

DM

A Deficiência de Vitamina D como Fator de Risco para a Doença Cardiovascular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fátima Maria Meneses Costa

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

setembro | 2016

A Deficiência de Vitamina D como Fator de Risco para a Doença Cardiovascular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fátima Maria Meneses Costa

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADORA

Helena Caldeira Araújo

CO-ORIENTADORA

Liliana da Silva Cardoso

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Doutora Helena Caldeira Araújo, Doutorada em Bioquímica, Docente da Faculdade de Ciências da Vida da Universidade da Madeira e da co-orientação da Dra Liliana da Silva Cardoso, Mestre em Bioquímica Aplicada, Técnica Superior de Saúde no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélcio Mendonça.

AGRADECIMENTOS

Quero dirigir o meu sincero agradecimento a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho:

- À Professora Doutora Helena Caldeira Araújo, pela orientação e revisão deste trabalho, pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas, pelos conselhos oportunos, pela motivação e por todos os ensinamentos importantes que me transmitiu ao longo deste trabalho.

- À Dra. Liliana Cardoso, pela sua co-orientação científica e pela revisão deste trabalho, por todos os conselhos e sugestões, pelas frequentes e enriquecedoras trocas de ideias, pela motivação, pela paciência e pela amizade.

- À Dra. Isabel Mendonça, cardiologista e Diretora da Unidade de Investigação do Hospital Dr. Nélío Mendonça por, gentilmente, ter autorizado o recrutamento dos participantes na referida Unidade, pela sua colaboração no desenho experimental deste trabalho, pelo acompanhamento no acesso aos dados clínicos imprescindíveis para a realização deste trabalho e pela sua disponibilidade, simpatia e generosidade.

- À restante equipa da Unidade de Investigação do Hospital Dr. Nélío Mendonça, em especial à Elsa Sousa, à Carolina Freitas e à Sofia Borges, por terem sido incansáveis e por me terem acolhido no seu espaço de forma tão gentil e calorosa. À Mariana Rodrigues, pela sua valiosa colaboração na disponibilização dos dados.

- À Professora Doutora Rita Vasconcelos, da Faculdade de Ciências Exatas e da Engenharia da Universidade da Madeira, pela sua preciosa colaboração na análise estatística dos resultados.

- À Dra. Graça Andrade, Diretora do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélío Mendonça, pela disponibilização de todas as condições necessárias à realização da componente laboratorial deste trabalho.

- Ao Dr. Ilídio Ornelas, por todo o tempo e apoio prestados, por todos os conselhos e sugestões, pela partilha de conhecimentos, pelo incentivo e pela amizade.

- Às empresas Roche e Beckman Coulter, pelo fornecimento de reagentes sem qualquer encargo monetário.

- A todos os participantes que integraram, de forma voluntária, este trabalho.

- Às minhas colegas e companheiras de batalha: Annabella Farinha, Claudia Pita e Dina Abreu. Obrigada pela amizade, pela cumplicidade e pelo companheirismo. Sem vocês a concretização deste trabalho não seria possível!

- Por último, quero fazer um agradecimento especial à minha família. À minha mãe por todo o seu apoio, pela sua confiança, pelo seu exemplo e inspiração. Ao meu irmão e à minha cunhada pela confiança, pelo carinho e pela motivação. Ao Nelson pelo incentivo, pela compreensão, pelo carinho e pela paciência! Obrigada por terem confiado em mim e por terem compreendido todas as minhas ausências. Este trabalho também é um bocadinho vosso!

A todos, o meu sincero Obrigada!

RESUMO

A deficiência de vitamina D, reconhecida como “a vitamina do sol”, constitui um fator de risco para o desenvolvimento de raquitismo, osteomalacia e osteoporose. Contudo, parece também existir uma relação entre a deficiência de vitamina D e outras doenças crónicas.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a deficiência de vitamina D e as doenças cardiovasculares e, simultaneamente, fazer uma avaliação preliminar da deficiência de vitamina D na população madeirense.

Assim, determinou-se a concentração sérica de 25(OH)D de 100 indivíduos saudáveis e 94 indivíduos com doença cardiovascular. A todos avaliou-se o perfil lipídico, o valor de HA_{1C} e as concentrações séricas de glicose, insulina, fibrinogénio, PCRhs e homocisteína. Recolheram-se, ainda, dados antropométricos e informações acerca do estilo de vida.

Obteve-se uma diferença significativa na concentração sérica de 25(OH)D entre controlos saudáveis e doentes cardiovasculares e constatou-se que as mulheres tinham uma concentração sérica de 25(OH)D mais baixa que os homens. Verificou-se que os indivíduos com níveis suficientes de vitamina D apresentavam um perfil lipídico e concentrações de APO B, glicose, insulina e valores de HA_{1C} mais favoráveis. Curiosamente, a concentração sérica de PCRhs e de fibrinogénio era menor nos indivíduos com insuficiência de vitamina D, notando-se a mesma tendência na concentração de homocisteína dos doentes cardiovasculares. Também se verificou que a concentração de Lp(a) era maior nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D. Constatou-se, ainda, que havia uma relação inversa entre o estado de vitamina D e a altura dos indivíduos.

Por último, apesar da Madeira estar numa posição geográfica favorável à produção de vitamina D durante todo o ano, verificou-se que a deficiência e insuficiência de vitamina D são frequentes. Porém, importa salientar que este foi um estudo preliminar nesse sentido e, para uma melhor avaliação, seria necessária uma amostra mais representativa da população madeirense.

Palavras-chave: vitamina D, 25-hidroxivitamina D, 1,25-dihidroxivitamina D, 1 α -hidroxilase, doença cardiovascular.

ABSTRACT

Deficiency of vitamin D, known as "vitamin of the sun", is a risk factor for the development of rickets, osteomalacia and osteoporosis. However, it seems that vitamin D deficiency is also related to other chronic diseases.

The aim of this study was to evaluate the relationship between vitamin D deficiency and cardiovascular disease and, additionally, to accomplish a preliminary assessment of vitamin D deficiency in Madeira population.

For this purpose, serum 25(OH)D was determined in 100 healthy subjects and 94 individuals with cardiovascular disease. Also, the lipid profile, HA_{1C} values and serum concentrations of glucose, insulin, fibrinogen, PCRhs and homocysteine were evaluated. Moreover, the anthropometric data and lifestyle information were obtained.

A significant difference in serum 25(OH)D was observed between healthy controls and cardiovascular patients and it was found that serum 25(OH)D was lower in women than in men. Individuals with adequate levels of vitamin D had better lipid profiles and lower APO B, glucose, insulin and HA_{1C} values. Interestingly, serum PCRhs and fibrinogen were lower in vitamin D insufficient individuals and the same trend was observed for homocysteine concentrations in cardiovascular disease patients. Also, Lp(a) concentrations were higher in individuals with sufficient levels of vitamin D. Additionally, an inverse relationship between vitamin D status and height was observed for the whole sample.

Finally, despite Madeira favorable geographic location for the production of vitamin D all over the year, vitamin D deficiency or insufficiency are frequent. However, this was a preliminary study and, for a better evaluation, a representative sample of Madeira population would be required.

Keywords: vitamin D, 25-hidroxyvitamin D, 1,25-dihidroxyvitamin D, 1 α -hidroxylase, cardiovascular disease.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
1.Introdução	- 1 -
2.Objetivos	- 2 -
2.1.Objetivos gerais.....	- 2 -
2.2.Objetivos específicos.....	- 2 -
3. Revisão da literatura.....	- 3 -
3.1.Vitamina D: Perspetiva histórica.....	- 3 -
3.2.Fontes e síntese de vitamina D.....	- 4 -
3.3.Metabolismo da vitamina D	- 6 -
3.4.Mecanismos de ação da 1,25(OH) ₂ D	- 8 -
3.4.1.Ação endócrina	- 9 -
3.4.2.Ação autócrina e parácrina.....	- 10 -
3.5.Determinação da concentração sérica e deficiência de vitamina D	- 12 -
3.6.Vitamina D e o sistema cardiovascular	- 16 -
3.6.1.Ação da vitamina D no tecido vascular e cardíaco	- 18 -
3.6.2.Ação da vitamina D na pressão arterial.....	- 24 -
3.6.3.Ação da vitamina D na Diabetes Mellitus.....	- 26 -
4.Metodologia	- 28 -
4.1.Recrutamento e seleção de participantes.....	- 28 -
4.2.Recolha de dados.....	- 28 -
4.2.1.Questionários	- 28 -
4.2.2.Exames antropométricos	- 30 -
4.3.Procedimentos laboratoriais	- 31 -

4.3.1.Recolha de sangue.....	- 31 -
4.3.2.Testes laboratoriais.....	- 32 -
4.4.Análise estatística.....	- 41 -
5.Resultados	- 42 -
5.1.Caracterização da população.....	- 42 -
5.1.1.Características biométricas e estilos de vida	- 43 -
5.1.2.Características bioquímicas.....	- 49 -
5.2.Vitamina D	- 55 -
5.2.1.Determinação da concentração sérica de 25(OH)D	- 55 -
5.2.2.Avaliação do estado de vitamina D.....	- 56 -
5.2.3.Concentração sérica de 25(OH)D em função das comorbilidades da população.....	- 57 -
5.2.4.Concentração sérica de 25(OH)D em função do estilo de vida da população	- 59 -
5.2.5.Testes bioquímicos em função do estado de vitamina D	- 66 -
5.2.6.Concentração sérica de 25(OH)D em função de todos os fatores estudados	- 70 -
5.2.7.Concentração de 25(OH)D por eletroquimioluminescência e por imunoquimioluminescência.	- 70 -
6.Discussão.....	- 71 -
7.Conclusão.....	- 92 -
8.Limitações	- 95 -
9.Perspetivas futuras	- 96 -
10.Bibliografia	- 97 -
11.Anexos.....	- 109 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese cutânea da vitamina D.....	- 5 -
Figura 2 - Metabolismo da vitamina D.	- 7 -
Figura 3 - Mecanismo de ação da 1,25(OH) ₂ D.....	- 8 -
Figura 4 - Ação endócrina da vitamina D.	- 10 -
Figura 5 - Ação parácrina e autócrina da 1,25(OH) ₂ D.....	- 11 -
Figura 6 - Mecanismos pelos quais a vitamina D exerce um papel protetor na saúde cardiovascular	- 17 -
Figura 7 - Cobas e411 (Roche Diagnostics).....	- 33 -
Figura 8 - Princípio de imunocompetição para a determinação da 25(OH)D.....	- 34 -
Figura 9 - Caracterização da população quanto ao gênero e à idade.....	- 42 -
Figura 10 - Comorbilidades da população	- 44 -
Figura 11 - Estilo de vida da população: consumo de alimentos ricos em vitamina D.....	- 47 -
Figura 12 - Estilo de vida da população: nível de exposição solar e fototipo de pele.....	- 48 -
Figura 13- Perfil lipídico	- 51 -
Figura 14 - Concentração sérica de APO B	- 52 -
Figura 15 – Concentração sérica de glicose e insulina e valor de HA _{1c} e HOMA	- 53 -
Figura 16 – Concentração sérica de fibrinogénio, PCRhs e homocisteína.....	- 54 -
Figura 17 - Concentração sérica de 25(OH)D.....	- 55 -
Figura 18 - Estado de vitamina D da população, de acordo com a concentração sérica de 25(OH)D dos indivíduos.	- 57 -
Figura 19 – Concentração sérica de 25(OH)D em função das comorbilidades da população -	59 -
Figura 20 – Concentração sérica de 25(OH)D em função do tabagismo e do consumo de bebidas alcoólicas.....	- 61 -
Figura 21 – Concentração sérica de 25(OH)D em função da alimentação	- 62 -
Figura 22 – Concentração sérica de 25(OH)D em função da atividade física	- 63 -
Figura 23 – Concentração sérica de 25(OH)D em função da época do ano, da exposição solar e do fototipo de pele.....	- 65 -

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fontes nutricionais de vitamina D.	- 4 -
Tabela 2 - Avaliação do estado de vitamina D.....	- 13 -
Tabela 3 - Condições que contribuem para a deficiência de vitamina D	- 14 -
Tabela 4 - Características biométricas da população	- 43 -
Tabela 5 - Estilo de vida da população	- 45 -
Tabela 6 – Perfil lipídico, valor de HA _{1C} e HOMA e concentração sérica de glicose, insulina, fibrinogénio, PCRhs e homocisteína.....	- 50 -
Tabela 7 - Concentração sérica de 25(OH)D de acordo com o género	- 56 -
Tabela 8 - Concentração sérica de 25(OH)D em função das comorbilidades da população...	- 58 -
Tabela 9 - Concentração sérica de 25(OH)D em função do estilo de vida da população	- 60 -
Tabela 10 - Concentração sérica de 25(OH)D de acordo com a época do ano, a exposição solar e o fototipo de pele.....	- 64 -
Tabela 11 - Testes bioquímicos em função do estado de vitamina D dos indivíduos.....	- 69 -
Tabela 12 - Concentração de 25(OH)D por eletroquimioluminescência e por imunoquimioluminescência	- 70 -
Tabela 13 - Características gerais dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género	- 120 -
Tabela 14 - Hemograma dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género	- 121 -
Tabela 15 - Avaliação da função renal e da função hepática dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género.....	- 122 -
Tabela 16 - Testes bioquímicos dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género	- 123 -
Tabela 17 - Testes bioquímicos em função do estado de vitamina D da população (divisão em 2 categorias de vitamina D).....	- 124 -

SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN – ácido desoxirribonucleico
ALT – alanina aminotransferase
APO B – apolipoproteína B
AST – aspartato aminotransferase
DBP – proteína específica de ligação à vitamina D
DCV – doenças cardiovasculares
DM – Diabetes Mellitus
EAM – enfarte agudo do miocárdio
ECA – enzima conversora da angiotensina
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
FGF23 – fator de crescimento de fibroblastos 23
GGT – gama glutamiltransferase
HA_{1C} – hemoglobina glicada
HDL – lipoproteínas de alta densidade
HOMA - *Homeostatic Model Assessment*
HPLC – cromatografia líquida de alta resolução
HTA – hipertensão arterial
IL - interleucina
IMC – índice de massa corporal
INF- γ – interferão gama
LDH – lactato desidrogenase
LDL – lipoproteínas de baixa densidade
Lp(a) – lipoproteína A
MDH – malato desidrogenase
NADH – nicotinamida adenina dinucleótido, na forma reduzida
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleótido, na forma oxidada
PAD – pressão arterial diastólica
PAS – pressão arterial sistólica
PCR – proteína C reativa
PCRhs – proteína C reativa de alta sensibilidade
PTH – hormona da paratiroide
RXR – recetor do ácido retinóico

SRAA – sistema renina angiotensina aldosterona

TNF- α – fator de necrose tumoral α

UV - Ultravioleta

VDR – recetor da vitamina D

VDRE – elementos de resposta da vitamina D

1 α -OHase - 1 α -hidroxilase

1,25(OH)₂D – 1,25-dihidroxivitamina D

24-OHase - 24-hidroxilase

24,25(OH)₂D - 24,25-dihidroxivitamina D

25-OHase - 25-hidroxilase

25(OH)D – 25-hidroxivitamina D

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade em Portugal e constituem uma das principais causas de incapacidade e de falta de qualidade de vida. Assim, as DCV constituem um enorme desafio nos sistemas de saúde, devido à sua grande prevalência e aos custos elevados do seu tratamento ^[1, 2].

A maior parte das DCV resulta de um estilo de vida inadequado e de fatores de risco que podem ser modificáveis. Hábitos de vida adotados por grande parte da população como o sedentarismo, o tabagismo e maus hábitos alimentares são fatores de risco a evitar. Outros fatores de risco com grande impacto nas DCV são a hipertensão arterial (HTA), a obesidade, o *stress*, a diabetes e a hipercolesterolemia.

Nas últimas décadas, vários estudos têm defendido uma relação entre as DCV e a deficiência de vitamina D. A falta desta vitamina, bem conhecida como um fator de risco para o raquitismo e para a osteoporose, tem vindo a ser relacionada com várias doenças crónicas, por desempenhar inúmeras funções biológicas que vão muito além do metabolismo ósseo ^[3, 4].

No entanto, o papel da vitamina D na mortalidade e morbilidade das DCV é um tema recente e controverso. Embora alguns estudos epidemiológicos sugiram uma associação entre as baixas concentrações de vitamina D e as DCV, ainda não se conseguiu estabelecer uma relação de causa-efeito. Alguns estudos sugerem até que a vitamina D possa ser um biomarcador do estilo de vida, uma vez que a insuficiência e a deficiência de vitamina D têm surgido associadas a estilos de vida menos saudáveis ^[5, 6, 7].

Este estudo pretende contribuir para um melhor conhecimento da relação entre as DCV e a concentração sérica de vitamina D, bem como avaliar preliminarmente a prevalência da deficiência em vitamina D, numa população madeirense.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Os principais objetivos deste trabalho foram determinar a relação entre as baixas concentrações de vitamina D e a doença cardiovascular e realizar um estudo preliminar para avaliar se existe deficiência de vitamina D, na população madeirense.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com este estudo pretendeu-se avaliar a relação entre a deficiência de vitamina D e a doença cardiovascular. Para o efeito, estudaram-se dois grupos de indivíduos adultos. Um grupo de indivíduos saudáveis (controlos) e um grupo de indivíduos com doença cardiovascular (doentes).

Para cada grupo foram determinados, laboratorialmente, vários parâmetros de rotina (hemograma, avaliação das funções hepática e renal) e outros parâmetros que se encontram relacionados com a doença cardiovascular (o perfil lipídico, HA_{1C} , concentrações séricas de glicose, insulina, fibrinogénio, PCRhs e homocisteína). Foi, ainda, determinada a concentração sérica de 25(OH)D. Para além disso, recolheram-se, também, vários dados antropométricos e informações acerca do estilo de vida de todos os indivíduos.

Foram analisados estatisticamente e comparados, os parâmetros laboratoriais e os dados antropométricos e de estilos de vida de ambos os grupos em estudo (controlos e doentes). Esses parâmetros foram relacionados com as concentrações de 25(OH)D.

Finalmente foram comparados dois métodos de determinação da concentração sérica de 25(OH)D, a fim de avaliar as diferenças.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. VITAMINA D: PERSPETIVA HISTÓRICA

Estima-se que a vitamina D exista há cerca de 750 milhões de anos e pensa-se que esta possa ter desempenhado um papel importante na evolução dos mamíferos.

No ser humano, a deficiência de vitamina D e as suas consequências para a saúde foram reconhecidas inicialmente com a industrialização do norte da Europa, a meados do século XVII. Nesta altura, a maioria das crianças que viviam nas cidades sobrelotadas e poluídas do norte da Europa desenvolveram raquitismo, que se caracteriza pelo aparecimento de deformações ósseas, atraso do crescimento e fraqueza muscular. Esta doença, originada pela privação de exposição solar, tornou-se o flagelo da industrialização do norte da Europa e EUA [8, 9].

Já no século XIX verificou-se que era possível prevenir o raquitismo com o consumo de óleo de fígado de bacalhau, que se sabia ser rico em vitamina A, pelo que se pensou que a falta desta vitamina era a responsável pelo raquitismo. No entanto, veio a verificar-se que o responsável pela cura do raquitismo era outro composto, até então desconhecido, e ao qual se deu o nome de vitamina D. Posteriormente verificou-se que a exposição à luz solar e à luz ultravioleta (UV) artificial também prevenia e curava o raquitismo. Foi em 1822 que se reconheceu, pela primeira vez, a importância da exposição solar na prevenção e cura do raquitismo tendo-se reconhecido, mais tarde, que a radiação UV era a responsável por esse efeito [8].

Mais tarde pensou-se que, se era possível irradiar pessoas e animais com radiação UV, também era possível irradiar alimentos, iniciando-se assim a fortificação dos alimentos com vitamina D. O início da fortificação do leite com vitamina D foi um passo importante que permitiu erradicar o raquitismo nos EUA e na Europa. No entanto, na década de 1950, ocorreu um surto de hipercalcemia neonatal na Grã-Bretanha e, embora houvesse poucas evidências, atribuiu-se a causa a uma possível intoxicação por vitamina D. Esta situação levou à proibição da fortificação do leite com vitamina D na Europa e, apenas recentemente, a Suécia e a Finlândia retomaram a fortificação do leite com vitamina D [8, 10].

Atualmente a deficiência de vitamina D voltou a ganhar relevo e a sua importância tem vindo a ser estudada em condições que vão muito além da saúde óssea.

3.2. FONTES E SÍNTESE DE VITAMINA D

Tendo sido inicialmente reconhecida como uma vitamina necessária em pequenas quantidades para manter a homeostase do cálcio e do fósforo no organismo, a vitamina D é atualmente considerada uma hormona que desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos ^[7, 11].

Quimicamente, a vitamina D é uma hormona esteróide lipossolúvel, capaz de exercer uma ação endócrina, parácrina e autócrina. Uma particularidade desta vitamina é o facto de poder ser obtida tanto pela sua síntese endógena como por fontes exógenas, através da alimentação. Existem várias formas químicas da vitamina D mas as principais são a vitamina D₂ ou ergocalciferol e a vitamina D₃ ou colecalciferol. A designação de vitamina D compreende tanto a vitamina D₂ como a D₃ ^[12, 13].

A vitamina D₂ é a forma predominante nas plantas e invertebrados e resulta da irradiação do ergosterol pelos raios UV-B, sendo obtida apenas através da alimentação. No entanto, a alimentação ocidental não é rica em vitamina D₂, pelo que esta é obtida principalmente pelo consumo de alimentos fortificados ou pela toma de suplementos alimentares. Por outro lado, a vitamina D₃ é a forma predominante no ser humano e resulta da irradiação do 7-deidrocolesterol ou pró-vitamina D₃ pelos raios UV-B, a comprimentos de onda entre 290 e 315nm, convertendo-o em pré-vitamina D₃. Embora possa ser obtida através da alimentação, a síntese cutânea constitui a principal fonte de vitamina D₃ (80 a 90%), uma vez que os alimentos ricos nesta vitamina são escassos, destacando-se o salmão, a sardinha, o atum, os ovos, o fígado de vaca e o óleo de fígado de bacalhau (Tabela 1) ^[11, 12].

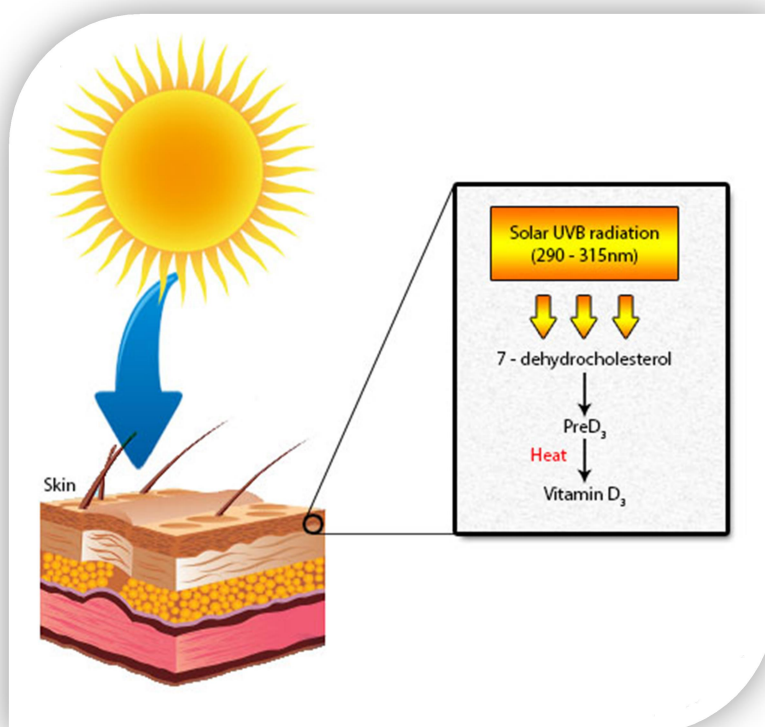
Tabela 1 - Principais fontes nutricionais de vitamina D ^[14].

Alimento	Teor de vitamina D
Sardinha fresca	21 µg/100 g
Salmão	11 µg/100 g
Sardinha enlatada	8,8 µg/100 g
Gema de ovo	4,9 µg/100 g
Atum fresco	4,2 µg/100 g
Fígado de vaca	1,1 µg/100 g
Atum enlatado	0,4 µg/100 g

A síntese cutânea de vitamina D₃ (Figura 1) inicia-se com a irradiação do 7-deidrocolesterol presente na pele. No ser humano, o 7-deidrocolesterol está presente em todas as camadas da pele, encontrando-se cerca de 65% na epiderme e os restantes 35% na derme, pelo que é na epiderme que ocorre a síntese da maior parte de pré-vitamina D₃ (cerca de 95%) [15].

Durante a exposição solar, o 7-deidrocolesterol presente na pele absorve a radiação UV-B e é convertido em pré-vitamina D₃ na membrana plasmática dos queratinócitos. A pré-vitamina D₃ é uma molécula termolábil e, através da temperatura da pele, sofre rapidamente uma isomerização que resulta na formação de vitamina D₃. Por outro lado, a pré-vitamina D₃ também pode sofrer uma fotoconversão dando origem a produtos biologicamente inativos como o lumiesterol e o taquiesterol, sendo este um mecanismo importante para evitar a produção excessiva de vitamina D, após longos períodos de exposição solar [15, 16].

Figura 1 - Síntese cutânea da vitamina D. Adaptado de [8] e [17]



Uma vez formada, a vitamina D₃ é expulsa da célula para o meio extracelular, sendo depois atraída para os capilares e entrando na circulação sanguínea. Uma vez em circulação, a vitamina D será sujeita a uma série de processos até se tornar numa molécula biologicamente ativa [8].

3.3. METABOLISMO DA VITAMINA D

A vitamina D, quer seja obtida através da alimentação ou sintetizada na pele, é um composto biologicamente inativo e, por isso, precisa de ser metabolizada para se tornar ativa e desempenhar diversas funções no organismo.

A Figura 2 ilustra o metabolismo da vitamina D. A vitamina D que é obtida através da alimentação (vitamina D₂ e vitamina D₃) é incorporada nas quilomicras e, posteriormente, absorvida no sistema linfático. A partir daí entra em circulação onde se liga a lipoproteínas e a uma α 1-glicoproteína, a proteína específica de ligação à vitamina D (DBP), à qual também se liga a vitamina D₃ produzida na pele. Uma vez que é lipossolúvel, é a ligação a esta proteína que permite que a vitamina D seja transportada na corrente sanguínea [8].

Independentemente da fonte, a vitamina D é transportada pela DBP até ao fígado e o seu excesso é acumulado no tecido adiposo. O armazenamento da vitamina D no tecido adiposo permite aumentar consideravelmente a sua semi-vida, sendo que a vitamina D₂ tem uma semi-vida mais curta do que a vitamina D₃ pois apresenta uma afinidade mais baixa para a DBP [18].

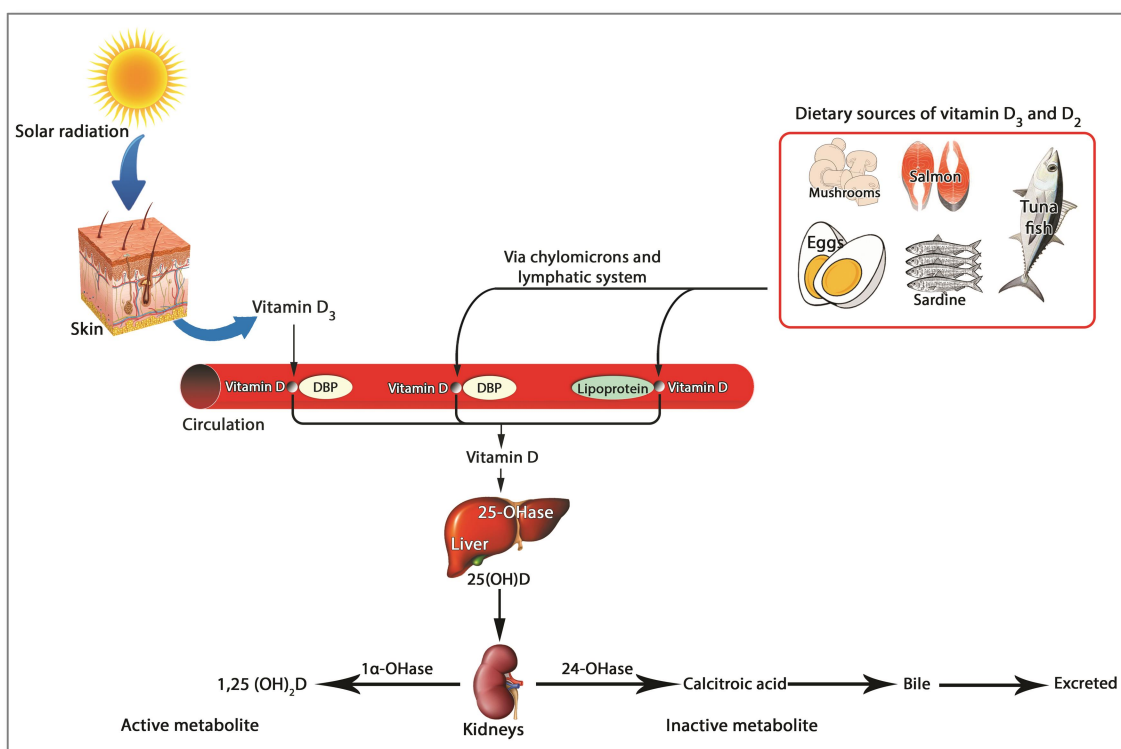
Para tornar-se biologicamente ativa a vitamina D sofre duas hidroxilações que, aparentemente, estão dependentes das enzimas do citocromo *CYP450*. A primeira hidroxilação ocorre no fígado e a segunda ocorre nos rins [18, 19].

No fígado, a vitamina D sofre uma hidroxilação no carbono 25 que é catalisada pela enzima 25-hidroxilase (25-OHase), transformando-se em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] também conhecida por calcidiol [20].

A 25(OH)D é o principal metabolito da vitamina D em circulação, apresentando um tempo de semi-vida de cerca de 15 dias. Este metabolito liga-se à DBP que a transporta até aos rins, onde ocorre a segunda hidroxilação. O complexo formado pela 25(OH)D e pela DBP liga-se à megalina. A megalina é uma proteína transmembranar presente na membrana plasmática das células do túbulo renal, que pertence à família dos recetores de lipoproteínas de baixa densidade e que atua como um recetor celular para a DBP. A megalina é responsável pela captação celular do complexo formado pela 25(OH)D e a DBP. Já no interior da célula, a 25(OH)D é libertada e transformada em 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] por ação da enzima 1 α -hidroxilase (1 α -OHase) [8, 20, 21].

Por outro lado, a 25(OH)D pode ser sujeita à ação da enzima 24-hidroxilase (24-OHase) dando origem à 24,25-dihidroxitamina D [24,25(OH)₂D], também conhecida por ácido calcitróico, que constitui o primeiro metabolito inativo da vitamina D. [8, 20]

Figura 2 - Metabolismo da vitamina D. Adaptado de [8] e [17]



Ao contrário da hidroxilação hepática, a hidroxilação renal é estreitamente regulada pelos níveis de: hormona da paratiroide (PTH), cálcio, fósforo, calcitonina, fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) e pela própria 1,25(OH)₂D [19,20].

A 1,25(OH)₂D, também conhecida por calcitriol, é a forma biologicamente ativa da vitamina D e desempenha diversas funções, não só a nível renal como noutros tecidos, através da ativação dos recetores da vitamina D (VDR) presentes nos diferentes tecidos alvo [8, 20].

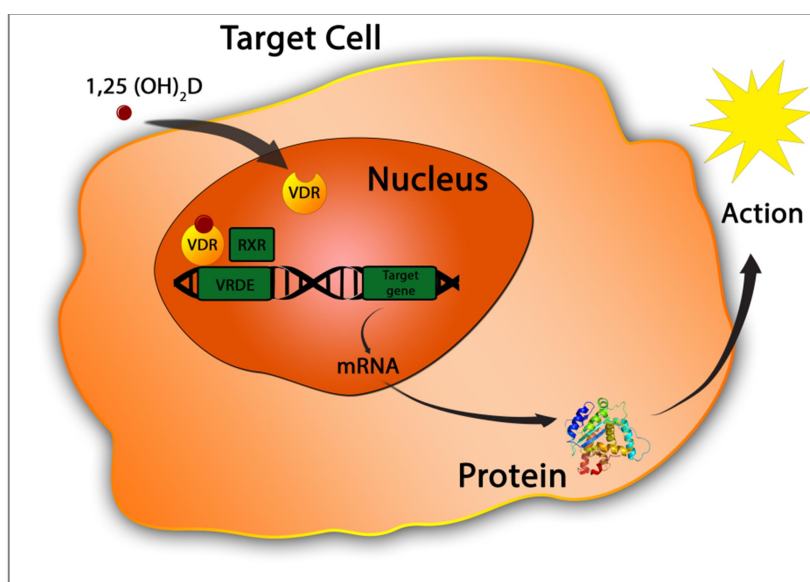
3.4. MECANISMOS DE AÇÃO DA 1,25(OH)₂D

Durante muitos anos investigou-se a relação entre o raquitismo e a 1,25(OH)₂D estudando-se, principalmente, a sua função no metabolismo ósseo e na regulação do cálcio. No entanto, nas últimas décadas vários estudos permitiram alargar os horizontes e atualmente sabe-se que as funções da 1,25(OH)₂D vão muito além do metabolismo ósseo.

A 1,25(OH)₂D atua através da ativação dos VDR que estão presentes num grande número de células de vários tecidos, incluindo miócitos, cardiomiócitos, células pancreáticas, células endoteliais, neurónios, osteoblastos e células do sistema imunitário^[19].

A Figura 3 ilustra o mecanismo de ação da 1,25(OH)₂D. Nas células alvo, a 1,25(OH)₂D liga-se aos VDR presentes na célula, desencadeando uma translocação para o núcleo e uma heterodimerização com o recetor do ácido retinóico (RXR). O complexo formado pela 1,25(OH)₂D, VDR e RXR, liga-se a sequências específicas do ácido desoxirribonucleico (ADN), designados por elementos de resposta da vitamina D (VDRE), complexos esses que podem reprimir ou ativar um determinado número de genes, modulando a síntese de várias proteínas com implicação em diversas funções biológicas^[22].

Figura 3 - Mecanismo de ação da 1,25(OH)₂D. Adaptado de [17] e [24].



Atualmente, além de se reconhecer que a maioria dos tecidos e células do organismo apresentam VDR, estima-se que mais de 200 genes sejam regulados, direta

ou indiretamente, pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ através dos VDR. Além disso, reconhece-se também que a maioria dos tecidos e células do organismo expressam a $1\alpha\text{-OHase}$. Esta enzima já foi identificada na pele, cólon, próstata e macrófagos ativados, entre outros tecidos e células [9].

Assim, através da expressão da $1\alpha\text{-OHase}$ e da ativação do VDR, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode desempenhar uma função endócrina, autócrina ou parácrina.

3.4.1. Ação endócrina

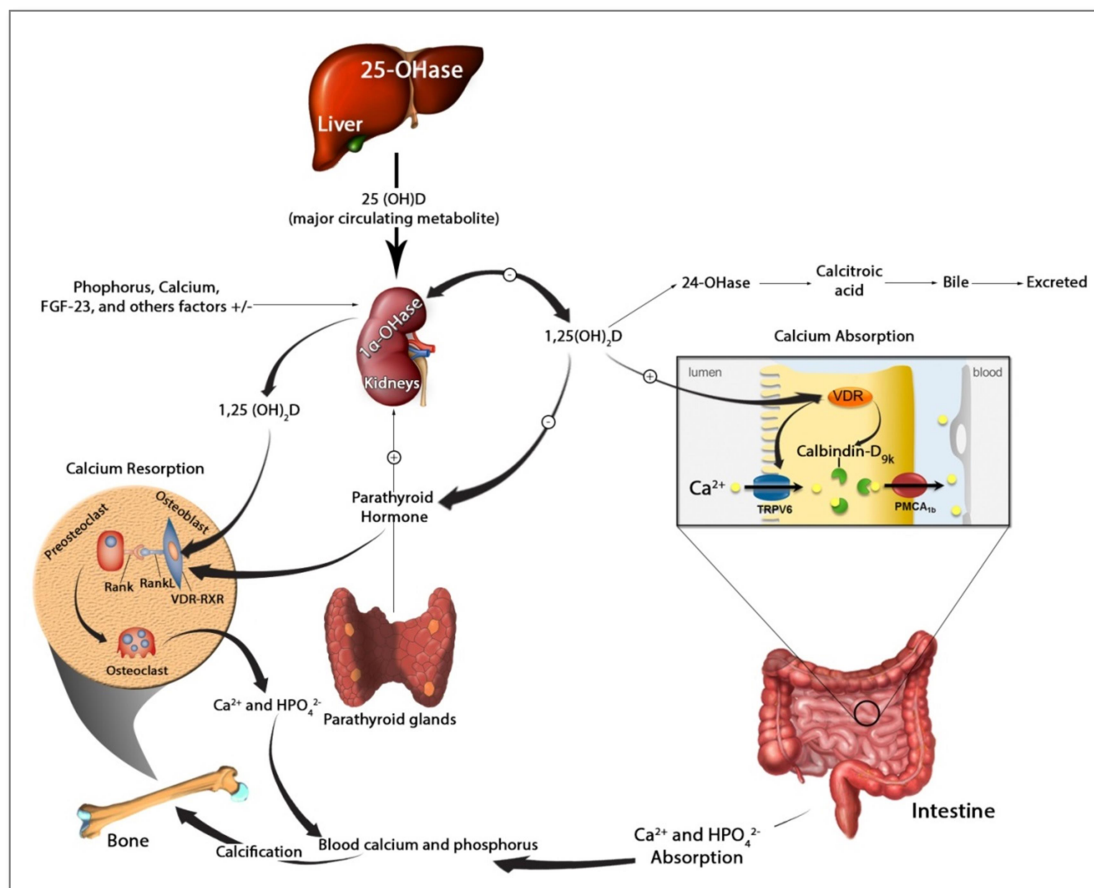
A principal função endócrina da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é manter a homeostase do cálcio e do fósforo de forma a assegurar uma boa saúde óssea e uma mineralização e crescimento ósseo adequados. Este equilíbrio é mantido através de diferentes sistemas fisiológicos, incluindo o aumento da absorção intestinal destes minerais, o aumento da remodelação óssea, o aumento da reabsorção renal de cálcio e fósforo e, por fim, a diminuição da libertação de PTH. A Figura 4 ilustra a ação endócrina da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

No intestino delgado, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ interage com os VDR das células intestinais, resultando no aumento da expressão dos canais de cálcio e da proteína calbidina 9K. Isto permite que uma maior quantidade de cálcio entre na célula, onde a proteína calbidina 9k, que é uma proteína de ligação ao cálcio dependente da vitamina D, intervém na translocação do cálcio para a circulação (Figura 4) [8].

