

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**POLIMORFISMOS DO GENE DA GLOBULINA CARREADORA DE  
VITAMINA D E VARIÁVEIS CLÍNICAS, HORMONAIS E METABÓLICAS EM  
CRIANÇAS E EM MULHERES ADULTAS COM E SEM A SÍNDROME DOS  
OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

**BETÂNIA RODRIGUES DOS SANTOS**

**Porto Alegre  
Outubro de 2015**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Polimorfismos do gene da Globulina Carreadora de Vitamina D e variáveis  
clínicas, hormonais e metabólicas em crianças e em mulheres adultas  
com e sem a Síndrome dos Ovários Policísticos**

Betânia Rodrigues dos Santos  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Poli Mara Spritzer

Tese de doutorado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia,  
UFRGS, como requisito parcial para  
a obtenção do grau de doutor.

Porto Alegre  
Outubro de 2015

Dedico esse trabalho ao meu avô Isaac Mendonça Rodrigues (*in memoriam*), que dentre tantos outros foi meu principal exemplo e incentivador.

“Vô, sei que de onde estiveres estás acompanhando esse momento, me aplaudindo. Participando, me enviando coragem e força para superar qualquer obstáculo.”

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família. Meu esposo, Rodrigo Rickes Azevedo, por ser o meu incentivador diário, em todo o período que se estende desde a iniciação científica, por não me deixar desanimar, por compreender os meus momentos de ausência e principalmente por me mostrar que as coisas podem ser mais simples e bonitas do que parecem. Agradeço a minha filha, Ana Laura, que chegou para alegrar minha vida no final dessa jornada, tão pequena e já participando de forma intensa desse processo. Fazendo com que minha energia se revigorasse diante de seu sorriso sincero e olhar puro.

Agradeço a minha mãe Patricia, pai Antônio Carlos, Irmãos Isaac, Camila, Julia e Laura, cunhada Ana Claudia, meus sobrinhos Éric e Lucca, meu avós Carmem e Isaac (*in memoriam*) e, Enilda e Ágar (*in memoriam*). Agradeço por todo amor, incentivo, compreensão e por estarem ao meu lado, mesmo que em pensamento, em todos esses momentos importantes.

Aos meus tios, João Egídio e Sara Gamboa, e as primas Jeanne, Tatiana e Juanita por terem me acolhido de forma tão carinhosa e confortante na capital gaúcha. Por terem sido minha segunda família, por terem me acompanhado e participado de todas as minhas angústias e alegrias.

Agradeço aquelas que são minhas irmãs por opção, Alinca da Fonseca, Liziane da Silva e Marília Mesemburg, agradeço pela amizade, pelas horas de descontração e desafogo que me proporcionaram, pelo companheirismo e pelas palavras de apoio e conforto durante os momentos mais desgastantes.

Um agradecimento muito especial a minha orientadora D<sup>ra</sup>. Poli Mara Spritzer. Pelos ensinamentos, sugestões e, principalmente, pela inquietude em busca de novos conhecimentos, que acaba por contagiar todos aqueles que estão a sua volta.

Agradeço imensamente a amiga e colega Sheila Lecke pela dedicação e comprometimento com as análises hormonais realizadas nesse estudo.

Aos amigos e colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Em especial aos amigos e colegas de laboratório Débora Morsch, Ramon Bossardi, Larissa Paixão e Cíntia Tusset, por todos os ensinamentos, pelo apoio e colaboração no trabalho.

A equipe de apoio do nosso grupo de pesquisa, Míriam Sant'Helena e Natália Goulart, pelo auxílio e disponibilidade.

Um agradecimento especial ao Dr. Luis Paulo Gomes Mascarenhas e a Dr<sup>a</sup> Margaret C. S. Boguszewski pela imensa colaboração científica que dispuseram para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia UFRGS, por sempre atenderem as minhas necessidades da melhor maneira possível.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de estudar na instituição.

A Capes, pela bolsa de estudo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Síntese e metabolismo da Vitamina D.....	<b>14</b>
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática do mecanismo de ação do Receptor de Vitamina D (VDR).....	<b>15</b>
<b>Figura 3</b>	Hibridização das sondas e emissão de fluorescência durante a reação de PCR em Tempo Real.....	<b>30</b>
<b>Figura 4</b>	Genotipagem do polimorfismo rs4588 do gene da <i>DBP</i> por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.....	<b>31</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Métodos e valores de referência dos testes bioquímicos e hormonais.....	<b>28</b>
-----------------	---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

A4: Androstenediona  
CC: Circunferência da Cintura  
DBP: Proteína Transportadora de Vitamina D  
EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg  
FSH: Hormônio Folículo Estimulante  
HDL: Lipoproteína de Alta Densidade  
HOMA: *Homeostasis Model Assessment*  
IAL: Índice de Androgênios Livres  
IGF: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina  
IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1  
IMC: Índice de Massa Corporal  
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade  
LH: Hormônio Luteinizante  
PAD: Pressão Arterial Diastólica  
PAS: Pressão Arterial Sistólica  
PCOS: Síndrome dos Ovários Policísticos  
PP: Pubarca Precoce  
PTH: Paratormônio  
RI: Resistência Insulínica  
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real  
RXR: Receptor X do ácido retinóico  
S-DHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona  
SHBG: Proteína Transportadora dos Hormônios Sexuais  
SMet: Síndrome metabólica  
SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único  
ToTG: Teste oral de Tolerância à Glicose  
TSH: Hormônio Estimulante da Tireoide  
UVB: Ultravioleta-B  
VDR: Receptor de Vitamina D  
25(OH)D: 25-hidroxivitaminaD  
25(OH)D<sub>3</sub>: 25-hidroxivitaminaD<sub>3</sub>  
25(OH)D<sub>2</sub>: 25-hidroxivitaminaD<sub>2</sub>  
1,25(OH)<sub>2</sub>D: 1,25-dihidroxivitaminaD  
24(OH)D: 24-hidroxivitaminaD  
17OHP: 17-hidroxiprogesterona



## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
Vitamina D .....	12
Ações extra esqueléticas da Vitamina D.....	16
Crianças, adolescentes e Vitamina D .....	17
Síndrome dos Ovários Policísticos e Vitamina D .....	18
Proteína Carreadora de Vitamina D (DBP) .....	19
2. OBJETIVOS .....	22
3. METODOLOGIA.....	24
População .....	24
Avaliação clínica e antropométrica.....	25
Avaliação hormonal e metabólica .....	27
Análise Molecular.....	28
Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS .....	33
Artigo 1: Variations in the vitamin D binding protein (DBP) gene are related to lower 25-hydroxyvitamin D levels in healthy girls: a cross-sectional study....	33
Artigo 2: Associations between Vitamin D Binding Protein gene variants, vitamin D levels and metabolic syndrome in PCOS women from Southern Brazil .....	50
5. DISCUSSÃO .....	72
6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERÊNCIAS.....	78

## APRESENTAÇÃO

Essa Tese de doutorado está organizada em seis tópicos, introdução, objetivos, metodologia, resultados, discussão e conclusões.

A introdução traz uma breve revisão sobre a Vitamina D, suas ações clássicas e não clássicas. Traz também uma abordagem sobre esse hormônio em meninas e adolescentes e em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos. Por fim, a introdução descreve a Proteína Carreadora de Vitamina D e polimorfismos no seu gene. Após a introdução são apresentados os objetivos do trabalho.

Na metodologia descreve-se o detalhamento dos procedimentos experimentais em relação ao arrolamento amostral, a avaliação clínica, hormonal e metabólica, a avaliação molecular e a análise estatística empregada.

O quarto tópico trata dos resultados obtidos. Esse está organizado em dois estudos. O primeiro artigo já publicado que compila dados sobre a associação de polimorfismos no gene da DBP com níveis séricos de 25(OH)D em uma amostra de meninas aparentemente saudáveis. O segundo artigo teve por objetivo avaliar os níveis séricos de vitamina D e polimorfismos no gene da DBP em uma população de mulheres com PCOS e controles e buscar relação desses com Síndrome Metabólica e seus componentes.

O quinto tópico abrange a discussão dos resultados obtidos e o sexto tópico traz as conclusões referentes aos dois artigos.

## RESUMO

**Introdução/objetivos:** A deficiência de Vitamina D tem sido descrita com uma epidemia mundial, afetando diversas populações, incluindo adolescentes e mulheres acometidas pela Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS). Na circulação, a Vitamina D se liga a Proteína Carreadora de Vitamina D (DBP), que é a principal proteína envolvida no seu transporte. Os objetivos dessa Tese foram determinar: 1) a distribuição dos genótipos e haplótipos dos polimorfismos rs4588 e rs7041 do gene que codifica a DBP e investigar a associação entre essas variantes genéticas e seus haplótipos com níveis séricos de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) em meninas do sul do Brasil; 2) a distribuição dos genótipos e haplótipos dos polimorfismos rs2282679, rs4588 e rs7041 do gene que codifica a DBP e investigar a associação desses polimorfismos com PCOS e síndrome metabólica (SMet).

