipoprotein; VLDL-c - Very Low Density Lipoprotein; HDL-c - High Density Lipoprotein; PCR - Proteína C Reativa; A1GPA - 1 Alfa Glicoproteína Ácida; MDA - Malonaldeído; CAT - Capacidade Antioxidante; IMC - Índice de Massa Corporal; CC - Circunferência da Cintura; RCA - Relação Cintura/Altura.

Tabela 3. Valores em média ou mediana das variáveis antropométricas e bioquímicas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo rs2228570 dos adolescentes.

Variáveis	rs2228570			
	FF n=92 (n=44,2%)	Ff n=94 (n=45,2%)	ff n=22 (10,6%)	p-valor
TG (mg/dL)	71,5 (54,0-91,0)	69,5 (55,0-93,0)	68,5 (52,0-101,0)	0,989
CT (mg/dL)	155,1(27,5)	155,0(26,0)	163,7(35,0)	0,383
LDL-c (mg/dL)	92,6 (77,3-105,9)	89,4 (77,0-105,0)	93,2 (80,2-123,2)	0,678
VLDL -c (mg/dL)	14,3 (10,8-18,2)	13,9 (11,0-18,6)	13,7 (14,4-20,2)	0,989
HDL-c (mg/dL)	45,8(11,1)	46,4(8,7)	48,0(9,2)	0,633
PCR (mg/dL)	0,96 (0,57-1,54)	0,97 (0,59-2,00)	0,79 (0,50-1,76)	0,354
A1GPA (mg/dL)	83,0 (75,5-99,0)	83,0 (70,0-95,0)	80,5 (66,0-93,0)	0,473
MDA	3,59(1,14)	3,50(1,07)	3,36(1,21)	0,674
CAT (%)	33,0 (26,5-37,5)	31,5 (25,0-37,0)	34,0 (29,0-40,0)	0,403
IMC (Kg/m ²)	21,7 (19,1-24,5)	22,1 (19,2-24,9)	22,3 (20,2-25,8)	0,800
CC (cm)	73,0 (69,0-78,0)	72,0 (67,0-77,5)	73,0 (67,5-79,0)	0,642
RCA	0,44 (0,41-0,48)	0,44 (0,41-0,47)	0,46 (0,41-0,49)	0,742

Os dados com distribuição normal são descritos como média (DP) no Teste ANOVA one-way e para dados não-normais, usado mediana (p25 - p75) no Teste Kruskal-Wallis. TG - Triglicerídeos; CT-c - Colesterol Total; LDL-c - Low Density Lipoprotein; VLDL-c - Very Low Density Lipoprotein; HDL-c - High Density Lipoprotein; PCR - Proteína C Reativa; A1GPA - 1 Alfa Glicoproteína Ácida; MDA - Malonaldeído; CAT - Capacidade Antioxidante; IMC - Índice de Massa Corporal; CC - Circunferência da Cintura; RCA - Relação Cintura/Altura.

OUTROS RESULTADOS

Tabela 1. Análise de regressão logística dos genótipos do polimorfismo rs1544410 em relação aos parâmetros bioquímicos.

	Não-ajustada			Ajustada		
	OR	p-valor	IC	OR	p-valor	IC
CT						
bb	1,0					
Bb	0,65	0,181	0,35-1,22	0,64	1,65	0,34-1,20
BB	0,56	0,180	0,27-1,14	0,53	0,88	0,26-1,10
bb	1,0					
Bb+BB	0,61	0,081	0,35-1,06	0,60	0,068	0,34-1,04
BB	1,0					
Bb+bb	1,36	0,084	0,96-1,94	1,39	0,068	0,98-1,98
HDL						
bb	1,0					
Bb	0,88	0,699	0,47-1,65			
BB	0,90	0,763	0,44-1,81			
bb	1,0					
Bb+BB	0,89	0,675	0,51-1,54			
BB	1,0					
Bb+bb	1,06	0,724	0,75-1,50			
LDL						
bb	1,0					
Bb	0,81	0,507	0,43-1,51			
BB	0,69	0,308	0,34-1,40			
bb	1,0					
Bb+BB	0,76	0,328	0,44-1,32			
BB	1,0					
Bb+bb	1,21	0,291	0,85-1,71			
VLDL						
bb	1,0					
Bb	0,64	0,168	0,34-1,20	0,63	0,150	0,33-1,18
BB	0,63	0,210	0,31-1,29	0,59	0,149	0,28-1,21
bb	1,0					
Bb+BB	0,64	0,112	0,37-1,11	0,61	0,084	0,35-1,07
BB	1,0					
Bb+bb	1,29	0,156	0,91-1,83	1,34	0,109	0,94-1,91
TG						
bb	1,0					
Bb	0,64	0,168	0,34-1,20	0,63	0,150	0,33-1,18
BB	0,63	0,210	0,31-1,29	0,59	0,149	0,28-1,21
bb	1,0					