No osso, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ interage com os VDR dos osteoblastos e, em conjunto com a PTH, estimula os pré-osteoclastos a transformarem-se em osteoclastos maduros. Estes libertam ácido hidrocloreídrico e collagenases que dissolvem o osso e libertam cálcio e fósforo na circulação (Figura 4) [8].

No rim, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e a PTH estimulam a reabsorção de cálcio e fósforo nos túbulos renais, diminuindo a excreção urinária destes minerais. Outra ação endócrina importante da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é o controlo da sua própria homeostase, tanto pela supressão de $1\alpha\text{-OHase}$ como pela expressão de 24-OHase e pela capacidade de induzir a expressão de megalina nos túbulos renais. Níveis elevados de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ inibem a síntese da PTH, o que diminui a atividade da $1\alpha\text{-OHase}$ e, dessa forma, a síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Além disso, a reabsorção de fósforo, que é estimulada pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, aumenta a libertação do FGF23 que ativa a 24-OHase (Figura 4) [18, 23].

Figura 4 - Ação endócrina da vitamina D. Adaptado de [18].



3.4.2. Ação autócrina e parácrina

A presença de VDR e de 1 α -OHase numa grande variedade de células e tecidos permite a síntese local de 1,25(OH)₂D que irá desempenhar um papel importante em muitas funções biológicas através de uma ação autócrina e parácrina, que vão muito além da manutenção da saúde óssea [13].

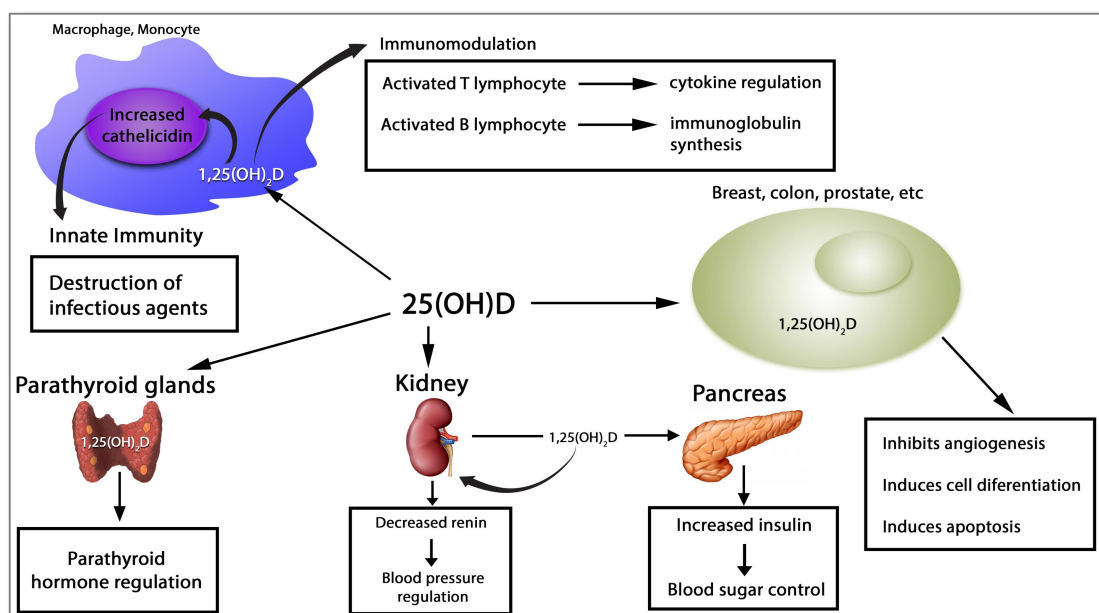
A 1,25(OH)₂D produzida localmente liga-se aos VDR existentes na célula e, tal como na ação endócrina, o complexo formado pelo VDR e pela 1,25(OH)₂D liga-se ao RXR, no núcleo da célula. Este complexo liga-se ao ADN, modulando a síntese de várias proteínas, e o excesso de 1,25(OH)₂D produzida localmente é inativado pela ação da 24-OHase local.

Os efeitos parácrinos e autócrinos da 1,25(OH)₂D dependem do tipo de célula que expressa os VDR e estão ilustrados na Figura 5. Nos macrófagos e monócitos, a 1,25(OH)₂D produzida localmente aumenta a expressão de catelicidina, uma proteína que promove a imunidade inata e que induz a destruição de agentes infecciosos. Além

disso, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzida nos macrófagos e monócitos pode ser libertada na circulação para atuar localmente sobre os linfócitos T ativados, regulando a síntese de citocinas e sobre os linfócitos B ativados, regulando a síntese de imunoglobulinas (Figura 5) [19].

Na paratiroide, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzida localmente inibe a expressão e a síntese da PTH. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzida no rim entra na circulação e consegue diminuir a produção de renina, regulando assim a pressão sanguínea, e atua também sobre as células β -pancreáticas, estimulando a síntese de insulina (Figura 5). Acredita-se também que níveis adequados de $25(\text{OH})\text{D}$ reduzem o risco de desenvolver alguns cânceros, como o cancro da mama, do cólon e da próstata. Isto porque a produção local de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, nestes e outros tecidos, regula vários genes envolvidos no controlo da proliferação celular, na inibição da angiogénese e na indução da diferenciação celular e da apoptose (Figura 5) [19].

Figura 5 - Ação parácrina e autócrina da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Adaptado de [8] e [18]



Embora ainda seja necessário estabelecer uma relação de causa-efeito entre a deficiência de vitamina D e os efeitos não clássicos desta vitamina, os benefícios observados em laboratório são bastante convincentes. A utilização de modelos animais em laboratório tem indicado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ origina um amplo número de efeitos extra-esqueléticos, incluindo inibição da progressão do cancro, modulação da imunidade

inata, inibição de doenças auto-imunes e efeitos no sistema cardiovascular, pelo que se pensa que a vitamina D desempenha um papel importante nestas patologias ^[24].

3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA E DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D

O estado da vitamina D no organismo é avaliado pela determinação da concentração sérica de 25(OH)D, pois este é o principal metabolito da vitamina D em circulação. Além disso, o tempo de semi-vida da 25(OH)D é maior do que o da 1,25(OH)₂D e a sua concentração na circulação é cerca de 1000 vezes superior à concentração de 1,25(OH)₂D. Outra razão importante é o facto da 1,25(OH)₂D ser influenciada pela PTH para regular a concentração do cálcio, o que faz com que a sua concentração sérica possa estar normal ou até elevada em indivíduos com deficiência severa de vitamina D, de forma a manter a concentração sérica de cálcio dentro de concentrações normais. Pelo contrário, como a hidroxilação hepática é pouco regulada, a concentração sérica de 25(OH)D reflete a quantidade de vitamina D que entra em circulação e que é proporcional à quantidade de vitamina D que é ingerida e que é produzida na pele ^[23].

Existe muita controvérsia à volta da definição de deficiência de vitamina D. Enquanto no passado, a deficiência de vitamina D era definida como o nível de vitamina D associado ao desenvolvimento de raquitismo, atualmente, e tendo em conta a relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e PTH, considera-se que o nível ótimo de vitamina D é muito superior. Considera-se que este valor é aquele que promove a melhor absorção de cálcio mantendo níveis reduzidos de PTH, permitindo assim obter o maior benefício para a saúde óssea e muscular. Desta forma, surgiram os termos suficiência, insuficiência e deficiência de vitamina D ^[13, 16].

Apesar da dificuldade em chegar a um consenso, a maioria concorda que uma concentração de 25(OH)D igual ou inferior a 50 nmol/L ou 20 ng/mL indica deficiência de vitamina D, uma concentração entre 57 e 74 nmol/L ou 21 e 29 ng/mL indicam insuficiência de vitamina D e que uma concentração acima de 75 nmol/L ou 30 ng/mL é considerada suficiente. A intoxicação por vitamina D é rara, a menos que se atinjam valores de 25(OH)D superiores a 150 ng/mL (Tabela 2) ^[10, 25].

Tabela 2 - Avaliação do estado de vitamina D

Estado de vitamina D	Concentração sérica de 25(OH)D
Deficiente	≤ 20 ng/mL
Insuficiente	21 – 29 ng/mL
Suficiente	≥ 30 ng/mL
Risco de intoxicação	≥ 150 ng/mL

Atendendo aos conceitos apresentados na Tabela 2, estima-se que cerca de 1 bilhão de pessoas, em todo o mundo, apresente deficiência ou insuficiência de vitamina D. Esta é uma situação que abrange várias faixas etárias, tendo sido reportada em crianças, adultos e idosos e que constitui um problema global que é muitas vezes subvalorizado [16, 19].

Existem vários fatores que condicionam a concentração sérica de 25(OH)D no organismo, podendo tratar-se de fatores físicos ou de fatores biológicos. Os fatores físicos são aqueles que condicionam a exposição aos raios UV-B e que, por essa razão, condicionam a síntese cutânea de vitamina D₃ e incluem a latitude, a nebulosidade, a poluição, as estações do ano, hora do dia, o tipo de vestuário e o uso de protetor solar (Tabela 3) [16, 26].

A intensidade da radiação UV-B que atinge a biosfera depende da quantidade de ozono que a radiação solar tem de atravessar e que está dependente do ângulo solar de zenith. À medida que este se torna mais oblíquo, o percurso que os raios UV-B têm de atravessar aumenta e, conseqüentemente, o ozono absorve a maioria dos fótons UV-B antes que estes atinjam a superfície da Terra. Isto explica a variação da síntese de vitamina D com a latitude, a estação do ano e a hora do dia e justifica a diminuição da produção de vitamina D₃ entre os meses de Novembro a Março a latitudes acima de 37° N e abaixo de 37° S [8, 9].

Por outro lado, os fatores biológicos são aqueles que, além de condicionarem a síntese cutânea da vitamina D₃, condicionam a biodisponibilidade da vitamina D e dos seus metabolitos e incluem condições como a pigmentação da pele, a idade, o índice de massa corporal (IMC), síndromes de má absorção intestinal, insuficiência hepática, insuficiência renal e a toma de alguns medicamentos (Tabela 3) [16, 26].

A pigmentação da pele condiciona a síntese de vitamina D pois a melanina absorve a radiação UV-B competindo com o 7-deidrocolesterol. Por esta razão, para

produzir a mesma quantidade de vitamina D₃ um indivíduo de pele mais escura precisa de estar exposto ao sol durante mais tempo do que um indivíduo de pele mais clara. A idade é outro aspeto importante pois, com o aumento da idade, ocorre o espessamento da pele e a diminuição das reservas de 7-deidrocolesterol. Assim, uma pessoa com 70 anos sintetiza menos cerca de 75% de vitamina D₃ do que uma pessoa com 20, com uma exposição solar semelhante ^[15, 27].

O IMC também é outra condicionante, sendo inversamente proporcional aos níveis séricos de 25(OH)D, provavelmente devido ao sequestro de 25(OH)D pelo tecido adiposo ^[16].

Indivíduos com síndromes de má absorção intestinal tais como fibrose quística, doença de Crohn e doença Celíaca apresentam um risco maior de deficiência de vitamina D, e o mesmo acontece em indivíduos com insuficiência hepática e insuficiência renal.

Alguns medicamentos como antiepiléticos e glicocorticóides também condicionam os níveis séricos de 25(OH)D ^[10, 27].

Por último, as diferentes políticas de fortificação dos alimentos também constituem um fator que contribui para as variações dos níveis séricos de 25(OH)D. Na Europa apenas alguns alimentos são enriquecidos ou fortificados com vitamina D, o que torna ainda maior o risco de deficiência de vitamina D ^[27].

Tabela 3 - Condições que contribuem para a deficiência de vitamina D

Fatores físicos	Fatores biológicos
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Latitude ✓ Estação do ano ✓ Nebulosidade ✓ Poluição ✓ Tipo de vestuário ✓ Uso de protetor solar 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Idade ✓ Pigmentação da pele ✓ Obesidade ✓ Síndromes de má absorção intestinal ✓ Insuficiência hepática ✓ Insuficiência renal ✓ Medicamentos

A deficiência de vitamina D resulta no comprometimento da absorção intestinal de cálcio, ocorrendo a absorção de cerca de apenas 10 a 15% de cálcio e de 60% do fósforo obtido na alimentação. A fraca absorção de cálcio resulta na diminuição da sua concentração sérica, que é imediatamente reconhecida pelos sensores de cálcio

da paratiroide e que resulta no aumento da expressão, da síntese e da secreção de PTH. Esta vai atuar de forma a manter a concentração sérica de cálcio dentro da normalidade, aumentando a reabsorção tubular de cálcio e promovendo a produção de osteoclastos maduros para mobilizar cálcio do esqueleto [8, 9, 19].

O aumento da atividade osteoblástica resulta na destruição do esqueleto, causando osteopenia, osteoporose e aumentando o risco de fratura. Além disso, a pobre mineralização esquelética que ocorre na deficiência de vitamina D, pode provocar raquitismo nas crianças, osteomalacia nos adultos e está também relacionada com a fraqueza muscular [8, 9, 10].

Além das consequências a nível esquelético, atualmente discutem-se possíveis consequências extra-esqueléticas da deficiência de vitamina D. Aparentemente, a latitudes mais altas o risco de desenvolver vários tipos de cancro, HTA, diabetes, esclerose múltipla e outras doenças auto-imunes é maior e, uma vez que a latitudes mais altas a produção de vitamina D₃ é menor, pensa-se que haja alguma relação entre estas doenças e a deficiência de vitamina D [10, 28].

Por esta razão, nos últimos anos vários estudos têm associado a deficiência de vitamina D a um risco maior de desenvolver doenças crónicas tais como alergias, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas, diferentes tipos de cancro, inflamação, diabetes e doenças cardiovasculares.

3.6. VITAMINA D E O SISTEMA CARDIOVASCULAR

As DCV constituem a principal causa de mortalidade em Portugal, à semelhança do que acontece noutros países da Europa e do resto do Mundo ^[1, 2].

Vários estudos têm demonstrado que indivíduos com deficiência de vitamina D são mais propensos a desenvolver DCV. Estudos epidemiológicos têm reportado uma prevalência maior de HTA e de doença coronária quanto maior a distância do equador e esse facto tem sido relacionado com a deficiência de vitamina D nessas regiões ^[27].

Um estudo publicado em 2008, que avaliou 1739 participantes do *Framingham Offspring Study*, demonstrou que níveis mais baixos de 25(OH)D estão relacionados com uma maior incidência de DCV ^[29].

Um outro estudo, que avaliou 18225 indivíduos do *Health Professionals Follow-Up Study*, mostrou que os indivíduos com deficiência de 25(OH)D tinham um risco maior de sofrer um enfarte agudo do miocárdio (EAM) do que os indivíduos com níveis normais de 25(OH)D ^[30].

A análise dos dados do *National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III) verificou que níveis mais baixos de 25(OH)D estão associados a uma maior mortalidade por DCV ^[31].

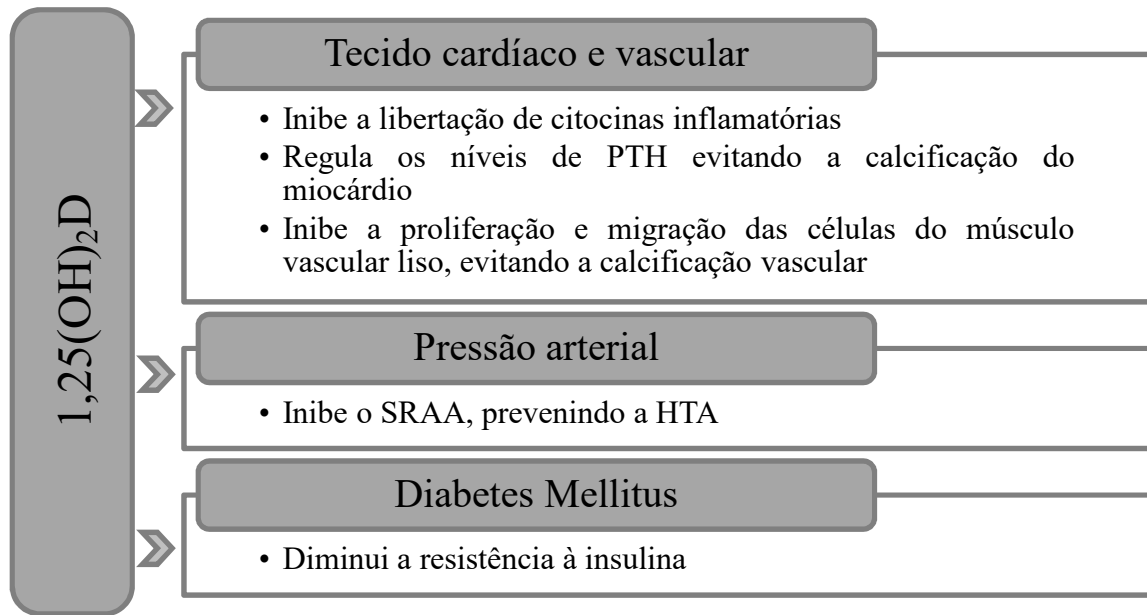
Por último, o estudo de mais de 3000 participantes do *Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study* (LURIC) demonstrou que níveis ótimos de 25(OH)D diminuem a mortalidade por DCV ^[32].

Estes e outros estudos têm estabelecido uma relação entre a deficiência de vitamina D e as DCV. Nos últimos anos, têm-se feito estudos *in vivo* e *in vitro*, que reportam efeitos diretos e indiretos da vitamina D no sistema cardiovascular e sabe-se que a ação da vitamina D no sistema cardiovascular é possível porque a maioria das células e tecidos envolvidos na patogénese das DCV, nomeadamente o músculo vascular liso, o tecido endotelial e os cardiomiócitos, expressam VDR e 1 α -OHase ^[7, 12, 22].

A vitamina D exerce um papel importante no sistema cardiovascular através de vários mecanismos (Figura 6). A 1,25(OH)₂D inibe a libertação de citocinas inflamatórias, evitando assim a ocorrência de lesões vasculares, regula os níveis de PTH evitando a calcificação do miocárdio e inibe a proliferação e migração das células do músculo vascular liso, evitando a calcificação vascular. Além disso, pensa-se que inibe o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), prevenindo assim a HTA e que

desempenha um papel importante na resistência à insulina, condição importante para o desenvolvimento da Diabetes Mellitus (DM), contribuindo desta forma para controlar importantes fatores de risco cardiovascular ^[22, 33].

Figura 6 - Mecanismos pelos quais a vitamina D exerce um papel protetor na saúde cardiovascular



3.6.1. Ação da vitamina D no tecido vascular e cardíaco

O sistema cardiovascular é um sistema fechado, constituído pelo coração e pelos vasos sanguíneos. A função do coração é bombear o sangue para os vasos sanguíneos, de forma a fornecer o oxigénio e os nutrientes necessários ao organismo, e esta capacidade de bombeamento é possível graças à ação dos cardiomiócitos, células que constituem o músculo cardíaco e que são responsáveis pelos movimentos de contração e relaxamento do coração ^[34].

Por sua vez, os vasos sanguíneos são constituídos por três camadas relativamente distintas. São elas a túnica adventícia, que é a mais externa, a túnica média, que é constituída por células musculares lisas e a túnica íntima, constituída por células endoteliais ^[34].

O volume de sangue que circula através de um vaso pode ser regulado pela contração ou relaxamento do músculo liso da túnica média. A diminuição do fluxo sanguíneo é provocada pela vasoconstrição, que resulta da diminuição do diâmetro do vaso em consequência da contração do músculo liso, enquanto o aumento do fluxo sanguíneo é provocado pela vasodilatação com o aumento do diâmetro do vaso, devido ao relaxamento do músculo vascular liso ^[34].

O tecido endotelial, que constitui a túnica íntima, também apresenta um papel importante no funcionamento do sistema cardiovascular. As células endoteliais revestem o interior dos vasos sanguíneos, controlam a passagem de substâncias para a corrente sanguínea e respondem a estímulos físicos e químicos, libertando agentes capazes de regular a hemostase, a adesão celular, o tônus vascular e a inflamação vascular ^[35, 36].

Disfunção endotelial

Alguns fatores de risco cardiovascular tais como a HTA, a hiperglicemia, a hipercolesterolemia e o consumo de tabaco estão associados à disfunção endotelial, que se caracteriza por alterações no funcionamento normal do endotélio, resultando em processos inflamatórios, na perda de agentes antitrombóticos e no aumento de agentes vasoconstritores e pró-trombóticos, contribuindo para o aumento da rigidez vascular e para a formação de placas ateroscleróticas ^[37].

A aterosclerose é a principal causa de DCV e trata-se de um processo complexo que envolve vários mecanismos e vários tipos de células, incluindo células do

sistema imunitário e da parede vascular. São conhecidos vários fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose e, recentemente, a deficiência de vitamina D tem vindo a ser considerado um novo fator de risco [38].

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm avaliado o papel da vitamina D em resposta a lesões no tecido cardíaco e vascular. Além da vitamina D atuar sobre vários tecidos e órgãos que contribuem indiretamente para a aterosclerose, também está envolvida diretamente neste processo inflamatório. Isto porque as células envolvidas na aterosclerose, como as células endoteliais, as células do músculo vascular liso e as células do sistema imune expressam VDR e 1α -OHase, o que lhes permite sintetizar $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ que poderá atuar de forma autócrina ou parácrina. Além disso, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ parece regular vários processos fisiológicos que desempenham um papel crítico na aterosclerose, incluído proliferação de células endoteliais, migração e diferenciação celular, expressão de citocinas e modulação da resposta imune [27, 38].

As principais alterações que provocam a disfunção endotelial são a diminuição da produção de óxido nítrico e o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio. O óxido nítrico é uma substância libertada pelo endotélio, que atua como vasodilatador e como antiagregante plaquetar. Níveis reduzidos de óxido nítrico podem resultar de uma atividade diminuída da enzima sintetase de monóxido de azoto endotelial e estão relacionados com a disfunção endotelial. Por outro lado, o excesso de stress oxidativo leva ao aumento da formação de espécies reativas de oxigénio, que irão atuar através de diferentes mecanismos, promovendo a disfunção endotelial [36].

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ desempenha um papel protetor, evitando a disfunção endotelial, pois tem a capacidade de aumentar a produção de óxido nítrico e de diminuir a formação de espécies reativas de oxigénio. Isto foi comprovado em culturas de células endoteliais do cordão umbilical, onde a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estimulou a produção de óxido nítrico, através da ativação da enzima sintetase de monóxido de azoto endotelial. Além disso, já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que um análogo da vitamina D suprimiu significativamente a produção de espécies reativas de oxigénio na vasculatura, evidenciando assim o papel antioxidante da vitamina D [39, 40].

Outro aspeto interessante é que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ parece estar envolvida na modulação do tónus vascular, regulando a libertação de fatores constritores derivados do endotélio. A libertação destes fatores é um processo dependente de cálcio, no qual o influxo de cálcio ativa uma enzima que converte os fosfolípidos da membrana em ácido araquidónico, cujos metabolitos atuam como vasoconstritores. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ controla o

tónus vascular reduzindo o influxo de cálcio nas células endoteliais e, dessa forma, diminuindo a produção de fatores constritores do endotélio. No entanto, também já foi comprovado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode regular o tónus vascular por um processo independente do cálcio ^[38, 41].

As células do músculo vascular liso também desempenham um papel importante na patogénese da aterosclerose através da migração de células da camada média para a camada íntima, alterações morfológicas e secreção de moléculas inflamatórias e também já foi demonstrado que o efeito antiaterogénico da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se estende do endotélio para o músculo vascular liso ^[38].

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ também parece mediar alterações na produção de proteínas envolvidas na trombogénese, como a trombomodulina e a antitrombina, desempenhando assim um papel antitrombótico ^[42].

Calcificação vascular

Uma característica importante e quase universal da aterosclerose é a calcificação vascular. Alguns estudos têm demonstrado que a transformação osteogénica das células do músculo vascular liso faz com que estas células segreguem uma matriz extracelular que calcifica com o passar do tempo. Várias proteínas envolvidas na osteogénese têm sido encontradas nas células do músculo vascular liso e nas lesões ateroscleróticas ^[38].

O papel da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na calcificação vascular é controverso. Enquanto alguns estudos *in vitro*, com células do músculo vascular liso, concluem que o tratamento com vitamina D culmina em calcificação vascular, outros defendem que a vitamina D desempenha um papel protetor neste sentido. Estes dados controversos devem-se, provavelmente, a diferenças no modelo experimental ou à dose de vitamina D usada, o que leva a crer que haja uma margem pequena entre o efeito protetor e os efeitos nefastos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na calcificação vascular ^[38, 43].

Inflamação

A inflamação crónica também desempenha um papel importante na patofisiologia da aterosclerose e, por isso, as células do sistema imune desempenham um papel importante na saúde vascular, através da produção de citocinas e subsequente imunomodulação e inflamação ^[7].

É possível encontrar várias células do sistema imune nas lesões ateroscleróticas e, enquanto umas iniciam a resposta inflamatória produzindo citocinas com efeito pró-aterogénico, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 12 (IL-12), outras segregam citocinas com efeito antiaterogénico como a interleucina 5 (IL-5), a interleucina 10 (IL-10) e a interleucina 13 (IL-13), neutralizando o efeito aterogénico das anteriores. A literatura sugere que a 1,25(OH)₂D altera a resposta imune neutralizando o efeito aterogénico, atuando de forma a diminuir a expressão de TNF- α e IL-6 e aumentando a expressão de IL-10 [7,38].

A secreção de citocinas inflamatórias pelas células endoteliais e pelos macrófagos induz a produção de substâncias cuja concentração pode ser determinada na circulação sanguínea, tais como a proteína C reativa (PCR) e o fibrinogénio.

O fibrinogénio e os seus metabolitos podem desencadear a disfunção endotelial e parecem estar envolvidos na formação de placas ateroscleróticas durante as primeiras fases da doença coronária. Devido à diminuição da concentração de plasminogénio e da atividade fibrinolítica, muitas vezes as lesões ateroscleróticas contêm grandes quantidades de fibrina, quer de forma intacta na superfície da placa, quer de forma dispersa e difusa por toda a placa [44].

Por outro lado, a PCR é o biomarcador inflamatório mais extensamente estudado na doença coronária. No entanto, sendo um marcador inespecífico, a inflamação de outros tecidos e órgãos confundem a relação plasmática deste marcador com o processo inflamatório da aterosclerose. Assim surgiu a necessidade de desenvolver metodologias de alta sensibilidade que permitissem detetar pequenas variações na concentração da PCR plasmática. O termo PCR de alta sensibilidade (PCRhs) refere-se ao método que permite detetar concentrações muito baixas de PCR e, por isso, deve ser o método laboratorial utilizado quando se pretende avaliar a inflamação vascular crónica da aterosclerose [45].

São cada vez mais as evidências de que, além de ser um marcador inflamatório, a PCR também atua diretamente no processo aterogénico, induzindo a produção de moléculas de adesão, a produção de fator tecidual nos monócitos, a oxidação do colesterol das LDL e atenuando a produção de óxido nítrico, entre outros mecanismos [45].

Hiperhomocisteinemia

Outro fator de risco cardiovascular que tem vindo a ser avaliado é a hiperhomocisteinemia. A homocisteína influencia várias respostas a nível vascular e alguns estudos sugerem que a homocisteína reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico e desencadeia danos no endotélio. Estudos epidemiológicos sugerem que mesmo pequenas elevações dos níveis séricos de homocisteína aumentam o risco de desenvolver aterosclerose. No entanto, este pode ser um fator de risco modificável através da suplementação com ácido fólico ^[36, 37].

Dislipidémia

A dislipidémia é um dos fatores de risco mais conhecidos para o desenvolvimento da doença coronária. Níveis elevados de colesterol total e de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) resultam em disfunção endotelial. Alguns estudos verificaram que os níveis de colesterol total, mesmo quando dentro do intervalo considerado normal, estão inversamente relacionados com a vasodilatação. Isto sugere que diminuir os níveis de colesterol total pode estimular a produção de óxido nítrico e melhorar a disfunção endotelial ^[37].

As normas do *National Cholesterol Education Program* e da *American Heart Association* indicam como principal alvo terapêutico na prevenção das DCV a diminuição dos níveis de colesterol das LDL. No entanto, tem surgido a necessidade de desenvolver novos alvos terapêuticos, o que tem aumentando o estudo de outras partículas aterogénicas como a lipoproteína A (Lp(a)) e a apolipoproteína B (APO B) ^[46].

A Lp(a) é uma lipoproteína semelhante às LDL e, embora a sua função fisiológica ainda não seja bem conhecida, a sua semelhança estrutural com o plasminogénio faz com que esta compita com o local de ligação deste, reduzindo a fibrinólise e desempenhando um papel trombogénico, estabelecendo-se assim uma forte relação entre os níveis plasmáticos de Lp(a) e a doença coronária ^[46].

A APO B é uma apolipoproteína presente em todas as frações de lipoproteínas aterogénicas e é responsável por transportar o colesterol para os tecidos, podendo levar à sua acumulação nas artérias e constituindo assim um fator importante no desenvolvimento da aterosclerose ^[47].

Vários estudos têm associado a deficiência de vitamina D com elevados níveis de colesterol total, colesterol das LDL e triglicéridos e a baixos níveis de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL) ^[48].

Além disso, foi demonstrado que a 25(OH)D pode ser transportada por partículas de LDL e entrar em várias células, incluindo monócitos, através dos recetores de LDL. Assim, quando os monócitos migram e se transformam em células espumosas, a 25(OH)D fica acumulada no espaço subendotelial ou na placa aterosclerótica e, caso ainda não esteja, pode transformar-se na sua forma ativa. A 1,25(OH)₂D consegue alterar a expressão genética dos macrófagos, influenciando a expressão de uma variedade de fatores implicados no processo aterosclerótico, desempenhando um papel protetor ^[38].

Tecido cardíaco

Além de atuar sobre o sistema endotelial, a vitamina D também parece atuar sobre os cardiomiócitos. Já foi demonstrado que a 1,25(OH)₂D influencia o crescimento, a proliferação e a morfologia dos cardiomiócitos de ratinhos e que o tratamento com 1,25(OH)₂D aumenta a expressão da miotrofina, uma proteína do músculo cardíaco, e diminui a expressão do péptido natriurético atrial, um marcador bioquímico inversamente relacionado com a função cardíaca ^[49].

Alguns estudos demonstraram que ratinhos sem VDR apresentam uma expressão aumentada das metaloproteinases, que são proteínas que contribuem para uma remodelação aberrante dos cardiomiócitos. Esses ratinhos apresentam movimentos de contração e relaxamento cardíaco comprometidos e desenvolvem hipertrofia ventricular ^[50, 51, 52, 53].

Assim, considera-se que a 1,25(OH)₂D é uma hormona importante na modulação e manutenção da função e estrutura das células cardíacas ^[49].

3.6.2. Ação da vitamina D na pressão arterial

A HTA é uma doença crónica na qual a pressão sanguínea se mantém constantemente elevada. É importante manter a pressão arterial dentro dos valores normais para garantir o funcionamento eficiente de vários órgãos vitais como o coração, o cérebro e os rins. Segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde, a HTA é definida por uma pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 140 mmHg e/ou uma pressão arterial diastólica (PAD) igual ou superior a 90 mmHg [54, 55].

A HTA pode ser provocada por condições endócrinas como o hiperparatiroidismo ou por uma atividade aumentada do SRAA e, além disso, alguns hábitos relacionados com um estilo de vida pouco saudável como o sedentarismo, o consumo de tabaco, o excesso de álcool e o aporte excessivo de sal são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da HTA.

A HTA constitui um dos principais fatores de risco para as DCV e, como doença crónica que é, necessita de uma terapêutica adequada e uma vigilância constante.

O efeito que a vitamina D exerce sobre a pressão arterial representa um dos mecanismos responsáveis pela ligação da vitamina D às DCV. A ação anti-hipertensiva da vitamina D inclui a supressão do SRAA, a prevenção do hiperparatiroidismo secundário, o seu efeito renoprotetor e a sua ação sobre as células vasculares. Como já foi referido anteriormente, a 1α -OHase é expressa nas células endoteliais e nas células do músculo vascular liso e sabe-se que ambas desempenham um papel importante na génese da HTA [11, 56].

A supressão do SRAA parece ser o principal mecanismo anti-hipertensivo da vitamina D. Cada vez são mais as evidências que sugerem que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ regula a pressão sanguínea através do controlo do SRAA. Este é um sistema em cascata que está envolvido na manutenção da pressão arterial, na homeostase dos eletrólitos e no volume intravascular [57].

O primeiro componente dessa cascata é a renina. A renina é uma protease sintetizada e segregada maioritariamente pelos nefrónios, que converte o angiotensinogénio em angiotensina I que, por sua vez, é convertida em angiotensina II por ação da enzima conversora da angiotensina (ECA). A angiotensina II é o efetor principal do SRAA e interage com os recetores de angiotensina II em vários tecidos, incluindo o cérebro, coração, rins, glândulas adrenais e vasos periféricos e, além disso,

estimula a secreção de aldosterona pelo córtex supra-renal. Isto resulta em vasoconstrição e na retenção de água e de sais, levando assim ao aumento da pressão arterial [56, 57].

A estimulação inadequada do SRAA tem sido relacionada com a HTA, ataque cardíaco e acidente vascular cerebral. Alguns estudos têm demonstrado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ atua como regulador negativo do SRAA, facto este que foi demonstrado em 2002 num estudo onde se examinaram ratinhos sem VDR e onde se verificou que estes apresentavam níveis elevados de renina, que se manifestavam com HTA e hipertrofia cardíaca [52, 57].

Estudos em humanos também têm constatado uma relação entre a deficiência de vitamina D e uma atividade aumentada do SRAA. Além disso, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aparenta ter um mecanismo de ação sobre a angiotensina II semelhante ao dos inibidores da ECA [58, 59, 60].

Além do efeito da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sobre o SRAA, também o hiperparatireoidismo secundário e a hipocalcémia parecem estar relacionados com a HTA. Contudo, o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está bem definido, pensando-se que isto acontece porque a PTH atua sobre as células endoteliais, aumentando a rigidez arterial e induzindo a ocorrência de danos ateroscleróticos. No entanto, são necessários mais estudos para clarificar o papel da PTH sobre o sistema cardiovascular e conhecer melhor o seu efeito sobre a pressão arterial [56].

3.6.3. Ação da vitamina D na Diabetes Mellitus

O termo Diabetes Mellitus (DM) descreve uma doença metabólica caracterizada por uma hiperglicemia crônica e que resulta da deficiência da secreção e/ou da ação da insulina. Os principais tipos de DM são a DM tipo 1 e a DM tipo 2.

São vários os mecanismos envolvidos na patogénese da DM. Enquanto a DM tipo 1 é uma doença de natureza multifatorial que resulta na destruição auto-imune dos ilhéus de Langerhans, na DM tipo 2 ocorrem várias alterações que resultam na resistência da ação da insulina nas células alvo e na disfunção das células β -pancreáticas [61].

A longo prazo, a DM está associada a vários danos que incluem a disfunção ou falência de vários órgãos, principalmente dos olhos, rins, coração e vasos sanguíneos. Assim, a DM constitui um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DCV.

A monitorização da DM pode ser feita através da determinação da hemoglobina glicada (HA_{1C}). Esta determinação permite avaliar a concentração média de glicose durante, aproximadamente, as últimas 6 a 8 semanas e apresenta uma relação mais estreita com o risco de desenvolver complicações do que as determinações pontuais de glicémia. Já foi demonstrado que a HA_{1C} está relacionada com o risco de desenvolver DCV, mesmo entre indivíduos aparentemente saudáveis e não diabéticos, podendo constituir um importante marcador precoce das DCV [62].