**Métodos:** estudo 1: estudo transversal incluindo 198 meninas aparentemente saudáveis, com idade entre 10 e 18 anos. As participantes foram genotipadas para os polimorfismos rs4588 e rs7041 por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica. Estudo 2: Estudo transversal incluindo 291 mulheres (191 PCOS e 100 mulheres não hirsutas e com ciclos ovulatórios regulares). A síndrome metabólica foi definida segundo os critérios do *Joint Scientific Statement*. As participantes foram genotipadas para os polimorfismos rs2282679, rs4588 e rs7041 por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.

**Resultados:** estudo 1: a média de idade e o percentil do IMC foram  $13,17 \pm 1,74$  anos e  $57,81 \pm 29,03$ , respectivamente. Níveis circulantes suficientes de 25(OH)D ( $\geq 30$  ng/mL) foram observados em 9,1% das meninas, níveis insuficientes (20-29.9 ng/mL) foram encontrados em 59.6% e deficientes ( $< 20$  ng/mL) em 31,3%. O genótipo AA do polimorfismo rs4588, o genótipo TT do rs7041 e o haplótipo CT-AT/AT-AT foram significativamente associados com menores níveis de 25(OH)D. Estudo 2: mulheres com PCOS eram mais jovens e apresentaram maior IMC, circunferência da cintura, pressão arterial, resistência insulínica, triglicerídeos, escore de Ferriman-Galwey e testosterona total, bem como menor HDL, quando comparadas aos controles. A prevalência de síndrome metabólica na PCOS e controles foi de 26,5% e 4,8%, respectivamente. Nenhum polimorfismo ou haplótipo foi associado com PCOS, mas o genótipo TT do SNP rs7041 foi relacionado com níveis mais baixos de vitamina D. Uma maior frequência do genótipo TT do SNP rs7041 foi observada nas PCOS com síndrome metabólica e esse mesmo genótipo foi mais frequente nas PCOS com níveis de glicose  $>100$ mg/dL.

**Conclusões:** Os genótipos da DBP podem ser relacionados com a susceptibilidade para baixos níveis de 25(OH)D em crianças e adolescentes do sexo feminino. Esses polimorfismos não foram associados com PCOS, mas os resultados sugerem a associação entre o genótipo TT do SNP rs7041 e síndrome metabólica e glicose em jejum em mulheres com PCOS do sul do Brasil.

## ABSTRACT

**Background/Aims:** Vitamin D deficiency has been recognized as a worldwide epidemic, affecting several populations, including adolescent and Polycystic Syndrome Ovary (PCOS). In the circulation, vitamin D is bound to vitamin D binding protein (DBP), which is the main protein involved on vitamin D transport. The aims this work were: 1) to determine the genotype and haplotype distribution of the rs4588 and rs7041 polymorphisms of the *DBP* gene encoding vitamin D binding protein (DBP) and to investigate the associations between these gene variants and their haplotypes with 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels in girls from South Brazil. 2) to determine the genotype and haplotype distribution of the rs2282679, rs4588 and rs7041 polymorphisms of the *DBP* gene and to investigate the associations between these gene variants and their haplotypes with PCOS and metabolic syndrome.

**Methods:** study 1: Cross-sectional study including 198 apparently healthy girls aged 10 to 18 years. Plasma levels of 25(OH)D were assessed by radioimmunoassay. Participants were genotyped for rs4588 and rs7041 by real-time PCR, with allelic discrimination assays. Study 2: Cross-sectional study including 291 women (191 with PCOS and 100 non-hirsute women with regular ovulatory cycles). Metabolic syndrome and the cutoffs for its isolated components were defined in accordance with the Joint Scientific Statement. Participants were genotyped for rs2282679, rs4588 and rs7041 by real-time PCR, with allelic discrimination assays.

**Results:** study 1: Mean chronological age and BMI percentile were  $13.17 \pm 1.74$  years and  $57.81 \pm 29.03$ , respectively. Sufficient circulating 25(OH)D levels ( $\geq 30$  ng/mL) were found in 9.1% of the overall group, insufficient levels (20-29.9 ng/mL) in 59.6%, and deficient levels ( $< 20$  ng/mL) in 31.3%. The AA genotype of rs4588, TT genotype of rs7041 and CT-AT/AT-AT (GC 1f-2/2-2) haplotypes were significantly associated with lower 25(OH)D levels. Study 2: Women with PCOS were younger and had significantly higher BMI, waist circumference, blood pressure, insulin resistance, triglycerides, Ferriman and total testosterone, as well as a lower HDL-c than control group. The prevalence of metabolic syndrome in PCOS and controls were 26.5% and 4.8%, respectively. Neither the polymorphisms nor their haplotypes were associated with PCOS, moreover the TT genotype of rs7041 was associated with lower vitamin D levels. A higher frequency of TT genotype of rs7041 was found in PCOS with metabolic syndrome and this same genotype was more frequent in PCOS with glucose  $> 100$ mg/dL.

**Conclusions:** The *DBP* gene genotype may be related to the susceptibility to low 25(OH)D levels in female children and adolescents. These polymorphisms were not related to PCOS, but the results suggest an association between the TT genotype of SNP rs7041 and metabolic syndrome and fasting glucose levels in PCOS women from southern Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

### Vitamina D

A vitamina D, é um hormônio esteroide que pode ser obtido através da dieta e, principalmente, através da exposição solar. A expressão “Vitamina D” engloba os dois tipos descritos desse hormônio, a Vitamina D<sub>2</sub> e a Vitamina D<sub>3</sub>. Quando obtidas a partir da dieta, são absorvidas pelo organismo através de sua incorporação em quilomicrons. Porém a Vitamina D<sub>3</sub>, que também é sintetizada na pele através da exposição aos raios ultravioleta-B (UVB), é a principal representante desse esteróide (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso, Brown et al. 2005, Holick 2007, Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008, Querales, Cruces et al. 2010).

Durante a exposição aos raios UVB, ocorre na pele a conversão do 7-deidrocolesterol em Pré-vitamina D<sub>3</sub>, que é rapidamente convertida em Vitamina D<sub>3</sub>, em um processo dependente de calor. Exposição solar excessiva promove a degradação da Pré-vitamina D<sub>3</sub> e da Vitamina D<sub>3</sub> em subprodutos inativos, sendo considerado um mecanismo de proteção contra a possível intoxicação (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso, Brown et al. 2005, Holick 2007, Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008, Querales, Cruces et al. 2010).

No fígado, ocorre a reação de hidroxilação no carbono 25 da Vitamina D, catalisada pela enzima 25-hidroxilase, que a converte em 25-hidroxivitaminaD (25(OH)D), principal metabólito circulante desse hormônio. A segunda reação de hidroxilação ocorre predominantemente no rim, por ação da 1 $\alpha$ -hidroxilase, que converte a 25(OH)D no metabólito ativo 1,25-dihidroxivitaminaD (1,25(OH)<sub>2</sub>D) (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso, Brown et al. 2005, Holick 2007, Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008, Querales, Cruces et al. 2010).

No rim, a 25(OH)D pode sofrer a ação da enzima 24-hidroxilase, dando origem a 24-hidroxitaminaD (24(OH)D), produto metabolicamente inativo que é catabolizado. Uma vez sintetizada, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D é transportada pela circulação, através de sua ligação a Proteína Transportadora de Vitamina D (DBP) (que será abordada mais adiante nesse capítulo), aos órgãos e tecidos onde irá exercer suas funções. A produção da 1,25(OH)<sub>2</sub>D é principalmente regulada pelo Paratormônio (PTH) e pelos níveis séricos de cálcio e fósforo (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso, Brown et al. 2005, Holick 2007, Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008, Querales, Cruces et al. 2010).

A principal função da Vitamina D no organismo é manter as concentrações intra e extracelulares de cálcio e fósforo em concentrações fisiológicas adequadas. Para isso atua principalmente no intestino, aumentando a absorção desses íons, e em menor proporção, no osso, estimulando o processo de ressorção óssea (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso, Brown et al. 2005, Holick 2007, Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008, Querales, Cruces et al. 2010).