Bb+BB	0,64	0,112	0,37-1,11	0,61	0,084	0,35-1,07
BB	1,0					
Bb+bb	1,29	0,156	0,91-1,83	1,34	0,109	0,94-1,91
PCR						
bb	1,0					
Bb	1,60	0,143	0,85-3,01	1,62	0,154	0,83-3,17
BB	1,44	0,312	0,71-2,93	1,31	0,484	0,62-2,78
bb	1,0					
Bb+BB	1,54	0,128	0,88-2,67	1,49	0,181	0,83-2,67
BB	1,0					
Bb+bb	0,80	0,223	0,57-1,14			
A1GPA						
bb	1,0					
Bb	1,95	0,039*	1,03-3,66	2,02	0,040*	1,03-3,95
BB	1,28	0,489	0,63-2,61	1,13	0,747	0,53-2,41
bb	1,0					
Bb+BB	1,64	0,078	0,94-2,86	1,60	0,116	0,89-2,87
BB	1,0					
Bb+bb	0,83	0,295	0,59-1,17			
MDA						
bb	1,0					
Bb	1,30	0,411	0,69-2,44			
BB	1,40	0,353	0,69-2,84			
bb	1,0					
Bb+BB	1,34	0,300	0,77-2,33			
BB	1,0					
Bb+bb	0,84	0,315	0,59-1,18			
CAT						
bb	1,0					
Bb	1,07	0,836	0,57-1,99			
BB	1,11	0,763				
bb	1,0					
Bb+BB	1,09	0,766	0,63-1,88			
BB						
Bb+bb	0,95	0,753	0,67-1,34			

Abreviações: OR – oddis ratio e IC – Intervalo de Confiança. Valores da mediana: CT= 153mg/dL; HDL=46,5mg/dL; LDL= 91,4mg/dL; VLDL= 14,2mg/dL; TG= 71,0mg/dL; PCR= 0,96; A1GPA= 83,0; MDA= 3,6; CAT=32,0. *p< 0,05. Análise ajustada para idade, IMC e CC.

Tabela 2. Análise de regressão logística dos genótipos do polimorfismo rs2228570 em relação aos parâmetros bioquímicos.

	Não-ajustada			Ajustada		
	OR	p-valor	IC	OR	p-valor	IC
CT						
ff	1,0					
Ff	0,53	0,194	0,21-1,37	0,54	0,196	0,21-1,38
FF	0,69	0,445	0,27-1,78	0,70	0,467	0,27-1,81
FF						
FF	1,0					
Ff	0,77	0,383	0,43-1,38			
ff	1,44	0,445	0,56-3,71			
ff						
ff	1,0					
Ff+FF	0,97	0,891	0,64-1,47			
FF						
FF	1,0					
Ff+ ff	1,03	0,891	0,68-1,55			
HDL						
ff	1,0					
Ff	0,60	0,290	0,23-1,55	0,58	0,282	0,22-1,55
FF	0,48	0,134	0,18-1,25	0,45	0,112	0,17-1,20
FF						
FF	1,0					
Ff	1,24	0,460	0,70-2,21	1,29	0,392	0,72-2,32
ff	2,08	0,134	0,80-5,44	2,21	0,112	0,83-5,88
ff						
ff	1,0					
Ff+FF	0,73	0,143	0,48-1,11	0,71	0,111	0,46-1,08
FF						
FF	1,0					
Ff+ ff	1,37	0,143	0,90-2,07	1,41	0,111	0,92-2,16
LDL						
ff	1,0					
Ff	0,70	0,458	0,28-1,78			
FF	0,95	0,914	0,37-2,42			
FF						
FF	1,0					
Ff	0,74	0,306	0,42-0,32			
ff	1,05	0,914	0,41-2,68			
ff						
ff	1,0					
Ff+FF	1,09	0,674	0,72-1,65			
FF						
FF	1,0					
Ff+ ff	0,91	0,674	0,61-1,18			
VLDL						
ff	1,0					