Nos últimos anos, também o papel que a vitamina D desempenha sobre o metabolismo da glicose tem despertado um interesse crescente. Uma das razões para esta ligação é o facto do pâncreas expressar VDR e 1α -OHase, o que lhe permite produzir $1,25(OH)_2D$ que irá atuar de forma parácrina ou autócrina.

O papel que a $1,25(OH)_2D$ desempenha na DM tipo 1 parece estar relacionado com as suas propriedades imunomoduladoras, que inibem a produção das citocinas, nomeadamente a interleucina 2 (IL-2) e o interferão gama ($INF-\gamma$), que ativam os macrófagos e as células T citotóxicas, levando à destruição dos ilhéus de Langerhans [61].

No caso da DM tipo 2, pensa-se que a $1,25(OH)_2D$ possa ter uma ação direta sobre as células β -pancreáticas, promovendo a síntese de insulina pela ativação do gene da insulina e melhorando a sensibilidade à insulina ao aumentar a expressão dos recetores de insulina nos tecidos alvo. Parece também desempenhar uma ação indireta, através da homeostase do cálcio e do influxo de cálcio nas células, mecanismo este que é importante na síntese e secreção de insulina [24, 48, 61].

Têm sido desenvolvidos alguns estudos para investigar o papel da vitamina D na resistência à insulina. Um dos primeiros estudos realizados neste âmbito foi publicado em 1980, quando Anthony W. Norman e a sua equipa constatarem que ratinhos com deficiência de vitamina D segregam insulina de forma inadequada e que a secreção normal de insulina é retomada com suplementação de vitamina D ^[63].

Em humanos, a deficiência de vitamina D tem sido relacionada com uma incidência maior de resistência à insulina e, conseqüentemente, com um risco maior de desenvolver DM ^[64].

A deficiência de vitamina D é uma condição mais comum em indivíduos com DM tipo 2 do que em indivíduos saudáveis e, além disso, a administração de suplementos de vitamina D durante a infância parece reduzir o risco de desenvolver DM tipo 1. Até ao momento, os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores da vitamina D parecem melhorar a patofisiologia auto-imune da DM tipo 1 e atenuar a inflamação crónica que parece contribuir para aumentar a resistência à insulina na DM tipo 2 ^[61, 65].

4. METODOLOGIA

4.1. RECRUTAMENTO E SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

Os participantes deste estudo foram recrutados na Unidade de Investigação do Hospital Dr. Nélio Mendonça, quando estes se deslocaram à referida unidade para as consultas de *follow-up* do projeto GENEMACOR, que ali decorre.

O recrutamento dos participantes decorreu entre Novembro de 2013 e Outubro de 2014.

O protocolo do estudo obteve a aprovação da Comissão de Ética do Hospital Dr. Nélio Mendonça e todos os participantes, um total de 412 indivíduos, assinaram o documento de Consentimento Informado (Anexo 3) após lhes ter sido entregue o documento de Informação ao Sujeito da Investigação (Anexo 1 e 2) e de lhes terem sido prestados todos os esclarecimentos que entenderam pertinentes.

A população do estudo foi dividida em dois grupos. Um grupo de indivíduos com história prévia de EAM ou doença coronária confirmada por angiografia coronária com pelo menos 75% de obstrução de um dos vasos coronários e um grupo de indivíduos saudáveis, sem doença cardíaca, HTA, DM ou qualquer outra doença crónica. Foram considerados critérios de exclusão para ambos os grupos a insuficiência hepática, insuficiência renal, síndromes de má absorção intestinal, cancro, doença auto-imune, doença neurodegenerativa e a ingestão de suplementos de vitamina D, β -caroteno, vitamina A, vitamina E e tratamento com anticoagulantes.

Após a aplicação dos critérios de exclusão, 194 indivíduos permaneceram elegíveis.

Dos 194 indivíduos selecionados, 94 constituíram o grupo de doentes cardiovasculares e os restantes 100 indivíduos constituíram o grupo de controlos.

A todos os indivíduos que integraram o estudo foi aplicado um protocolo que envolvia avaliação física, preenchimento de um questionário e exames laboratoriais.

4.2. RECOLHA DE DADOS

4.2.1. Questionários

A todos os participantes foi pedido para responder a um breve questionário (Anexo 4) com o qual se pretendeu obter informação acerca das características dos indivíduos, tais como estilo de vida (hábitos tabágicos, ingestão de álcool, atividade

física, e exposição solar), história de doença crónica (doença cardíaca, HTA, DM, cancro, doença auto-imune, neurodegenerativa, hepática ou renal), tipo de alimentação e ingestão de suplementos vitamínicos.

Hábitos tabágicos e consumo de álcool

Foram considerados não fumadores os indivíduos que nunca fumaram ou que deixaram de fumar há mais de cinco anos e considerou-se presente o consumo de álcool quando este sucede com uma frequência igual ou superior a uma vez por semana.

Atividade física

Foi pedido aos indivíduos para referirem o tipo de atividade física que praticam habitualmente (moderada e/ou intensa) e a sua duração.

As perguntas foram adaptadas do *International Physical Activity Questionnaire*, desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde e as respostas serviram para calcular o tempo médio de atividade física moderada e/ou intensa praticada pelo indivíduo ao longo da semana.

Os indivíduos foram classificados quanto à atividade física como muito ativos, ativos, irregularmente ativos e sedentários, segundo as recomendações globais para a atividade física e saúde da Organização Mundial de Saúde ^[66].

Alimentação

Os indivíduos indicaram com que frequência consumiam alimentos ricos em vitamina D (salmão, sardinha, atum, ovos e fígado de vaca).

O consumo de alimentos ricos em vitamina D foi considerado muito frequente quando ocorria quatro vezes por semana ou mais, frequente quando acontecia com uma regularidade de uma a três vezes por semana e raro quando se verificava menos do que quatro vezes por mês.

Foram excluídos todos os indivíduos que afirmaram tomar ou ter tomado suplementos vitamínicos nos últimos 12 meses.

Exposição solar

A literatura sugere que a exposição dos braços e das pernas durante 5 a 30 minutos por dia, entre as 10h00 e as 15h00, duas vezes por semana, é suficiente para manter níveis suficientes de vitamina D ^[19].

No entanto, como não foi possível saber de forma exata se os indivíduos mantinham sempre uma exposição de braços e pernas, a exposição solar foi considerada elevada quando os indivíduos afirmaram estar expostos à luz solar durante mais de uma hora por dia, moderada quando afirmaram manter uma exposição solar com uma duração entre 30 e 60 minutos por dia e baixa quando afirmaram ficar expostos ao sol por um período inferior a 30 minutos por dia.

4.2.2. Exames antropométricos

Determinação da pressão arterial e da frequência cardíaca

A pressão arterial e frequência cardíaca foram medidas no braço direito, com recurso a um esfigmomanómetro automático (OMROM M6 Comfort). Após 10 minutos de repouso com o indivíduo em posição sentada, foram efetuadas três medições, com dois minutos de intervalo entre cada uma delas e calculou-se a média aritmética.

Os indivíduos foram classificados como hipertensos caso estivessem a tomar medicação anti-hipertensora ou apresentassem uma PAS igual ou superior a 140 mmHg e/ou uma PAD igual ou superior a 90 mmHg, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde e das *guidelines* da Sociedade Europeia da Hipertensão e da Sociedade Europeia de Cardiologia ^[54,55].

Registo da massa corporal, altura, perímetro abdominal e IMC

A massa corporal foi determinada com o indivíduo descalço e com roupas leves, com recurso a uma balança (Krupps). Esta medição foi determinada com um erro de 50g.

A altura foi registada de acordo com a informação descrita na ficha clínica do indivíduo.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IMC = \frac{\text{massa corporal (Kg)}}{\text{altura (m)}^2}$$

O perímetro abdominal foi medido com o indivíduo na posição vertical, com recurso a uma fita antropométrica colocada no ponto médio entre o rebordo inferior da

última costela e a crista ilíaca, após expiração do ar pulmonar. Os indivíduos foram considerados obesos para valores de IMC superiores a 30 kg/m² e o perímetro abdominal foi considerado elevado para valores superiores a 102 cm nos homens e 88 cm nas mulheres, de acordo com as orientações da Organização Mundial de Saúde [67].

4.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

4.3.1. Recolha de sangue

Foram solicitadas análises laboratoriais específicas a todos os indivíduos que integraram o estudo. A recolha de sangue foi realizada no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, por profissionais devidamente qualificados, após 12 horas de jejum, como confirmado verbalmente por cada um dos indivíduos.

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa utilizando-se o sistema de vácuo Vacuette® (Greiner Bio-One, Áustria).

O sangue foi colhido em tubos devidamente identificados. A todos os participantes foi colhido um tubo de 3 mL contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Vacuette® K₃EDTA, Ref.454086), um tubo de 3 mL contendo citrato de sódio (Vacuette® 9NC Coagulation sodium citrate 3,2%, Ref.454325) e um tubo seco de 5 mL (Vacuette® Z Serum Sep Clot Activator, Ref.456018).

O tubo de EDTA foi processado de seguida para a determinação do Hemograma e da HA_{1C}. O tubo de citrato de sódio foi centrifugado na centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) a 3500 rpm durante 15 minutos, para obtenção de plasma para o doseamento de fibrinogénio. O tubo seco foi deixado em repouso à temperatura ambiente e na posição vertical durante meia hora, para facilitar a retração do coágulo. Após este tempo, o tubo seco foi centrifugado na centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) a 4200 rpm durante 8 minutos para a obtenção de soro.

O soro isolado de cada amostra foi transferido para microtubos devidamente identificados, para a determinação da 25(OH)D, insulina, APO B, Lp(a), PCRhs e homocisteína. De cada amostra foram realizadas duas alíquotas com 500 µL de soro, que foram conservadas a -20°C até ao seu processamento. O restante soro foi processado no próprio dia para a determinação de vários parâmetros bioquímicos de rotina, que serviram para complementar a informação clínica dos indivíduos (glicose, proteínas totais, albumina, bilirrubina, fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase

(GGT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina, colesterol total, colesterol das HDL, colesterol das LDL e triglicéridos).

4.3.2. Testes laboratoriais

Hemograma

O hemograma foi realizado no contador automático Coulter LH780 (Beckman Coulter Inc, EUA). O funcionamento deste equipamento baseia-se no Princípio de Coulter, que utiliza a impedância elétrica para medir o volume das partículas.

Neste equipamento, uma suspensão de células sanguíneas atravessa um pequeno orifício, de tamanho definido, em simultâneo com uma corrente elétrica. Quando as células passam individualmente pelo orifício iniciam uma alteração da impedância, de acordo com o tamanho da célula, permitindo ao sistema fazer a contagem das células individuais e fornecer a distribuição das células por tamanho.

HA_{1c}

A HA_{1c} foi determinada no analisador VARIANT II TURBO (Bio-Rad Laboratories Inc, EUA), um equipamento totalmente automatizado, que utiliza o princípio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Foi utilizado o kit HA_{1c} 2.0, Ref.270-2455EX (Bio-Rad Laboratories Inc, EUA).

O VARIANT TURBO II é composto por dois módulos: uma estação cromatográfica e um módulo de pipetagem de amostras. As amostras são diluídas automaticamente no módulo de pipetagem e introduzidas na coluna analítica através de uma injeção automática. Na estação cromatográfica, duas bombas fornecem solução tampão à coluna analítica e as hemoglobinas são separadas de acordo com a sua força iônica. Depois da separação, as hemoglobinas passam por um fotómetro, onde a absorvância é medida.

Os dados obtidos são transmitidos para o *software* do equipamento e o valor da HA_{1c} é calculado com base na curva de calibração gerada para este teste.

Fibrinogénio

O fibrinogénio foi determinado utilizando o kit Fibrinogen C, Ref.0020301100 (Instrumentation Laboratory Company, EUA), no analisador ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory Company, EUA), com base método de Clauss.

Este método avalia a taxa de conversão de fibrinogénio em fibrina, utilizando um excesso de trombina no plasma diluído. Quando um excesso de trombina é adicionado a um plasma diluído, o tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio na amostra.

Posteriormente, o tempo de coagulação obtido é comparado com uma preparação de fibrinogénio padronizada e a concentração de fibrinogénio na amostra é calculada.

25(OH)D

A concentração sérica de 25(OH)D foi determinada por eletroquimioluminescência no autoanalisador Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha) (Figura 7), por um princípio de imunocompetição. Foi utilizado o kit Vitamin D Total, Ref.05894913 190 (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha).

Figura 7 - Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha)

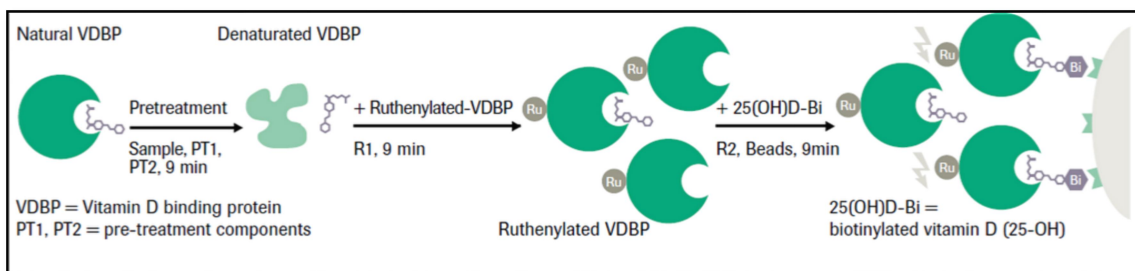


O princípio do teste está ilustrado na Figura 8. Na primeira etapa, a amostra é incubada com um reagente de pré-tratamento e a 25(OH)D ligada é libertada da proteína de ligação da vitamina D. Numa segunda incubação, a amostra é pré-tratada com uma proteína de ligação à vitamina D marcada com ruténio, formando-se um complexo entre a 25(OH)D e a proteína de ligação à vitamina D rutenilada.

Na 3ª incubação, são adicionadas micropartículas revestidas com estreptovidina de vitamina D marcadas com biotina. Assim, as proteínas de ligação à vitamina D marcadas com ruténio não ligadas ficam ocupadas. Depois forma-se um complexo, constituído pela proteína de ligação à vitamina D rutenilada e da vitamina D biotinilada, que se liga à fase sólida, pela interação da biotina com a estreptavidina.

A mistura da reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo, e os elementos não ligados são removidos. A emissão de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

Figura 8 - Princípio de imunocompetição para a determinação da 25(OH)D



Os resultados da concentração de 25(OH)D são expressos em ng/mL e são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, através de uma calibração de dois pontos, e numa curva principal incluída no código de barras do reagente. O intervalo de deteção do teste é de 3 a 70 ng/mL

O nível sérico de 25(OH)D foi considerado deficiente para valores iguais ou inferiores a 20 ng/mL, insuficiente para valores entre 21 e 29 ng/mL e suficiente para valores iguais ou superiores a 30 ng/mL ^[10, 25].

Insulina

A insulina foi determinada por quimioluminescência no autoanalisador Unicel DXI 800 (Beckman Coulter Inc, EUA) pelo princípio de sandwich.

A amostra é misturada com um conjugado e com partículas paramagnéticas revestidas de anticorpos monoclonais anti-insulina. A insulina sérica liga-se ao anticorpo na fase sólida, enquanto o conjugado reage com outro sítio da molécula de insulina. Após incubação, o material ligado à fase sólida é mantido num campo magnético, enquanto o material não ligado é lavado e desprezado. Depois, é adicionado um substrato quimioluminescente e a luz gerada na reação é medida com um luminómetro. A intensidade da luz é diretamente proporcional à concentração de insulina na amostra.

A determinação da concentração sérica de insulina serviu para calcular a resistência à insulina aplicando o *Homeostatic Model Assessment* (HOMA), através da seguinte fórmula:

$$HOMA = \frac{Glicose\ (mg/dl) \times Insulina\ (\mu U/ml)}{405}$$

Os valores de HOMA foram considerados normais quando inferiores a 2,33 [68].

Parâmetros bioquímicos de rotina

Os restantes parâmetros bioquímicos foram determinados no autoanalisador AU5400 (Beckman Coulter Inc, EUA). Este analisador, totalmente automatizado, faz a determinação de diversos testes bioquímicos por um princípio espectrofotométrico, através de reações colorimétricas, imunoturbidimétricas, enzimáticas e cinéticas.

Os reagentes utilizados foram adquiridos à Beckman Coulter e não carecem de preparação. Após a calibração dos lotes de reagente em uso, os valores da concentração foram obtidos automaticamente para cada analito, com recurso à respetiva curva de calibração que é guardada na base de dados do equipamento

Reações cinéticas

Ureia

Para a determinação da ureia usou-se o kit UREA, Ref.OSR6234 (Beckman Coulter Inc, EUA) A ureia foi determinada pelo método da urease. Neste método a ureia é hidrolisada na presença de água e urease para produzir amónia e dióxido de carbono. O amoníaco produzido nesta reação combina com 2-oxoglutarato e com nicotinamida adenina dinucleótido na sua forma reduzida (NADH) na presença de glutamato-desidrogenase para produzir glutamato e nicotinamida adenina dinucleótido na sua forma oxidada (NAD⁺). A redução da absorvância de NADH por unidade de tempo é proporcional à concentração de ureia na amostra.

Creatinina

A creatinina foi determinada pelo método de Jaffé, utilizando o kit CREATININE, Ref.OSR6178 (Beckman Coulter Inc, EUA). Neste método, a creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino, formando um complexo alaranjado. A taxa

de alteração na absorvância a 520 e 800 nm é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

Fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada com o kit ALP, Ref.OSR6104 (Beckman Coulter Inc, EUA). Utilizou-se o método baseado nas recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry*, no qual a atividade da fosfatase alcalina é determinada através da medição da taxa de conversão de p-nitro-fenilfosfato em p-nitrofenol na presença de íons de magnésio e de zinco e de 2-amino-2-metil-1-propanol.

A taxa de alteração na absorvância decorrente da formação de p-nitrofenol é medida bicomatematicamente a 410 e a 480 nm e é diretamente proporcional à atividade de fosfatase alcalina na amostra.

Alanina aminotransferase

O método utilizado para a determinação da alanina aminotransferase (ALT) baseia-se nas recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry*. Utilizou-se o kit ALT, Ref.OSR6107 (Beckman Coulter Inc, EUA). Neste ensaio, a ALT transfere o grupo amino da alanina para o 2-oxoglutarato para formar piruvato e glutamato. A adição de fosfato de piridoxal à mistura da reação garante uma atividade catalítica máxima de ALT. O piruvato participa numa reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH) com o NADH para produzir lactato e NAD^+ . A redução na absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à atividade do ALT na amostra. O piruvato endógeno é removido durante o período de incubação.

Aspartato aminotransferase

Para a determinação da aspartato aminotransferase (AST) utilizou-se o kit AST, Ref.OSR6109 (Beckman Coulter Inc, EUA). Neste método, baseado nas recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry*, a AST catalisa a transaminação de aspartato e 2-oxoglutarato, formando L-glutamato e oxalacetato. A adição de fosfato de piridoxal à mistura da reação garante uma atividade catalítica máxima de AST. O oxalacetato é reduzido em L-malato pelo malato desidrogenase (MDH), enquanto o NADH é convertido simultaneamente em NAD^+ . A redução na absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à

atividade do AST na amostra. O piruvato endógeno é removido pela reação da LDH durante o período de incubação.

Gamaglutamiltransferase

A gamaglutamiltransferase (GGT) foi determinada segundo as recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry*, utilizando o kit GGT, Ref.OSR6120 (Beckman Coulter Inc, EUA). Neste método, a GGT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil do substrato, gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilido, para glicilglicina, produzindo 5-amino-2-nitrobenzoato. A alteração na absorvância a 410 e 480 nm, devido à formação de 5-amino-2 nitrobenzoato, é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra.

Homocisteína

A homocisteína foi determinada utilizando o kit Homocysteine Liquid, Ref.17371H (Sentinel Diagnostics, Itália). Neste método, a homocisteína dimerizada e oxidada é reduzida a homocisteína livre, que depois reage com a serina catalisada pela enzima cistationina beta-sintase para formar cistationina. A cistationina pode ser dividida em cistationina beta-liase para formar homocisteína, piruvato e amoníaco. O piruvato é convertido em lactato pela LDH com NADH como coenzima. A taxa de NADH convertida em NAD^+ é diretamente proporcional à concentração de homocisteína.

Reações colorimétricas

Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método do biureto, utilizando o kit TOTAL PROTEIN, Ref.OSR6132 (Beckman Coulter Inc, EUA). Neste método, íons de cobre reagem com as proteínas presentes na amostra, numa solução alcalina, formando um complexo de cor violeta, cuja absorvância é diretamente proporcional à concentração de proteínas totais na amostra.

Albumina

A albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol, utilizando o kit ALBUMIN, Ref.OSR6202 (Beckman Coulter Inc, EUA). Quando o verde de

bromocresol, presente no reagente, reage com a albumina, forma um complexo corado. A absorvância deste complexo é proporcional à concentração de albumina na amostra.

Bilirrubina

A bilirrubina foi determinada por um método colorimétrico baseado na reação de diazo. Na determinação da bilirrubina total, utilizando o kit TOTAL BILIRUBIN, Ref.OSR6212 (Beckman Coulter Inc, EUA), a bilirrubina conjugada e a bilirrubina não conjugada reagem com um sal de diazônio, na presença de um catalisador, para formar azobilirrubina. A absorvância da solução é medida a 540 nm e é proporcional à concentração de bilirrubina total presente na amostra.

Reações enzimáticas

Glicose

A glicose foi determinada pelo método da hexoquinase, utilizando o kit GLUCOSE, Ref.OSR6221 (Beckman Coulter Inc, EUA). Nesta reação a glicose é fosforilada pela adenosina trifosfato na presença da enzima hexoquinase e de íons de magnésio para produzir glucose-6-fosfato e adenosina difosfato. A glucose-6-fosfato desidrogenase oxida a glucose-6-fosfato, transformando-a em gluconato-6-fosfato e ocorrendo a redução concomitante de NAD^+ para NADH. A quantidade de NADH produzida é diretamente proporcional à concentração de glucose na amostra, sendo medida pela absorvância a 340 nm.

Os indivíduos sob terapêutica com antidiabéticos orais ou insulina, ou com níveis séricos de glicose em jejum superiores a 126 mg/dL, foram classificados como diabéticos ^[69].

Colesterol total

O colesterol total foi determinado por um método enzimático, utilizando o kit CHOLESTEROL, Ref.OSR6216 (Beckman Coulter Inc, EUA). Neste método, os ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pela colesterol esterase. O colesterol livre produzido é oxidado pela colesterol oxidase com a produção simultânea de peróxido de hidrogénio, o qual acopla com 4-aminoantipirina e fenol na presença de peroxidase para produzir um composto corado, o vermelho de quinoneimina, que pode ser lido espectrofotometricamente. O aumento da absorvância é proporcional ao aumento da concentração de colesterol total na amostra.

Triglicéridos

O método utilizado para determinar a concentração de triglicéridos na amostra baseia-se numa série de reações enzimáticas. Para esta determinação utilizou-se o kit TRIGLYCERIDE, Ref.OSR61118 (Beckman Coulter Inc, EUA). Os triglicéridos na amostra são hidrolisados através de uma combinação de lipases microbianas, para produzir glicerol e ácidos gordos. O glicerol é fosforilado na presença da enzima quinase de glicerol para produzir glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato é oxidado na presença da enzima oxidase de fosfato glicerol para produzir peróxido de hidrogénio e dihidroxiacetona fosfato. No final da reação origina-se um cromóforo, que é lido a 660 e 800 nm. O aumento da absorvância é proporcional ao conteúdo de triglicéridos na amostra.

Colesterol das HDL

O colesterol das HDL foi determinado utilizando o kit HDL-CHOLESTEROL, Ref.OSR6287 (Beckman Coulter Inc, EUA), por um método enzimático na qual estão envolvidas a colesterol esterase, a colesterol oxidase e a peroxidase. Numa primeira parte da reação, são adicionados anticorpos anti-lipoproteína humana que se ligam a todas as lipoproteínas à exceção das HDL. Esta ligação vai bloquear a ação enzimática, que ocorre na segunda parte da reação, sobre as lipoproteínas que estão ligadas. Isto permite que estas enzimas atuem apenas sobre as HDL. No final da reação forma-se um cromogénio e a alteração da absorvância vai permitir determinar a concentração de HDL presente na amostra.

Colesterol das LDL

O colesterol das LDL foi calculado pela aplicação da fórmula de Friedewald, que é válida para valores de triglicéridos inferiores a 400 mg/dL. Para os indivíduos com uma concentração de triglicéridos superior a 400 mg/dL o LDL-Colesterol foi doseado por um método enzimático, utilizando o kit LDL-CHOLESTEROL, Ref.OSR6183 (Beckman Coulter Inc, EUA). Nessa reação, é adicionado um agente protetor à amostra, que protege o LDL e todas as outras lipoproteínas são degradadas. Na segunda fase da reação o LDL é libertado do agente protetor e é sujeito à ação da colesterol esterase. O colesterol livre produzido é oxidado pela colesterol oxidase. No final da reação, forma-se um composto corado e a absorvância da solução é proporcional à concentração de colesterol das LDL presente na amostra.

De acordo com as orientações da Direção Geral da Saúde, a dislipidémia foi considerada para qualquer uma das seguintes situações: concentração sérica de colesterol total igual ou superior a 200 mg/dL, concentração sérica de colesterol das LDL igual ou superior a 130 mg/dL, concentração sérica de colesterol das HDL igual ou inferior a 40 mg/dL, concentração sérica de triglicéridos igual ou superior a 150 mg/dL ou, ainda, quando os indivíduos afirmavam tomar medicação antidislipidémica [70].

Reações imunoturbidimétricas

Proteína C reativa de alta sensibilidade

A Proteína C Reativa de alta sensibilidade (PCRhs) foi determinada por um ensaio imunoturbidimétrico utilizando o kit CRP Latex, Ref.OSR6299 (Beckman Coulter Inc, EUA). A amostra é misturada com um tampão e com uma suspensão de partículas de látex revestidas de anticorpos anti-PCR aos quais se liga a PCR, formando agregados insolúveis. A absorvância destes agregados é proporcional à concentração de PCR na amostra. A aplicação ultrasensível deste método permite detetar concentrações de PCR muito baixas, entre 0,08 e 80 mg/L. A curva de calibração foi traçada utilizando o calibrador CRP Calibrator Highly Sensitive Set, Ref.OCD0027 (Beckman Coulter Inc, EUA).

APO B

A APO B foi determinada por um ensaio imunoturbidimétrico, utilizando o kit APO B, Ref.OSR6143 (Beckman Coulter Inc, EUA). A amostra é misturada com um tampão e com uma solução contendo anticorpos anti-Apo B. A APO B liga-se a estes anticorpos formando agregados insolúveis, cuja absorvância é proporcional à concentração de APO B na amostra.

Lp(a)

A Lp(a) foi determinada por um ensaio imunoturbidimétrico, utilizando o kit Lp(a) Ultra, Ref.11504D (Sentinel Diagnostics, Itália). A amostra é misturada com um tampão e com uma solução de partículas de latex revestidas com anticorpos anti-Lp(a), ocorrendo aglutinação. Essa aglutinação resulta numa alteração da absorvância, que é proporcional à concentração de Lp(a) na amostra.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* SPSS 23.0 for Windows (IBM SPSS statistics 23.0, Chicado, Inc).

Na estatística descritiva, as variáveis contínuas foram expressas sob a forma de medidas de tendência central e dispersão (média \pm desvio padrão) e as variáveis categóricas em frequências e percentagens. Na análise comparativa, entre grupos, foram usados o teste de homogeneidade do Qui-Quadrado, o teste *t* de *Student*, o teste de *Mann-Whitney*, o teste de *Kruskal Wallis* e a análise de variância *one-way* ANOVA. Foi usado o teste de *Shapiro-Wilk* para testar a normalidade das distribuições e o teste de *Levene* para testar a homogeneidade das variâncias. O teste de homogeneidade do Qui-Quadrado foi usado na análise das variáveis categóricas. Na análise das variáveis contínuas foi usado o teste *t* de *Student* e o teste *one-way* ANOVA para distribuições normais e, os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* e de *Kruskal-Wallis* para distribuições não normais. Finalmente, foi feita uma análise de variância dupla usando o teste *two-way* ANOVA e aplicado o modelo de regressão logística. Consideraram-se estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$.

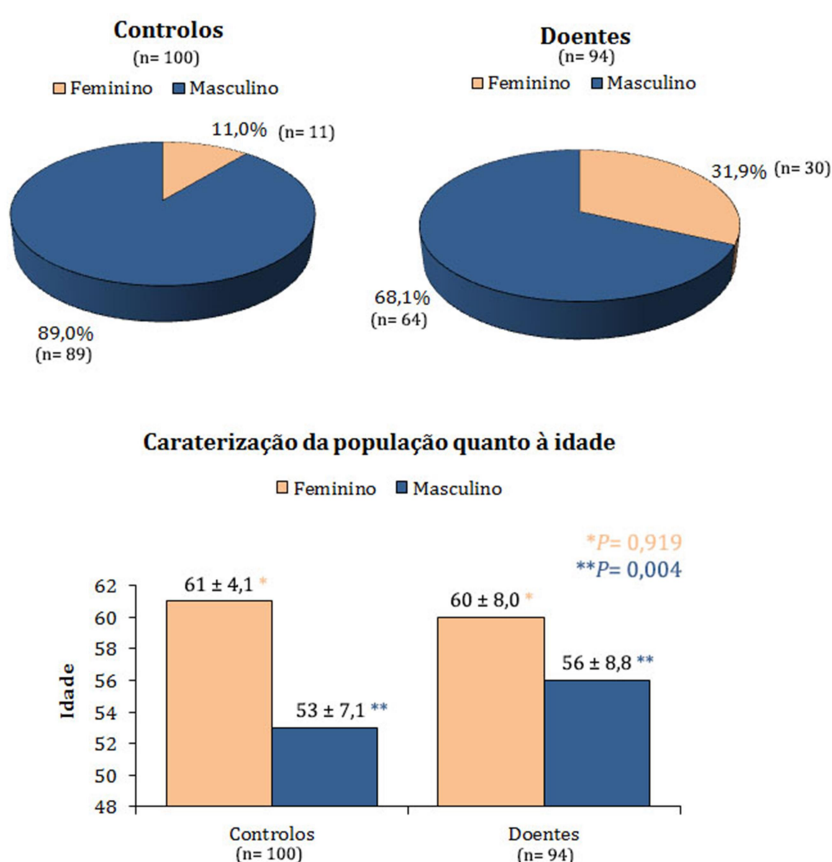
5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Foi avaliada uma amostra total de 194 indivíduos distribuídos por dois grupos. Um grupo com 100 indivíduos saudáveis (controlos), dos quais 89 homens (89,0%) e 11 mulheres (11,0%) e um grupo com 94 indivíduos com doença coronária (doentes), dos quais 64 homens (68,1%) e 30 mulheres (31,9%).

A Figura 9 mostra a classificação da população quando ao género e à idade.

Figura 9 - Caracterização da população quanto ao género e à idade



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média \pm desvio padrão. n refere-se ao tamanho da amostra.

Os valores de *P* apresentados na imagem foram obtidos por aplicação do teste *t* de *Student* ($n \geq 30$) ou do teste de *Mann-Whitney* ($n < 30$) (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores inferiores a 0,05).

Quanto ao género, verificou-se uma predominância do sexo masculino tanto no grupo dos controlos como no grupo dos doentes. No que diz respeito à idade verificou-se que, em ambos os grupos, a idade média dos indivíduos do sexo masculino era mais baixa do que a dos indivíduos do sexo feminino (Figura 9). As mulheres dos dois

grupos tinham uma idade média semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa, enquanto os homens do grupo dos controlos eram ligeiramente mais novos do que os homens do grupo dos doentes, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($P= 0,004$).

5.1.1. Características biométricas e estilos de vida

Na Tabela 4 estão apresentadas as características gerais dos indivíduos que constituíram os grupos dos controlos e dos doentes.

Tabela 4 - Características biométricas da população

	Controlos (n=100)	Doentes (n=94)	<i>P</i>
IMC	26,4±3,6	28,4±3,5	0,000
Perímetro abdominal (cm)	94,9±9,7	101,2±8,9	0,000
Pressão arterial sistólica (mmHg)	126,9±7,7	136,3±19,8	0,000
Pressão arterial diastólica (mmHg)	77,8±6,1	79,8±10,2	0,094
Frequência cardíaca (bt/min)	63,8±11,1	65,2±10,9	0,353

Os resultados apresentados referem-se aos valores de média ± desvio padrão.

O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste *t* de *Student* (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

Após a determinação do IMC verificou-se que, os indivíduos do grupo dos controlos apresentavam um valor significativamente mais baixo (26,4±3,6) do que os indivíduos do grupo dos doentes (28,4±3,5) ($P= 0,000$), verificando-se a mesma condição no valor do perímetro abdominal ($P= 0,000$).

Relativamente à pressão arterial, verificou-se que tanto os valores da PAS como da PAD eram mais baixos no grupo dos controlos do que no grupo dos doentes. O valor médio da PAS foi de 126,9±7,7 mmHg no grupo dos controlos e de 136,3±19,8 mmHg no grupo dos doentes e a PAD média foi de 77,8±6,1 mmHg no grupo dos controlos e de 79,8±10,2 mmHg no grupo dos doentes. Após a aplicação do teste *t* de *Student*, entre os dois grupos, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa no valor da PAS ($P= 0,000$) enquanto na PAD essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P= 0,094$).

A frequência cardíaca foi semelhante em ambos os grupos e não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P= 0,353$).

Comorbilidades

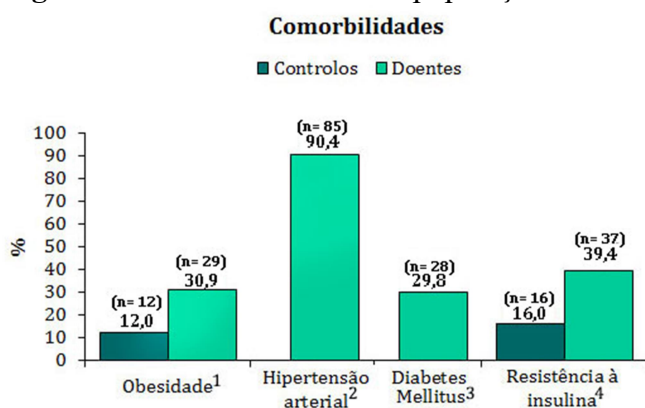
Na Figura 10 estão representadas as características da população no que diz respeito às comorbilidades.

Atendendo aos valores do IMC, segundo as normas da Organização Mundial de Saúde, foram considerados obesos 12 indivíduos (12,0%) no grupo dos controlos e 29 indivíduos (30,9%) no grupo dos doentes.

No grupo dos controlos não foram admitidos indivíduos hipertensos e/ou diabéticos porque a HTA e a DM são fatores que podem estar associados a alterações da concentração de vitamina D. No entanto e, de acordo com as definições da Organização Mundial de Saúde, 90,4% dos indivíduos do grupo dos doentes foram considerados hipertensos e 29,8% foram considerados diabéticos.

Apesar de não haver indivíduos diabéticos no grupo dos controlos, 16,0% apresentavam resistência à insulina, de acordo com os valores de HOMA. A percentagem foi mais alta no grupo dos doentes, no qual 37 indivíduos (39,4%) apresentavam resistência à insulina.

Figura 10 - Comorbilidades da população



1 - Consideraram-se obesos os indivíduos com IMC igual ou superior a 30 Kg/m² [67].

2 - Consideraram-se hipertensos os indivíduos com PAS igual ou superior a 140 mmHg e /ou PAD igual ou superior a 90 mmHg e/ou que tomavam medicação anti-hipertensiva [54,55].

3 - Consideraram-se diabéticos os indivíduos com uma concentração de glicose em jejum igual ou superior a 126 mg/dl e/ou terapêutica com insulina ou antidiabéticos orais [69].

4 - Considerou-se a resistência à insulina para valores de HOMA iguais ou superiores a 2,33[68].

n refere-se ao tamanho da amostra.