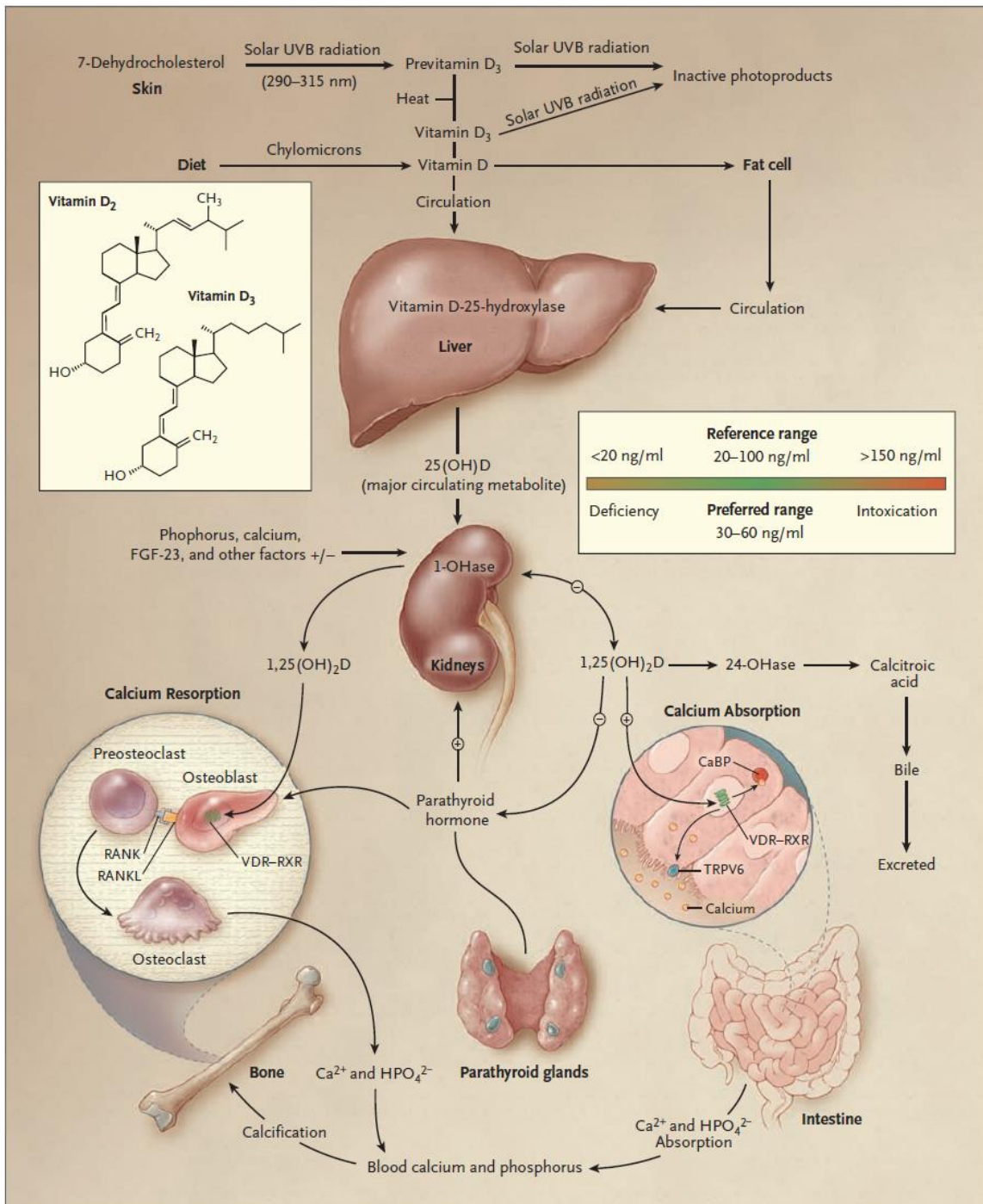


Figura 1: Síntese e metabolismo da Vitamina D (Holick, 2007).

As funções da 1,25 (OH)<sub>2</sub>D são mediadas pelo seu receptor (VDR). Ele pertence à família dos receptores de hormônios esteróides/tireoideos (Brumbaugh and Haussler 1974). Trata-se de um receptor intracelular cuja proteína é composta por três regiões distintas: um domínio N-terminal DNA-ligante com dois dedos de zinco, um domínio ativo C-terminal ligante e uma região extensa e não estruturada que liga os dois domínios funcionais da proteína (região de

dobradiça). A região C-terminal é a mais complexa e possui 12 cadeias  $\alpha$ -hélice. Coletivamente esses domínios do VDR criam uma macromolécula receptiva aos níveis fisiológicos de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , capaz de direcionar a maquinaria de regulação celular para grupos de genes que produzem as proteínas necessárias aos efeitos desse hormônio (Pike and Meyer 2010).

O mecanismo de ação do VDR baseia-se no reconhecimento de uma sequência específica na fita de DNA, chamada de elemento responsivo à Vitamina D. Esse sítio de ligação, existente em inúmeros genes, permite o reconhecimento e acoplamento do VDR, após sua heterodimerização com receptor X do ácido retinóico (RXR) (Mangelsdorf and Evans 1995, Haussler et al. 1998), que por sua vez irá estimular ou inibir transcrição dos genes de interesse (figura 2). Uma de suas principais ações é a estimulação da transcrição de proteínas transmembrana formadoras de canais de cálcio, promovendo a elevação da concentração intracelular desse íon, via canais de cálcio voltagem-dependentes (Sergeev and Rhoten 1995).

Desde a década de 80 já é conhecido que os níveis de expressão do gene do VDR são regulados pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Hoje soma-se a esse conhecimento que a regulação do VDR também é feita por uma grande variedade de outros hormônios, incluindo o PTH, Ácido Retinóico e glicocorticóides (Pike and Meyer 2010).

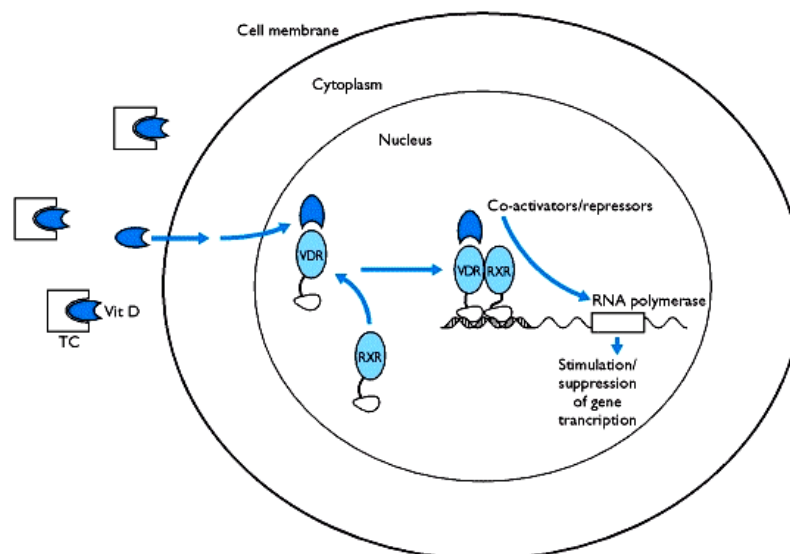


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação do Receptor de Vitamina D (VDR).



### **Ações extra esqueléticas da Vitamina D**

Inúmeras evidências indicam que a Vitamina D pode atuar em diversos órgãos e tecidos, desempenhando funções que vão além de seu clássico envolvimento no metabolismo do cálcio. Esse hormônio desempenha um importante papel sobre a secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, e tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* foi verificado que ele é essencial para a liberação em níveis normais de insulina em resposta à glicose e para a manutenção da tolerância à glicose (Pittas, Lau et al. 2007, Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008, Alvarez and Ashraf 2010, Takiishi, Gysemans et al. 2010).

A ação da Vitamina D sobre as células  $\beta$ -pancreáticas pode ser mediada pela ligação da sua forma ativa ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) ao receptor de Vitamina D (VDR), ou, através da conversão da  $25(\text{OH})\text{D}$  em  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  pela ação da  $1\alpha$ -hidroxilase presente nas células  $\beta$ -pancreáticas (Bland, Markovic et al. 2004, Pittas, Lau et al. 2007, Pittas and Dawson-Hughes 2010). Em estudo *in vitro*, com linhagem de células  $\beta$ -pancreáticas, foi demonstrado que esse esteroide promove a elevação da concentração do cálcio intracelular via canais de cálcio voltagem-dependentes (Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008, Querales, Cruces et al. 2010). Como consequência, o principal mecanismo de ação da Vitamina D sobre a síntese e liberação por exocitose da insulina, está possivelmente relacionado com a ativação de endopeptidases cálcio-dependentes que promovem a clivagem que facilita a conversão da molécula de pró-insulina em insulina. Além disso, a elevação do cálcio citoplasmático é importante no metabolismo da glicose nas células  $\beta$ -pancreáticas, o qual desempenha relevante papel na sinalização da concentração de glicose circulante (Boucher 1998, Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008).

Há alguns anos vêm se estudando o papel de regulação exercida pela Vitamina D sobre a biossíntese de hormônios esteroides, em especial dos estrogênios. Muitos estudos têm demonstrado que a Vitamina D pode regular a expressão e atividade de enzimas chaves envolvidas na biossíntese desses hormônios. Ao que parece, a ativação do VDR pela ligação da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  promove um aumento da expressão da aromatase (enzima que catalisa a síntese de estrogênios a partir de um precursor androgênico) em cultura celular de osteoblastos humanos e em modelos animais bloqueados para o VDR (Kinuta, Tanaka et al. 2000, Enjuanes, Garcia-Giralt et al. 2003, He, Cheng et al. 2010).

Porém, de forma interessante, em 2010 foi demonstrado em estudo com modelos *in vitro* e *in vivo* que a vitamina D diminui a expressão da aromatase em células mamárias humanas e pré-adipócitos de ratos e, que promove uma modesta elevação na expressão da aromatase em tecido ovariano cancerígeno (Krishnan, Swami et al. 2010). Esses dados em conjunto, sugerem que a Vitamina D pode regular a expressão da aromatase de forma seletiva, de acordo com o tecido de atuação hormonal.

### **Crianças, adolescentes e Vitamina D**

Não existe um consenso sobre os níveis ideais de vitamina D circulante. No entanto, através de estudos que avaliaram as relações entre níveis séricos de 25(OH)D, PTH e absorção de cálcio intestinal, pode-se observar que a maioria dos pesquisadores adotaram como valores de referência aqueles revisados por Holick em 2007. São referidos como status de deficiência de 25(OH)D níveis menores que 20ng/mL (50nmol/L), insuficiência de 20 a 29 ng/mL (52 a 72 nmol/L) e, como suficiente, níveis séricos iguais ou superiores a 30ng/mL (75nmol/L) (Holick 2007).