Ff	0,81	0,652	0,32-2,05				
FF	1,00	>0,999	0,39-2,53				
FF	1,0						
Ff	0,81	0,468	0,45-1,44				
ff	1,00	>0,999	0,39-2,53				
ff	1,0						
Ff+FF	1,08	0,723	0,71-1,63				
FF	1,0						
Ff+ ff	0,93	0,723	0,61-1,40				
TG							
ff	1,0						
Ff	0,81	0,652	0,32-2,05				
FF	1,00	>0,999	0,39-2,53				
FF	1,0						
Ff	0,81	0,468	0,45-1,44				
ff	1,00	>0,999	0,39-2,53				
ff	1,0						
Ff+FF	1,08	0,723	0,71-1,63				
FF	1,0						
Ff+ ff	0,93	0,723	0,61-1,40				
PCR							
ff	1,0						
Ff	2,04	0,140	0,79-5,23	2,45	0,087	0,88-6,82	
FF	1,65	0,301	0,64-4,23	1,91	0,211	0,69-5,27	
FF	1,0						
Ff	1,24	0,471	0,69-2,21				
ff	0,61	0,301	0,24-1,56				
ff	1,0						
Ff+FF	1,09	0,677	0,72-1,65				
FF	1,0						
Ff+ ff	0,92	0,677	0,61-1,38				
A1GPA							
ff	1,0						
Ff	1,38	0,498	0,54-3,55				
FF	1,32	0,560	0,52-3,40				
FF	1,0						
Ff	1,04	0,880	0,59-1,86				
ff	0,75	0,560	0,29-1,94				
ff	1,0						

Ff+FF	1,08	0,723	0,71-1,63
FF	1,0		
Ff+ ff	0,93	0,723	0,61-1,40
MDA			
ff	1,0		
Ff	1,06	0,909	0,42-2,68
FF	0,88	0,794	0,35-2,25
FF	1,0		
Ff	1,20	0,545	0,67-2,13
ff	1,13	0,794	0,44-2,89
ff	1,0		
Ff+FF	0,90	0,627	0,60-1,37
FF	1,0		
Ff+ ff	1,11	0,627	0,73-1,68
CAT			
ff	1,0		
Ff	0,67	0,405	0,26-1,71
FF	0,95	0,914	0,37-2,42
FF	1,0		
Ff	0,71	0,242	0,38-1,26
ff	1,05	0,914	0,41-2,68
ff	1,0		
Ff+FF	1,11	0,623	0,73-1,68
FF	1,0		
Ff+ ff	0,90	0,623	0,60-1,36

Abreviações: OR – oddis ratio e IC – Intervalo de Confiança. Valores da mediana: CT= 153mg/dL; HDL=46,5mg/dL; LDL= 91,4mg/dL; VLDL= 14,2mg/dL; TG= 71,0mg/dL; PCR= 0,96; A1GPA= 83,0; MDA= 3,6; CAT=32,0. Análise ajustada para idade, IMC e CC.

Tabela 3. Análise das variáveis antropométricas em função da distribuição dos genótipos do polimorfismo BsmI e FokI dos adolescentes do Nordeste do Brasil.

	Média (DP) BB (n= 47)	Média (DP) Bb (n= 70)	Média (DP) bb (n= 91)	p-valor
PESO (Kg)	63,07 ±15,5	61,88 ±16,26	60,27 ±13,52	0,56
ALTURA (m)	1,65 ±0,10	1,64 ±0,09	1,63 ±0,07	0,54
IMC (Kg/m²)	23,01 ±4,77	22,74 ±4,82	22,51 ±4,60	0,83
PAS (mmHg)	115,10 ±14,42	112,83 ±15,73	110,42 ±16,65	0,24
PAD (mmHg)	72,71 ±11,11	73,40 ±10,86	73,12 ±9,53	0,94
	FF (n= 92)	Ff (n= 94)	ff (n= 22)	
PESO (Kg)	61,78 ±15,37	60,06 ±12,86	65,13 ±20,11	0,33
ALTURA (m)	1,64 ±0,08	1,63 ±0,09	1,65 ±0,09	0,65
IMC (Kg/m²)	22,73 ±4,70	22,46 ±4,38	23,64 ±5,92	0,57
PAS (mmHg)	113,02 ±15,39	111,61 ±16,85	110,90 ±13,85	0,77
PAD (mmHg)	73,40 ±10,58	73,02 ±9,74	73,04 ±11,07	0,96

Os dados são expressos em média (desvio padrão). Abreviações: IMC- índice de massa corporal; PAS- pressão arterial sistólica; PAD- pressão arterial diastólica. ANOVA one-way.