Estilo de vida da população

Os dois grupos (doentes e controlos) foram caracterizados quanto aos estilos de vida dos indivíduos. Avaliaram-se hábitos como o tabagismo, o consumo de bebidas alcoólicas, o consumo de alimentos ricos em vitamina D, o nível de atividade física e a intensidade da exposição solar. Adicionalmente, avaliou-se o fototipo de pele dos indivíduos. Os parâmetros avaliados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Estilo de vida da população

Tabagismo	Controlos (n=100)		Doentes (n=94)		P
	N	%	N	%	
Sim	16	16,0	8	8,5	--
Ex-fumador	3	3,0	28	29,8	
Não ^a	81	81,0	58	61,7	
Consumo de bebidas alcoólicas ^b					
Sim	76	76,0	37	39,4	--
Não	24	24,0	57	60,6	
Consumo de alimentos ricos em vitamina D ^c					
Muito Frequente	4	4,0	4	4,3	0,097
Frequente	67	67,0	49	52,1	
Raramente	29	29,0	41	43,6	
Nível de atividade física ^d					
Muito ativo	6	6,0	--	--	0,024
Ativo	64	64,0	70	74,5	
Irregularmente ativo	18	18,0	9	9,6	
Sedentário	12	12,0	15	15,9	
Exposição solar ^e					
Baixa	18	18,0	25	26,6	0,286
Moderada	29	29,0	28	29,8	
Elevada	53	53,0	41	43,6	
Fototipo de pele ^f					
1	4	4,0	8	8,5	0,207
2	23	23,0	19	20,2	
3	44	44,0	30	31,9	
4	20	20,0	29	30,9	
5	9	9,0	8	8,5	
Estatinas					
Toma	8	8,0	66	70,2	--
Não toma	92	92,0	28	29,8	

O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste de homogeneidade do Qui-Quadrado, (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

a - Nunca fumou ou deixou de fumar há mais de 5 anos

b - **Sim** – pelo menos uma vez por semana; **Não** – menos do que uma vez por semana

c - **Muito frequente** – 4 vezes por semana ou mais; **Frequente** - 1 a 3 vezes por semana; **Raramente** – menos de 4 vezes por mês.

d - **Muito ativo** - atividade vigorosa pelo menos 5 vezes por semana ou atividade vigorosa 3 vezes por semana + atividade moderada pelo menos 5 vezes por semana; **Ativo** - atividade vigorosa pelo menos 3 vezes por semana ou moderada pelo menos 5 vezes por semana; **Irregularmente ativo** - atividade moderada menos do que 3 vezes por semana; **Sedentário** – nenhuma atividade ^[66].

e - **Baixa** – menos de 30 minutos por dia; **Moderada** – de 30 a 60 minutos por dia; **Elevada** – mais de 60 minutos por dia.

f - **Fototipo de pele: 1** – Muito Clara. Queima com frequência. Nunca bronzeia; **2** – Clara. Queima com frequência. Às vezes bronzeia; **3** – Clara média. Às vezes queima. Bronzeia com frequência; **4** – Escura média. Raramente queima. Bronzeia com frequência; **5** – Escura. Raramente queima. Bronzeia bastante.

Tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas

Na análise do consumo de tabaco (Tabela 5), verificou-se que 81 indivíduos (81,0%) do grupo dos controlos e 58 indivíduos (61,7%) do grupo dos doentes eram não fumadores, havendo assim uma predominância de indivíduos não fumadores em ambos os grupos.

A principal diferença foi observada na percentagem de ex-fumadores. Enquanto apenas 3 indivíduos (3,0%), do grupo dos controlos, eram ex-fumadores, no grupo dos doentes esse número era maior, havendo 28 indivíduos (29,8%) ex-fumadores.

O consumo de bebidas alcoólicas, verificou-se ser um hábito mais comum no grupo dos controlos (76,0%) do que no grupo dos doentes (39,4%) (Tabela 5).

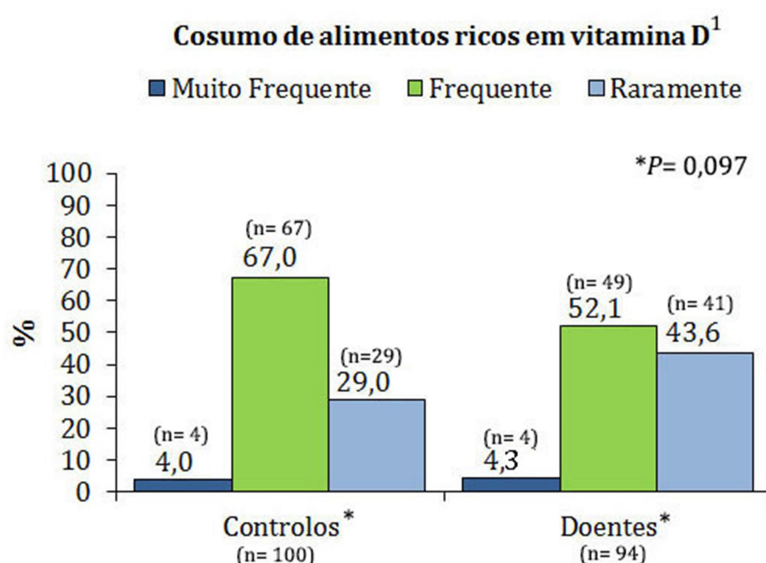
Alimentação

Na avaliação dos hábitos alimentares e, no que respeita ao consumo de alimentos ricos em vitamina D, verificou-se que era mais frequente no grupo dos controlos do que no grupo dos doentes (Tabela 5 e Figura 11). Em qualquer um dos grupos foram poucos os indivíduos (apenas 4 em cada grupo) que referiram consumir alimentos ricos em vitamina D com uma frequência superior a 3 vezes por semana. No entanto, foi possível verificar que, no grupo dos controlos, foi maior o número de indivíduos (67,0%) que referiu consumir alimentos ricos em vitamina D entre 1 a 3 vezes por semana, do que no grupo dos doentes (52,1%).

Por último, enquanto no grupo dos controlos apenas 29 indivíduos (29,0%) referiram consumir alimentos ricos em vitamina D raramente, no grupo dos doentes essa percentagem foi superior (41 indivíduos; 43,6%).

Contudo, por aplicação do teste de homogeneidade do Qui-Quadrado, verificou-se que não havia diferença estatisticamente significativa entre os hábitos alimentares dos dois grupos ($P=0,097$).

Figura 11 - Estilo de vida da população: consumo de alimentos ricos em vitamina D



¹**Muito frequente** – 4 vezes por semana ou mais; **Frequente** - 1 a 3 vezes por semana; **Raramente** – menos de 4 vezes por mês. O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste de homogeneidade do Qui-Quadrado (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores inferiores a 0,05). *n* refere-se ao tamanho da amostra.

Atividade física

A análise da prática de atividade física, não revelou grandes diferenças entre o grupo de controlos e o grupo de doentes (Tabela 5). A maioria dos indivíduos foi considerada na categoria dos ativos, em ambos os grupos (controlos 64,0%; doentes 74,5%). A percentagem de sedentarismo também não diferiu muito entre grupos. No grupo dos controlos, 12,0% dos indivíduos foram considerados sedentários e no grupo dos doentes, 15,9%. É de salientar que no grupo dos doentes, nenhum indivíduo foi considerado muito ativo.

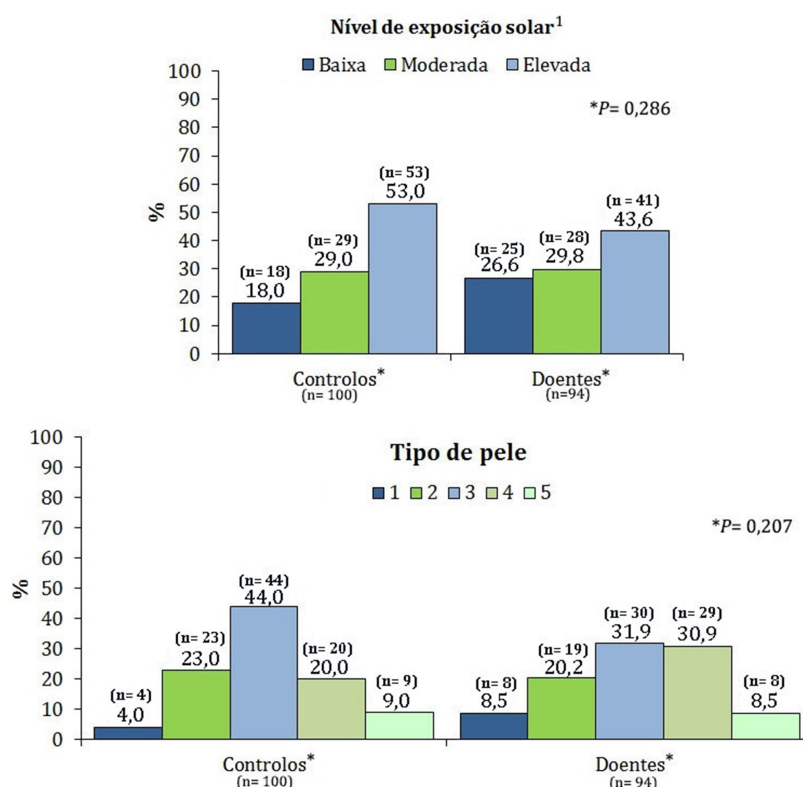
Exposição solar e fototipo de pele

A avaliação do nível de exposição solar revelou semelhanças nos dois grupos (Tabela 5 e Figura 12). Grande parte dos indivíduos afirmou estar exposto ao sol mais do que uma hora por dia, tanto no grupo dos controlos (53,0%) como no grupo dos doentes (43,6%), tendo-se verificado, pelo teste de homogeneidade do Qui-Quadrado, que não havia diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, quanto ao nível de exposição solar (*P*= 0,286).

No entanto, verificou-se que, no grupo dos doentes, existia um maior número de indivíduos (26,6%) que estavam expostos ao sol menos de 30 minutos por dia, do que no grupo dos controlos (18,0%).

A maioria dos indivíduos, de ambos os grupos, apresentava fototipo de pele 2, 3 e 4, havendo poucos indivíduos com tipo de pele 1 e 5 (Tabela 5 e Figura 12).

Figura 12 - Estilo de vida da população: nível de exposição solar e fototipo de pele



¹**Nível de exposição solar:** **Baixa** – menos de 30 minutos por dia; **Moderada** – de 30 a 60 minutos por dia; **Elevada** – mais de 60 minutos por dia.

²**Fototipo de pele:** **1** – Muito Clara. Queima com frequência. Nunca bronzeia; **2** – Clara. Queima com frequência. Às vezes bronzeia; **3** – Clara média. Às vezes queima. Bronzeia com frequência; **4** – Escura média. Raramente queima. Bronzeia com frequência; **5** – Escura. Raramente queima. Bronzeia bastante. O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste de homogeneidade do Qui-Quadrado (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores inferiores a 0,05)
n refere-se ao tamanho da amostra.

Toma de estatinas

Por último, outra das características estudadas foi a toma de medicação (Tabela 5). Verificou-se que no grupo dos doentes a toma de estatinas era muito mais frequente (70,2%) do que no grupo dos controlos (8,0%).

5.1.2. Características bioquímicas

Todos os indivíduos realizaram testes laboratoriais de rotina que foram complementados com testes laboratoriais específicos. Inicialmente, todos os indivíduos realizaram um hemograma e, uma vez que a insuficiência renal e hepática foram consideradas como critério de exclusão, realizaram-se testes bioquímicos que permitiram avaliar a função renal e a função hepática. Os resultados destes testes laboratoriais estão apresentados nas Tabela 14 e na Tabela 15 (Anexo 5).

Nenhum dos indivíduos admitidos no estudo tinha insuficiência hepática ou renal.

Avaliação do risco cardiovascular

A fim de avaliar o risco cardiovascular dos indivíduos, foram determinados vários parâmetros bioquímicos cujos resultados estão apresentados na Tabela 6 e na Tabela 16 (Anexo 5). O perfil lipídico foi analisado e foram determinadas as concentrações séricas de glicose e insulina, em jejum, a percentagem da HA_{1C} e, ainda, o valor de HOMA para a resistência à insulina. Além disso, foram ainda determinados alguns parâmetros laboratoriais que estão relacionados com o aumento do risco cardiovascular como o fibrinogénio, a homocisteína e a PCRhs.

Tabela 6 – Perfil lipídico, valor de HA_{1c} e HOMA e concentração sérica de glicose, insulina, fibrinogénio, PCRhs e homocisteína.

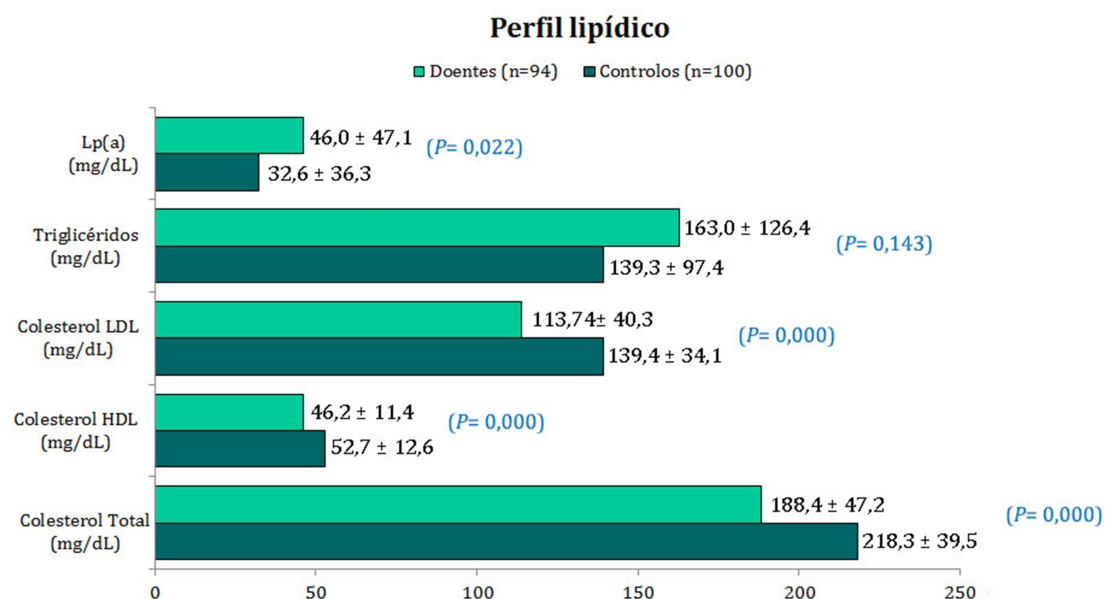
	Controlos (n=100) Mulheres (n= 11); Homens (n=89)	Doentes (n=94) Mulheres (n= 30); Homens (n= 64)	P
Colesterol Total <200 (mg/dL)	218,2 ± 39,5	188,4 ± 47,2	0,000
Colesterol HDL <40 (mg/dL)	52,7 ± 12,6	46,2 ± 11,4	0,000
Colesterol LDL <130 (mg/dL)	139,4 ± 34,1	113,7 ± 40,3	0,000
Triglicéridos <150 (mg/dL)	139,3 ± 97,4	163,0 ± 126,4	0,143
APO B Mulher: 55 - 130 (mg/dL)	126,4 ± 29,8	108,2 ± 28,6	0,103
Homem: 60 - 140 (mg/dL)	121,9 ± 31,5	107,2 ± 27,6	0,003
Lp(a) <30 mg/dL	32,6 ± 36,3	46,0 ± 47,1	0,022
Glicose 74 - 106 (mg/dL)	95,4 ± 10,3	129,7 ± 56,1	0,000
Insulina 1,9 - 2,3 (μUI/mL)	6,0 ± 3,8	9,7 ± 10,5	0,001
HOMA <2.33	1,4 ± 1,0	3,2 ± 3,9	0,000
HA_{1c} 4,0 - 6,0 %	5,3 ± 0,4	6,6 ± 1,8	0,000
Fibrinogénio 238-498 mg/dL	376,9 ± 86,3	414,1 ± 88,2	0,003
PCRhs <1 mg/dL	0,26 ± 0,34	0,53 ± 1,17	0,027
HCY 5,0-15 μmol/L	12,3 ± 4,0	12,9 ± 4,0	0,311

Os resultados apresentados referem-se aos valores de média ± desvio padrão.

O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste *t* de *Student* (n≥30) ou do teste de *Mann-Whitney* (n<30) (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

Perfil lipídico

Figura 13- Perfil lipídico

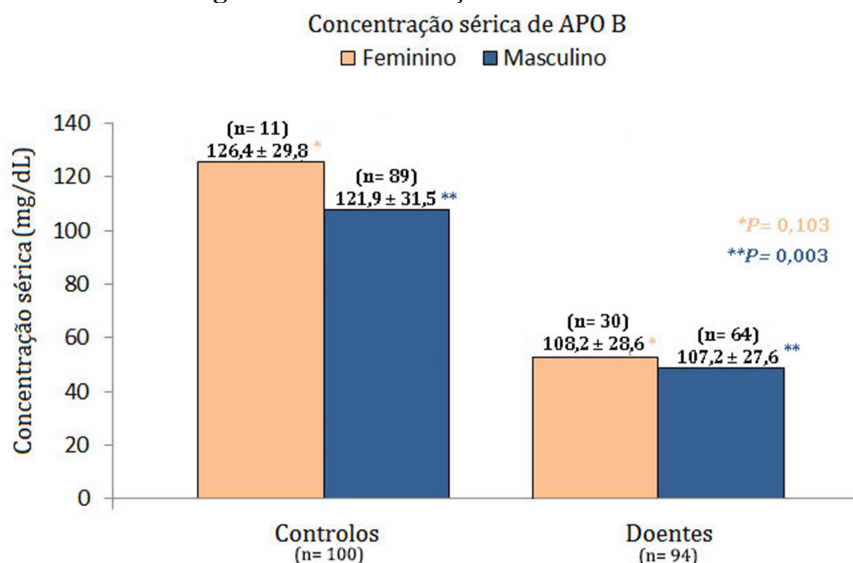


Os valores apresentados junto às barras referem-se ao valor da média ± desvio padrão.

Os valores de *P* apresentados da imagem foram obtidos por aplicação do teste *t* de *Student* (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores de *P* inferiores a 0,05).

O grupo dos controlos apresentou concentrações séricas de colesterol total (218,3±39,5 mg/dL), colesterol das HDL (52,7±12,6 mg/dL) e de colesterol das LDL (139,4±34,1 mg/dL) significativamente mais altas do que o grupo dos doentes (188,4±47,2 mg/dl; 46,2±11,4 mg/dL e 113,7±40,3 mg/dl respetivamente). Pelo contrário, as concentrações médias de triglicéridos e de Lp(a) apresentadas pelo grupo dos doentes, foram mais elevadas do que as do grupo dos controlos, embora essas diferenças apenas tenham mostrado significância estatística (*P*= 0,022) para a concentração de Lp(a) (Tabela 6 e Figura 13).

Figura 14 - Concentração sérica de APO B



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média \pm desvio padrão.

n refere-se ao tamanho da amostra.

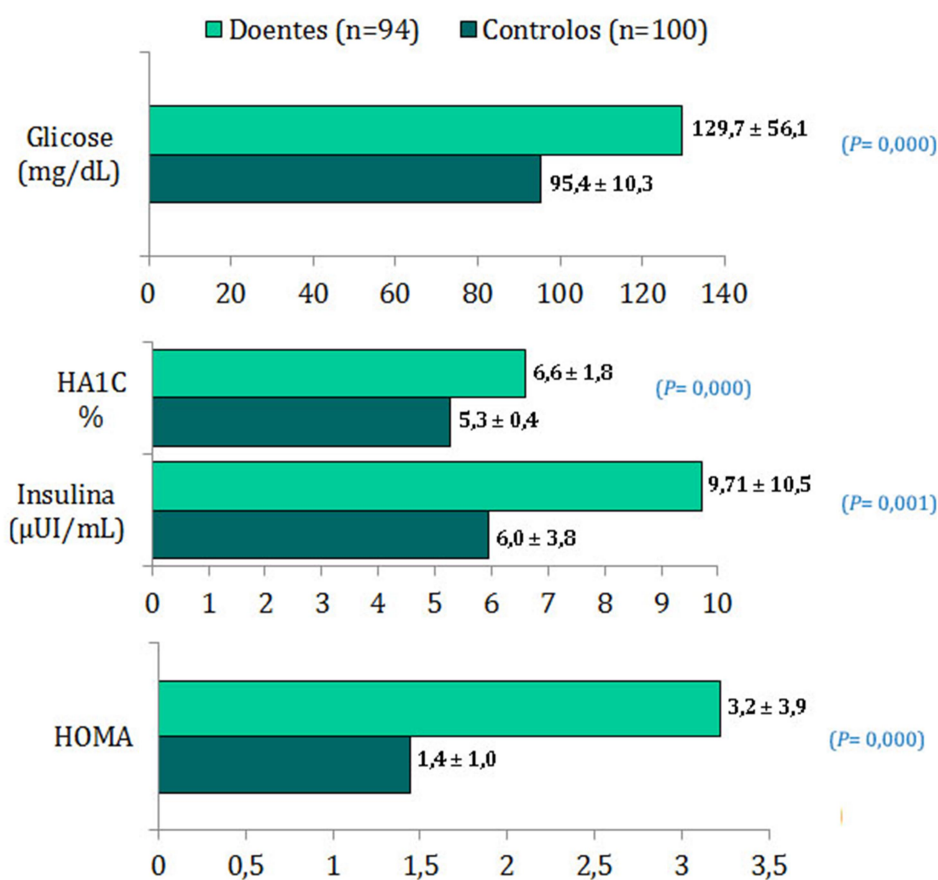
Os valores de *P* apresentados na imagem foram obtidos por aplicação do teste *t* de *Student* ($n \geq 30$) ou do teste de *Mann-Whitney* ($n < 30$) (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores de *P* inferiores a 0,05).

Uma vez que os valores de referência da APO B são diferentes para homens e mulheres, para este parâmetro fez-se a análise estatística de acordo com o género (Figura 14). Verificou-se que, tanto no grupo dos controlos como no grupo dos doentes, a concentração sérica de APO B foi mais alta nas mulheres do que nos homens. Além disso, verificou-se que no grupo dos doentes, tanto nos homens como nas mulheres, as concentrações de APO B foram mais baixas ($108,2 \pm 28,6$ mg/dL nas mulheres e $107,2 \pm 27,6$ mg/dL nos homens) do que no grupo dos controlos ($126,4 \pm 29,8$ mg/dL nas mulheres e $121,9 \pm 31,5$ mg/dL nos homens). Para verificar se essa diferença era estatisticamente significativa, aplicou-se o teste *t* de *Student* para comparar os indivíduos de ambos os grupos, em função do género. Apenas se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos do sexo masculino ($P=0,003$). Nos indivíduos do sexo feminino a diferença não foi significativa ($P=0,103$).

Glicose, HA1C e Insulina

As concentrações séricas de glicose e insulina foram determinadas em jejum e foi avaliada a percentagem da HA_{1C}, para todos os indivíduos. Os resultados estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 15.

Figura 15 – Concentração sérica de glicose e insulina e valor de HA_{1C} e HOMA



Os valores apresentados junto às barras referem-se ao valor da média ± desvio padrão.

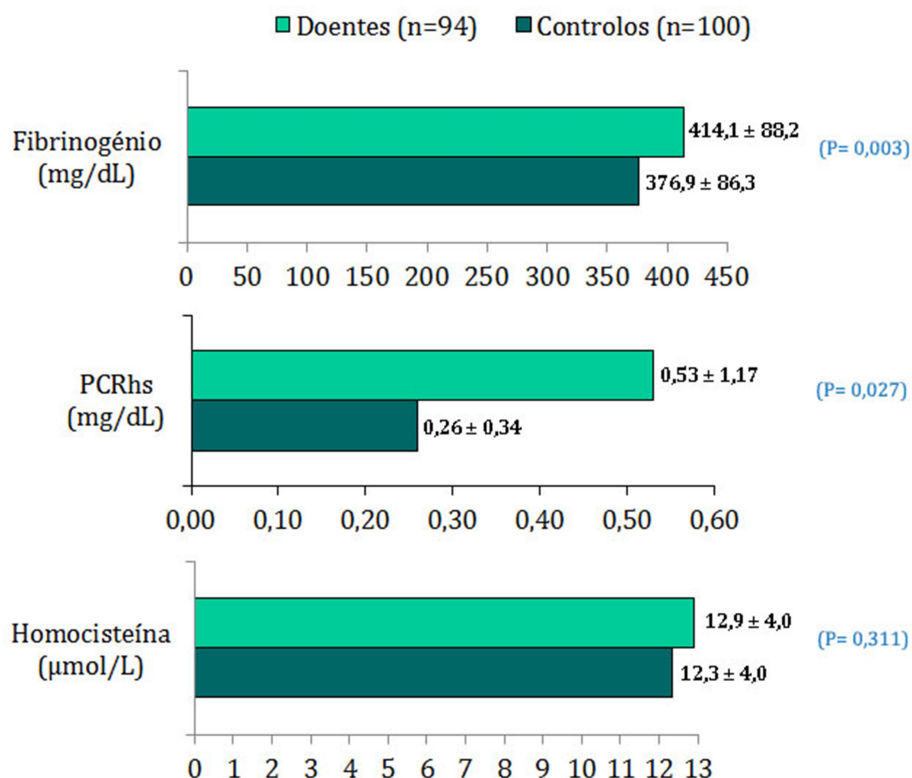
Os valores de *P* apresentados na imagem foram obtidos por aplicação do teste *t* de Student (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores de *P* inferiores a 0,05).

Após a determinação destes parâmetros laboratoriais verificou-se que tanto as concentrações séricas de glicose e de insulina, como a percentagem de HA_{1C} e o valor de HOMA eram significativamente mais baixos no grupo dos controlos do que no grupo dos doentes.

Fibrinogénio, PCRhs e homocisteína

Foram determinadas as concentrações séricas de fibrinogénio, PCRhs e de homocisteína em ambos os grupos e os resultados estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 16.

Figura 16 – Concentração sérica de fibrinogénio, PCRhs e homocisteína



Os valores apresentados junto às barras referem-se ao valor da média ± desvio padrão.

Os valores de *P* apresentados da imagem foram obtidos por aplicação do teste *t* de *Student* (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores de *P* inferiores a 0,05).

A concentração sérica de fibrinogénio foi significativamente mais elevada no grupo dos doentes do que no grupo dos controlos ($P= 0,003$).

Da mesma forma, a concentração sérica de PCRhs foi mais elevada no grupo dos doentes do que no grupo dos controlos, tendo essa diferença sido estatisticamente significativa ($P= 0,027$).

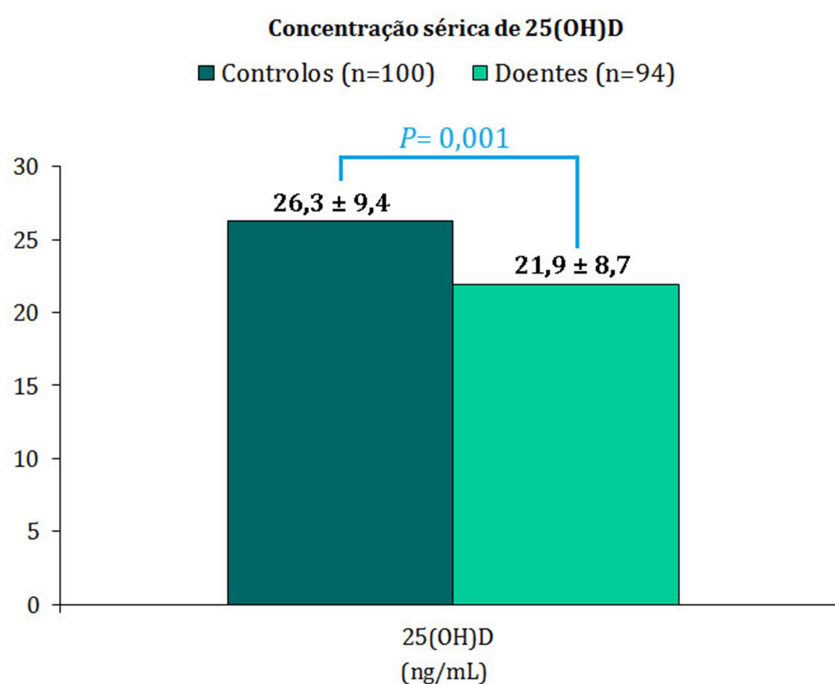
Quanto à concentração sérica de homocisteína, apesar de esta ter revelado ser ligeiramente mais elevada no grupo dos doentes do que no grupo dos controlos, a diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($P= 0,311$).

5.2. VITAMINA D

5.2.1. Determinação da concentração sérica de 25(OH)D

No gráfico da Figura 17 apresenta-se a concentração sérica de 25(OH)D, que foi determinada no soro dos indivíduos dos dois grupos estudados.

Figura 17 - Concentração sérica de 25(OH)D



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média \pm desvio padrão.

O valor de P apresentado na imagem foi obtido por aplicação do teste t de *Student* (consideraram-se estatisticamente significativos todos os valores de P inferiores a 0,05).

Ao comparar os valores médios das concentrações séricas de 25(OH)D apresentados pelos indivíduos dos grupos de controlos e de doentes, verificou-se que o grupo dos doentes revelou um valor médio inferior ao valor do grupo dos controlos. Esta diferença entre os dois grupos foi considerada estatisticamente significativa ($P=0,001$), após a aplicação do teste t de *Student*.

Apesar da literatura não fazer distinção na concentração de 25(OH)D entre géneros, no presente trabalho foram encontradas diferenças significativas entre homens e mulheres, no grupo dos doentes ($P=0,021$). No grupo dos controlos também se encontrou uma diferença na concentração de 25(OH)D entre homens e mulheres, apesar de, neste grupo, essa diferença não ter significância estatística ($P=0,067$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentração sérica de 25(OH)D de acordo com o género

	Controlos				Doentes			
	Total (n=100)	Feminino ^a (n=11)	Masculino ^b (n=89)	P	Total (n=94)	Feminino ^a (n=30)	Masculino ^b (n=64)	P
25(OH)D (ng/mL)	26,3±9,4	20,8±9,7	26,9±9,1	0,067	21,9±8,7	19,2±9,8	23,2±7,9	0,021

A concentração sérica de 25(OH)D está apresentada em média ± desvio padrão.

O valores de *P* apresentados na tabela foram obtidos por aplicação do teste de *Mann-Whitney*, (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

a – Teste de *Mann-Whitney* entre os indivíduos do sexo feminino de ambos os grupos (*P* = 0,552).

b – Teste *t* de *Student* entre os indivíduos do sexo masculino de ambos os grupos (*P* = 0,009).

Uma vez que se observaram diferenças estatisticamente significativas entre homens e mulheres no grupo dos doentes, compararam-se as médias da concentração sérica das mulheres de ambos os grupos e fez-se o mesmo para os homens. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa nos indivíduos do sexo masculino (*P*= 0,009) (Tabela 7).

Finalmente e, atendendo aos resultados anteriores, a fim de verificar se existiam diferenças significativas entre doentes e controlos, nas proporções de homens e de mulheres, aplicou-se o teste de homogeneidade do Qui-quadrado, tendo-se verificado que existiam diferenças estatisticamente significativas (*P*= 0,000).

5.2.2. Avaliação do estado de vitamina D

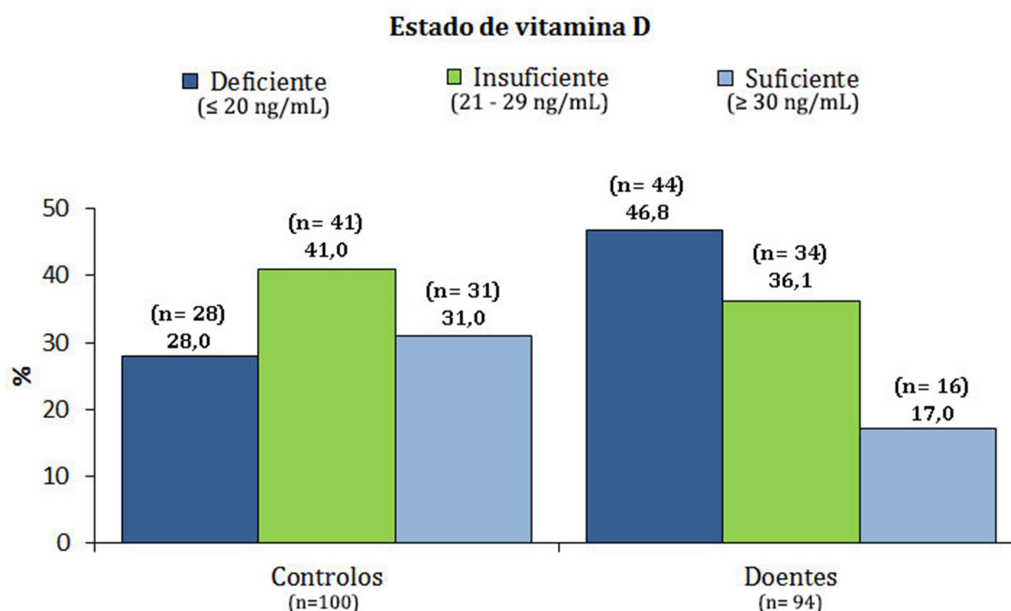
De acordo com o valor da concentração sérica de 25(OH)D determinou-se o estado de vitamina D de cada indivíduo, ou seja, verificou-se se esse valor correspondia a uma das seguintes categorias: suficiente, insuficiente ou deficiente de vitamina D. Para cada um dos grupos estudados, determinou-se a percentagem de indivíduos em cada uma das categorias de vitamina D.

Como é possível verificar na Figura 18, em ambos os grupos, a maioria dos indivíduos apresentava valores deficientes ou insuficientes de vitamina D e apenas uma pequena percentagem de indivíduos apresentava níveis suficientes de vitamina D.

No grupo dos doentes verificou-se que cerca de metade dos indivíduos apresentava deficiência de vitamina D (46,8%), enquanto no grupo dos controlos essa percentagem era mais baixa (28,0%). Apesar do grupo dos controlos ter apresentado uma percentagem mais elevada de indivíduos com insuficiência de vitamina D, do que o grupo dos doentes, a principal diferença entre os dois grupos diz respeito à percentagem

de indivíduos com níveis suficientes de vitamina D. Enquanto que no grupo dos controles, 31,0% dos indivíduos revelaram ter concentrações séricas suficientes de vitamina D, no grupo dos doentes foram apenas 17,0%, os indivíduos nessa categoria.

Figura 18 - Estado de vitamina D da população, de acordo com a concentração sérica de 25(OH)D dos indivíduos.



5.2.3. Concentração sérica de 25(OH)D em função das comorbilidades da população

Avaliou-se a concentração sérica de 25(OH)D em função de fatores como a obesidade, resistência à insulina, HTA e a DM. Os resultados estão representados na Tabela 8 e na Figura 19.

Tanto no grupo dos doentes como no grupo dos controles, os indivíduos obesos apresentaram uma concentração mais baixa de 25(OH)D do que os indivíduos sem obesidade. Contudo, essa diferença não foi significativa no grupo dos controles ($P=0,203$) nem no grupo dos doentes ($P=0,174$). Além disso, verificou-se que, com ou sem obesidade, os indivíduos do grupo dos doentes apresentaram uma concentração mais baixa de 25(OH)D do que os controles, havendo uma diferença significativa entre os indivíduos sem obesidade do grupo dos controles e do grupo dos doentes ($P=0,007$).

Também, nos dois grupos, os indivíduos que apresentavam resistência à insulina tinham níveis séricos de 25(OH)D mais baixos do que os indivíduos sem resistência à insulina, apesar da diferença não ser significativa em nenhum dos grupos.

No entanto, verificou-se uma diferença significativa entre a concentração sérica de 25(OH)D dos indivíduos sem resistência à insulina, do grupo dos controlos e os indivíduos do grupo dos doentes, com a mesma condição ($P=0,003$).

No grupo dos controlos, não foi possível relacionar o valor de 25(OH)D com a HTA nem com a DM porque neste grupo não havia indivíduos hipertensos nem diabéticos. No entanto, no grupo dos doentes verificou-se que os indivíduos diabéticos tinham uma concentração de 25(OH)D mais baixa do que os indivíduos sem DM, sendo essa diferença significativa ($P=0,005$).

No caso da HTA verificou-se o contrário, ou seja, no grupo dos doentes, os indivíduos com HTA apresentaram concentrações mais elevadas de 25(OH)D do que os indivíduos sem HTA, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa ($P=0,542$). Da mesma forma, não se verificou uma diferença significativa entre a concentração de 25(OH)D dos controlos e dos doentes sem HTA, apesar destes últimos terem uma concentração mais baixa de 25(OH)D ($P=0,089$).

Tabela 8 - Concentração sérica de 25(OH)D em função das comorbilidades da população

		Controlos (n=100)		Doentes (n=94)	
Obesidade ¹	N	25(OH)D (ng/mL)	N	25(OH)D (ng/mL)	P
Sim	12	23,2 ± 6,3	29	20,4 ± 9,3	0,274
Não	88	26,7 ± 9,7	65	22,6 ± 8,4	0,007
Hipertensão ²					
Sim	0	--	85	22,1 ± 8,9	--
Não	100	26,3 ± 9,4	9	20,0 ± 6,7	0,089
Diabetes Mellitus ³					
Sim	0	--	28	18,4 ± 9,4	--
Não	100	26,3 ± 9,4	66	23,5 ± 8,1	0,045
Resistência à insulina ⁴					
Sim	16	22,2 ± 8,7	37	21,1 ± 10,1	0,462
Não	84	27,1 ± 9,3	57	22,5 ± 7,8	0,003

A concentração sérica de 25(OH)D está apresentada em média ± desvio padrão.

O valor de P foi obtido por aplicação do teste t de Student ($n \geq 30$) ou do teste de Mann-Whitney ($n < 30$) (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de P inferiores a 0,05).