Existem vários estudos que buscaram analisar os níveis de 25(OH)D em população pediátrica e adolescente. Dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) publicados em 2008 e 2009, revelaram que 61% da população pediátrica americana apresenta níveis de Vitamina D entre 15 e 29ng/mL, e que esses índices de deficiência aumentaram ao longo dos anos (Melamed and Kumar 2010).

A prevalência de deficiência de Vitamina D é similar em várias regiões do mundo. Na Índia chamou a atenção o fato de que 81,5% das crianças saudáveis da zona rural e urbana apresentaram deficiência em 25(OH)D (Harinarayan, Ramalakshmi et al. 2008). Na Noruega, ao se avaliar mães e filhos imigrantes do Paquistão, Turquia e Somália, foi observado que 40% das crianças apresentavam níveis séricos de Vitamina D abaixo de 20ng/mL (Madar, Stene et al. 2009). Somam-se a esses dados, o achado de que 39% das crianças, entre 4 e 5 anos de idade, do norte da Jordânia também apresentam deficiência desse esteroide (Gharaibeh and Stoecker 2009). Dados de países da América do Sul são escassos, porém um estudo realizado com indivíduos brasileiros revelou que

62,1% de 136 adolescentes magros, entre 16 e 20 anos, da zona rural do estado de São Paulo apresentam insuficiência de Vitamina D, sendo que entre as meninas a frequência é de 60,6% (Peters, dos Santos et al. 2009). Na região sul do Brasil, foi relatado em meninas aparentemente saudáveis, entre 7 e 18 anos, que a prevalência de insuficiência/deficiência de Vitamina D chega a 90,3% (Santos, Mascarenhas et al. 2012).

Arabi e colaboradores descreveram que a hipovitaminose D atinge de 3 a 74% da população pediátrica e adolescente de países em desenvolvimento. Além disso, os principais fatores de risco para a ocorrência dos baixos níveis de Vitamina D nesses países são pertencer ao sexo feminino e a grupos específicos, como neonatos, pré-escolares ou idosos. A obesidade também pode ser um fator que predispõe à hipovitaminose D (Arabi, El Rassi et al. 2010).

### **Síndrome dos Ovários Policísticos e Vitamina D**

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é uma condição heterogênea, primariamente caracterizada por anovulação crônica e hiperandrogenismo (Asuncion, Calvo et al. 2000, Azziz, Woods et al. 2004). A prevalência de PCOS varia de acordo com o critério diagnóstico utilizado, com estimativas de 9% de acordo com o critério do *National Institutes of Health criteria* até 18% de acordo com o critério de *Rotterdam* (Asuncion, Calvo et al. 2000, Azziz, Woods et al. 2004, March, Moore et al. 2010). Mulheres com PCOS também possuem características psicológicas significativas, incluindo aumento da ansiedade, depressão e piora da qualidade de vida (Teede, Deeks et al. 2010). Além disso, frequentemente essas mulheres desenvolvem disfunções metabólicas, incluindo RI, obesidade e síndrome metabólica (SM) (Di Domenico, Wiltgen et al. 2013, Graff, Mario et al. 2013, Aydin, Hassa et al. 2015).

Como já elencado nesse texto, a vitamina D parece ter uma participação importante na biossíntese dos hormônios sexuais e no metabolismo da glicose. Pesquisadores sugerem que a hipovitaminose D possa ser um fator de risco para o desenvolvimento de quadros de doenças crônicas (Palomer, Gonzalez-Clemente et al. 2008). Além disso, é demonstrado que os níveis de vitamina D são inferiores em indivíduos com sobrepeso/obesidade, inversamente associados com pressão arterial, RI, insulina e glicose em jejum (Reinchr, de

Sousa et al. 2007, Alemzadeh, Kichler et al. 2008, Ashraf, Alvarez et al. 2009, Reis, von Muhlen et al. 2009, Delvin, Lambert et al. 2010, Johnson, Nader et al. 2010).

Ainda, investigações indicam que pacientes com hirsutismo (Glintborg, Andersen et al. 2005), PCOS (Wehr, Trummer et al. 2011) e pubarca precoce (Santos, Mascarenhas et al. 2012) apresentam níveis séricos de vitamina D inferiores quando comparadas a controles. Em pacientes com PCOS as evidências também sugerem que exista associação entre níveis mais baixos de vitamina D com RI, perfil lipídico, IMC, obesidade central e Síndrome Metabólica (Hahn, Haselhorst et al. 2006, Wehr, Pilz et al. 2009, Yildizhan, Kurdoglu et al. 2009, Irani and Merhi 2014). Quanto aos hormônios sexuais, nas PCOS foram já relatadas correlações negativas entre os níveis séricos de Vitamina D e Testosterona Total, SDHEA e escore de hirsutismo (Hahn, Haselhorst et al. 2006, Wehr, Pilz et al. 2009, Yildizhan, Kurdoglu et al. 2009). Também, em nível ovariano, parece que a vitamina D tem efeito importante sobre a foliculogênese nas PCOS (Irani and Merhi 2014).

Agregando esses dados, uma recente meta-análise demonstrou que os níveis séricos de vitamina D se relacionam com alterações metabólicas e hormonais em mulheres com PCOS. Entre essas alterações, aquelas mulheres com deficiência de vitamina D apresentam maior risco para alterações nos valores de glicemia (He, Lin et al. 2015). No que se refere a SMet, sabe-se que a concentração de vitamina D apresenta-se inferior em mulheres com PCOS e SMet comparada aquelas sem SMet e que os níveis de vitamina D diminuem conforme se somam fatores de risco para SMet (Joham, Teede et al. 2015).

### **Proteína Carreadora de Vitamina D (DBP)**

A DBP é um membro da família do gene da albumina. É principalmente sintetizada no fígado, suas concentrações plasmáticas variam 4 a 8 $\mu$ mol/L e sua meia-vida é de 2,5 - 3 dias. A DBP é encontrada no plasma, fluido cerebrospinal e na superfície de muitos tipos de células (Speeckaert, Huang et al. 2006). A DBP é reconhecida com sendo multifuncional, pois além do envolvimento no transporte dos metabolitos da vitamina D, a DBP é participa em muitas funções importantes, incluindo o sequestro de actina, a modulação de respostas imunes

e inflamatórias, a ligação de ácidos graxos e controle de desenvolvimento ósseo (Speeckaert, Speeckaert et al. 2014).

Acredita-se que polimorfismos possam contribuir para alterações na afinidade de DBP pelos metabólitos da vitamina D e ainda influenciar nas ações fisiológicas desse hormônio. Dentre os polimorfismos descritos para o gene da DBP (também conhecido como GRD3; VDBG; VDBP; DBP/GC; GC) (ID: 2638), localizado no cromossomo 4q12-q13 e composto por 13 exons e 12 introns (Witke, Gibbs et al. 1993), os mais estudados são rs7041, rs4588 e o rs2282679.

Os polimorfismos rs7041 e rs4588 estão localizados no exon 11 e são do tipo missense (quando a presença do polimorfismo provoca alteração no aminoácido codificado). O primeiro está localizado na posição 72618334 do cromossomo, corresponde a troca de uma Timina por uma Guanina (**GAT** → **GAG**) e promove a mudança de um Ácido Aspártico para Ácido Glutâmico no códon 416. O segundo encontra-se na posição 72618323 do cromossomo, corresponde a troca de uma Citosina por uma Adenina (**ACG** → **AAG**) e provoca a alteração de uma Treonina para uma Lisina no códon 420 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)). Esses dois polimorfismos são a base genética para os três principais fenótipos da DBP, denominados Gc1 *fast* (Gc1F), Gc1 *slow* (Gc1S), e Gc2 (Speeckaert, Huang et al. 2006). Essas variantes diferem pela sequência de aminoácidos bem como pela afinidade de ligação a Vitamina D e seus metabólitos, com a variante GC-1f apresentando maior afinidade e a Gc2 apresentando menor afinidade (Arnaud and Constans 1993, Chun, Adams et al. 2008, Chun 2012). A importância biológica dessa diferença de afinidade encontrada entre os fenótipos da DBP não está totalmente elucidada, pois proporcionalmente verifica-se uma quantidade muito maior de DBP circulante do que de Vitamina D. Ainda, sabe-se que pequenas quantidades de 25(OH)D circulam na forma livre e que a maior parte da DBP circula sem estar transportando esse ligante (Chun 2012).

Já o polimorfismo rs2282679 é intrônico, não interferindo na composição de aminoácidos da proteína, e localiza-se na posição 71742666 do cromossomo, corresponde a troca de uma Timina por uma Citosina ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)).