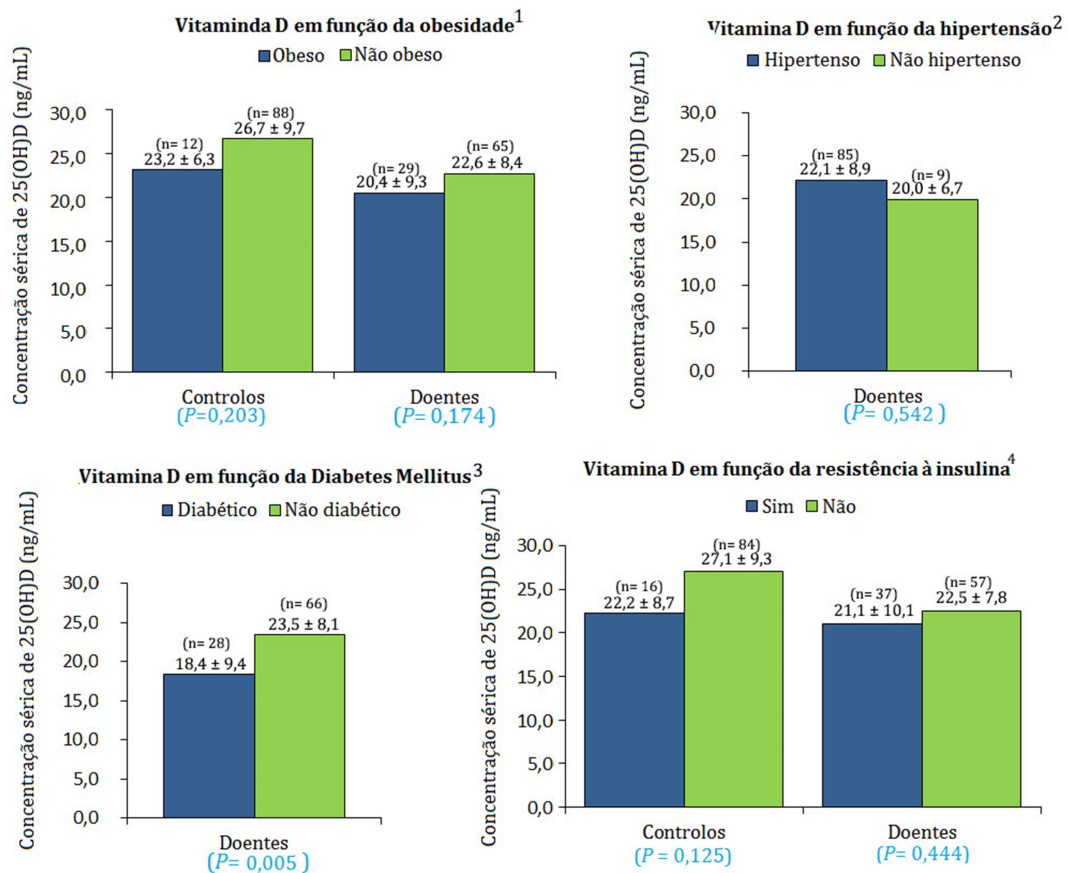
1 - Consideraram-se obesos os indivíduos com IMC igual ou superior a 30 Kg/m² [67].

2 - Consideraram-se hipertensos os indivíduos com PAS igual ou superior a 140 mmHg e/ou PAD igual ou superior a 90 mmHg e/ou que tomavam medicação anti-hipertensiva [54,55].

3 - Consideraram-se diabéticos os indivíduos com uma concentração de glicose em jejum igual ou superior a 126 mg/dl e/ou terapêutica com insulina ou antidiabéticos orais [69].

4 - Considerou-se a resistência à insulina para valores de HOMA iguais ou superiores a 2,33 [68].

Figura 19 – Concentração sérica de 25(OH)D em função das comorbilidades da população



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média ± desvio padrão.

Os valores de *P* apresentados na imagem foram obtidos por aplicação do *t* de *Student* ($n \geq 30$) ou do teste de *Mann-Whitney* ($n < 30$), (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

n refere-se ao tamanho da amostra.

1 - Consideraram-se obesos os indivíduos com IMC igual ou superior a 30 Kg/m² [67].

2 - Consideraram-se hipertensos os indivíduos com PAS igual ou superior a 140 mmHg e /ou PAD igual ou superior a 90 mmHg e/ou que tomavam medicação anti-hipertensiva [54,55].

3 - Consideraram-se diabéticos os indivíduos com uma concentração de glicose em jejum igual ou superior a 126 mg/dl e/ou terapêutica com insulina ou antidiabéticos orais [69].

4 - Considerou-se a resistência à insulina para valores de HOMA iguais ou superiores a 2,33 [68].

5.2.4. Concentração sérica de 25(OH)D em função do estilo de vida da população

Na Tabela 9 apresenta-se a concentração sérica de 25(OH)D de acordo com o estilo de vida dos indivíduos dos dois grupos estudados (controlos e doentes).

Tabela 9 - Concentração sérica de 25(OH)D em função do estilo de vida da população

	Controlos (n=100)		Doentes (n=94)		
Tabagismo	N	25(OH)D (ng/mL)	N	25(OH)D (ng/mL)	P
Sim	16	24,1 ± 9,2	8	18,7 ± 5,9	0,106
Ex-fumador	3	26,9 ± 1,9	28	23,7 ± 8,6	0,590
Não ¹	81	26,7 ± 9,5	58	21,5 ± 9,0	0,002
Consumo de bebidas alcoólicas²					
Sim	76	26,6 ± 9,0	37	23,8 ± 7,5	0,107
Não	24	25,2 ± 10,7	57	20,7 ± 9,3	0,075
Consumo de alimentos ricos em vitamina D³					
Muito Frequente	4	33,1 ± 14,6	4	22,0 ± 3,0	0,343
Frequente	67	25,8 ± 8,7	49	22,9 ± 8,6	0,072
Raramente	29	26,4 ± 10,1	41	20,8 ± 9,3	0,032
Nível de atividade física⁴					
Muito ativo	6	34,6 ± 7,5		--	--
Ativo	64	26,9 ± 9,1	70	22,2 ± 8,6	0,002
Irregularmente ativo	18	24,0 ± 9,1	9	22,5 ± 9,3	0,668
Sedentário	12	22,2 ± 9,4	15	20,5 ± 9,3	0,614

A concentração sérica de 25(OH)D está apresentada em média ± desvio padrão.

O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste *t* de *Student* (n≥30) ou do teste de *Mann-Whitney* (n<30), (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

1 - Nunca fumou ou deixou de fumar há mais de 5 anos

2 - **Sim** – pelo menos uma vez por semana; **Não** – menos do que uma vez por semana

3 - **Muito frequente** – 4 vezes por semana ou mais; **Frequente** - 1 a 3 vezes por semana; **Raramente** – menos de 4 vezes por mês.

4 - **Muito ativo** - atividade vigorosa pelo menos 5 vezes por semana ou atividade vigorosa 3 vezes por semana + atividade moderada pelo menos 5 vezes por semana; **Ativo** - atividade vigorosa pelo menos 3 vezes por semana ou moderada pelo 5menos vezes por semana; **Irregularmente ativo** - atividade moderada menos do que 3 vezes por semana; **Sedentário** – nenhuma atividade [66].

Concentração sérica de 25(OH)D em função do tabagismo e do consumo de álcool

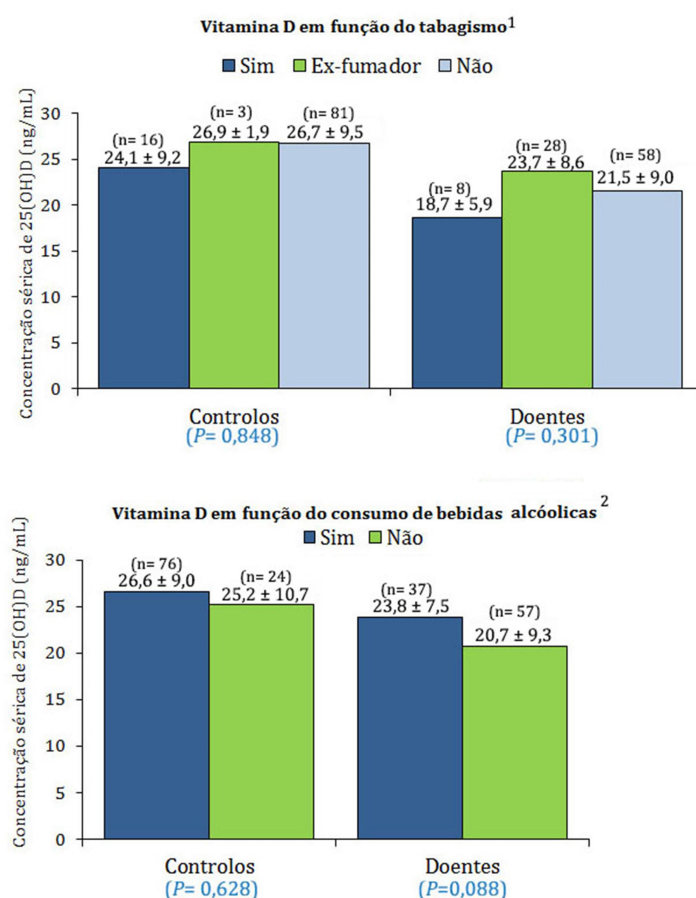
Avaliou-se a concentração de 25(OH)D em função do consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas. Os resultados estão representados na Tabela 9 e na Figura 20. Relativamente ao consumo de tabaco, verificou-se que tanto no grupo dos controlos como no grupo dos doentes, a concentração de 25(OH)D foi mais baixa nos indivíduos fumadores do que nos restantes, embora essa diferença não tenha sido significativa em nenhum dos grupos (*P*= 0,848 no grupo dos controlos; *P*= 0,301 no grupo dos doentes).

Além disso, foi possível constatar que no grupo dos doentes a concentração sérica de 25(OH)D foi mais baixa do que nos controlos, em cada uma das três categorias: indivíduos fumadores, ex-fumadores e não fumadores. No entanto,

comparando os dois grupos estudados, por categoria, essa diferença apenas se considerou significativa para a dos indivíduos não fumadores ($P=0,002$).

Por outro lado, o valor da concentração sérica de 25(OH)D foi mais elevada nos indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas frequentemente do que naqueles que não consumiam bebidas alcoólicas. À semelhança do que se observou para o tabagismo, tanto nos indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas como nos restantes, a concentração de 25(OH)D foi mais baixa no grupo dos doentes. Contudo, nenhuma destas diferenças foi significativa.

Figura 20 – Concentração sérica de 25(OH)D em função do tabagismo e do consumo de bebidas alcoólicas



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média ± desvio padrão. n refere-se ao tamanho da amostra.

Os valores de P apresentados na imagem referente ao tabagismo foram obtidos por aplicação do teste One-way ANOVA ou do teste de Kruskal-Wallis e os valores de P apresentados na imagem referente ao consumo de bebidas alcoólicas foram obtidos por aplicação do teste t de Student ou do teste de Mann-Whitney (consideraram-se estatisticamente significativos os valores inferiores a 0,05).

n refere-se ao tamanho da amostra.

¹**Tabagismo:** Sim – Fuma; Ex-fumador – deixou de fumar há menos de 5 anos; Não – nunca fumou ou deixou de fumar há mais de 5 anos.

²**Consumo de bebidas alcoólicas:** Sim – pelo menos uma vez por semana; Não – menos do que uma vez por semana

Concentração sérica de 25(OH)D em função da alimentação

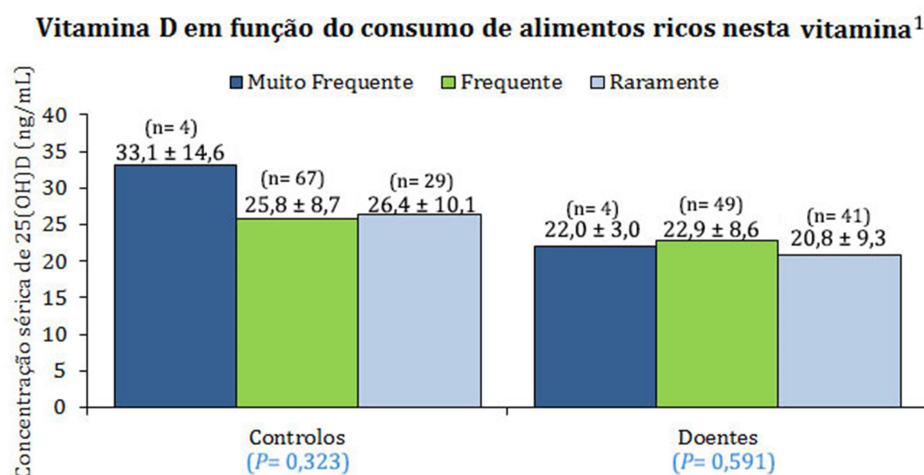
A concentração de 25(OH)D foi avaliada em função da frequência da ingestão de alimentos ricos em vitamina D e os resultados estão representados na Tabela 9 e na Figura 21.

No grupo dos controlos, verificou-se que os indivíduos que consumiam alimentos ricos em vitamina D com muita frequência tinham uma concentração de 25(OH)D bem mais elevada ($33,1 \pm 14,6$ ng/mL) que os restantes. No entanto, no mesmo grupo, não se observou uma diferença muito acentuada entre a concentração de 25(OH)D dos indivíduos que consumiam alimentos ricos em vitamina D frequentemente ou raramente.

Por outro lado, no grupo dos doentes, as concentrações de 25(OH)D foram muito semelhantes tanto nos indivíduos que consumiam alimentos ricos em vitamina D com muita frequência, com frequência ou que raramente consumiam. Estatisticamente essas diferenças não foram significativas nem no grupo dos controlos ($P= 0,323$) nem no grupo dos doentes ($P= 0,591$)

Porém, verificou-se que, independentemente da frequência com que consumiam alimentos ricos em vitamina D, a concentração de 25(OH)D era mais baixa no grupo dos doentes do que no grupo dos controlos, sendo essa diferença significativa nos indivíduos que raramente consumiam alimentos ricos em vitamina D ($P= 0,032$).

Figura 21 – Concentração sérica de 25(OH)D em função da alimentação



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média \pm desvio padrão. n refere-se ao tamanho da amostra.

Os valores de P apresentados na imagem foram obtidos por aplicação do teste One-way ANOVA ou do teste de Kruskal-Wallis (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de P inferiores a 0,05).

¹**Muito frequente** – 4 vezes por semana ou mais; **Frequente** - 1 a 3 vezes por semana; **Raramente** – menos de 4 vezes por mês.

Concentração sérica de 25(OH)D em função da atividade física

Na Tabela 9 e na

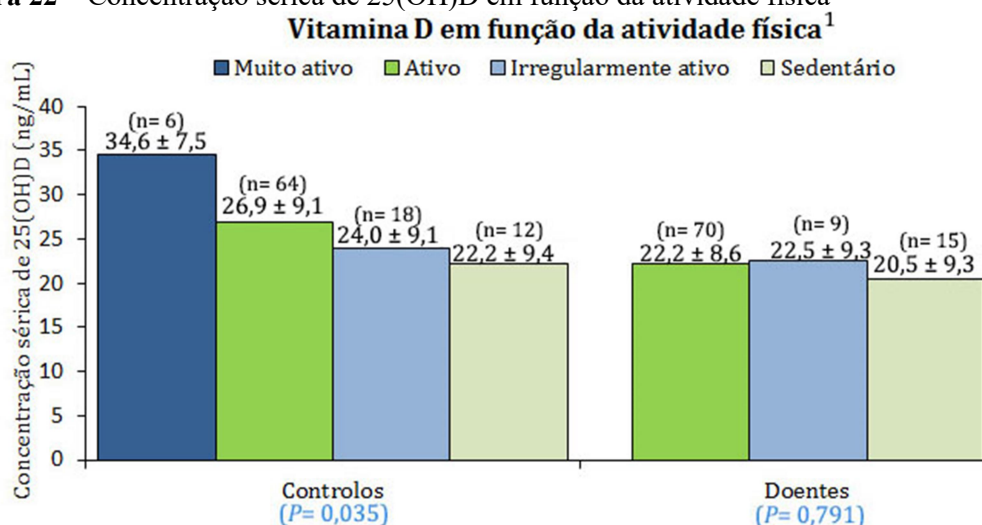
Figura 22, apresenta-se a concentração de 25(OH)D em função do nível de atividade física dos indivíduos.

No grupo dos controlos, foi possível notar que quanto mais intenso era o nível de atividade física, mais elevada era a concentração de 25(OH)D, verificando-se uma diferença significativa entre as quatro categorias ($P= 0,035$).

No grupo dos doentes, apesar de não haver uma diferença tão acentuada e de não ser estatisticamente significativa, os indivíduos sedentários foram os que apresentaram uma concentração de 25(OH)D mais baixa.

Verificou-se que os indivíduos do grupo dos doentes tinham uma concentração mais baixa de 25(OH)D do que os indivíduos do grupo dos controlos quando comparando a mesma categoria de atividade física. Esta diferença mostrou ser estatisticamente significativa nos indivíduos ativos ($P= 0,002$).

Figura 22 – Concentração sérica de 25(OH)D em função da atividade física



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média \pm desvio padrão. n refere-se ao tamanho da amostra

Os valores de P apresentados na imagem foram obtidos por aplicação do teste One-way ANOVA (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de P inferiores a 0,05).

¹**Muito ativo** - atividade vigorosa pelo menos 5 vezes por semana ou atividade vigorosa 3 vezes por semana + atividade moderada pelo menos 5 vezes por semana; **Ativo** - atividade vigorosa pelo menos 3 vezes por semana ou moderada pelo menos 5 vezes por semana; **Irregularmente ativo** - atividade moderada menos do que 3 vezes por semana; **Sedentário** – nenhuma atividade [66].

Concentração sérica de 25(OH)D em função da época do ano, da exposição solar e do tipo de pele

Um dos fatores que condicionam a concentração sérica de 25(OH)D é a época do ano. Para os dois grupos estudados, determinou-se a média da concentração sérica de 25(OH)D dos indivíduos que foram recrutados nos meses de verão e dos indivíduos que foram recrutados nos meses de inverno. Os resultados estão apresentados na Tabela 10 e na Figura 23. Consideraram-se meses de verão os meses de Maio a Outubro por serem os meses com maior exposição solar e com temperaturas mais amenas e os restantes meses (Novembro a Abril) foram considerados meses de inverno.

Além disso, determinou-se a média da concentração sérica de 25(OH)D de acordo com o nível de exposição solar e do tipo de pele dos indivíduos de ambos os grupos.

Tabela 10 - Concentração sérica de 25(OH)D de acordo com a época do ano, a exposição solar e o fototipo de pele

		Controlos (n=100)		Doentes (n=94)	
Época do ano ¹	N	25(OH)D (ng/mL)	N	25(OH)D (ng/mL)	P
Meses de verão	65	28,7 ± 9,4	50	24,6 ± 7,7	0,012
Meses de inverno	35	21,7 ± 7,6	44	19,0 ± 9,0	0,144
Exposição solar ²					
Baixa	18	20,2 ± 7,1	25	17,9 ± 9,6	0,196
Moderada	29	24,7 ± 8,5	28	19,6 ± 6,3	0,017
Elevada	53	29,2 ± 9,4	41	26,0 ± 8,0	0,083
Fototipo de pele ³					
1	4	22,1 ± 8,5	8	21,9 ± 10,2	1,000
2	23	22,9 ± 8,4	19	17,1 ± 8,3	0,027
3	44	28,4 ± 9,6	30	23,8 ± 9,2	0,043
4	20	28,5 ± 8,3	29	23,2 ± 7,9	0,059
5	9	21,5 ± 10,0	8	21,8 ± 6,9	0,963

A concentração sérica de 25(OH)D está apresentada em média ± desvio padrão.

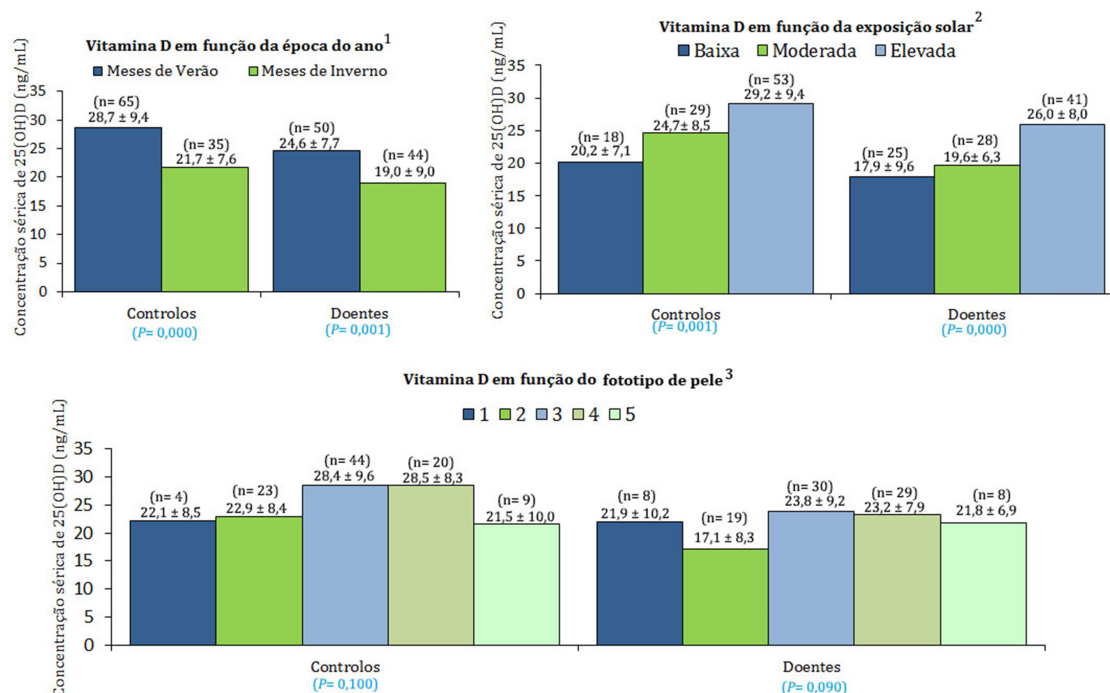
O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste *t* de *Student* ($n \geq 30$) ou do teste de *Mann-Whitney* ($n < 30$) (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

1 - **Meses de verão** (Maio a Outubro); **Meses de inverno** (Novembro a Abril)

2 - **Baixa** – menos de 30 minutos por dia; **Moderada** – de 30 a 60 minutos por dia; **Elevada** – mais de 60 minutos por dia.

3 - Fototipo de pele: **1** – Muito Clara. Queima com frequência. Nunca bronzeia; **2** – Clara. Queima com frequência. Às vezes bronzeia; **3** – Clara média. Às vezes queima. Bronzeia com frequência; **4** – Escura média. Raramente queima. Bronzeia com frequência; **5** – Escura. Raramente queima. Bronzeia bastante.

Figura 23 – Concentração sérica de 25(OH)D em função da época do ano, da exposição solar e do fototipo de pele



Os valores apresentados no topo das colunas referem-se ao valor da média ± desvio padrão. n refere-se ao tamanho da amostra.

Os valores de *P* apresentados na imagem foram obtidos por aplicação do teste One-way ANOVA ou do teste de Kruskal-Wallis (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

1 - **Meses de verão** (Maio a Outubro); **Meses de inverno** (Novembro a Abril)

2 - **Baixa** – menos de 30 minutos por dia; **Moderada** – de 30 a 60 minutos por dia; **Elevada** – mais de 60 minutos por dia.

3 - Fototipo de pele: **1** – Muito Clara. Queima com frequência. Nunca bronzeia; **2** – Clara. Queima com frequência. Às vezes bronzeia; **3** – Clara média. Às vezes queima. Bronzeia com frequência; **4** – Escura média. Raramente queima. Bronzeia com frequência; **5** – Escura. Raramente queima. Bronzeia bastante.

Verificou-se que a concentração sérica de 25(OH)D foi mais elevada nos indivíduos recrutados nos meses de verão do que nos indivíduos recrutados nos meses de inverno, havendo uma diferença significativa tanto no grupo dos controlos (*P*= 0,000) como no grupo dos doentes (*P*= 0,001). Tanto nos indivíduos recrutados nos meses de verão como nos indivíduos recrutados nos meses de inverno, registou-se uma concentração de 25(OH)D mais baixa no grupo dos doentes do que no grupo dos controlos, sendo esta diferença significativa apenas entre os indivíduos recrutados nos meses de verão (*P*= 0,012).

Tanto no grupo dos controlos como no grupo dos doentes verificou-se que, quanto maior o tempo de exposição solar maior era a concentração sérica de 25(OH)D, salientando-se que esta diferença foi significativa tanto no grupo dos controlos

($P=0,001$) como no grupo dos doentes ($P= 0,000$). No entanto e, apesar deste facto, nenhum dos grupos apresentou valores suficientes de 25(OH)D, independentemente do nível de exposição solar. Adicionalmente, verificou-se que os indivíduos do grupo dos doentes apresentavam concentrações mais baixas de 25(OH)D do que os indivíduos do grupo dos controlos com uma exposição solar semelhante, observando-se uma diferença significativa entre os controlos e os doentes que tinham uma exposição solar moderada ($P= 0,017$).

Quanto ao tipo de pele, verificou-se que, em ambos os grupos estudados, o valor da concentração sérica de 25(OH)D era mais elevado nos indivíduos com tipo de pele 3 e 4, e que os indivíduos do grupo dos doentes tinham uma concentração de 25(OH)D mais baixa do que os controlos com o mesmo tipo de pele. A diferença entre os controlos e os doentes com tipo de pele 2 ($P= 0,027$) e 3 ($P= 0,043$) foi significativa.

5.2.5. Testes bioquímicos em função do estado de vitamina D

Perfil lipídico

Compararam-se as concentrações do colesterol total, colesterol das HDL, colesterol das LDL, triglicéridos, APO B e Lp(a) consoante o estado de vitamina D dos indivíduos que constituíram cada um dos grupos estudados e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Verificou-se que, no grupo dos controlos, quanto melhor era o estado de vitamina D mais baixa era a concentração de colesterol total e que, no grupo dos doentes, os indivíduos com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de colesterol total mais alta do que os indivíduos com suficiência de vitamina D. No entanto, em nenhuma das situações se verificou uma diferença estatisticamente significativa.

Relativamente ao colesterol das HDL, verificou-se que, no grupo dos controlos, os indivíduos com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de colesterol das HDL mais baixa do que os indivíduos com níveis suficientes de vitamina D. Contudo, no grupo dos doentes verificou-se o contrário, embora dessa diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Quanto ao colesterol das LDL, os indivíduos com uma concentração de 25(OH)D superior 30 ng/mL apresentaram uma concentração mais baixa de colesterol das LDL do que os indivíduos com deficiência de vitamina D, tanto no grupo dos

controles como no grupo dos doentes, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa em nenhum dos grupos.

Também, nos dois grupos estudados, a concentração de triglicéridos foi mais alta nos indivíduos com deficiência de vitamina D do que os indivíduos com suficiência de vitamina D, apesar de essa diferença não ter sido considerada estatisticamente significativa.

Verificou-se, também, que as mulheres com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de APO B mais alta, tanto no grupo dos controles como no grupo dos doentes, do que aquelas que tinham uma concentração suficiente de 25(OH)D, apesar de não se verificar uma diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos. Quanto aos homens, no grupo dos controles, verificou-se que os que tinham deficiência de vitamina D apresentaram uma concentração mais alta de APO B do que os homens com níveis suficientes de vitamina D. No grupo dos doentes, observou-se um resultado diferente. Os homens com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de APO B mais baixa do que os indivíduos com suficiência de vitamina D. Apesar disso, não se registou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Por último, tanto no grupo dos controles como no grupo dos doentes, verificou-se que a concentração de Lp(a) era mais alta nos indivíduos com suficiência de vitamina D do que nos que tinham deficiência de vitamina D.

Glicose, insulina e HA_{1C}

Também se compararam as concentrações de glicose e de insulina e o valor da HA_{1C} de todos os participantes do estudo, de acordo com o seu estado de vitamina D e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Nos dois grupos estudados, verificou-se que a concentração média de glicose era mais baixa nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D do que nos indivíduos com deficiência de vitamina D. Também se verificou, em ambos os grupos, que a concentração sérica de insulina era mais baixa nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D do que nos indivíduos com deficiência de vitamina D. De forma semelhante, no grupo dos doentes, os indivíduos com níveis adequados de vitamina D tinham um valor de HA_{1C} mais baixo do que os indivíduos com deficiência de vitamina D.

Fibrinogénio, PCRhs e homocisteína

Por último, compararam-se as concentrações séricas de fibrinogénio, PCRhs e de homocisteína de acordo com o estado de vitamina D dos indivíduos e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tanto no grupo dos controlos como no grupo dos doentes, verificou-se que os indivíduos com suficiência de vitamina D apresentavam concentrações mais baixas de fibrinogénio do que os indivíduos com deficiência de vitamina. Embora não se tenha verificado uma diferença estatisticamente significativa, é curioso notar que, nos dois grupos, os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram uma concentração mais baixa de fibrinogénio.

Quanto à PCRhs, no grupo dos doentes verificou-se que o valor de PCRhs era mais alto nos indivíduos com deficiência de vitamina D do que nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D, apesar de não se ter verificado uma diferença estatisticamente significativa. Embora no grupo dos controlos os indivíduos com deficiência de vitamina D apresentassem uma concentração de PCRhs mais baixa do que os indivíduos que tinham níveis suficientes de vitamina D, é de salientar que, à semelhança do que foi observado para o fibrinogénio, os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram uma concentração mais baixa de PCRhs.

No que diz respeito à concentração sérica de homocisteína, obtiveram-se resultados diferentes nos dois grupos estudados. Enquanto no grupo dos controlos, os indivíduos com suficiência de vitamina D apresentaram concentrações de homocisteína mais baixas do que os indivíduos com deficiência de vitamina, no grupo dos doentes ocorreu o contrário, ou seja, os indivíduos com suficiência de vitamina D apresentaram concentrações de homocisteína mais altas do que os indivíduos com deficiência de vitamina D. Além disso, enquanto no grupo dos controlos os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram uma concentração mais alta de homocisteína, no grupo dos doentes os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram uma concentração de homocisteína mais baixa. Apesar disso, não se registou uma diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos.

Tabela 11 - Testes bioquímicos em função do estado de vitamina D dos indivíduos

	Controlos (n=100)				Doentes (n=94)			
	Deficiência (n= 28)	Insuficiência (n= 31)	Suficiência (n= 41)	<i>P</i>	Deficiência (n= 44)	Insuficiência (n= 34)	Suficiência (n= 16)	<i>P</i>
Colesterol Total <200 (mg/dL)	222,2 ± 44,0	220,7 ± 39,6	211,5 ± 35,4	0,461	194,6 ± 50,5	181,2 ± 47,4	186,5 ± 36,3	0,684
Colesterol HDL <40 (mg/dL)	52,8 ± 11,9	51,2 ± 9,7	54,7 ± 16,3	0,844	46,0 ± 11,6	47,8 ± 12,5	43,50 ± 7,7	0,461
Colesterol LDL <130 (mg/dL)	140,6 ± 38,2	142,1 ± 34,9	134,8 ± 29,3	0,625	118,1 ± 46,0	106,5 ± 35,7	117,1 ± 32,1	0,565
Triglicéridos <150 (mg/dL)	159,4 ± 120,6	147,7 ± 108,1	110,1 ± 35,9	0,227	181,7 ± 152,6	154,6 ± 110,2	129,5 ± 56,3	0,130
APO B Mulher: 55 - 130 (mg/dL)	137,5 ± 32,5	126,5 ± 36,4	104,1 ± 5,3	0,354	110,4 ± 29,9	104,6 ± 30,6	103,7 ± 19,7	0,870
Homem: 60 - 140 (mg/dL)	124,5 ± 35,6	127,1 ± 30,8	111,9 ± 2,4	0,130	108,1 ± 29,1	101,5 ± 25,7	116,8 ± 27,6	0,350
Lp(a) <30 mg/dL	29,1 ± 26,7	34,2 ± 40,7	32,2 ± 38,6	0,864	43,9 ± 50,1	46,2 ± 43,9	51,3 ± 47,6	0,520
Glicose 74 - 106 (mg/dL)	96,3 ± 11,2	95,6 ± 9,5	94,5 ± 10,6	0,830	142,9 ± 63,0	119,5 ± 50,6	114,9 ± 39,5	0,050
Insulina 1,9 - 2,3 (μUI/mL)	6,6 ± 2,9	5,6 ± 2,7	5,7 ± 5,4	0,034	11,8 ± 14,4	7,2 ± 4,3	9,2 ± 5,1	0,167
HA1C 4,0 - 6,0 %	5,3 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,3 ± 0,4	0,473	7,1 ± 1,9	6,3 ± 1,7	6,0 ± 1,5	0,009
Fibrinogénio 238-498 mg/dL	385,8 ± 76,4	368,7 ± 90,0	379,8 ± 91,3	0,850	434,0 ± 92,9	390,2 ± 77,1	410,2 ± 89,2	0,075
PCRhs <1 mg/dL	0,26 ± 0,36	0,23 ± 0,24	0,29 ± 0,43	0,662	0,81 ± 1,64	0,22 ± 0,20	0,41 ± 0,48	0,059
HCY 5,0-15 μmol/L	12,3 ± 3,8	13,3 ± 4,7	11,1 ± 2,7	0,086	12,8 ± 2,8	12,5 ± 3,6	14,2 ± 6,7	0,760

Os resultados estão apresentados em média ± desvio padrão.

O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste de Kruskal-Wallis, (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

5.2.6. Concentração sérica de 25(OH)D em função de todos os fatores estudados

O facto de se testar cada uma das variáveis independentes, separadamente, em função da variável resposta, pode introduzir um viés no estudo. Após os testes estatísticos já apresentados, foi feita uma Análise de Variância Dupla em que a variável resposta era a vitamina D e as variáveis independentes, os Controlos, os Doentes e o Sexo, a fim de se verificar se existia interação. Verificou-se que não existia interação e o Sexo deu significativo. A partir daqui foi possível juntar Controlos e Doentes no estudo. Foi, então, feita a análise simultânea de todas as variáveis estudadas através da aplicação de uma Regressão Logística para determinar possíveis fatores de risco (*odds ratio* e respetivos intervalos de confiança a 95%). A variável que mais influenciou a concentração sérica de 25(OH)D foi a altura dos indivíduos ($P=0,033$).

5.2.7. Concentração de 25(OH)D por eletroquimioluminescência e por imunoquimioluminescência.

No presente trabalho, 70 das 194 amostras foram testadas por dois testes de duas casas comerciais diferentes, com o objetivo de comparar um novo método de imunoquimioluminescência com o método existente de eletroquimioluminescência. Estas amostras foram testadas pelo teste *Vitamin D Total* da Roche, que é um imunoensaio por eletroquimioluminescência e pelo teste *Vitamin D Total* da Beckman Coulter, que é um imunoensaio quimioluminescente. Os resultados desta comparação estão representados na Tabela 12.

Ao analisar os dados, verificou-se que a concentração média de 25(OH)D nessas 70 amostras era ligeiramente diferente mas essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($P=0,099$).

Tabela 12 - Concentração de 25(OH)D por eletroquimioluminescência e por imunoquimioluminescência

	Eletroquimioluminescência (n= 70)	Imunoquimioluminescência (n=70)	P
25(OH)D (ng/mL)	19,7 ± 9,1	21,8 ± 6,0	0,099

A concentração sérica de 25(OH)D está apresentada em média ± desvio padrão.

O valor de *P* foi obtido por aplicação do teste *t* de *Student* (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

6. DISCUSSÃO

Tendo em conta os vários estudos já realizados e que referem a importância da vitamina D na saúde cardiovascular, o primeiro objetivo deste trabalho foi verificar se havia alguma relação entre a deficiência de vitamina D e a doença cardiovascular, numa amostra da população da ilha da Madeira.

Para isso, estudaram-se 194 indivíduos divididos em dois grupos (100 indivíduos saudáveis e 94 indivíduos com doença cardiovascular) e verificou-se que os indivíduos saudáveis tinham uma concentração sérica de 25(OH)D mais alta ($26,3 \pm 9,4$ ng/mL) do que os indivíduos com doença cardiovascular ($21,9 \pm 8,7$ ng/mL), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P = 0,001$). Para além disso, verificou-se que a deficiência de vitamina D era uma condição mais frequente nos indivíduos com doença coronária (46,8%) do que nos indivíduos saudáveis (28,0%). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos em alguns estudos. Efetivamente, Pittas A. et al.^[71] verificaram que as concentrações mais baixas de 25(OH)D estavam associadas ao aumento do risco cardiovascular. Além disso, a deficiência de vitamina D foi considerada um fator de risco independente para mortalidade por doenças cardiovasculares em populações sem doença cardiovascular prévia^[5] e, no *The Framingham Offspring Study*^[29] estabeleceu-se uma associação entre as baixas concentrações de 25(OH)D e o aumento do risco de eventos cardiovasculares em geral. Também no *The Health Professionals Follow-up study*^[30] estabeleceu-se uma relação entre as concentrações mais baixas de 25(OH)D e um maior risco de EAM. Adicionalmente, a concentração de vitamina D parece, também, permitir prever o risco de eventos adversos, após um EAM ou uma cirurgia cardíaca, havendo um maior risco nos pacientes com concentrações de 25(OH)D mais baixas^[47].

Já foi também sugerido que, em vez de ser uma causa direta da doença cardiovascular, a deficiência de vitamina D poderá constituir um fator de risco indireto, ao atuar sobre marcadores inflamatórios e levando a efeitos fatais^[72].

Assim, até ao momento, não foi possível estabelecer uma relação causa-efeito entre a deficiência de vitamina D e as DCV e, alguns estudos até sugerem que a deficiência de vitamina D possa ser resultado de um estilo de vida pouco saudável^[5, 6, 7].

Neste trabalho, além de ser ter verificado existir uma diferença estatisticamente significativa, entre a concentração de 25(OH)D dos indivíduos saudáveis e dos doentes cardiovasculares, também se verificou haver diferença entre a concentração de

25(OH)D de homens e mulheres. No grupo dos doentes, a diferença na concentração de 25(OH)D entre homens ($23,2 \pm 7,9$ ng/mL) e mulheres ($19,2 \pm 9,8$ ng/mL) mostrou significância estatística ($P= 0,021$). No grupo dos controlos também se verificou haver uma diferença na concentração de 25(OH)D entre homens ($26,9 \pm 9,1$ ng/mL) e mulheres ($20,8 \pm 9,7$ ng/mL), embora essa diferença não tenha mostrado significância estatística ($P= 0,067$). Apesar de não haver muitos estudos sobre o assunto, alguns trabalhos sugerem que esta diferença efetivamente existe e que merece ser estudada ^[73,74]. Um estudo publicado em 2015, que pretendia avaliar a diferença da concentração de 25(OH)D entre homens e mulheres e o seu impacto na extensão da doença coronária, concluiu que o sexo feminino estava relacionado com uma deficiência de vitamina D mais severa e que a deficiência de vitamina D está associada a uma forma mais agressiva da doença coronária nas mulheres do que nos homens ^[74]. Uma vez que a vitamina D pode modificar a concentração de algumas hormonas sexuais, é natural que existam diferenças na concentração de 25(OH)D entre géneros ^[73]. Além disso, as mulheres apresentam uma maior percentagem de massa gorda e uma maior quantidade de gordura subcutânea. Sendo a vitamina D uma vitamina lipossolúvel, este fator deverá contribuir para um maior armazenamento de vitamina D no tecido adiposo nas mulheres do que nos homens ^[73]. No entanto, uma grande parte dos estudos não considera existir diferenças entre sexos, no que diz respeito à concentração plasmática de vitamina D.

Uma possível justificação para a diferença encontrada na concentração de 25(OH)D entre controlos e doentes poderá ter sido a diferente proporção de homens e de mulheres nos dois grupos (controlos e doentes). Para verificar esta possível diferença, foi aplicado o teste de homogeneidade do Qui-Quadrado, o qual demonstrou que existiam diferenças significativas naquela proporção. Neste trabalho em particular, também podemos apresentar a idade como uma possível justificação para a diferença encontrada entre a concentração de 25(OH)D dos homens e das mulheres. Atendendo à média de idades dos indivíduos que participaram no estudo, é possível constatar que, no grupo dos controlos, as mulheres eram mais velhas ($61 \pm 4,1$) que os homens ($53 \pm 7,1$). Da mesma forma, no grupo dos doentes, as mulheres também tinham uma idade superior ($60 \pm 8,0$) do que os homens ($56 \pm 8,8$). Sabe-se que a idade constitui um fator importante na síntese cutânea de vitamina D pois, com o aumento da idade, a síntese de vitamina D tende a diminuir por duas razões principais que são o espessamento da pele e a diminuição das reservas de 7-dehidrocolesterol ^[15, 27].

Além de fatores como o género e a idade, é necessário ter em conta alguns aspetos que poderiam influenciar os resultados, tais como a obesidade, o tabagismo e o sedentarismo ^[5, 6, 7]. Para evitar esses fatores de confusão, avaliou-se a população quanto à existência de comorbilidades e avaliou-se o estilo de vida da população quanto ao tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, consumo de alimentos ricos em vitamina D e nível de atividade física. Além disso, registou-se o nível de exposição solar e o fototipo de pele dos participantes.

Vitamina D e comorbilidades

Seguindo as orientações da Organização Mundial de Saúde, foram considerados obesos os indivíduos com um IMC superior a 30 kg/m². Assim, foram considerados obesos 12 indivíduos (12,0%) no grupo dos controlos e 29 indivíduos (30,9%) no grupo dos doentes.

Relativamente à concentração de 25(OH)D, verificou-se que esta era mais baixa nos indivíduos obesos, tanto no grupo dos controlos (23,2±6,3 ng/mL) como no grupo dos doentes (20,4±9,3 ng/mL) do que nos indivíduos sem obesidade (26,7±9,7 ng/mL e 22,6±8,4 ng/mL) controlos e doentes, respetivamente. Este resultado está de acordo com a literatura pois, sendo a vitamina D uma vitamina lipossolúvel, tende a ficar armazenada no tecido adiposo. Assim, nos indivíduos obesos podemos afirmar que há um maior sequestro de vitamina D pelo tecido adiposo e, consequentemente, estes indivíduos apresentam concentrações séricas de 25(OH)D mais baixas ^[16].

No entanto, o estado de vitamina D não parece influenciar o IMC, ou seja, até ao momento parece ser a obesidade a responsável pelas baixas concentrações de 25(OH)D e não a deficiência de vitamina D a responsável pelo desenvolvimento da obesidade. Por outras palavras, a obesidade parece levar à deficiência de vitamina D mas a deficiência de vitamina D não parece levar à obesidade. Além disso, aumentar a concentração de 25(OH)D não parece reverter a obesidade ^[75].

No grupo dos doentes 29,8% dos indivíduos foram considerados diabéticos por apresentarem, em jejum, valores de glicémia superiores a 126 mg/dL e/ou tomarem antidiabéticos orais ou administrarem insulina. Apesar de não existirem indivíduos diabéticos no grupo dos controlos, no grupo dos doentes foi possível comparar a concentração sérica de 25(OH)D entre indivíduos diabéticos (18,4±9,4 ng/mL) e não diabéticos (23,5±8,1 ng/mL), observando-se um valor significativamente mais alto nos indivíduos não diabéticos ($P= 0,005$). Estes resultados vão de encontro aos resultados

obtidos em outros estudos. Uma metanálise realizada em 2015 que incluiu 23 estudos, dos quais 11 avaliaram crianças e adolescentes e 12 foram realizados com adultos^[76], permitiu concluir que a concentração de 25(OH)D era significativamente mais baixa em indivíduos com DM tipo 1 do que em indivíduos sem DM. Também em 2015, Serra-Planas E. et al^[77] avaliaram a relação entre a concentração de 25(OH)D e a presença de aterosclerose precoce, em indivíduos com DM tipo 1. Concluíram que os indivíduos diabéticos tinham concentrações mais baixas de 25(OH)D e registavam o dobro da prevalência de deficiência de vitamina D, relativamente aos indivíduos sem DM. Estudos anteriores já tinham permitido verificar que existe uma grande incidência de deficiência de vitamina D, não só em indivíduos com DM tipo 1 mas, também, em indivíduos com DM tipo 2^[78, 79].

A ligação entre a deficiência de vitamina D e a DM parece estar relacionada com o papel que a vitamina D exerce sobre a insulina. No presente trabalho, apesar de não existirem indivíduos diabéticos no grupo dos controlos, considerou-se que 16,0% dos controlos e 39,4% dos indivíduos que constituíram o grupo dos doentes, apresentavam resistência à insulina de acordo com os respetivos valores de HOMA. Tanto no grupo dos controlos, como no grupo dos doentes, verificou-se que a concentração sérica de 25(OH)D era mais elevada nos indivíduos que não apresentavam resistência à insulina ($27,1 \pm 9,3$ ng/mL e $22,5 \pm 7,8$ ng/mL) do que nos indivíduos com resistência à insulina ($22,2 \pm 8,7$ ng/mL e $21,1 \pm 10,1$ ng/mL) controlos e doentes, respetivamente. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa em nenhum dos grupos. Resultados semelhantes foram observados em 2013, num estudo que envolveu adolescentes coreanos e no qual se verificou uma relação inversa entre o estado de vitamina D e a resistência à insulina^[80].

Em suma, manter uma concentração sérica de 25(OH)D em níveis adequados poderá ser uma boa medida preventiva da DM, uma vez que, em adultos saudáveis, parece haver uma relação inversa entre a concentração de 25(OH)D e o risco de desenvolver DM tipo 2^[81]. Além disso, também se verificou uma correlação negativa entre a 25(OH)D e a HA_{1C} , ao comparar indivíduos diabéticos com indivíduos não diabéticos^[82]. Por último, manter uma concentração adequada de 25(OH)D na infância parece reduzir o risco de desenvolver DM, através de um efeito imune protetor^[61]. Os mecanismos por detrás deste papel protetor da vitamina D incluem a existência de VDR nas células β -pancreáticas, que influenciam a secreção e a sensibilidade à insulina, e o

efeito da vitamina D no metabolismo do cálcio, que é necessário para a secreção adequada de insulina ^[83, 75].

No grupo dos controlos, tanto a PAS (126,9±7,7 mmHg) como a PAD (77,8±6,1 mmHg) foi mais baixa do que no grupo dos doentes, no qual se registou uma PAS de 136,3±19,8 mmHg e uma PAD de 79,8±10,2 mmHg. Enquanto no grupo dos controlos não existiam indivíduos hipertensos, no grupo dos doentes 90,40% dos indivíduos foram considerados hipertensos. Isto porque, aplicando as recomendações da Organização Mundial de Saúde, foram considerados hipertensos todos os indivíduos com uma PAS \geq 140mmHg e/ou uma PAD \geq 90mmHg e/ou que tomavam medicação anti-hipertensiva.

Ao contrário do esperado, no grupo dos doentes, os indivíduos com HTA apresentaram valores mais altos de 25(OH)D (22,1±8,9 ng/mL) do que os indivíduos sem HTA (20,0±6,7 ng/mL). No entanto, é importante salientar que este resultado poderá estar condicionado pelo facto de serem muito poucos os indivíduos sem HTA (apenas 9 indivíduos), no grupo dos doentes. Era de esperar que os indivíduos hipertensos tivessem uma concentração de 25(OH)D mais baixa do que os indivíduos sem HTA pois, segundo a revisão feita por Vaidya A. et al^[84], a maioria dos estudos observacionais sugere que concentrações mais baixas de 25(OH)D estão associadas a valores de pressão arterial mais elevados e a um maior risco de desenvolver HTA. Concentrações mais baixas de 25(OH)D têm sido, também, relacionadas com uma maior prevalência de HTA e uma PAD mais elevada ^[85, 57]. Além disso, estudos experimentais em animais sugerem que a vitamina D está relacionada com a pressão arterial, inibindo o SRAA ^[52, 56]. Também em humanos já foi provado que, tanto a 25(OH)D como a 1,25(OH)₂D, estão inversamente relacionadas com a concentração de renina e de angiotensina II e, portanto, exercem um efeito modulador sobre o SRAA ^[58].

Um artigo de revisão publicado em 2015 por Mozos I. et al^[83] refere que alguns ensaios clínicos já demonstraram uma relação inversa de dose-resposta entre a concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ e o valor da pressão arterial, tanto em indivíduos com HTA, como em indivíduos com pressão arterial normal. No entanto, o mesmo artigo refere alguns estudos nos quais não se conseguiu comprovar que a suplementação com vitamina D pudesse baixar a pressão arterial. Segundo os autores desse trabalho^[83], fatores como a dose de vitamina D administrada e a duração do tratamento poderão ser aspetos importantes que se refletem nessa discrepância de resultados.

O efeito anti-hipertensivo da vitamina D inclui a supressão do SRAA, o seu efeito anti-inflamatório, o efeito direto nas células endoteliais e no metabolismo do cálcio e, ainda, o seu papel na prevenção do hiperparatiroidismo ^[83].

Vitamina D e o estilo de vida

A maioria dos indivíduos de ambos os grupos estudados (controles e doentes) foi considerada não fumador. A maior diferença observada entre os dois grupos foi a percentagem de indivíduos ex-fumadores. Enquanto no grupo dos controles apenas 3,0% dos indivíduos eram ex-fumadores, essa percentagem era bem superior no grupo dos doentes (29,8%). Neste último grupo, a maioria dos entrevistados que referiram ser ex-fumadores, deixaram de fumar quando lhes foi feito o diagnóstico de DCV.

O tabagismo também parece influenciar a concentração de 25(OH)D. Os resultados obtidos permitiram verificar que os fumadores têm uma concentração mais baixa de 25(OH)D do que os ex-fumadores e não fumadores. Uma possível justificação para este resultado poderá ser o envelhecimento da pele provocado pelo tabagismo e que poderá levar à redução da capacidade de síntese cutânea de vitamina D ^[73].

No grupo dos controles houve mais indivíduos que referiram consumir bebidas alcoólicas (76,0%) do que no grupo dos doentes (39,4%), provavelmente, porque no grupo de doentes os indivíduos tomam medicação de forma crónica. De qualquer forma, os que admitiram consumir bebidas alcoólicas faziam-no com moderação e, principalmente, à refeição.

Curiosamente, verificou-se que o valor da concentração sérica de 25(OH)D era mais elevada nos indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas frequentemente do que naqueles que não consumiam bebidas alcoólicas, tanto no grupo dos controles, como no grupo dos doentes. A informação sobre esta relação é escassa, no entanto, um resultado semelhante foi descrito por McCullough M. et al^[86], quando verificaram existir uma associação positiva entre a concentração de 25(OH)D e o consumo de álcool. Contudo, a razão para essa associação continua por esclarecer.

Quanto à alimentação, foi possível verificar que o consumo de alimentos ricos em vitamina D era um hábito mais frequente no grupo dos controles do que no grupo dos doentes. Apesar de existirem poucos indivíduos que consumiam alimentos ricos em vitamina D com uma frequência superior a 3 vezes por semana (apenas 4 em cada grupo), foi possível verificar que no grupo dos controles existiam mais indivíduos que consumiam alimentos ricos em vitamina D entre 1 a 3 vezes por semana (67,0%) do que

no grupo dos doentes (52,1%). Por último, enquanto no grupo dos controlos, 29 indivíduos (29,0%) raramente consumiam alimentos ricos em vitamina D, no grupo dos doentes essa percentagem era superior, havendo 41 indivíduos (43,6%) que raramente consumiam alimentos ricos nesta vitamina.

Apesar dos resultados deste trabalho permitirem verificar que a concentração sérica de 25(OH)D era mais alta nos indivíduos que consumiam alimentos ricos em vitamina D, pelo menos uma vez por semana, do que naqueles que raramente consumiam alimentos ricos em vitamina D, essa diferença não foi significativa em nenhum dos grupos. Isto pode ser justificado com o facto de serem poucos os alimentos ricos em vitamina D, destacando-se o salmão, a sardinha, o atum, os ovos e o fígado de vaca, pelo que a nossa alimentação pouco fornece esta vitamina e, consequentemente, a concentração sérica de 25(OH)D pouco depende da ingestão de alimentos ricos em vitamina D ^[11,12].

Não sendo possível obter níveis suficientes de vitamina D através da alimentação, os níveis séricos desta vitamina dependem essencialmente da sua síntese cutânea que, como já foi referido, é a principal fonte de vitamina D ^[11, 12].

Relativamente à atividade física, não se observaram grandes diferenças entre o grupo de controlos e o grupo de doentes. A percentagem de sedentarismo não diferiu muito entre os grupos. No grupo dos controlos 12,0% dos indivíduos foram considerados sedentários e no grupo dos doentes, 15,9%. No grupo dos doentes foi possível verificar que, dentro do possível, estes indivíduos tentaram adotar um estilo de vida mais saudável, após terem tido o EAM ou terem feito o cateterismo. No entanto, é de salientar que no grupo dos doentes nenhum indivíduo foi considerado muito ativo, possivelmente devido às limitações físicas que adquiriram após a doença.

Ao avaliar a concentração de 25(OH)D em função do nível de atividade física, foi possível notar que, no grupo dos controlos, quanto mais elevado era o nível de intensidade física, mais elevada era a concentração de 25(OH)D. Esta diferença foi significativa ($P= 0,035$). Também, no grupo dos doentes foi possível verificar que os indivíduos com alguma atividade física tinham uma concentração sérica de 25(OH)D mais elevada do que os indivíduos sedentários, embora essa diferença não fosse significativa ($P=0,791$). Verificou-se ainda, que os indivíduos do grupo dos doentes tinham uma concentração mais baixa de 25(OH)D, do que os indivíduos do grupo dos controlos com o mesmo nível de atividade física, sendo esta diferença estatisticamente significativa nos indivíduos ativos ($P= 0,002$).

A relação entre o nível de atividade física e a concentração sérica de 25(OH)D já foi descrita anteriormente, verificando-se que os indivíduos mais ativos tendem a ter uma concentração sérica de 25(OH)D mais alta ^[86]. Embora se observem concentrações de 25(OH)D mais altas quando a atividade física é praticada no exterior, a prática de atividade física no interior também resulta no aumento da concentração sérica de 25(OH)D. Já se verificou que esta relação positiva, entre a atividade física e a concentração sérica de 25(OH)D, não era mais forte nos indivíduos que praticavam atividade física no exterior do que nos que o faziam no interior ^[87]. Isto leva a pensar que a atividade física poderá exercer algum efeito na concentração de 25(OH)D, independentemente do nível de exposição solar.

Adicionalmente, já foram reportadas concentrações elevadas de metabolitos da vitamina D em atletas. Pensa-se que isso se deve a algumas alterações que ocorrem durante a prática de exercício, como por exemplo a diminuição do cálcio sérico, que poderão estimular a secreção de PTH e, conseqüentemente, estimular a produção renal de 1,25(OH)₂D ^[88].

Quanto à exposição solar verificou-se que, embora em ambos os grupos estudados, a maioria dos indivíduos apresentasse uma exposição solar de mais de 60 minutos por dia, esta percentagem foi mais baixa no grupo dos doentes (43,6%) do que no grupo dos controlos (53,0%). Além disso, existiam mais indivíduos com uma exposição solar inferior a 30 minutos no grupo dos doentes (26,6%) do que no grupo dos controlos (18,0%).

Um dos objetivos deste trabalho foi realizar um estudo preliminar para verificar se existia deficiência de vitamina D na população madeirense. A síntese cutânea de vitamina D depende da exposição aos raios UV-B e, como tal, depende de fatores como a latitude, a nebulosidade, a poluição, as estações do ano, a hora do dia, o tipo de vestuário e o uso de protetor solar ^[16, 26]. Em latitudes acima dos 37°N e abaixo dos 37°S, a intensidade dos UV-B não é suficiente para permitir a síntese de vitamina D durante os meses de Novembro a Março ^[8,9]. Estando a ilha da Madeira posicionada a uma latitude entre 32° e 33°N, é de esperar que não haja diferenças na síntese de vitamina D entre os meses de inverno e os meses de verão. Além disso, esta é uma região com um clima e uma temperatura agradáveis durante quase todo o ano, favorecendo a prática de atividades ao ar livre e, desta forma, promovendo uma exposição solar mais prolongada.

Assim, seria de esperar que os indivíduos saudáveis apresentassem uma concentração suficiente de 25(OH)D, mas tal não se verificou. No grupo dos controlos, constituído por indivíduos saudáveis, a concentração média de 25(OH)D foi de $26,3 \pm 9,4$ ng/mL. Além disso, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração de 25(OH)D dos indivíduos recrutados nos meses de inverno e os indivíduos recrutados nos meses de verão ($P= 0,000$), ao contrário do que seria de esperar dada a posição geográfica da ilha.

Quanto ao tempo de exposição solar, também se verificou uma diferença estatisticamente significativa na concentração de 25(OH)D. Os indivíduos que estiveram expostos ao sol mais de 60 minutos por dia tinham uma concentração sérica de 25(OH)D mais alta ($29,2 \pm 9,4$ ng/mL nos controlos e $26,0 \pm 8,0$ ng/mL nos doentes) embora, mesmo assim, esse valor não fosse considerado suficiente. No entanto, é importante referir que existem outros fatores que poderão influenciar a concentração de 25(OH)D além do nível de exposição solar, tais como, o tipo de pele e a idade dos indivíduos. Além disso, como referido por Papandreou D. et al^[72], uma exposição solar prolongada leva à fotodegradação da vitamina D, para evitar toxicidade.

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos resultados obtidos em outros trabalhos realizados em Portugal. Até ao momento não existem publicações de estudos epidemiológicos, para avaliar a prevalência da deficiência de vitamina D em Portugal mas, não é de esperar que os resultados difiram muito daqueles obtidos em outros países europeus^[89]. Um estudo realizado entre Abril e Maio de 2004, que avaliou a concentração sérica de 25(OH)D em doentes internados no Serviço de Medicina Interna dos Hospitais da Universidade de Coimbra, verificou que 92,7% dos indivíduos avaliados tinham deficiência de vitamina D. No entanto, este estudo teve a duração de apenas dois meses, não permitindo avaliar a variabilidade sazonal da concentração sérica de 25(OH)D. Além disso, apenas foram avaliados doentes idosos, internados, com comorbilidades associadas e, consequentemente, que tomavam medicação de forma crónica^[90].

Outro estudo, realizado entre Junho e Outubro de 2009, no Hospital de São João, no Porto^[91], detetou existir deficiência de vitamina D em 28,6% dos indivíduos, insuficiência em 45,2% e suficiência em apenas 26,2% dos indivíduos estudados. Ao contrário de outros estudos realizados em Portugal, estes indivíduos não estavam internados e o estudo decorreu nos meses de verão, pelo que se esperavam valores de

25(OH)D mais elevados. No entanto, a concentração média de 25(OH)D na população estudada foi de 25,6 ng/mL.

Mais recentemente, entre Setembro e Dezembro de 2010, foi realizado um estudo que avaliou a concentração sérica de 2071 indivíduos internados nos Hospitais da Universidade de Coimbra^[92]. Verificou-se existir deficiência de vitamina D em 65% dos indivíduos estudados. No entanto, dado o curto espaço de tempo do estudo, mais uma vez não foi possível avaliar a variabilidade sazonal da concentração de 25(OH)D.

Um outro estudo observacional semelhante foi desenvolvido entre Junho de 2012 e Novembro de 2014, no Hospital de Braga. Também neste estudo se verificou uma deficiência de vitamina D em 60% dos indivíduos estudados^[93]. No entanto, esta elevada prevalência de deficiência de vitamina D poderá dever-se ao facto desta avaliação ter sido feita em contexto de internamento e na presença de doença ativa, com consequente toma de medicação.

Nos quatro artigos acima referidos^[90, 91, 92, 93], apenas um deles^[90] forneceu informação relativa à exposição solar dos participantes. No entanto, em nenhum deles se obteve informação relativamente ao estilo de vida dos indivíduos, nomeadamente, ao nível de atividade física e aos hábitos alimentares no que diz respeito a alimentos ricos em vitamina D. O tipo de pele dos indivíduos também não foi registado em nenhum destes estudos. Estes seriam dados importantes e que deveriam ser tidos em conta, no contexto da avaliação do estado de vitamina D dos indivíduos. É, também, de salientar que os estudos anteriormente referidos^[90, 91, 92, 93] foram realizados em cidades portuguesas que se situam acima dos 37°N.

Dada a posição geográfica da Madeira, no presente estudo eram esperadas concentrações de 25(OH)D mais elevadas. No entanto, em relação a diferenças de latitude, vários estudos revelaram que, ao contrário do esperado, a 25(OH)D é mais alta no norte da Europa do que no sul. Esse facto poderá dever-se à uma maior procura de exposição solar, a um tipo de pele mais clara e a uma maior taxa do uso de suplementos de vitamina D e da fortificação de alimentos no norte da Europa, enquanto um comportamento de procura de sombra e uma pele mais escura são fatores mais comuns nos países mediterrânicos^[94].

Outro fator importante na produção de vitamina D é a pigmentação da pele. No presente trabalho verificou-se que, quanto ao tom de pele, a maioria dos participantes, de ambos os grupos, apresentava o fototipo 3, seguido dos fototipos 2 e 4. Ao comparar

os valores da concentração sérica de 25(OH)D nos diferentes fototipos, verificou-se que, em nenhum deles, se obteve um valor considerado suficiente.

Num indivíduo de pele escura, a produção cutânea de vitamina D pode estar reduzida cerca de 99,9%. Os indivíduos com fototipos de pele mais claros, apesar de precisarem de menos tempo de exposição solar para produzir a mesma quantidade de vitamina D do que os indivíduos com tom de pele mais escura, são possivelmente aqueles que passam menor quantidade de tempo expostos ao sol, pelo risco de escaldões [16].

Testes bioquímicos em função do estado de vitamina D

Vitamina D e o perfil lipídico

Curiosamente e, ao contrário do que seria de esperar, o grupo dos controlos apresentou uma concentração média de colesterol total mais alta ($218,3 \pm 39,5$ mg/dL) do que o grupo dos doentes ($188,4 \pm 47,2$ mg/dL). No entanto, no grupo dos doentes havia uma maior percentagem de indivíduos que tomava estatinas (70,2%) do que no grupo dos controlos (8,0%), sendo esta a possível justificação para este resultado.

Uma das hipóteses que parece suportar a importância da vitamina D, nas doenças cardiovasculares, é a relação da 25(OH)D com o perfil lipídico. Apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas, obtiveram-se valores de colesterol total mais baixos nos indivíduos com uma concentração de 25(OH)D superior a 30 ng/mL ($211,5 \pm 35,4$ mg/dL no grupo dos controlos e $186,5 \pm 36,3$ mg/dL no grupo dos doentes) do que nos indivíduos com deficiência de vitamina D ($222,2 \pm 44,0$ mg/dL no grupo dos controlos e $194,6 \pm 50,5$ mg/dL no grupo dos doentes). Quanto ao colesterol das HDL, verificou-se que, no grupo dos controlos, os indivíduos com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de colesterol das HDL mais baixa ($52,8 \pm 11,9$ mg/dL) do que os indivíduos com níveis suficientes de vitamina D ($54,7 \pm 16,3$ mg/dL). No entanto, no grupo dos doentes observou-se o contrário, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa ($P = 0,461$). Este resultado, no grupo dos doentes, poderá dever-se ao facto deste grupo apenas apresentar 16 indivíduos com suficiência de vitamina D. Adicionalmente, os indivíduos com uma concentração de 25(OH)D superior a 30 ng/mL apresentavam uma concentração mais baixa de colesterol das LDL ($134,8 \pm 29,3$ mg/dL no grupo dos controlos e $117,1 \pm 32,1$ mg/dL no grupo dos doentes), do que os indivíduos com deficiência de vitamina D ($140,6 \pm 38,2$ mg/dL no grupo dos controlos e $118,1 \pm 46,0$ mg/dL no grupo dos doentes). Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa em nenhum dos grupos.

Também a concentração de triglicéridos foi mais alta nos indivíduos com deficiência de vitamina D ($159,4 \pm 120,6$ mg/dL no grupo dos controles e $181,7 \pm 152,6$ no grupo dos doentes) do que nos indivíduos com suficiência de vitamina D ($110,1 \pm 35,9$ mg/dL no grupo dos controles e $129,5 \pm 56,3$ mg/dL no grupo dos doentes), embora essa diferença não tenha sido considerada estatisticamente significativa. Resultados semelhantes já tinham sido observados num outro trabalho [95], no qual se verificou que os indivíduos com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de colesterol total mais elevada do que os restantes. Além disso, quanto melhor o estado de vitamina D, mais elevada era a concentração de colesterol das HDL e mais baixa era a concentração de colesterol das LDL e dos triglicéridos.

O mecanismo responsável pela relação entre a vitamina D e o colesterol ainda não se encontra bem esclarecido mas poderá estar relacionado com o fotometabolismo. Na presença da luz solar, o esqualeno presente na pele é convertido a 7-dehidrocolesterol e vitamina D, enquanto na ausência de luz solar, é metabolizado de forma a dar origem ao colesterol [96]. Além disso, pensa-se que a absorção intestinal de cálcio possa constituir um mecanismo para as concentrações mais baixas de triglicéridos nos indivíduos com concentrações suficientes de 25(OH)D. Sabe-se que a vitamina D aumenta a concentração sérica de cálcio ao promover a sua absorção intestinal e esse cálcio pode depois diminuir a concentração sérica de triglicéridos através da redução da formação e secreção de triglicéridos pelo fígado [95].

Parece, também, haver uma relação entre a vitamina D e a concentração de APO B. A vitamina D parece estar inversamente relacionada com a concentração de APO B, verificando-se que quanto mais severa é a deficiência de vitamina D, mais alta é a concentração de APO B [97]. No presente trabalho, verificou-se que as mulheres com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de APO B mais alta, tanto no grupo dos controles ($137,5 \pm 32,5$ mg/dL) como no grupo dos doentes ($110,4 \pm 29,9$ mg/dL), do que aquelas que tinham uma concentração suficiente de 25(OH)D ($104,1 \pm 5,3$ mg/dL no grupo dos controles e $103,7 \pm 19,7$ mg/dL no grupo dos doentes), apesar de não se verificar uma diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos. Quanto aos homens, no grupo dos controles, verificou-se que aqueles que tinham deficiência de vitamina D apresentaram uma concentração mais alta de APO B ($124,5 \pm 35,6$ mg/dL) do que os homens com níveis suficientes de vitamina D ($111,9 \pm 2,4$ mg/dL). No grupo dos doentes, observou-se um resultado diferente. Os homens com deficiência de vitamina D tinham uma concentração de APO B mais baixa ($108,1 \pm 29,1$ mg/dL) do que os

indivíduos com suficiência de vitamina D ($116,8 \pm 27,6$ mg/dL). Apesar disso, não se registou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Mais uma vez, este resultado no grupo dos doentes, poderá estar condicionado pelo facto dos indivíduos com DCV e com níveis suficientes de vitamina D, constituírem um grupo muito pequeno.

Apesar de vários estudos associarem uma concentração desejável de 25(OH)D a um perfil lipídico mais favorável, existem poucos dados que relacionem a 25(OH)D com a Lp(a). No presente trabalho, tanto no grupo dos controlos como no grupo dos doentes, verificou-se que a concentração de Lp(a) era mais alta nos indivíduos com suficiência de vitamina D ($32,2 \pm 38,6$ mg/dL versus $51,3 \pm 47,6$ mg/dL) do que nos que tinham deficiência de vitamina D ($29,1 \pm 26,7$ mg/dL versus $43,9 \pm 50,1$ mg/dL). Estes resultados vão contra aquilo que seria de esperar pois, estando a maior concentração de 25(OH)D relacionada com um perfil lipídico mais favorável, seria de esperar que a concentração de Lp(a) fosse mais baixa quanto melhor fosse o estado de vitamina D. A vitamina D já foi associada a uma melhoria na concentração de Lp(a), num estudo onde se aumentou o aporte de vitamina D na alimentação ^[98]. No entanto, nesse estudo apenas se determinaram as concentrações da APO A1, APO B e Lp(a) e não se determinou a concentração de 25(OH)D para avaliar o estado de vitamina D dos indivíduos.

De uma forma geral, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura. Valores mais favoráveis de colesterol das HDL, triglicéridos, glicose, perímetro abdominal e uma menor incidência de síndrome metabólico foram observados em indivíduos com uma concentração sérica de 25(OH)D mais elevada ^[72]. Além disso, a concentração sérica de 25(OH)D parece estar inversamente relacionada com a concentração sérica de triglicéridos, de APO B e com o rácio LDL/HDL ^[99]. Num estudo realizado em pacientes diabéticos, verificou-se que indivíduos com deficiência de vitamina D tinham concentrações mais elevadas de colesterol total, triglicéridos e colesterol das LDL e concentrações mais baixas de colesterol das HDL, quando comparados com indivíduos que tinham uma concentração suficiente de 25(OH)D ^[100]. Além disso, a deficiência de vitamina D também parece estar associada à hiperlipidemia familiar e o tratamento para a dislipidemia parece aumentar a concentração de 25(OH)D por um mecanismo ainda desconhecido. No entanto, estudos futuros serão necessários para esclarecer o mecanismo envolvido nesta associação ^[101].

Um artigo de revisão, publicado em 2011 com o objetivo de analisar a relação da 25(OH)D com o perfil lipídico, analisou 22 estudos transversais e 10 ensaios clínicos

controlados por placebo, nos quais se administraram suplementos de vitamina D ^[102]. Nessa análise, verificou-se que em todos os estudos transversais se observou uma relação direta entre a 25(OH)D e a concentração de colesterol das HDL e uma relação inversa entre a 25(OH)D e a concentração de triglicéridos e de colesterol das LDL. Por outro lado, os ensaios clínicos analisados não foram concordantes. Enquanto alguns estudos mostram um efeito positivo no perfil lipídico com a suplementação de vitamina D, outros mostram uma ação negativa. No entanto, nenhum destes estudos clínicos foi desenhado especificamente para avaliar o papel da vitamina D no perfil lipídico. Assim, até ao momento, o efeito da suplementação com vitamina D no perfil lipídico continua incerto e continuam a ser necessários mais estudos para esclarecer este assunto.

Vitamina D, glicose, insulina e HA_{1C}

A concentração média de glicose era mais baixa nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D, quer no grupo dos controlos (94,5±10,6 mg/dL) como no grupo dos doentes (114,9±39,5 mg/dL), do que nos indivíduos com deficiência de vitamina D (96,3±11,2 mg/dL no grupo dos controlos e 142,9±63,0 mg/dL no grupo dos doentes). Observou-se, no grupo dos doentes, uma diferença estatisticamente significativa na concentração sérica de glicose, consoante os diferentes estados de vitamina D dos indivíduos ($P= 0,05$). Também se verificou, nos dois grupos estudados, que a concentração sérica média de insulina era mais baixa nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D (5,7±5,4 µUI/mL no grupo dos controlos e 9,2±5,1 µUI/mL no grupo dos doentes), do que nos indivíduos com deficiência de vitamina D (6,6±2,9 µUI/mL no grupo dos controlos e 11,8±14,4 µUI/mL no grupo dos doentes). No grupo dos controlos, houve uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração sérica de insulina dos indivíduos, consoante o seu estado de vitamina D ($P= 0,034$). De forma semelhante, no grupo dos doentes, os indivíduos com níveis adequados de vitamina D tinham um valor de HA_{1C} mais baixo (6,0±1,5%) do que os indivíduos com deficiência de vitamina D (7,1±1,9%), verificando-se uma diferença significativa consoante o estado de vitamina D dos indivíduos ($P= 0,009$).

Estes resultados estão de acordo com o esperado pois, como publicado anteriormente ^[76, 77, 78, 79, 80], parece existir uma relação entre a deficiência de vitamina D e a resistência à insulina. Além disso, apesar de existirem poucos dados que relacionem a 25(OH)D com a HA_{1C}, um estudo publicado em 2010^[103] analisou a relação entre a concentração de 25(OH)D e o valor de HA_{1C}, dividindo os indivíduos em três grupos de

acordo com a idade (18-34 anos; 35-74 anos; 75 ou mais anos). Os resultados deste estudo identificaram uma relação inversa entre a concentração de 25(OH)D e a HA_{1C} no grupo de indivíduos entre os 35 e os 74 anos. Nos outros dois grupos essa relação não se verificou mas, segundo os investigadores, no grupo de indivíduos entre os 18 e os 34 não se observou uma grande incidência de valores anormais de HA_{1C}, o que poderia ter tornado essa relação estatística difícil de detetar. Por outro lado, o grupo de indivíduos com 75 anos ou mais, foi o grupo mais pequeno e no qual poderia ter existido a influência de eventuais tratamentos.

Vitamina D e biomarcadores inflamatórios

Além dos fatores de risco cardiovascular tradicionais, bem conhecidos, nomeadamente a obesidade, o tabagismo e a DM, as elevadas concentrações séricas de biomarcadores inflamatórios, como o fibrinogénio e a PCR, também constituem um importante fator de risco cardiovascular. Por outro lado, a deficiência de vitamina D tem sido associada a um aumento da concentração sérica de biomarcadores inflamatórios, sugerindo-se assim uma ligação entre a deficiência de vitamina D e a doença cardiovascular, devido à inflamação ^[104].

No presente trabalho, verificou-se que os indivíduos com suficiência de vitamina D apresentavam concentrações médias de fibrinogénio mais baixas (controlos: 379,8±91,3 mg/dL; doentes: 410,2±89,2 mg/dL) do que os indivíduos com deficiência de vitamina D (controlos: 385,8±76,4 mg/dL; doentes: 434,0±92,9 mg/dL). No entanto, ao contrário do que seria de esperar, os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram concentrações médias de fibrinogénio mais baixas (controlos: 368,7±90,0 mg/dL; doentes: 390,2±77,1 mg/dL), embora a diferença não se tenha verificado ser significativa do ponto de vista estatístico, quando comparadas com as das restantes categorias de vitamina D.