São escassos na literatura trabalhos que avaliaram esses SNPs em relação a parâmetros metabólicos, seja em populações saudáveis ou afetadas

por alguma patologia. Alguns estudos mais antigos demonstram associação dos polimorfismos do exon 11 com níveis circulantes de insulina e com medida de RI (HOMA-IR) (Hirai, Suzuki et al. 2000) e com níveis de glicose durante o ToTG (Baier, Dobberfuhl et al. 1998) em sujeitos não diabéticos, porém não os associam com diabetes tipo 2 (Baier, Dobberfuhl et al. 1998, Ye, Dubois-Laforgue et al. 2001). Por outro lado, em meta-análise foi demonstrado que a associação dos polimorfismos rs7041 e rs4588 com diabetes tipo 2 somente de evidencia quando avaliando os grupos étnicos separadamente. Com resultado positivo em populações de origem asiática, mas não nas de origem caucasiana (Wang, Li et al. 2014).

Também, são raros estudos que tenham avaliado esses polimorfismos em pacientes diagnosticadas com PCOS, bem como em pacientes afetadas pelo excesso de androgênios. Em um único trabalho feito em PCOS, que avaliou o SNP rs2282679, as frequências genotípicas não diferiram entre PCOS e controles. No entanto, quando analisadas somente as PCOS o peso, a altura, o IMC, a circunferência da cintura, o colesterol total, o HDL e os níveis de Vitamina D diferiram entre os genótipos desse polimorfismo (Wehr, Trummer et al. 2011).

Por outro lado, vários trabalhos encontram associações dos três SNPs (rs7041, rs4588 e rs2282679) com níveis séricos de Vitamina D em distintas populações (Engelman, Fingerlin et al. 2008, Ahn, Albanes et al. 2009, Fang, van Meurs et al. 2009, Sinotte, Diorio et al. 2009, Ahn, Yu et al. 2010, Janssens, Bouillon et al. 2010, Wang, Zhang et al. 2010, Santos, Mascarenhas et al. 2013). Esses dados em conjunto demonstram que essas variantes genéticas possivelmente possam estar contribuindo com disfunções endócrino-metabólicas relacionadas ao metabolismo da Vitamina D.

## 2. OBJETIVOS

**Objetivo geral:** Avaliar os níveis séricos de Vitamina D e polimorfismos do gene da Globulina Carreadora de Vitamina D e variáveis clínicas, hormonais e metabólicas em crianças e em mulheres adultas com e sem a Síndrome dos Ovários Policísticos

### **Objetivos específicos:**

- Verificar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D em meninas em idade escolar do sul do Brasil;
- Analisar a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos rs4588 e rs7041 do gene da Globulina Carreadora de Vitamina D em uma amostra de meninas do sul do Brasil;
- Determinar se essas variantes genéticas e seus haplótipos estão associados com os níveis de 25-hidroxivitamina D (*Estudo 1: Variations in the Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene Are Related to Lower 25-hydroxyvitamin D Levels in Healthy Girls: A Cross-Sectional Study*).
- Verificar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D em mulheres adultas com e sem a Síndrome dos Ovários Policístico;
- Analisar a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos rs4588, rs7041 e rs2282679 do gene da Globulina Carreadora de Vitamina D em uma amostra de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos e controles do sul do Brasil;
- Determinar se essas variantes genéticas e seus haplótipos estão associados com níveis circulantes de 25-hidroxivitamina D, com síndrome metabólica e seus componentes (*Estudo 2: Associations between Vitamin D Binding Protein gene*

*variants, vitamin D levels and metabolic syndrome in PCOS women from Southern Brazil).*



### **3. METODOLOGIA**

#### **Delineamento**

Estudos transversais para a avaliação da associação de polimorfismos da Globulina Carreadora da Vitamina D com variáveis clínicas, hormonais e metabólicas em meninas aparentemente saudáveis e em mulheres com PCOS do sul do Brasil.

#### **População**

##### **Estudo 1: Meninas aparentemente saudáveis do sul do Brasil**

Meninas recrutadas através de projeto de colaboração científica com a Unidade de Endocrinologia Pediátrica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Esse compreendeu um estudo de base populacional que realizou recrutamento de crianças e adolescentes em idade escolar da cidade de Curitiba/Paraná; as meninas participantes realizaram as avaliações necessárias e foram arroladas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

**Critérios de inclusão:** meninas que não tivessem desenvolvimento de caracteres sexuais secundários antes dos oito anos de idade e que não apresentassem doenças crônicas.

**Critérios de exclusão:** uso de medicamentos que pudessem induzir pubarca e/ou interferir com as variáveis de interesse do estudo, disfunções endócrinas, doença clínica relatada ou aparente.

**Estudo 2:****Grupo com PCOS**

Mulheres diagnosticadas com PCOS e em acompanhamento na Unidade de Endocrinologia Ginecológica (UEG), Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) que foram convidadas a participar do projeto de pesquisa. Também, as pacientes foram recrutadas a partir de convite para participar do estudo na mídia. O anúncio chamou voluntárias com hirsutismo e menstruação irregular, e voluntárias sem hirsutismo e com ciclos menstruais regulares (para compor o grupo controle).

A PCOS foi definida de acordo com os critérios de Rotterdam, que exige a presença de no mínimo dois dos critérios a seguir: 1) oligo ou anovulação ( $\leq 9$  ciclos/ano e/ou progesterona de fase lútea  $\leq 3.8\text{ng/mL}$ ), 2) hiperandrogenismo clínico ou laboratorial, 3) aparência policística dos ovários.

**Critérios de inclusão:** pacientes com PCOS de acordo com os critérios do Consenso de Rotterdam (2004), IMC entre 18,5 e 35 kg/m<sup>2</sup>, função renal e hepática normal; sem uso de medicação hormonal ou outras que possam interferir com as dosagens hormonais e metabólicas.

**Critérios de exclusão:** tumores produtores de androgênios, hiperplasia adrenal forma não clássica (HAC-NC), Síndrome de Cushing, hiperprolactinemia, disfunção da tireóide não tratada, doenças crônicas, gestação.

**Grupo controle**

Mulheres com ciclos menstruais regulares ( $\geq 10$  ciclos/ano) e ovulatórios, níveis de androgênios normais e sem manifestações clínicas de hiperandrogenismo, função renal e hepática normal; sem uso de medicação hormonal ou outras que pudessem interferir com as dosagens hormonais e metabólicas nos últimos três meses.

**Avaliação clínica e antropométrica**

As participantes dos 2 estudos realizaram anamnese e exame físico padronizados para cada estudo que incluíram medidas antropométricas, aferição

de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD). Presença ou histórico familiar de comorbidades como diabetes, dislipidemia e hipertensão, dados de desenvolvimento puberal, utilização de medicamentos. A avaliação do desenvolvimento de caracteres sexuais secundários como pêlos pubianos e mamas (escore de Marshall e Tanner) (Marshall and Tanner 1969) foi realizada para as participantes do estudo 1. Os critérios para hirsutismo, foram acessados utilizando-se o escore de *Ferriman–Gallway* (Ferriman and Gallwey 1961) no caso das participantes do estudo 2.

As meninas arroladas na cidade de Curitiba/PR foram avaliadas pela equipe multidisciplinar. Tal equipe é composta por profissionais e alunos dos Departamentos de Educação Física, Fisioterapia, Nutrição, Medicina e Enfermagem da Universidade Federal do Paraná. Todas as avaliações (anamnese e exame físico padronizados) foram realizadas nas escolas, em local reservado e pré-determinado pela direção escolar, e em datas pré-definidas. A avaliação do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários foi feita por auto-avaliação através da apresentação de ilustrações. O teste realizado em forma de auto-avaliação da pilosidade pubiana é considerado um procedimento simples que pode ser realizado pela própria criança ou adolescente (Matsudo and Matsudo 1994, Bojikian, Massa et al. 2002).

Os dados de peso, altura e IMC das crianças e adolescentes de Curitiba/PR foram transformados para seus respectivos valores de percentil e score-Z de acordo com as curvas de crescimento para idade e sexo descritas no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC 2000) (Kuczmarski, Ogden et al. 2000). Para determinar se o indivíduo apresentava sobrepeso ou obesidade foram adotados os pontos de corte sugeridos por Cole e colaboradores, em 2000 (Cole, Bellizzi et al. 2000). Classifica-se como eutróficos aqueles indivíduos com  $IMC < \text{percentil } 85$ , sobrepeso  $IMC \text{ percentil } \geq 85 \text{ a } \leq 95$  e obesos  $IMC > \text{percentil } 95$ .

As pacientes arroladas em Porto Alegre/RS tiveram a avaliação clínica realizada pela equipe médica da UEG/HCPA. A anamnese incluiu história e evolução de sintomas associados ao hiperandrogenismo, ciclos menstruais, história familiar de doenças correlatas e métodos contraceptivos ou medicamentos utilizados previamente. A avaliação antropométrica e o exame físico (medidas de peso, altura, circunferência da cintura, pressão arterial,

determinação do escore clínico de hirsutismo) foram feitos conforme estudos prévios realizados do grupo (Toscani, Mighavacca et al. 2007, Di Domenico, Wiltgen et al. 2013, Graff, Mario et al. 2013, Ramos and Spritzer 2015). As participantes desse estudo foram também submetidas a ultrassonografia transvaginal ou transabdominal. A paciente foi considerada com aparência ecográfica de ovários policísticos quando pelo menos um dos ovários apresentou 12 ou mais folículos entre 2 mm e 9 mm e/ou volume superior a 10mL.