Quanto à PCRhs, no grupo dos doentes, verificou-se que o valor médio era mais alto nos indivíduos com deficiência de vitamina D (0,81±1,64 mg/dL) do que nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D (0,41±0,48 mg/dL). Apesar de não se ter verificado uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,059$), este resultado vai de encontro ao esperado, pois a vitamina D tem um efeito anti-inflamatório, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias ^[95]. Embora no grupo dos controlos, os indivíduos com deficiência de vitamina D apresentassem uma concentração média de PCRhs mais baixa (0,26±0,36 mg/dL) do que os indivíduos que tinham níveis

suficientes de vitamina D ($0,29 \pm 0,43$ mg/dL), é de salientar que, à semelhança do que foi observado para o fibrinogénio, os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram uma concentração mais baixa de PCRhs ($0,23 \pm 0,24$ mg/dL no grupo dos controlos e $0,22 \pm 0,20$ mg/dL no grupo dos doentes). Estes resultados vão de encontro aos de um estudo publicado em 2014^[104], no qual se pretendia investigar a relação entre a concentração de 25(OH)D e a concentração de alguns biomarcadores inflamatórios. Nesse estudo, verificou-se que existia uma associação inversa entre a concentração sérica de 25(OH)D e a concentração sérica de fibrinogénio mas, no caso da PCRhs observou-se uma associação em forma de U, sugerindo que uma concentração elevada de 25(OH)D poderia ter efeitos pró-inflamatórios. Verificou-se que a concentração de PCRhs descia até uma concentração sérica de 25(OH)D de cerca de 21 ng/mL e começava a subir quando as concentrações séricas de 25(OH)D estavam acima de 25 ng/mL. Nesse estudo, os resultados obtidos levaram a concluir que a relação da 25(OH)D com a inflamação variava consoante os biomarcadores inflamatórios em estudo. Também num estudo anterior, publicado em 2012^[105], foi obtido um resultado semelhante, ao observar-se uma relação inversa entre a concentração de PCRhs e a concentração de 25(OH)D até 21 ng/mL, relação essa que deixou de existir para concentrações de 25(OH)D superiores a 21 ng/mL. Ademais, alguns autores defendem atualmente que as baixas concentrações de vitamina D são uma consequência da inflamação e não a causa^[106].

No que diz respeito à concentração sérica da homocisteína, obtiveram-se resultados opostos nos dois grupos estudados. Enquanto no grupo dos controlos, os indivíduos com suficiência de vitamina D apresentaram concentrações de homocisteína mais baixas ($11,1 \pm 2,7$ μ mol/L) do que os indivíduos com deficiência de vitamina D ($12,3 \pm 3,8$ μ mol/L), no grupo dos doentes ocorreu o contrário, ou seja, os indivíduos com suficiência de vitamina D apresentaram concentrações de homocisteína mais altas ($14,2 \pm 6,7$ μ mol/L) do que os indivíduos com deficiência de vitamina D ($12,8 \pm 2,8$ μ mol/L). Além disso, enquanto no grupo dos controlos os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram uma concentração mais alta de homocisteína ($13,3 \pm 4,7$ μ mol/L), no grupo dos doentes os indivíduos com insuficiência de vitamina D foram os que apresentaram uma concentração de homocisteína mais baixa ($12,5 \pm 3,6$ μ mol/L). Apesar disso, não se registou uma diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos. Os resultados obtidos no grupo dos doentes não estão de acordo com o esperado pois, de forma semelhante ao observado no grupo dos controlos, seria

de esperar que os indivíduos com deficiência de vitamina D apresentassem uma concentração de homocisteína mais alta do que os indivíduos com níveis adequados de 25(OH)D, estando assim de acordo com os resultados obtidos em outros estudos^[107, 108].

Muhammad Amer et al^[107] verificaram que a 25(OH)D parece modular a expressão dos genes envolvidos no metabolismo da homocisteína e, embora pouco se saiba sobre essa relação, supõe-se que exista uma relação inversa entre a concentração sérica de 25(OH)D e a concentração de homocisteína. Essa relação inversa foi observada apenas até uma concentração de 25(OH)D de cerca de 21 ng/mL. Acima dessa concentração de 25(OH)D, a relação inversa parece deixar de existir. Estes resultados suportam a hipótese de que uma concentração de 25(OH)D acima de 21 ng/mL não resulta em uma maior diminuição da concentração de homocisteína e, provavelmente, não é essencial para a prevenção primária da aterosclerose, pelo menos em adultos saudáveis^[107].

Anteriormente, também já tinha sido observado um resultado semelhante^[108], no qual se verificou uma forte correlação, em forma de U, entre a concentração sérica de 25(OH)D e a concentração sérica de homocisteína. Nessa relação, observaram-se concentrações mais baixas de homocisteína quando a concentração de 25(OH)D se situava entre 20 e 24 ng/mL.

Concentração de 25(OH)D em função de todos os fatores estudados

Considerando que o exame de cada uma das variáveis independentes, separadamente, em função da variável resposta, poderia introduzir um viés no estudo, fez-se a análise simultânea de todas as variáveis estudadas através da aplicação de uma Regressão Logística. Este modelo foi aplicado após uma Análise de Variância Dupla em que apenas o sexo tinha mostrado ser significativo. A aplicação destes testes estatísticos teve como objetivo evitar o efeito confundente, da possível interação das várias variáveis estudadas, na concentração sérica de 25(OH)D.

Verificou-se que a variável que mais influenciou a concentração sérica de 25(OH)D foi a altura dos indivíduos. Os resultados obtidos pela regressão logística levaram a concluir que, quanto maior a altura dos indivíduos, menor era o risco destes apresentarem concentrações inadequadas de 25(OH)D.

Como já foi referido anteriormente neste trabalho, verificou-se que os homens apresentavam uma concentração sérica de 25(OH)D mais elevada do que as mulheres e, curiosamente, os homens apresentam, tendencialmente, estatura mais alta do que as

mulheres. Ademais, tem sido referido na literatura que, ao contrário do esperado, a população do norte da Europa apresenta concentrações médias de 25(OH)D mais elevadas do que as da população dos países mediterrânicos, incluindo Portugal ^[94]. Tendo em conta que a população do norte da Europa apresenta uma estatura média mais alta do que a população portuguesa, estes resultados poderão estar relacionados com o facto daqueles indivíduos possuírem uma maior massa óssea e/ou também maior área corporal para a exposição solar. Kremer R. et al^[109], já tinham reportado uma correlação positiva inesperada entre a 25(OH)D e a altura. Enquanto a vitamina D é um fator chave para o desenvolvimento do esqueleto e a sua deficiência pode resultar em baixa estatura associada ao raquitismo, nenhum dos indivíduos participantes no estudo, tinha evidências de raquitismo.

Por outro lado, num estudo onde se pretendeu analisar os fatores nutricionais associados a uma elevada taxa de nanismo em crianças entre os 2 e os 5 anos^[110], verificou-se que o cálcio, a vitamina D e a vitamina E não eram ingeridos em quantidades adequadas. Além disso, eram consumidos em menor quantidade pelas crianças com nanismo do que nas restantes. Isto levou a concluir que o consumo inadequado de cálcio e de vitamina D terão contribuído para a alta taxa de nanismo nessa população.

Num outro estudo^[111], cujo objetivo era avaliar os fatores de risco para a deficiência de vitamina D em raparigas adolescentes e avaliar o seu impacto na massa óssea, concluiu-se que a deficiência de vitamina D era uma condição muito frequente nessa população e que isso tinha um impacto negativo na mineralização óssea e no crescimento dos indivíduos.

Em bebés que tinham nascido com baixo peso, administraram-se doses adequadas de vitamina D desde 1 semana até aos 6 meses de idade e verificou-se um aumento do seu comprimento e peso, ao fim desses 6 meses. Para verificar os efeitos a longo prazo dessa suplementação com vitamina D, avaliaram-se as mesmas crianças já com 3 a 6 anos de idade e verificou-se que as crianças do grupo que tomou os suplementos de vitamina D eram mais magras e mais altas do que as crianças do grupo placebo^[112].

Num estudo no qual se avaliou o impacto da vitamina D e da atividade física na saúde esquelética durante a adolescência^[113], verificou-se que a insuficiência de vitamina D estava relacionada com uma menor densidade óssea. Isto faz sentido, uma vez que uma baixa concentração de 25(OH)D prejudica a absorção do cálcio e esta

baixa concentração de cálcio estimula a produção de PTH a qual, por sua vez, mobiliza cálcio do osso para a corrente sanguínea, resultando numa diminuição da densidade óssea e consequente aumento do risco de fraturas.

Também é importante ter em conta que o aporte de vitamina D varia entre os diferentes países, de acordo com os padrões alimentares e com as suas políticas de fortificação de alimentos. Na Europa estão a ser aplicadas diferentes estratégias para aumentar o aporte de vitamina D. Em países do norte da Europa como a Dinamarca, a Suécia, a Noruega e a Finlândia promove-se o consumo regular de óleo de peixe e, também nestes países, existem políticas de fortificação dos alimentos com vitamina D. Pelo contrário, em países do sul da Europa como a Espanha e a Itália, não estão implementadas políticas de fortificação nem de suplementação com vitamina D ^[114]. Em Portugal, existem no mercado suplementos vitamínicos que contêm vitamina D, quer na forma de vitamina D₂ como D₃. De igual forma, estão acessíveis no mercado alguns alimentos fortificados com vitamina D, tais como iogurtes, leite, cereais de pequeno-almoço e fórmulas infantis. Contudo, à semelhança do que se verifica em outros países do sul da Europa, em Portugal não existe qualquer norma que estabeleça uma obrigação por parte da indústria alimentar, no que diz respeito à dose recomendada para a fortificação de alimentos com vitamina D ^[115].

Para além de tudo o que foi dito anteriormente, também o consumo de suplementos alimentares com vitamina D é um hábito mais frequente no norte do que no sul da Europa. O país com maior consumo de suplementos de vitamina D é a Dinamarca, enquanto na Grécia se registou o menor consumo dos mesmos. Isto constitui um fator importante que deverá contribuir para as diferenças observadas na concentração de 25(OH)D entre os indivíduos do norte e do sul da Europa ^[114].

Os estudos anteriormente referidos ^[110, 111, 112, 113, 114] levam a crer que a altura seja uma consequência de um aporte apropriado de vitamina D e de uma adequada concentração sérica de 25(OH)D, principalmente durante a infância e adolescência, e não o contrário. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho levam a especular que é possível que a altura dos indivíduos possa ter alguma influência na concentração sérica de 25(OH)D e que, apesar de não haver informação sobre este assunto na literatura, esta relação merece ser melhor estudada futuramente, para se perceber melhor se a maior estatura é uma causa ou uma consequência de uma superior concentração de 25(OH)D.

Concentração de 25(OH)D por eletroquimioluminescência e por imunoquimioluminescência.

O crescente interesse no papel da vitamina D na saúde humana refletiu-se num aumento notável do número de pedidos de doseamento de 25(OH)D, principalmente pela crescente preocupação da comunidade médica com a elevada prevalência da deficiência de vitamina D ^[116, 117, 118].

Existem vários métodos para a determinação laboratorial de 25(OH)D. No entanto, é importante referir que o doseamento da 25(OH)D constitui um enorme desafio, devido à sua natureza lipofílica, à sua grande afinidade com a VDBP e devido ao facto desta se apresentar em duas formas moleculares muito semelhantes: 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃ ^[116, 119, 120].

Por esta razão, ao longo do tempo foi detetada uma grande variabilidade de métodos e de resultados entre diferentes laboratórios. Uma análise ao programa de controlo de qualidade externo, realizada em 1994, revelou uma grande variação interlaboratorial na média da concentração de 25(OH)D. Desde então, tem-se vindo a melhorar a padronização dos métodos laboratoriais, tendo-se verificando que essa variação tinha diminuído drasticamente, em 2009 ^[118]. A variação interlaboratorial dificulta, também, a implementação de diretrizes bem definidas que possam ser usadas no diagnóstico. Para tentar resolver este problema, em 2010, várias entidades juntaram-se para estabelecer um programa de padronização, com o principal objetivo de promover a coerência entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos utilizados para a determinação da 25(OH)D ^[118]. Assim, como método de referência, desenvolveram-se técnicas de deteção de 25(OH)D baseadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Estas técnicas implicam o tratamento prévio da amostra para separar a 25(OH)D da sua proteína de ligação e permitem o doseamento da 25(OH)D₂ e da 25(OH)D₃, em simultâneo. No entanto, estas são técnicas manuais, que envolvem equipamentos muito dispendiosos, são demoradas e requerem um grande volume de amostra ^[118, 119, 120].

Por todas estas razões, na prática clínica, os métodos laboratoriais mais frequentemente utilizados para a determinação de 25(OH)D são os imunoensaios. A grande procura do doseamento laboratorial de 25(OH)D veio justificar a necessidade de várias casas comerciais lançarem no mercado imunoensaios automatizados para a determinação de 25(OH)D, como se tem presenciado nos últimos anos ^[116, 117]. Como exemplo, a Roche Diagnostics lançou há poucos anos um teste no qual, ao contrário do

anterior da mesma casa, se utiliza DBP recombinante em vez de anticorpos para reconhecer a 25(OH)D. Este método permite detetar tanto a 25(OH)D₂ como a 25(OH)D₃ ^[116, 121]. Mais recentemente, também a Beckman Coulter desenvolveu um teste para a determinação de 25(OH)D. Este é um ensaio de duas fases, com ligação competitiva à 25(OH)D ^[121]. Tanto o teste da Roche como o teste da Beckman Coulter são padronizados pelo *National Institute of Standards and Technology Serum-Based Standard Reference Material* (NIST-SRM) ^[121].

A diferença de resultados obtidos por diferentes métodos tem sido descrita em vários estudos e, apesar das melhorias que se têm vindo a implementar, continua a constituir um fator de preocupação. Nos últimos anos houve um crescimento demasiado rápido no número de pedidos da 25(OH)D e a evolução dos métodos pode não ter conseguido acompanhar esse crescimento com a mesma rapidez, para dar uma resposta adequada. Por esta razão, têm sido feitos vários estudos para comparar o desempenho de diferentes imunoensaios automatizados e, apesar de algumas diferenças, tem-se demonstrado uma excelente correlação entre estes imunoensaios e a técnica de referência, por HPLC, o que indica que o desempenho destes imunoensaios é aceitável e que estes podem ser utilizados de forma segura para a determinação da 25(OH)D nos laboratórios clínicos ^[116, 121].

No presente trabalho, 70 amostras foram testadas pelo método de eletroquimioluminescência da Roche Diagnostics e pelo método de imunoquimioluminescência da Beckman Coulter. Verificou-se que a concentração média de 25(OH)D nessas 70 amostras era ligeiramente diferente (19,7±9,1 ng/mL e 21,8±6,0 ng/mL respetivamente) mas essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($P=0,099$). Apesar de não ter sido feita uma comparação com o método de referência, por HPLC, a semelhança dos resultados obtidos pelos dois métodos testados indica que atualmente, apesar de se tratar de métodos e de casas comerciais diferentes, se caminha no sentido da padronização.

7. CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, a deficiência de vitamina D tem despertado grande interesse na comunidade científica por estar, aparentemente, relacionada com várias doenças crônicas, nomeadamente as doenças cardiovasculares. Assim, têm-se desenvolvido diversos trabalhos de investigação a fim de esclarecer melhor esta relação. No entanto, alguns estudos clínicos não conseguiram comprovar a melhoria destas doenças com a suplementação de vitamina D e continua a haver controvérsia nos resultados obtidos. Desta forma, justifica-se a realização de mais estudos científicos para que se possa compreender melhor a relação da vitamina D com as doenças cardiovasculares, pelo que se achou oportuno a realização deste trabalho.

Com este trabalho verificou-se que a concentração sérica de 25(OH)D era significativamente mais baixa nos indivíduos com doença cardiovascular do que nos indivíduos saudáveis e que a deficiência de vitamina D era uma condição mais frequente nos primeiros.

Também se verificou que havia uma tendência para que as mulheres apresentassem uma concentração de 25(OH)D mais baixa do que os homens, independentemente de serem saudáveis ou terem doença cardiovascular.

Quanto à relação da vitamina D com o estilo de vida dos indivíduos, verificou-se que os indivíduos não fumadores tinham uma concentração de 25(OH)D mais alta do que os fumadores e que os indivíduos que praticavam alguma atividade física tinham uma concentração de 25(OH)D mais favorável do que os indivíduos sedentários. Ou seja, de certa forma, um estilo de vida mais saudável parece contribuir para um melhor estado de vitamina D.

Foi, ainda, possível constatar que o consumo de alimentos ricos em vitamina D não contribui significativamente para o aumento da concentração sérica de 25(OH)D. Por outro lado, sabe-se que a principal fonte de vitamina D é a sua produção endógena durante a exposição solar e, como esperado, comprovou-se que a concentração sérica de 25(OH)D era mais alta durante os meses de verão do que durante os meses de inverno e que os indivíduos que estavam expostos ao sol durante mais tempo eram os que tinham uma concentração sérica de 25(OH)D mais elevada.

De uma forma geral, verificou-se que uma concentração adequada de 25(OH)D está relacionada com um perfil lipídico mais favorável, observando-se uma concentração de colesterol total, colesterol das LDL e triglicéridos mais baixa e uma

concentração de colesterol das HDL mais alta nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D. De igual forma, observaram-se concentrações de APO B, de glicose e de insulina mais baixas e um valor de HA_{1C} mais baixo nos indivíduos com níveis suficientes de vitamina D, relativamente aos indivíduos com deficiência de vitamina D.

Os resultados mais curiosos e inesperados foram obtidos ao relacionar os chamados novos marcadores de risco cardiovascular com o estado de vitamina D dos indivíduos. A concentração sérica de fibrinogénio e de PCRhs, ambos biomarcadores inflamatórios que estão associados ao risco cardiovascular, não era mais baixa quanto melhor o estado de vitamina D, como seria de esperar. Tanto para um marcador como para o outro, os resultados mais favoráveis foram observados nos indivíduos com insuficiência de vitamina D. O mesmo se observou relativamente à concentração sérica de homocisteína nos indivíduos com doença cardiovascular. Também foi curioso notar que a concentração sérica de Lp(a) era mais elevada quanto melhor o estado de vitamina D dos indivíduos.

Com todos estes resultados, podemos especular que os níveis muito baixos de 25(OH)D contribuem para o risco cardiovascular mas que esse risco pode ser atenuado a partir de uma concentração sérica de 25(OH)D superior a 21 ng/mL. Ou seja, a concentração atualmente recomendada para a saúde esquelética deverá ser suficiente para manter uma boa saúde cardiovascular, continuando a ser importante manter essa concentração sérica de 25(OH)D. Além disso, é possível que a suplementação de vitamina D, para prevenir ou para melhorar a doença cardiovascular, apenas beneficie indivíduos com concentrações de 25(OH)D inferiores a 21 ng/mL, não surtindo qualquer efeito em indivíduos com uma concentração de 25(OH)D mais alta, podendo estar aí a justificação para a controvérsia dos resultados obtidos em alguns ensaios clínicos, onde se pretendia verificar o efeito da suplementação de vitamina D na doença cardiovascular.

Outra conclusão importante e, ao contrário do esperado, é de que a deficiência e a insuficiência de vitamina D parecem atingir percentagens elevadas da população da ilha da Madeira. Esta é uma região com um clima agradável e uma temperatura amena durante quase todo o ano, o que favorece a prática de atividades ao ar livre e, estando situada a uma latitude entre 32° e 33°N, seria de esperar que os indivíduos saudáveis tivessem uma concentração sérica de 25(OH)D mais alta. No entanto, é importante salientar que este foi um trabalho preliminar nesse sentido e que, para se poder concluir de forma segura sobre a deficiência e a insuficiência de vitamina D na Madeira, seria

necessário analisar uma amostra mais representativa da população, de forma a que se pudessem obter resultados mais fiáveis. Seria ainda importante, se eventualmente se confirmasse essa grande percentagem de níveis inadequados de vitamina D, apurar as principais causas para essa observação.

Também se concluiu que existe uma forte relação entre a concentração sérica de 25(OH)D e a altura dos indivíduos. Esta relação merece ser melhor estudada, a fim de se conseguir determinar se é a concentração adequada de 25(OH)D, durante as fases de crescimento, que contribui para uma maior altura dos indivíduos ou se, por outro lado, a altura tem alguma influência na concentração sérica de 25(OH)D, quer porque os indivíduos mais altos têm uma maior densidade óssea ou porque têm uma maior área de exposição solar.

Por último, é visível que cada vez mais se caminha no sentido de tornar a avaliação laboratorial do estado de vitamina D num procedimento de rotina, uma vez que se tem vindo a demonstrar que uma concentração adequada de 25(OH)D contribui para um bom funcionamento de várias células, tecidos e órgãos. Assim, torna-se imprescindível continuar a caminhar no sentido da padronização dos diferentes métodos existentes no mercado.

8. LIMITAÇÕES

Como em qualquer trabalho de investigação, neste trabalho também se identificaram algumas limitações. Uma das limitações foi o facto dos grupos não serem homogéneos quanto à proporção de homens e mulheres. Os resultados não foram tratados em função do género para todas as variáveis porque, para a maioria delas, estaríamos a trabalhar com uma amostra muito pequena. Se tivéssemos mais mulheres poderíamos ter tratado todos os dados em função do género e verificar se as variáveis estudadas tinham comportamentos diferentes entre homens e mulheres. Isto teria sido interessante uma vez que em algumas variáveis, nomeadamente a 25(OH)D, parece haver influência do género.

Uma outra possível limitação foi o facto do grupo dos doentes ser constituído por indivíduos que foram diagnosticados com doença coronária, EAM ou que fizeram cateterismo cerca de 2 ou 3 anos antes do recrutamento. Possivelmente, se o recrutamento tivesse sido realizado passadas poucas semanas ou meses do evento cardiovascular, os resultados teriam sido diferentes. As diferenças entre os controlos e os doentes poderiam ter sido ainda maiores. No entanto, é isso que tem sido feito na maioria dos estudos publicados até à data. Talvez esta seja uma lacuna e se devam desenvolver estudos em doentes monitorizados ao longo de vários anos para, de certa forma, avaliar o papel da vitamina D na evolução e prognóstico desses indivíduos.

No grupo dos doentes, existiam apenas 16 indivíduos com suficiência de vitamina D. Se a amostra tivesse sido maior, é possível que tivéssemos um maior número de indivíduos com suficiência de vitamina D nesse grupo e teria sido possível fazer comparações com um maior grau de fiabilidade.

9. PERSPETIVAS FUTURAS

De seguida são apresentadas algumas considerações que poderão ser adequadas para o seguimento deste trabalho:

- Uma vez que neste trabalho se observaram diferenças na concentração de 25(OH)D entre homens e mulheres, seria interessante reproduzir esta análise avaliando uma amostra com uma proporção homogénea de homens e mulheres, a fim de se verificar se esta diferença entre géneros se deveu ao acaso ou se de facto existe.

- Também parece pertinente explorar a relação entre o estado de vitamina D dos indivíduos e os novos biomarcadores de risco da DCV, nomeadamente a APO B, a Lp(a), o fibrinogénio, a PCRhs e a homocisteína, pois os resultados obtidos indicam que concentrações muito baixas de 25(OH)D não são favoráveis para estes biomarcadores mas, ainda mais interessante, as concentrações de 25(OH)D acima dos níveis recomendados também parecem ter uma relação negativa com estes marcadores.

- Uma vez que, ao contrário do esperado dada a posição geográfica da Madeira, se verificou uma elevada percentagem de deficiência e insuficiência de vitamina D, seria pertinente fazer uma avaliação do estado de vitamina D numa amostra maior e representativa da população madeirense, a fim de caracterizá-la quanto ao estado de vitamina D.

- Por último, dada a forte relação encontrada entre a concentração sérica de 25(OH)D e a altura dos indivíduos, seria interessante explorar esta relação, a fim de se compreender melhor se é a concentração adequada de 25(OH)D, durante as fases de crescimento, que contribui para uma maior altura dos indivíduos ou se, por outro lado, é a altura que tem alguma influência na concentração sérica de 25(OH)D e, ao verificar-se esta teoria, apurar quais as razões que se encontram por detrás dessa relação.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Instituto Nacional de Estatística, Direção Geral da Saúde. Risco de Morrer 2012. Lisboa: INE, 2014. Disponível em <http://www.ine.pt> (acedido a 1 de Julho de 2015).
2. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death. WHO, 2014. Disponível em www.who.int (acedido a 1 de Julho de 2015).
3. Ke L, Graubard BI, Albanes D, Fraser DR, Weinstein SJ, Virtamo J, et al. Hypertension, pulse, and other cardiovascular risk factors and vitamin D status in finnish men. *Am J Hypertens* 2013; doi:10.1093/ajh/hpt051.
4. 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; 12:708-718.
5. vanHolten TC, Waanders LF, Groot PG, Vissers J, Hoefler IE, Pasterkamp G, et al. Circulating biomarkers for predicting cardiovascular disease risk; a systematic review and comprehensive overview of meta-analyses. *Plos One* 2013; doi:10.1371/journal.pone.0062080.
6. Gunta SS, Thadhani RI, Mak R. The effect of vitamin D status on risk factors for cardiovascular disease. *Nat Ver Nephrol* 2013; doi:10.1038/nrneph.2013.74.
7. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality - a review of recent evidence. *Autoimmun Rev* 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2013.02.004>.
8. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116:2062-2072.
9. Holick MF. Vitamin D: a D-lightful health perspective. *Nutr Ver* 2008; 66(2):S182-S194.
10. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:S1080-S1086.

11. Liu ZM, Woo J, Wu SH, Ho SC. The role of vitamin D in blood pressure, endothelial and renal function in postmenopausal women. *Nutrient* 2013; 5:2590-2610.
12. Wang C. Role of vitamin D in cardiometabolic diseases. *J Diabetes Res* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/243934>.
13. Visweswaran RK, Lekha H. Extraeskeletal effects and manifestations of vitamin D deficiency. *Indian J Endocrinol Metab* 2013; 17(4): 602-610.
14. Instituto Nacional de Saúde Doutor. Ricardo Jorge (INSA). Tabela de composição de alimentos. Disponível em www.insa.pt (acedido a 9 de Julho de 2015).
15. Chen TC, Lu Z, Holick MF. Vitamin D physiology, molecular biology, and clinical applications. 2ª Edição. Nova Iorque: Humana Press; 2005. Capítulo 2, Photobiology of vitamin D; p.35-60.
16. Holick MF. High prevalence of vitamin inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(3):353-373.
17. Mandarino N, Júnior F, Salgado J, Lages J, Filho N. Is vitamin D a new risk factor for cardiovascular disease? *Open Cardiovasc Med J* 2015; 9: 40 - 49.
18. Bartoszewicz Z, Kondracka A, Jazwiec R, Popow M, Dadlez M, Bednarczuk T. Can we accurately measure the concentration of clinically relevant vitamin D metabolites in the circulation? The problems and their consequences. *Endokrinologia Polska* 2013; 64:238-245. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-281.
19. Lehmann B, Meurer M. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther* 2010; 23:2-12.
20. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev* 2016; 96: 365 - 408.
21. Judd S, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117(4): 503-511.

22. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F8-F28.
23. Christakos S, Hewison M, Gardner DG, Wagner CL, Sergeev IN, Rutten E, et al. Vitamin D: beyond bone. *Ann N Y Acad Sci* 2013; doi:10.1111/nyas.12129.
24. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7): 1911-1930.
25. Wagner CL, Taylor SN, Holiis BW. Does vitamin D makes de world go 'round'? *Breastfeeding Medicine* 2008; 3:239-250.
26. McGreevy C, Williams D. New insights about vitamin D and cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2011; 155:820-826.
27. Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res* 2007; 22(2):V28-V33.
28. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117:503-511.
29. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. A prospective study of 25-hydroxy-vitamin D and risk of myocardial infarction in men. *Arch Intern Med* 2008; 168(11):1174-1180.
30. Fiscella K, Frank P. Vitamin D, race, and cardiovascular mortality: findings from national US sample. *Ann Fam Med* 2010; 8:11-18.
31. Thomas GN, Hartaigh BO, Bosh JA, Pilz S, Loerbroks A, Kleber ME, et al. Vitamin D levels predict all-cause and cardiovascular disease mortality in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2012; 35:1158-1164.
32. Ku YC, Liu ME, Ku CS, Liu TY, Lin SL. Relationship between vitamin D deficiency and cardiovascular disease. *World J Cardiol* 2013; 5(9):337-346.

33. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Anatomia e Fisiologia. 3ª Edição. Lisboa: Lusodidacta; 2001. Capítulo 21, Aparelho circulatório: circulação e regulação periférica; p.692-695.
34. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction. *Circulation* 2007; 115:1285-1295.
35. Endermann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1983-1992.
36. Hadi AR, Carr CS, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1(3): 183-198.
37. Kassi E, Adamopoulos C, Basdra EK, Papavassiliou AG. Role of vitamin D in atherosclerosis. *Circulation* 2013; 128:2517-2531.
38. Molinari C, Uberti F, Grossini E, Vacca G, Carda S, Invernizzi M, et al. 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2011; 27:661-668.
39. Hirata M, Serizawa K, Aizawa K, Yogo K, Tashiro Y, Takeda S, et al. 22-oxacalcitriol prevents progression of endothelial dysfunction through antioxidative effects in rats with type 2 diabetes and early-stage nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28:1166-1174.
40. Wong MS, Man RY, Vanhoutte PM. Calcium-independent phospholipase A2 plays a key role in the endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298:H1260-H1266.
41. Zitterman A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18:41-46.
42. Papageorgiou N, Tousoulis D, Siasos G, Stefanadis C. Is fibrinogen a marker of inflammation in coronary artery disease?. *Hellenic J Cardiol* 2010; 51:1-9.
43. Silva D, Lacerda AP. High-sensitivity C-reactive protein as a biomarker of risk in coronary artery disease. *Rev Port Cardiol* 2012; 31(11):733-745.

44. Ramjee V, Sperling LS, Jacobson TA. Non-high-density lipoprotein cholesterol versus apolipoprotein B in cardiovascular risk stratification. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58(5):457-463.
45. Chan DC, Watts GF. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk. *Q J Med* 2006; 99:277-287.
46. Kienreich K, Tomaschitz A, Verheyen N, Pieber T, Gaksch M, Gröbler MR, et al. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients* 2013; 5:3005-3021.
47. Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, et al. Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem* 2004; 279:35798-35802.
48. Zittermann A, Koerfer R. Vitamin D in the prevention and treatment of coronary heart disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11:1-6.
49. Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:416-419.
50. Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU. Functional vitamin D receptor (VDR) in the T-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology* 2008; 149(2):558-564.
51. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002; 110:229-238.
52. Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:521-524.
53. World Health Organization; International Society of Hypertension. World Health Organization/ International Society of Hypertension statement on management of hypertension. *J Hypertens* 2003; 21:1983-1992.

54. European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2013; 31:1281-1357.
55. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin–angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 387-392.
56. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 2009; doi:10.1038/nrcardio.2009.135.
57. Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, Grammer T, Drechsler C, Boehm BO. Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin–angiotensin system. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1354-1360.
58. Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension* 2010; 55:1283-1288.
59. Vaidya A, Sun B, Larson C, Forman JP, Williams JS. Vitamin D3 therapy corrects the tissue sensitivity to angiotensin II akin to the action of a converting enzyme inhibitor in obese hypertensives: an interventional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(7): 2456-2465.
60. Harinarayan CV. Vitamin D and diabetes mellitus. *Hormones* 2014; 13(2):163-181.
61. Pai JK, Cahill LE, Hu FB, Rexrode KM, Manson JE, Rimm EB. Hemoglobin A1C is associated with increased risk of incident coronary heart disease among apparently healthy, nondiabetic men and women. *J Am Heart Assoc* 2013; 2:e00007.
62. Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 1980; 209(4458): 823-825.

63. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the third national health and nutrition examination survey. *Diabetes Care* 2004; 4:2813-2818.
64. Kolb H, Mandrup-Poulsen T. An immune origin of type 2 diabetes?. *Diabetologia* 2005; 48:1038-1050.
65. World Health Organization (WHO). Global recommendations on physical activity for health. Geneva: WHO, 2010. Disponível em www.who.int (acedido a 7 de Setembro de 2014).
66. World Health Organization (WHO). Waist circumference and waist-hip ratio. Geneva: WHO, 2008. Disponível em www.who.int (acedido a 9 de Julho de 2015).
67. Timóteo A, Miranda F, Carmo M, Ferreira R. Optimal cutt-off value for Homeostasis Model Assessment (HOMA) index of insulin resistance in a population of patients admitted electively in a portuguese cardiology ward. *Acta Med Port* 2014; 27(4): 473 - 479.
68. World Health Organization (WHO); International Diabetes Federation (IDF). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Geneva: WHO, 2006. Disponível em www.who.int (acedido a 7 de Setembro de 2014).
69. Direção Geral da Saúde (DGS). Abordagem terapêutica das dislipidémias. Lisboa: DGS, 2013. Disponível em www.dgs.pt (acedido a 9 de Julho de 2015).
70. Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, et al. Vitamin D and cardiometabolic outcomes: a systematic review. *Ann Intern Med* 2010; 152(5):307-314.
71. Papandreou D, Hamid Z. The role of vitamin D in diabetes and cardiovascular disease: an updated review of the literature. *Dis Markers* 2015; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/580474>.
72. Datta S, Pal M, De A. The dependency of vitamin D status on anthropometric data. *J Med Sci* 2014; 21(3):54-61.

73. Verdoia M, Schaffer A, Barbieri L, Di Giovine G, Marino P, Suryapranata H, et al. Impact of gender difference on vitamin D status and its relationship with the extent of coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovas* 2015; 25: 464-470.
74. Matyjaszek-Matuszek B, Lenart-Lipinska M, Wozniakowska E. Clinical implications of vitamin D deficiency. *Prz Menopauzalny* 2015; 14(2): 75 - 81.
75. Feng R, Li Y, Li G, Li Z, Zhang Y, Li Q et al. Lower serum 25(OH)D concentrations in type 1 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2015; 108(3): e71-e75.
76. Serra-Planas E, Aguilera E, Granada M, Soldevila B, Salinas I, Reverter J et al. High prevalence of vitamin D deficiency and lack of association with subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with type 1 Diabetes Mellitus from a Mediterranean area. *Acta Diabetol* 2015; 52: 773 - 779.
77. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39(2): 419-446.
78. Knekt P, Laaksonen M, Mattila C, Härkänen T, Marniemi J, Heliövaara M et al. Serum vitamin D and subsequent occurrence of type 2 diabetes. *Epidemiology* 2008; 19: 666-671.
79. Chung S, Lee Y, Hong H, Kang M, Kwon H, Shim C et al. Inverse relationship between vitamin D status and insulin resistance and the risk of impaired fasting glucose in Korean children and adolescents: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009 - 2010. *Public Health Nutr* 2013; 17(4): 795-802.
80. Khan H, Kunutsor S, Franco O, Chowdhury Rajiv. Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc* 2013; 72: 89-97.
81. Laway B, Kotwal S, Shah Z. Pattern of 25 hydroxy vitamin D status in north Indian people with newly detected type 2 diabetes: a prospective case control study. *Indian J Endocrinol Metab* 2014; 18: 726-730.

82. Mozos I, Marginean O. Links between vitamin deficiency and cardiovascular diseases. *Biomed Res Int* 2015; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/109275>.
83. Vaidya A, Forman J. Vitamin D and hypertension - current evidence and future directions. *Hypertension* 2010; 56: 774 - 779.
84. Martins D, Wolf M, Pan D, Zadshir A, Tareen N, Thadhani R et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1159-1165.
85. McCullough M, Weinstein S, Freedman D, Helzlsouer K, Flanders W, Koenig K et al. Correlates of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Am J Epidemiol* 2010; 172: DOI: 10.1093/aje/kwq113.
86. Wanner M, Richard A, Martin B, Linseisen J, Rohrmann S. Associations between objective and self-reported physical activity and vitamin D serum levels in the US population. *Cancer Causes Control* 2015; 26: 881 - 891.
87. Maïmoun L, Sultan C. Effect of Physical Activity on Calcium Homeostasis and Calciotropic Hormones: A Review. *Calcif Tissue Int* 2009; 85: 277 - 286.
88. Pisco L, Barros H, Mascarenhas M, Carvalheiro M, Cantista P, Laíns J, et al. Declaração Portuguesa da Vitamina D. 2009. Disponível em: http://www.spmi.pt/pdf/Declaracao_Port_VitD_2009_final.pdf (acedido a 1 de Setembro de 2014).
89. Santiago T, Rebelo M, Porto J, Silva N, Vieira j, Costa J. Hipovitaminose D em doentes internados num Servido de Medicina Interna. *Acta Med port* 2012; 25(2): 68-76.
90. Silva L, Freitas J, Sampaio L, Terroso G, Pinto J, Veludo V, et al. Níveis séricos de vitamina D em portugueses com fraturas de fragilidade. *Acta Reumatol Port* 2010; 35: 352-357.
91. Alves M, Bastos M, Leitão F, Marques G, Ribeiro G, Carrilho F. Vitamina D - importância da avaliação laboratorial. *Rev Port Endocrinol Metab* 2013; 8(1): 32-39.

92. Santos M, Fernandes V, Garcia F. Carência de vitamina D numa população hospitalar: uma fotografia pela perspectiva laboratorial. *Acta Med Port* 2015; 28(6): 726-734.
93. Cashman K, Dowling K, Skrabáková Z, Gonzalez-Gross M, Valtueña J, Henauf S, et al. Vitamin deficiency in Europe: pandemic?. *Am J Clin Nutr* 2016; doi: 10.3945/ajcn.115.120873.
94. Chaudhuri J, Mridula K, Anamika A, Boddu D, Misra P, Lingaiah A, et al. Deficiency of 25-hidroxyvitamin D and dyslipidemia in Indian subjects. *Journal of lipids* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/623420>.
95. D Grimes, E Hindle, T Dyer. Sunlight, cholesterol and coronary heart disease. *Q J Med* 1996; 89: 579-589.
96. Hirschler V, Maccallini G, Molinari C, Inés U, Castano L, Sanchez M et al. Association between vitamin D and Apo B concentrations in argentinean indian children. *Clin Chim Acta* 2014; 429: 147 - 151.
97. Heravifard S, Neyestani T, Nikooyed B, Alavi-Majd H, Houshiarrad A, Kalayi A et al. Regular consumption of both vitamin D and calcium and vitamin D fortified yogurt drink is equally accompanied by lowered blood lipoprotein (a) and elevated apoprotein A1 in subjects with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *J Am Coll Nutr* 2013; 32: 26 - 30.
98. Sun X, Cao Z, Tanisawa K, Ito T, Oshima S, Ishimi Y, et al. Associations between the serum 25(OH)D concentration and lipid profiles in Japanese men. *J Atheroscler Thromb* 2015; 22: 355-362.
99. Saedisomelia A, Taheri E, Djalali M, Moghadam A, Qorbani M. Association between serum level of vitamin D and lipid profiles in type 2 diabetic patients in Iran. *J Diabetes Metab Disord* 2014; 13:7.
100. Miñambres I, Sánchez-Quesada J, Sánchez-Hernández J, Rodríguez J, Leiva A, Pérez A. Vitamin D concentration in familial combined hyperlipidemia: effects of lipid lowering treatment. *Diabetol Metab Syndr* 2014; 6:7.