### **Avaliação hormonal e metabólica**

A coleta de sangue das pacientes arroladas na cidade de Curitiba/PR foi realizada na própria escola em um local reservado cedido pela direção e realizada por enfermeiras qualificadas da Unidade de Endocrinologia Pediátrica, utilizando materiais descartáveis (seringa e agulhas, BD®, Brasil). Todo o material utilizado nas coletas e durante o processo de coleta foi recolhido em recipientes apropriados para o descarte de lixo hospitalar e levado ao Hospital de Clínicas do Paraná para descarte adequado.

As pacientes arroladas em Porto Alegre foram coletadas no Centro de Pesquisa Clínica do HCPA em data previamente agendada. Essas coletas ocorreram entre os dias 2 e 10 do ciclo menstrual (exceto nas mulheres em amenorreia, em que as coletas foram realizadas em qualquer dia do ciclo).

Todas as pacientes realizaram coleta de sangue para as dosagens bioquímicas e hormonais. A avaliação laboratorial foi realizada no Serviço de Patologia Clínica do HCPA, exceto a 25(OH)D das escolares de Curitiba/PR, que foi mensurada por RIA pelo Instituto Genese.

Foram calculados os valores para LDL (colesterol total – (Triglicerídeos /5 + HDL) e HOMA- IR (glicemia x insulinemia em jejum/22.5). As coletas de sangue foram realizadas entre 8 e 10 horas, após 12 horas de jejum noturno. Uma alíquota adicional da amostra de sangue foi obtida para posterior extração do DNA total.

Os critérios utilizados para a classificação da SMet nas mulheres adultas foram a presença de pelo menos 3 dos 5 parâmetros: circunferência abdominal elevada (>88 cm), aumento de triglicerídeos ( $\geq 150$  mg/dL), níveis diminuídos de HDL (<50 mg/dL), glicemia de jejum elevada ( $\geq 100$ mg/dL) e aumento da pressão

arterial (PA sistólica  $\geq 130$ mmHg e /ou PA diastólica  $\geq 85$ mmHg, ou uso de anti-hipertensivos) (Alberti, Eckel et al. 2009).

As dosagens hormonais e metabólicas foram realizadas de acordo com os métodos constantes na tabela 1, que também apresenta os valores de referência.

Tabela 1: Métodos e valores de referência dos testes bioquímicos e hormonais.

Exame	Método	Valor de Referência
Colesterol HDL (mg/dL)	Enzimático colorimétrico	Risco baixo: $>50$ ; Risco moderado: 35-49; Risco alto: $<35$
Colesterol Total (mg/dL)	Enzimático colorimétrico	Ótimo: $< 200$ ; Limítrofe: 200-239; Alto: $>240$
Triglicerídeos (mg/dL)	Enzimático colorimétrico	Ótimo: $< 150$ ; Limítrofe: 150-200; Alto: 201 – 499; Muito alto: $>500$
IGF-1 (ng/mL)	Quimioluminescência	Crianças: 52 – 996; Adolescentes: 116 – 424
Insulina ( $\mu$ UI/mL)	Eletroquimioluminescência	2.6 – 24.9
Glicose (mg/dL)	Enzimático colorimétrico	70-100
25(OH)D total (ng/mL)	*Radioimunoensaio Quimioluminescência	$<20$ : deficiente; $20 \geq 29$ : insuficiente; $\geq 30$ : suficiente
Testosterona Total (ng/mL)	Quimioluminescência	Mulheres: 0.14 – 0.76

IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 1; 25(OH)D: 25hidroxivitaminaD. \* Amostras do estudo 1.

### Análise Molecular

A avaliação molecular foi realizada no laboratório de Endocrinologia Molecular do Departamento de Fisiologia/UFRGS, módulo instalado no Serviço de Endocrinologia do HCPA.

### Extração do DNA genômico

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico venoso. Para a extração foi escolhido o método de *salting-out* (Miller, Dykes et al. 1988). Foram colhidos 4 mL de sangue venoso em ácido etileno diaminotetracético (EDTA, 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos com solução de lise de hemácias ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  114 mM,

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  1 mM) em incubação a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado durante 15 minutos a 5000 rpm, sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais duas vezes. O sobrenadante foi descartado e o botão de células brancas foi suspenso em 2,4 mL de solução de lise de leucócitos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 48  $\mu\text{L}$  de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 40  $\mu\text{L}$  de proteinase K (10 mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), posteriormente o material foi submetido a incubação a 37°C por 18 horas. Após este período, 0,96 mL de solução saturada de cloreto de sódio (6 M) foi adicionada agitando-se o conjunto vigorosamente. O material sofreu centrifugação por 15 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizou-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, e em seguida lavado em etanol 70% durante 5 minutos repetindo-se a operação por mais duas vezes. Por fim, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo seco a temperatura ambiente. Após tal procedimento, o DNA foi ressuspenso em tampão TE (10:0,1) (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

### **Ensaio de Discriminação Alélica**

Para a obtenção dos resultados das genotipagens dos polimorfismos presentes nessa tese foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (7500 Fast Applied Biosystems, California, USA) utilizando ensaio de discriminação alélica com oligonucleotídeos e sondas Taqman *Minor Groove Binder* (MGB) e Probes (Applied Biosystems, California, USA) (Taqman MGB Probes®).

O ensaio de discriminação alélica é uma reação de PCR no equipamento de PCR em tempo real que, através do anelamento de sondas específicas ao polimorfismo de interesse, detecta diferenças de uma única base nitrogenada variante na sequência de DNA por meio de emissão de fluorescência.

Assim como na PCR convencional, um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) é utilizado para amplificação da região de interesse do genoma. O diferencial do sistema de discriminação alélica é a adição de duas

sondas, cada uma com especificidade de ligação para um dos alelos do polimorfismo. Cada sonda possui um fluoróforo emissor na porção 5' (*reporter*) e um fluoróforo silenciador na região 3' (*quencher*). Quando a sonda está intacta, a proximidade dos dois fluoróforos resulta na supressão da fluorescência do emissor. Durante a reação da PCR, as sondas hibridizam na região que possuem especificidade, e a enzima AmpliTaq Gold (que realiza a extensão das fitas de DNA na PCR) cliva a sonda, já que possui atividade de nucleasse 5'-3'. Os fluoróforos são separados pela clivagem e ocorre a emissão da fluorescência do emissor.

Cada sonda é marcada com um tipo distinto de fluoróforo. No caso dos polimorfismos genotipados para essa tese, utilizou-se a marcação fluorescente com as sondas VIC® e FAM®. A emissão de diferentes fluoróforos, detectada ao final da reação da PCR fornece o genótipo de cada indivíduo. Se houver a emissão de apenas uma fluorescência (VIC® ou FAM®) o indivíduo é homocigoto para o alelo marcado por tal fluorescência, se houver a emissão das duas fluorescências o indivíduo é heterocigoto. A Figura 2 ilustra o processo de hibridização específica das sondas e a emissão de fluorescência.

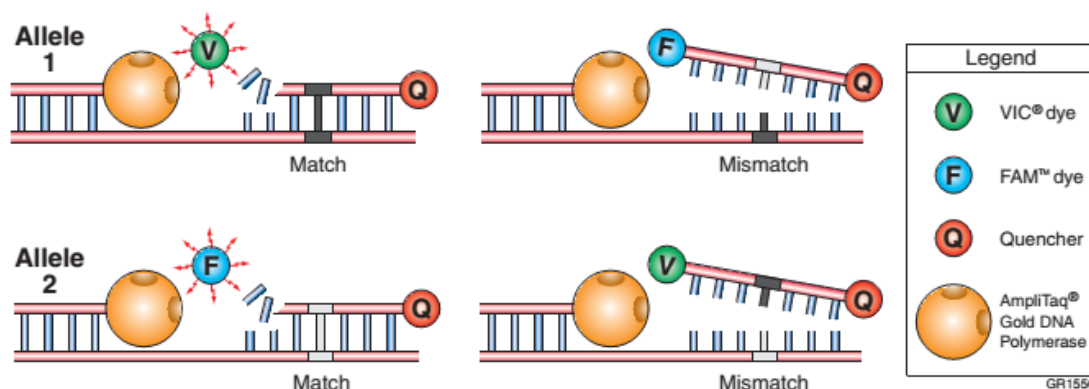


Figura 3: Hibridização das sondas e emissão de fluorescência durante a reação de PCR em Tempo Real.

Os *primers* e sondas foram customizados no programa File Buider 3.0, com base nas informações dos SNPs disponíveis no banco de dados do Website de Publicações Médicas (PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). O desenho e confecção dos *primers* e sondas foi realizado pela Applied Biosystems. Após quantificação estimada por leitura espectrofotométrica no

equipamento NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) o DNA genômico das pacientes foi diluído em 2ng/ $\mu$ L.

Para genotipar os SNPs rs4588 e rs2282679 foi adicionado ao mix de reação 2.5 $\mu$ L TaqMan Master mix, 0.25  $\mu$ L TaqMan assay, 1.25 $\mu$ L H<sub>2</sub>O e 1 $\mu$ L de DNA, para um volume final de 5 $\mu$ L. As condições da reação foram: 10 minutos a 95°C, 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto. Para genotipar o SNP rs7041 foi adicionado ao mix de reação 5.0 $\mu$ L TaqMan Master mix, 0.50  $\mu$ L TaqMan assay, 3.5 $\mu$ L H<sub>2</sub>O e 1 $\mu$ L de DNA, para um volume final de 10 $\mu$ L. As condições da reação foram: 10 minutos a 95°C, 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 61°C por 1 minuto.

Após o final das reações o programa 7500 Fast SDS Systems Software plota os resultados da discriminação alélica em gráficos que ilustram a emissão de fluorescência em cada amostra submetida a amplificação (Figura 3).

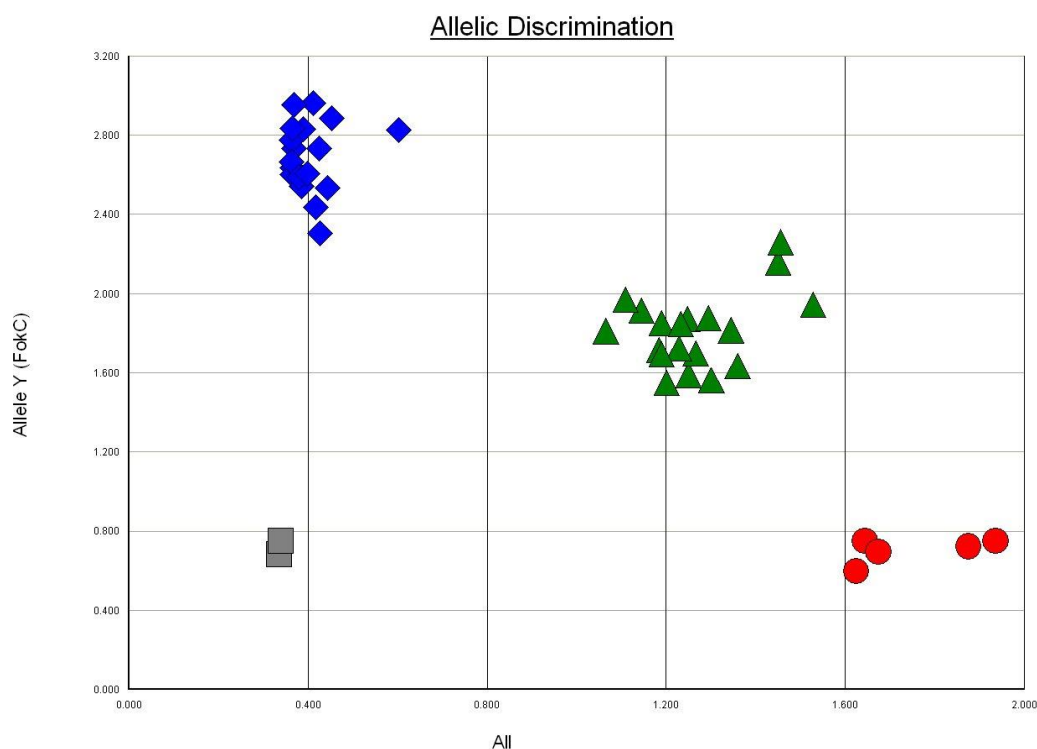


Figura 4: Genotipagem do polimorfismo rs4588 do gene da *DBP* por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.

Legenda: ● = AA ▲ = CA ◆ = CC □ = controle negativo.



### **Análise Estatística**

Os dados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão, medianas e intervalo interquartil (25% - 75%), conforme a natureza gaussiana ou não-gaussiana da variável, ou frequência (percentual). Comparações de variáveis contínuas entre grupos foram analisadas pelo teste “t” de Student não pareado ou ANOVA de uma via, seguida pelo Bonferroni post hoc test. ANOVA de duas vias foi utilizada para testar a interação entre os grupos de interesse. As variáveis assimétricas foram transformadas para logaritmo e, então aplicados os testes paramétricos.

Frequências alélicas e genotípicas entre grupos foram comparadas com o teste  $\chi^2$ , após ter sido verificado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises estatísticas foram realizadas usando-se *Statistical Package for Social Sciences versão 19.0* (SPSS, Chicago, IL, USA) e *Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health versão 2.3.1*, sendo considerado como significativo um valor de  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

**Artigo 1:** Variations in the **vitamin D binding protein (DBP) gene** are related to lower **25-hydroxyvitamin D levels in healthy girls: a cross-sectional study**

Publicado em: Horm Res Paediatr 2013;79:162–168

DOI: 10.1159/000348847.

**Betânia R. Santos<sup>a</sup>, Luis P. G. Mascarenhas<sup>b</sup>, Margaret C. S. Boguszewski<sup>b,c</sup>, Poli Mara Spritzer<sup>a,c</sup>**

<sup>a</sup> Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil. Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. <sup>b</sup> Department of Pediatrics, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil. <sup>c</sup> National Institute of Hormones and Women's Health, Porto Alegre, Brazil.

Running head: Association between DBP and lower 25(OH)D levels

### **Abstract**

**Background/Aims:** Vitamin D deficiency has been recognized as a worldwide epidemic, affecting several pediatric and adolescent populations. We determined the genotype and haplotype distribution of the rs4588 and rs7041 polymorphisms of the *GC* gene encoding vitamin D binding protein (DBP) and investigated the associations between these gene variants and their haplotypes with 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels in girls from South Brazil.

**Methods:** Cross-sectional study including 198 apparently healthy girls aged 10 to 18 years. Plasma levels of 25(OH)D were assessed by radioimmunoassay. Participants were genotyped for rs4588 and rs7041 by real-time PCR, with allelic discrimination assays.

**Results:** Mean chronological age and BMI percentile were  $13.17 \pm 1.74$  years and  $57.81 \pm 29.03$ , respectively. Sufficient circulating 25(OH)D levels ( $\geq 30$  ng/mL) were found in 9.1% of the overall group, insufficient levels (20-29.9 ng/mL) in 59.6%, and deficient levels ( $< 20$  ng/mL) in 31.3%. The AA genotype of rs4588, TT genotype of rs7041 and CT-AT/AT-AT (GC 1f-2/2-2) diplotypes were significantly associated with lower 25(OH)D levels, even after adjustment for age and season at the time of blood collection.

**Conclusions:** The GC gene genotype may be related to the susceptibility to low 25(OH)D levels in female children and adolescents.

Key words

**25-hydroxyvitamin D; Vitamin D binding protein; gene polymorphisms; females.**

## Introduction

Vitamin D deficiency has become a worldwide epidemic [1], with high prevalence in developing countries [2]. It affects pediatric and adolescent populations [3-6], and is recognized for its effects on bone metabolism and for being an important determinant of growth and body development [1, 7].

Vitamin D transport in the body is performed mainly by vitamin D binding protein (DBP), a member of the albumin and alpha-fetoprotein gene family [8] encoded by the GC gene (group-specific component, also known as DBP; GRD3; VDBG; VDBP; DBP/GC, NCBI Gene ID#2638), located on chromosome 4 (4q12-13). There are two well-studied missense single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the GC gene: rs4588 (T436K), which causes a C-to-A transversion [threonine (ACG) to a lysine (AAG)], and rs7041 (D432E), which causes a T-to-G transversion [an aspartic acid (GAT) to a glutamic acid (GAG)]. The combination of these two SNPs is the molecular basis for the three major isoforms of DBP serum, namely GC-1f (wild type), GC-1s, and GC-2 [9-11]. These variants have been previously shown to be strongly associated with circulating 25-

hydroxyvitamin D [25(OH)D] in genome wide association studies [12, 13] and in diverse populations [14-18]. Given the well-known high prevalence of 25(OH)D deficiency in children and adolescents, it may be speculated that GC gene polymorphisms are linked to increased susceptibility to develop 25(OH)D deficiency.

Therefore, the aims of the present study were to assess the genotypic and allelic distribution of the rs4588 and rs7041 polymorphisms of the GC gene in a population of girls from South Brazil and to determine whether these gene variants and their haplotypes are associated with 25(OH)D levels.

## **Methods**

### *Participants*

This cross-sectional study was carried out between April 2008 and September 2010. Participants were 198 apparently healthy female students from four public schools located in the four main regions of the city of Curitiba (North, South, East, and West), in the state of Paraná, Brazil (latitude – 25°). Most of these girls were also included in the control group of a previous study [19]. Girls who reported use of hormonal medication or clinical disease were excluded. None of the girls took calcium or vitamin D supplements.

Approval for this study was obtained from the Institutional Review Boards and the local Ethics Committees at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Universidade Federal do Paraná. Written informed consent was obtained from all participants or their caretakers.

### *Study protocol*

All participants underwent physical examination and clinical interview to collect information on thelarche and menarche age. Anthropometric measurements included height and weight for subsequent calculation of body mass index (BMI). Height was obtained using a stadiometer fixed to the wall, and weight was obtained with a digital scale (resolution of 100 grams). Participants were evaluated barefoot and wearing light clothing. Individual BMI and height were converted into percentiles according to age based on the 2000 Centers for

Disease Control and Prevention chart (CDC 2000) [20]. For that, the software EpiInfo/AnthropometricData (version 3.5.1) was used.

Insulin like growth factor type 1 (IGF-1) and 25(OH)D, the main vitamin D circulating metabolite, were assessed in blood samples drawn between 8:00 and 10:00 AM from an antecubital vein, after an overnight fast. Blood samples were also collected for genomic DNA extraction.