101. Jorde R, Grimnes G. Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Progress in Lipid Research* 2011; 50: 303-312.
102. Kositsawat J, Freeman V, Gerber B, Geraci S. Association of A1C levels with vitamin D status in U.S adults. *Diabetes Care* 2010; 33: 1236 - 1238.
103. Mellenthin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Völzke H, Nauck M, Hannemann A. Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population. *Metab Clin Exp* 2014; 63: 1056 - 1062.
104. Amer M, Qayyum R. Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-Reactive Protein in asymptomatic adults (From the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006). *Am J Cardiol* 2012; 109: 226 - 230.
105. Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res* 2014; 63: 803-819.
106. Amer M, Qayyum R. The relationship between 25-hydroxyvitamin D and homocysteine in asymptomatic adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(2): 633 - 638.
107. Kriebitzsch C, Verlinden L, Eelen G, van Schoor N, Lips P, Meyer M et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ influences cellular homocysteine levels in murine pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells by direct regulation of cystathionine β -synthase. *J Bone Miner Res* 2011; 26(12):2991 - 3000.
108. Kremer R, Campbell P, Reinhardt T, Gilsanz V. Vitamin D status and its relationship to body fat, final height, and peak bone mass in young women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(1):67-73.
109. Stujivenberg M, Nel J, Schoeman S, Lombard C, Plessis L, Dhansay Muhammad. Low intake of calcium and vitamin D, but not zinc, iron or vitamin A, is associated with stunting in 2- to 5-year-old children. *Nutrition* 2015; 31: 841 - 846.
110. Alyahya K, Lee W, Al-Mazidi Z, Morgan J, Lanham-New S. Risk factors of low vitamin D status in adolescent females in Kuwait: implications for high peak bone mass attainment. *Arch Osteoporos* 2014; doi:10.1007/s11657-014-0178-z.

111. Trilok-Kumar G, Kaur M, Rehman AM, Arora H, Rajput MM, Chugh R, et al. Effects of vitamin D supplementation in infancy on growth, bone parameter, body composition and gross motor development and age 3-6 years: follow-up of a randomized controlled trial. *Int J Epidemiol* 2015; 44(3):894 - 905.
112. Pekkinen M, Viljakainen H, Saamio E, Lamberg-Allardt C, Makitie O. Vitamin D is a major determinant of bone mineral density at school age. *PloS One* 2012; 7(7): doi:10.1371/journal.pone.0040090.
113. Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: an overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutrition Bulletin* 2014; 39: 322 - 350.
114. Parreira D. Validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para doseamento de vitamina D em géneros alimentícios. Aplicação do método em diferentes matrizes alimentares [Dissertação de Mestrado]. Lisboa: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa; 2013 Dezembro. Capítulo 2.3, Suplementação de vitamina D; p. 14-15.
115. Herrmann M. The measurement of 25-hydroxy vitamin D - an analytical challenge. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(11): 1873 - 1876.
116. Fraser W, Milan A. Vitamin D assays: past and present debates, difficulties and developments. *Calcif Tissue Int* 2013; doi 10.1007/s00223-012-9693-3.
117. Goff C, Cavalier E, Souberbielle J, Gonzáles-Antuña A, Delvin E. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: a historical review. *Practical Laboratory Medicine* 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.plabm.2015.04.001>.
118. Wagner D, Hanwell H, Vieth R. An evaluation of automated methods for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem* 2009; 42: 1549 - 1556.
119. Beastall G, Rainbow S. Vitamin D reinvented: implications for clinical chemistry. *Clin Chem* 2008; 54(4): 630 - 632.
120. Lippi G, Salvagno G, Forunato A, Dipalo M, Aloe R, Rin G et al. Multicenter comparison of seven 25OH vitamin D automated immunoassays. *J Med Biochem* 2015; 34(3): 344 - 350.

11. ANEXOS

11.1. ANEXO 1 - DOCUMENTO DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA INVESTIGAÇÃO ENTREGUE AOS PARTICIPANTES SAUDÁVEIS

DOCUMENTO DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA INVESTIGAÇÃO

NOME DO ESTUDO: A deficiência de vitamina D como fator de risco para a doença cardiovascular.

INVESTIGADOR: Fátima Maria Meneses Costa, Orientadora Prof. Doutora Helena Caldeira Araújo, Co-orientadora Dra Liliana Cardoso.

CONTACTOS:

Fátima Costa, Telefone 968627170, E-mail: fatimamcosta@sapo.pt

Prof. Doutora Helena Caldeira Araújo, Telefone 965012051, E-mail: caldeira@uma.pt

Dr^a Liliana Cardoso, Telefone 963614198, E-mail: lilianacardoso@hotmail.com

Recentemente, as baixas concentrações de vitamina D, um fator de risco bem conhecido para as doenças osteoporóticas, têm também sido relacionadas com a ocorrência de doenças crónicas tais como, a hipertensão, as doenças cardiovasculares, a diabetes, a doença renal crónica, as doenças neurodegenerativas, determinados tipos de cancro e, ainda, doenças autoimunes e imunossupressão.

No entanto, o papel da vitamina D na morbilidade e mortalidade por doença cardiovascular é um tema recente e que tem vindo a ser muito debatido. Alguns estudos epidemiológicos sugerem uma associação entre as baixas concentrações de vitamina D e os fatores de risco para doença cardiovascular mas, ainda não se conseguiu estabelecer uma relação de causa-efeito.

Foi-lhe pedido para participar num estudo de investigação, no âmbito de desenvolvimento de Projeto/Dissertação de Mestrado, que pretende ajudar a compreender melhor o papel da deficiência em vitamina D no desenvolvimento de doença cardiovascular. Para este estudo serão recrutados participantes com patologia cardiovascular confirmada através de exame clínico e angiografia coronária e indivíduos saudáveis, para efeitos de comparação dos níveis séricos desta vitamina. A sua participação neste estudo implica a contribuição com amostra de sangue e significa que a sua informação e resultados das análises laboratoriais serão analisados

juntamente com as informações recolhidas de outras pessoas, que integram um dos grupos de estudo. A sua identificação bem como os resultados das análises serão confidenciais.

QUAL É O OBJECTIVO DESTA ESTUDO?

A vitamina D pode ser adquirida através da dieta mas, a principal fonte desta vitamina é a sua síntese cutânea após a exposição solar. Por esta razão, a vitamina D é popularmente conhecida como “a vitamina do Sol”.

Com este estudo pretende-se verificar se existe uma correlação entre baixos níveis de vitamina D e as doenças cardiovasculares. Para isso, pretende-se determinar os níveis séricos de vitamina D em indivíduos, de ambos os sexos, com doença cardiovascular pré-estabelecida e também em indivíduos saudáveis, da mesma faixa etária.

Além disso, estando a Madeira numa posição geográfica que permite a exposição solar durante todo o ano, pretende-se avaliar se existe deficiência em vitamina D na população madeirense.

O QUE É QUE ESTE ESTUDO ENVOLVE?

Se aceitar participar neste estudo, ser-lhe-á pedido para responder a um breve questionário. Com este pretende-se obter informação sobre o seu estilo de vida (hábitos tabágicos, ingestão de álcool, atividade física, etc), o seu tipo de alimentação e história clínica (diabetes, doença cardíaca ou renal crónica, doença hepática, síndromes de malabsorção, etc). O questionário levará cerca de 10 minutos a responder.

Solicitar-se-á a sua contribuição com a recolha de uma pequena amostra de sangue, em jejum, para procedermos à determinação de alguns parâmetros bioquímicos de rotina e também à determinação dos níveis séricos de vitamina D. A recolha de sangue implicará a sua deslocação ao Serviço de Patologia Clínica e demorará cerca de 5 minutos.

Ser-lhe-ão avaliados vários parâmetros antropométricos (peso, altura, perímetro abdominal) e ser-lhe-á medida a sua tensão arterial e a sua pulsação.

A informação recolhida será armazenada juntamente com as informações de outras pessoas que participam neste estudo.

A QUEM É PEDIDO PARA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Foi-lhe pedido para participar neste estudo por ser uma pessoa saudável, sem patologia cardiovascular.

EXISTEM RISCOS NESTA PARTICIPAÇÃO?

Os riscos associados são unicamente os inerentes à recolha de sangue por venipunctura.

EXISTEM BENEFÍCIOS POR PARTICIPAR?

Não irá receber nenhum benefício imediato por participar neste estudo. No entanto, a informação recolhida no estudo poderá vir a beneficiar no futuro pessoas com doença cardiovascular.

QUEM TERÁ ACESSO À MINHA INFORMAÇÃO?

Não há identificação do seu nome em nenhum relatório. Todos os relatórios e materiais pertencentes a este estudo serão mantidos confidenciais. Contudo, não podemos garantir confidencialidade absoluta. A sua informação pessoal pode ser revelada se solicitada pelas vias legais. É também possível que a informação deste estudo seja divulgada e/ou publicada no futuro. Neste caso, a sua identidade será confidencial e não será revelada na divulgação. No final do estudo destruiremos todos os relatórios.

EXISTEM CUSTOS ENVOLVIDOS?

A sua participação não envolve quaisquer encargos ou despesas da sua parte, com exceção do tempo necessário para a recolha de sangue e para o preenchimento do questionário.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS?

A sua participação neste estudo é inteiramente voluntária. Pode recusar participar neste estudo ou desistir em qualquer altura. Se decidir não participar, isto não afetará o seu futuro tratamento, ou direitos de saúde e legais.

QUEM POSSO CONTACTAR SE TIVER ALGUMA QUESTÃO OU PREOCUPAÇÃO?

Se tiver alguma dúvida sobre os seus direitos como participante, pode contactar os números de telefone acima indicados.

11.2. ANEXO 2 – DOCUMENTO DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA INVESTIGAÇÃO ENTREGUE AOS PARTICIPANTES COM PATOLOGIA VASCULAR

DOCUMENTO DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA INVESTIGAÇÃO

NOME DO ESTUDO: A deficiência de vitamina D como fator de risco para a doença cardiovascular.

INVESTIGADOR: Fátima Maria Meneses Costa, Orientadora Prof. Doutora Helena Caldeira Araújo, Co-orientadora Dra Liliana Cardoso.

CONTACTOS:

Fátima Costa, Telefone 968627170, E-mail: fatimamcosta@sapo.pt

Prof. Doutora Helena Caldeira Araújo, Telefone 965012051, E-mail: caldeira@uma.pt

Dr^a Liliana Cardoso, Telefone 963614198, E-mail: lilianacardoso@hotmail.com

Recentemente, as baixas concentrações de vitamina D, um fator de risco bem conhecido para as doenças osteoporóticas, têm também sido relacionadas com a ocorrência de doenças crónicas tais como, a hipertensão, as doenças cardiovasculares, a diabetes, a doença renal crónica, as doenças neurodegenerativas, determinados tipos de cancro e, ainda, doenças autoimunes e imunossupressão.

No entanto, o papel da vitamina D na morbilidade e mortalidade por doença cardiovascular é um tema recente e que tem vindo a ser muito debatido. Alguns estudos epidemiológicos sugerem uma associação entre as baixas concentrações de vitamina D e os fatores de risco para doença cardiovascular mas, ainda não se conseguiu estabelecer uma relação de causa-efeito.

Foi-lhe pedido para participar num estudo de investigação, no âmbito de desenvolvimento de Projeto/Dissertação de Mestrado, que pretende ajudar a compreender melhor o papel da deficiência em vitamina D no desenvolvimento de doença cardiovascular. Para este estudo serão recrutados participantes com patologia cardiovascular confirmada através de exame clínico e angiografia coronária e indivíduos saudáveis, para efeitos de comparação dos níveis séricos desta vitamina. A sua participação neste estudo implica a contribuição com amostra de sangue e significa que a sua informação e resultados das análises laboratoriais serão analisados juntamente com as informações recolhidas de outras pessoas, que integram um dos grupos de estudo. A sua identificação bem como os resultados das análises serão confidenciais.

QUAL É O OBJECTIVO DESTE ESTUDO?

A vitamina D pode ser adquirida através da dieta mas, a principal fonte desta vitamina é a sua síntese cutânea após a exposição solar. Por esta razão, a vitamina D é popularmente conhecida como “a vitamina do Sol”.

Com este estudo pretende-se verificar se existe uma correlação entre baixos níveis de vitamina D e as doenças cardiovasculares. Para isso, pretende-se determinar os níveis séricos de vitamina D em indivíduos, de ambos os sexos, com doença cardiovascular pré-estabelecida e também em indivíduos saudáveis, da mesma faixa etária.

Além disso, estando a Madeira numa posição geográfica que permite a exposição solar durante todo o ano, pretende-se avaliar se existe deficiência em vitamina D na população madeirense.

O QUE É QUE ESTE ESTUDO ENVOLVE?

Se aceitar participar neste estudo, ser-lhe-á pedido para responder a um breve questionário. Com este pretende-se obter informação sobre o seu estilo de vida (hábitos tabágicos, ingestão de álcool, atividade física, etc), o seu tipo de alimentação e história clínica (diabetes, doença cardíaca ou renal crónica, doença hepática, síndromes de malabsorção, etc). O questionário levará cerca de 10 minutos a responder.

Solicitar-se-á a sua contribuição com a recolha de uma pequena amostra de sangue, em jejum, para procedermos à determinação de alguns parâmetros bioquímicos de rotina e também à determinação dos níveis séricos de vitamina D. A recolha de sangue implicará a sua deslocação ao Serviço de Patologia Clínica e demorará cerca de 5 minutos.

Ser-lhe-ão avaliados vários parâmetros antropométricos (peso, altura, perímetro abdominal) e ser-lhe-á medida a sua tensão arterial e a sua pulsação.

A informação recolhida será armazenada juntamente com as informações de outras pessoas que participam neste estudo.

A QUEM É PEDIDO PARA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Foi-lhe pedido para participar neste estudo por apresentar uma patologia cardiovascular.

EXISTEM RISCOS NESTA PARTICIPAÇÃO?

Os riscos associados são unicamente os inerentes à recolha de sangue por venipunctura.

EXISTEM BENEFÍCIOS POR PARTICIPAR?

Não irá receber nenhum benefício imediato por participar neste estudo. No entanto, a informação recolhida no estudo poderá vir a beneficiar no futuro pessoas com doença cardiovascular.

QUEM TERÁ ACESSO À MINHA INFORMAÇÃO?

Não há identificação do seu nome em nenhum relatório. Todos os relatórios e materiais pertencentes a este estudo serão mantidos confidenciais. Contudo, não podemos garantir confidencialidade absoluta. A sua informação pessoal pode ser revelada se solicitada pelas vias legais. É também possível que a informação deste estudo seja divulgada e/ou publicada no futuro. Neste caso, a sua identidade será confidencial e não será revelada na divulgação. No final do estudo destruiremos todos os relatórios.

EXISTEM CUSTOS ENVOLVIDOS?

A sua participação não envolve quaisquer encargos ou despesas da sua parte, com excepção do tempo necessário para a recolha de sangue e para o preenchimento do questionário.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS?

A sua participação neste estudo é inteiramente voluntária. Pode recusar participar neste estudo ou desistir em qualquer altura. Se decidir não participar, isto não afetará o seu futuro tratamento, ou direitos de saúde e legais.

QUEM POSSO CONTACTAR SE TIVER ALGUMA QUESTÃO OU PREOCUPAÇÃO?

Se tiver alguma dúvida sobre os seus direitos como participante, pode contactar os números de telefone acima indicados.

11.4. ANEXO 3 – DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Entendo que toda a informação derivada do estudo “A deficiência de vitamina D como fator de risco para a doença cardiovascular” é propriedade de SESARAM, E.P.E.. Dou o meu consentimento para que se proceda à recolha de sangue e que dados anónimos a meu respeito possam ser guardados e processados pela Mestranda Fátima Maria Meneses Costa, para fins de avaliação científica. Li (Foi-me lida) a informação mencionada acima. Entendo o significado desta informação, e as minhas perguntas foram satisfatoriamente respondidas. Tive tempo suficiente para decidir sobre a participação neste estudo. Venho por este meio consentir a minha participação e consentir na recolha, uso e revelação de informação. Irei receber uma cópia deste documento de consentimento informado assinada e datada.

Assinatura do participante

Data

Nome do Representante legal -Se aplicável

Data

Nome do Investigador

Data

11.5. ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO

Questionário

Indique a sua idade: _____ anos

Sexo:

- ☐ Feminino
- ☐ Masculino

HÁBITOS TABÁGICOS

1 – É fumador?

- ☐ Sim.
- ☐ Não, mas já fui fumador. (Há quanto tempo deixou de fumar? _____)
- ☐ Não.

2 – Se é fumador (ou ex-fumador) indique a quantidade de cigarros que fuma (ou fumava):

- ☐ Menos de 10 cigarros por dia.
- ☐ Entre 10 a 20 cigarros por dia.
- ☐ Mais de um maço por dia.
- ☐ Mais de 2 maços por dia.

CONSUMO DE BEBIDAS ALCOOLICAS

3 – Com que frequência consome bebidas alcoólicas?

- ☐ Todos os dias.
- ☐ Algumas vezes por semana.
- ☐ Algumas vezes por mês.
- ☐ Menos de uma vez por mês.
- ☐ Nunca.

4 – Qual a bebida alcoólica que consome com maior frequência?

- ☐ Vinho
- ☐ Cerveja
- ☐ Bebidas brancas
- ☐ Licores
- ☐ Cocktails/Shots

ALIMENTAÇÃO/NUTRIÇÃO

5 – Com que frequência consome os seguintes alimentos?

	Salmão	Sardinha	Atum	Ovo de galinha	Fígado de vaca
3 vezes por semana ou mais					
1 a 3 vezes por semana					
Algumas vezes por mês					
Menos de uma vez por mês					

6 – Toma atualmente, ou tomou nos últimos 12 meses, algum suplemento alimentar (incluindo suplementos de β -caroteno, vitamina A, vitamina E, vitamina D, etc.)?

- ☐ Não.
- ☐ Sim. Qual? _____

ATIVIDADE FÍSICA

7 – Com que frequência realiza atividades físicas de intensidade moderada (por exemplo: subir escadas, tarefas domésticas, jardinagem, dança, hidroginástica, caminhadas rápidas)?

- ☐ Todos os dias.
- ☐ 3 ou mais vezes por semana.
- ☐ 1 ou 2 vezes por semana.
- ☐ Menos de 1 vez por semana.

8 – Nos dias em que realiza atividades físicas de intensidade moderada, quanto tempo demora, em média (somando o tempo despendido com as diferente atividades realizadas)?

- ☐ Menos de 30 minutos.
- ☐ 30 minutos.
- ☐ Entre 30 minutos e 1 hora.
- ☐ Mais de 1 hora.

9 – Com que frequência realiza atividades físicas de intensidade vigorosa (por exemplo nadar, correr, ginástica aeróbica/step, jogar futebol, andar de bicicleta)?

- ☐ Todos os dias.
- ☐ 3 ou mais vezes por semana.
- ☐ 1 ou 2 vezes por semana.
- ☐ Menos de 1 vez por semana.

10 - Nos dias em que realiza atividades físicas de intensidade vigorosa, quanto tempo demora, em média (somando o tempo despendido com as diferente atividades realizadas)?

- ☐ Menos de 30 minutos.
- ☐ 30 minutos.
- ☐ Entre 30 minutos e 1 hora.
- ☐ Mais de 1 hora.

11 – Onde costuma praticar atividade física? (pode assinalar mais do que uma opção)

- ☐ Ginásios
- ☐ Piscinas
- ☐ Ar livre
- ☐ Casa
- ☐ Outro(s). Qual(ais)? _____

EXPOSIÇÃO SOLAR

12 – Assinale a opção que melhor combina com o seu tipo de pele:

- ☐ I – Muito clara – Queima com frequência. Nunca bronzeia.
- ☐ II – Clara – Queima com frequência. Às vezes bronzeia.
- ☐ III – Clara média – Às vezes queima. Bronzeia com frequência.
- ☐ IV – Escura média – Raramente queima. Bronzeia com frequência.
- ☐ V – Escura – Raramente queima. Bronzeia bastante.
- ☐ VI – Muito escura – Nunca queima. Totalmente pigmentada.

13 – Em média, quanto tempo passa exposto ao sol, de 2ª a 6ª feira?

- ☐ Menos de 30 minutos por dia.
- ☐ Entre 30 minutos e 1 hora por dia.
- ☐ Entre 1 a 2 horas por dia.
- ☐ Mais de 2 horas por dia.

14 – Em média quanto tempo passa exposto ao Sol durante o fim-de-semana (Sábado e Domingo)?

- ☐ Menos de 30 minutos por dia.
- ☐ Entre 30 minutos e 1 hora por dia.
- ☐ Entre 1 a 2 horas por dia.
- ☐ Mais de 2 horas por dia.

15 – Em que horário costuma expor-se ao Sol?

- ☐ Até às 11h00 e após as 16h00.
- ☐ Entre as 11h00 e as 16h00.
- ☐ Todos os horários.

DOENÇAS

16 – Tem alguma doença crónica (por exemplo diabetes, doença cardíaca, doença renal, doença hepática, esclerose múltipla, epilepsia, cancro, doença auto-imune, doença neurodegenerativa, etc.)?

- ☐ Não.
- ☐ Sim. Qual? _____

MEDICAMENTOS

17 – Indique todos os medicamentos que toma atualmente (incluindo cálcio, vitaminas, antiepilépticos, anticoagulantes, cortisona, etc.):

OBRIGADO PELA SUA COLABORAÇÃO!

11.6. ANEXO 5 – DADOS BIOMÉTRICOS E DADOS LABORATORIAIS DOS INDIVÍDUOS QUE CONSTITUÍRAM OS DOIS GRUPOS ESTUDADOS.

Tabela 13 - Características gerais dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género

	Controlos				Doentes			
	Total (n=100)	Feminino (n=11)	Masculino (n=89)	<i>P</i>	Total (n=94)	Feminino (n=30)	Masculino (n=64)	<i>P</i>
IMC	26,4 ± 3,6	27,0 ± 3,0	26,3 ± 3,6	0,402	28,4 ± 3,5	28,6 ± 4,1	28,2 ± 3,2	0,655
Perímetro abdominal (cm)	94,9 ± 9,7	92,3 ± 8,7	95,2 ± 9,9	0,332	101,2 ± 8,9	95,8 ± 10,8	101,8 ± 7,9	0,322
Pressão arterial sistólica (mmHg)	126,9 ± 7,7	128,0 ± 7,7	126,7 ± 7,7	0,574	136,1 ± 19,8	135,5 ± 23,2	136,4 ± 18,2	0,843
Pressão arterial diastólica (mmHg)	77,8 ± 6,1	77,6 ± 6,7	77,8 ± 6,1	0,960	79,8 ± 10,6	78,4 ± 10,7	80,4 ± 9,9	0,367
Frequência cardíaca (bt/min)	63,8 ± 11,1	67,4 ± 13,0	63,3 ± 10,9	0,340	65,2 ± 10,9	66,5 ± 10,3	64,6 ± 11,2	0,431

Os resultados estão apresentados em valores de média ± desvio padrão.

Valor de *P* obtido por aplicação do teste *t* de *Student* ($n \geq 30$) ou do teste de *Mann-Whitney* ($n < 30$), (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

Tabela 14 - Hemograma dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género

	Controlos				Doentes			
	Total (n=100)	Feminino (n=11)	Masculino (n=89)	P	Total (n=94)	Feminino (n=30)	Masculino (n=64)	P
Leucócitos 4,5-11 (10 ³ /μL)	6,8 ± 2,0	7,1 ± 2,9	6,8 ± 1,8 ^b	0,943	7,8 ± 2,0	7,8 ± 2,1	7,8 ± 1,9 ^b	0,896
Neutrófilos Homem: 1,5-7,1(10 ³ /μL) Mulher: 2,0-7,5 (10 ³ /μL)	3,8 ± 1,4	3,9 ± 1,8	3,8 ± 1,4 ^b	0,724	4,5 ± 1,6	4,4 ± 1,6	4,5 ± 1,6 ^b	0,859
Linfócitos 1,5-4,0 (10 ³ /μL)	2,2 ± 0,7	2,4 ± 1,2	2,2 ± 0,6 ^b	0,570	2,4 ± 0,8	2,5 ± 0,9	2,4 ± 0,7 ^b	0,435
Monócitos 0,0-1,0 (10 ³ /μL)	0,58 ± 0,21	0,56 ± 0,19	0,58 ± 0,22 ^b	0,726	0,63 ± 0,20	0,55 ± 0,15	0,67 ± 0,21 ^b	0,007
Eosinófilos 0,0-0,5 (10 ³ /μL)	0,23 ± 0,15	0,18 ± 0,09	0,23 ± 0,16	0,426	0,24 ± 0,18	0,21 ± 0,14	0,25 ± 0,20	0,311
Basófilos 0,0-0,2 (10 ³ /μL)	0,02 ± 0,05	0,05 ± 0,05	0,02 ± 0,05	0,029	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,04	0,865
Eritrócitos Homem: 4,50-6,50 (10 ⁶ /μL) Mulher: 3,80-5,80 (10 ⁶ /μL)	4,8 ± 0,3	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0,3	0,001	4,7 ± 0,4	4,5 ± 0,4	4,8 ± 0,4	0,001
Hemoglobina Homem: 13,0-18,0 (g/dL) Mulher: 11,5-16,0 (g/dL)	14,8 ± 0,9	13,8 ± 0,4	15,0 ± 0,9	0,000	14,2 ± 1,3	13,2 ± 1,4	14,7 ± 1,0	0,000
Hematócrito Homem: 40-54 (%) Mulher: 37-47 (%)	43,6 ± 2,7	40,9 ± 1,7	43,9 ± 2,6	0,000	41,9 ± 3,5	39,6 ± 3,7	43,0 ± 2,8	0,000
VCM 80-100 (fL)	91,4 ± 4,0	91,0 ± 3,5	91,5 ± 4,0	0,826	90,1 ± 4,4	88,6 ± 4,6	90,8 ± 4,2	0,022
HCM > 27 (pg)	31,1 ± 1,4	30,8 ± 1,2	31,2 ± 1,5	0,375	30,5 ± 1,7	29,6 ± 1,9	31,0 ± 1,5	0,000
CHCM 30 - 35 (g/dL)	34,0 ± 0,6	33,8 ± 0,6	34,1 ± 0,6	0,180	33,9 ± 0,8	33,4 ± 0,9	34,1 ± 0,7	0,000
RDW 11,5 - 14,5 (%)	13,2 ± 0,6	13,4 ± 0,5	13,2 ± 0,6 ^b	0,104	13,5 ± 1,1	13,8 ± 1,6	13,4 ± 0,7 ^b	0,138
Plaquetas 150 - 450 (10 ³ /μL)	214,0 ± 48,8	227,4 ± 61,8	212,3 ± 47,1	0,057	223,8 ± 62,5	243,7 ± 67,6	214,5 ± 58,1	0,034

Os resultados estão apresentados em valores de média ± desvio padrão. Valor de *P* obtido por aplicação do teste *t* de *Student* (n≥30) ou do teste de *Mann-Whitney* (n<30), (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

^bResultados com diferença estatisticamente significativa entre controlos e doentes do sexo masculino.

Tabela 15 - Avaliação da função renal e da função hepática dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género

	Controlos (n= 100)				Doentes (n=94)			
	Total (n=100)	Feminino (n=11)	Masculino (n=89)	<i>P</i>	Total (n=94)	Feminino (n=30)	Masculino (n=64)	<i>P</i>
Ureia 17 - 43(mg/dL)	36,9 ± 6,7	41,8 ± 7,5	36,3 ± 6,4	0,017	38,9 ± 11,6	39,4 ± 14,1	38,6 ± 10,4	0,802
Creatinina Homem: 0,81-1,44 (mg/dL) Mulher: 0,66-1,09 (mg/dL)	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,000	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,036
GPT Homem: <50 (U/L) Mulher: <35 (U/L)	27,4 ± 12,4	21,5 ± 10,0	28,1 ± 12,5	0,039	33,8 ± 30,6	27,0 ± 11,9	36,9 ± 35,8	0,143
GOT Homem: <50 (U/L) Mulher: <35 (U/L)	23,8 ± 6,6	21,5 ± 5,1	24,1 ± 6,8	0,102	27,7 ± 18,9	23,9 ± 6,6	29,5 ± 22,3	0,179
GGT Homem: <55 (U/L) Mulher: <38 (U/L)	33,8 ± 22,2	28,6 ± 21,0	34,5 ± 22,4 ^b	0,130	44,5 ± 45,1	37,7 ± 43,0	47,7 ± 46,0 ^b	0,320
Fosfatase Alcalina 30 - 120 (U/L)	75,1 ± 21,1	96,3 ± 25,0	72,5 ± 19,1 ^b	0,003	83,7 ± 25,5	87,2 ± 25,3	82,0 ± 25,6 ^b	0,361
Bilirrubina Total 0,3 - 1,20 (mg/dL)	0,9 ± 0,5	0,7 ± 0,17	0,9 ± 0,5	0,035	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,025
Proteínas Totais 60 - 83 (g/L)	72,3 ± 3,5	70,4 ± 3,1	72,6 ± 3,5	0,098	72,2 ± 4,2	71,0 ± 4,1	72,8 ± 4,2	0,064
Albumina 35 - 52 (g/L)	45,3 ± 2,4	43,8 ± 2,1	45,5 ± 2,4	0,012	44,1 ± 3,6	42,3 ± 3,3	45,0 ± 3,4	0,000

Os resultados estão apresentados em valores de média ± desvio padrão. Valor de *P* obtido por aplicação teste *t* de *Student* (n≥30) ou do teste de *Mann-Whitney* (n<30), (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

^bResultados com diferença estatisticamente significativa entre controlos e doentes do sexo masculino.

Tabela 16 - Testes bioquímicos dos indivíduos do grupo dos controlos e do grupo dos doentes, de acordo com o género

	Controlos				Doentes			
	Total (n=100)	Feminino (n=11)	Masculino (n=89)	<i>P</i>	Total (n=94)	Feminino (n=30)	Masculino (n=64)	<i>P</i>
Colesterol Total <200 (mg/dL)	218,3 ± 39,5	230,8 ± 27,1 ^a	216,7 ± 40,7 ^b	0,170	188,4 ± 47,2	194,8 ± 47,6 ^a	185,3 ± 47,1 ^b	0,368
Colesterol HDL <40 (mg/dL)	52,7 ± 12,6	65,1 ± 15,2 ^a	51,2 ± 11,5 ^b	0,002	46,2 ± 11,4	51,2 ± 12,1 ^a	43,9 ± 10,3 ^b	0,003
Colesterol LDL <130 (mg/dL)	139,4 ± 34,1	142,7 ± 24,9 ^a	139,0 ± 35,1 ^b	0,659	113,7 ± 40,3	116,2 ± 42,2 ^a	112,6 ± 39,7 ^b	0,691
Triglicéridos <150 (mg/dL)	139,3 ± 97,4	115,2 ± 52,6	142,3 ± 101,4	0,311	163,0 ± 126,4	153,4 ± 136,6	167,6 ± 122,1	0,614
APO B Homem: 60 - 140 (mg/dL) Mulher: 55 - 130 (mg/dL)	122,4 ± 31,2	126,4 ± 29,8	121,9 ± 31,5 ^b	0,545	107,5 ± 27,8	108,2 ± 28,6	107,2 ± 27,6 ^b	0,870
Lp(a) <30 (mg/dL)	32,2 ± 36,3	58,6 ± 57,4	28,9 ± 31,8 ^b	0,102	46,0 ± 47,1	43,4 ± 50,2	47,2 ± 46,0 ^b	0,718
Glicose 74 - 106 (mg/dL)	95,4 ± 10,3	93,2 ± 14,4 ^a	95,7 ± 9,7 ^b	0,285	129,66 ± 56,1	139,6 ± 71,1 ^a	125,0 ± 47,5 ^b	0,314
Insulina 1,9 - 2,3 (µUI/mL)	6,0 ± 3,8	5,9 ± 3,8	6,0 ± 3,8 ^b	0,864	9,71 ± 10,5	11,3 ± 15,4	9,0 ± 7,2 ^b	0,321
HOMA	1,4 ± 1,0	1,4 ± 0,9 ^a	1,4 ± 1,0 ^b	0,895	3,22 ± 3,9	4,0 ± 5,4 ^a	2,8 ± 2,8 ^b	0,259
HA1C 4,0 - 6,0 %	5,3 ± 0,4	5,5 ± 0,3 ^a	5,2 ± 0,4 ^b	0,013	6,59 ± 1,8	7,3 ± 2,4 ^a	6,3 ± 1,4 ^b	0,027
Fibrinogénio 238-498 mg/dL	376,9 ± 86,3	451,7 ± 68,0	367,7 ± 84,0 ^b	0,001	414,13 ± 88,2	438,4 ± 92,4	402,8 ± 84,6 ^b	0,068
PCRhs <1 mg/dL	0,26 ± 0,34	0,38 ± 0,38	0,24 ± 0,34	0,088	0,53 ± 1,17	0,62 ± 0,85	0,49 ± 1,30	0,614
HCY 5,0-15 µmol/L	12,3 ± 4,0	11,8 ± 3,9	12,4 ± 4,0	0,498	12,92 ± 3,98	12,5 ± 3,4	13,1 ± 4,2	0,439

Os resultados estão apresentados em valores de média ± desvio padrão. Valor de *P* obtido por aplicação teste *t* de *Student* (n≥30) ou do teste de *Mann-Whitney* (n<30), (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).

^aResultados com diferença estatisticamente significativa entre controlos e doentes do sexo feminino.

^bResultados com diferença estatisticamente significativa entre controlos e doentes do sexo masculino.

Tabela 17 - Testes bioquímicos em função do estado de vitamina D da população (divisão em 2 categorias de vitamina D)

	Controlos (n=100)			Doentes (n=94)		
	Deficiência ou Insuficiência (n= 59)	Suficiência (n= 41)	P	Deficiência ou Insuficiência (n= 78)	Suficiência (n= 16)	P
Colesterol Total <200 (mg/dL)	221,3 ± 41,2	211,5 ± 35,4	0,254	188,7 ± 49,3	186,5 ± 36,3	0,952
Colesterol HDL <40 (mg/dL)	51,8 ± 10,6	54,7 ± 16,3	0,367	46,8 ± 12,0	43,5 ± 7,7	0,290
Colesterol LDL <130 (mg/dL)	141,5 ± 36,0	134,8 ± 29,3	0,366	113,1 ± 42,0	117,1 ± 32,1	0,566
Triglicéridos <150 (mg/dL)	152,4 ± 112,6	110,1 ± 35,9	0,006	169,9 ± 135,6	129,5 ± 56,3	0,245
APO B Mulher: 55 - 130 (mg/dL) Homem: 60 - 140 (mg/dL)	134,8 ± 31,1 126,5 ± 32,3	104,1 ± 5,3 111,9 ± 27,4	0,134 0,041	108,7 ± 29,6 104,7 ± 27,3	103,7 ± 19,7 116,8 ± 27,6	0,744 0,196
Lp(a) <30 mg/dL	32,1 ± 35,5	32,2 ± 38,6	0,993	44,9 ± 47,3	51,3 ± 47,6	0,510
Glicose 74 - 106 (mg/dL)	95,9 ± 10,2	94,5 ± 10,6	0,521	132,7 ± 58,7	114,9 ± 39,5	0,376
Insulina 1,9 - 2,3 (μUI/mL)	6,0 ± 2,8	5,7 ± 5,4	0,712	9,8 ± 11,4	9,2 ± 5,1	0,553
HA1C 4,0 - 6,0 %	5,3 ± 0,4	5,3 ± 0,4	0,695	6,7 ± 1,9	6,0 ± 1,5	0,076
Fibrinogénio 238-498 mg/dL	375,7 ± 84,6	379,8 ± 91,3	0,825	414,9 ± 88,6	410,2 ± 89,2	0,577
PCRhs <1 mg/dL	0,25 ± 0,29	0,29 ± 0,43	0,558	0,56 ± 1,27	0,41 ± 0,48	0,770
HCY 5,0-15 μmol/L	12,9 ± 4,4	11,1 ± 2,7	0,036	12,7 ± 3,2	14,2 ± 6,7	0,706

Os resultados estão apresentados em valores de média ± desvio padrão.

Valor de *P* obtido por aplicação do teste *t* de *Student* (n≥30) ou do teste de *Mann-Whitney* (n<30), (consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *P* inferiores a 0,05).