Weight was classified as normal (BMI < 85 percentile), overweight (85 percentile  $\leq$  BMI  $\leq$  percentile 95), or obesity (BMI > 95 percentile). Serum 25(OH)D status was defined as sufficient ( $\geq$  30 ng/mL), insufficient (20–29.9 ng/mL) or deficient (< 20 ng/mL) [21]. Participants were stratified according to tertiles of serum 25(OH)D levels. Blood was collected from each participant at the time of enrollment. Samples were then stored with identification of the season of blood collection (spring/summer and fall/winter).

#### *Dietary assessment*

Daily intake of calcium from dietary sources was estimated using a food frequency questionnaire (FFQ). The FFQ was developed and validated for the Brazilian pediatric population [22] and was randomly applied as a self-assessment instrument to a sub-sample 91 participants.

#### *Assays*

Chemiluminescent immunoassay (Siemens DPC Buhlmann, Salzburg, Austria) was used to measure serum IGF-1, with sensitivity of < 20.00 and intra and inter-assay coefficients of variation of < 3.9% and < 8.1% respectively. Serum 25(OH)D (sensitivity = 1.5 ng/mL) was measured with radioimmunoassay (DiaSorin, Stillwater, USA) with intra and inter-assay coefficients of variation of < 12.0% and < 15.0% respectively.

#### *Genotype analysis*

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes [23]. Molecular genotyping for the rs4588 SNP (change of the C→A) and rs7041 (change of the T→G) was performed through real-time PCR (7500 Fast Applied Biosystems, California, USA) with allelic discrimination assays (Taqman MGB

Probes®) according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, California, USA).

Lewontin's D' statistic for linkage disequilibrium was calculated for each pair of polymorphisms. Haplotypes were constructed from the combination of the two DBP polymorphisms (rs4588 and rs7041), and their frequencies were inferred using the PHASE 2.1.1 program.

### *Statistical analysis*

Sample size estimation was based on the study by Sinotte et al. [14], which found an association between rs7041 variants of the GC gene and lower concentrations of 25(OH)D in premenopausal women. Therefore, considering a difference of 2.84 ng/mL in 25(OH)D levels between the same rs7041 variants, an alpha of 5%, and a beta of 80%, the sample size was estimated as 261 girls. A subsequent interim analysis showed that a difference of 2.84 ng/mL was actually obtained with the sample of 198 girls enrolled in the study.

Normality of the variables was tested using the Shapiro-Wilk normality test. Data were described as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or percentages. Comparisons between means were analyzed by the unpaired two-tailed Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc tests. ANOVA Partial Eta Squared was used to measure the variance of 25(OH)D that may be explained by categorical variable. Data were adjusted by age and season at the time of blood collection by analysis of covariance (ANCOVA). Test for linear trend was used to test codominant effects of genotypes on 25(OH)D levels.

Categorical variables and the agreement of genotype frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium for each SNP were analyzed using the Pearson chi-square test [ $\chi^2$ ]. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) were obtained using binary logistic regression, considering as reference the protective genotypes and haplotype. Data were considered as statistically significant at  $p < 0.05$ . The Statistical Package for the Social Sciences 16 (SPSS, Chicago, IL) was used for the analyses.

## Results

All the 198 healthy girls who were enrolled following parental consent completed the interview, physical examination, and blood collection. Ninety-one (45.96%) subjects completed the calcium dietary assessment. Table 1 shows clinical features in the total sample and according to tertiles of 25(OH)D. Mean chronological age and BMI percentile were  $13.17 \pm 1.74$  years and  $57.81 \pm 29.03$ , respectively. The frequency of overweight was 15.2%, and of obesity 9.1%. Menarche had not occurred in 32.8% of participants. Height percentile and IGF1 levels were within the normal range, irrespective of 25(OH)D tertile.

Mean serum 25(OH)D was  $22.1 \pm 5.9$  ng/mL. Stratification by 25(OH)D status revealed sufficient circulating levels ( $\geq 30$  ng/mL) in only 9.1% of the overall group, insufficient levels (20 - 29.9 ng/mL) in 59.6%, and deficient levels ( $< 20$  ng/mL) in 31.3%. Most participants were studied during fall/winter. No significant differences were found between season at the time of the blood collection and tertiles of 25(OH)D ( $p = 0.688$ ) (Table 1) or 25(OH)D status ( $p = 0.947$ ). No associations were found between season at the time of the blood collection and 25(OH)D levels (spring/summer =  $22.9 \pm 5.1$  ng/mL vs. fall/winter =  $22 \pm 6.1$  ng/mL;  $p = 0.467$ ).

**Table 1.** Anthropometric and clinical features of girls according to 25(OH)D serum levels

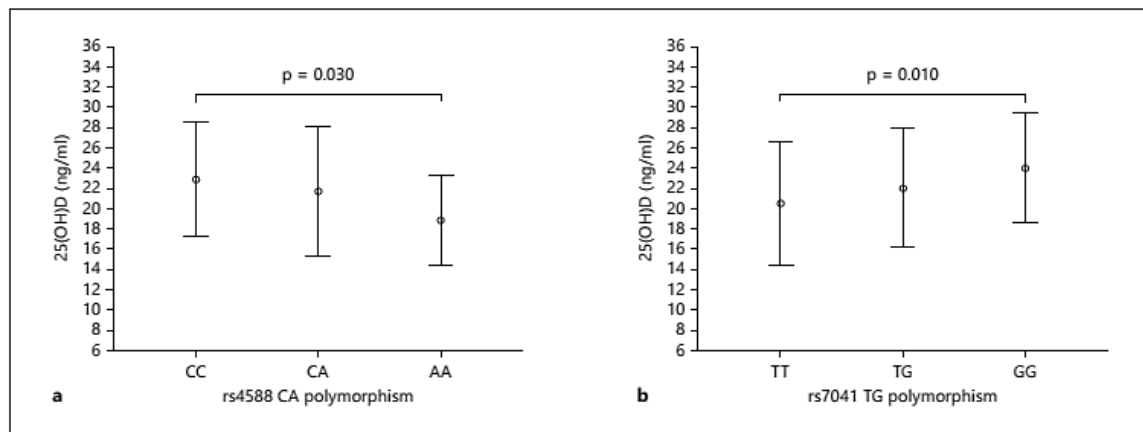
Variable	All (198)	25(OH)D tertiles (ng/mL)			p
		≤ 20.1 (66)	20.1-24.2 (65)	≥ 24.2 (67)	
Age (years)	13.17 ± 1.74	13.19 ± 1.63	13.26 ± 1.78	13.05 ± 1.83	0.780
Height percentile	54.02 ± 27.65	58.39 ± 27.23	52.32 ± 27.34	51.36 ± 28.24	0.286
BMI percentile	57.81 ± 29.03	53.50 ± 30.29	62.50 ± 27.14	57.50 ± 29.29	0.207
% Normal weight	150 (75.7%)	51 (77.3%)	46 (70.8%)	53 (79.1%)	0.459 <sup>a</sup>
% Overweight	30 (15.2%)	7 (10.6%)	13 (20.0%)	10 (14.9%)	
% Obesity	18 (9.1%)	8 (12.1%)	6 (9.2%)	4 (6.0%)	
Age at menarche (years)	11.75 ± 1.19	11.90 ± 1.25	11.72 ± 1.02	11.64 ± 1.32	0.585
% Menarche yes	133 (67.2%)	42 (63.6%)	47 (72.3%)	44 (65.7%)	0.543 <sup>a</sup>
% Menarche no	65 (32.8%)	24 (36.4%)	18 (27.7%)	23 (34.3%)	
Age at thelarche (years)	10.27 ± 1.11	10.29 ± 1.11	10.27 ± 1.00	10.26 ± 1.23	0.988
IGF-1 (ng/mL)	465.34 ± 140.69	471.48 ± 117.87	465.02 ± 149.89	459.33 ± 154.43	0.887
25(OH)D (ng/mL)	22.1 ± 5.9	15.9 ± 3.6	21.9 ± 1.2	28.4 ± 3.5	< 0.001
Calcium intake (mg/day)	1200.89 ± 579.30 (91)	1185.14 ± 546.53 (39)	1255.74 ± 551.73 (28)	1162.47 ± 675.81 (24)	0.828
Season at the time of blood collection					
spring/summer	24 (12.1%)	7 (10.6%)	7 (10.8%)	10 (14.9%)	0.688 <sup>a</sup>
fall/winter	174 (87.9%)	59 (89.4%)	58 (89.2%)	57 (85.1%)	

Values are expressed as mean ± SD or percentages. p value by one-way analysis of variance (ANOVA). <sup>a</sup>Chi-square test. IGF-1: insulin like growth factor type 1; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D.



Regarding *GC* gene polymorphisms, all two SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium (rs4588:  $\chi^2 = 0.432$  and rs7041:  $\chi^2 = 0.966$ ). Table 2 shows genotype frequencies to rs4588 and rs7041 SNPs in total sample and according to 25(OH)D levels. The rs4588 (C→A) polymorphism was in linkage disequilibrium with the rs7041 (T→G) polymorphism ( $|D'| = 1$ ;  $r^2 = 0.38$ ). Three allele haplotypes were inferred in the sample: CT, CG and AT, formally called GC-1f, GC-1s and GC-2 respectively. The first letter of each haplotype refers to rs4588 SNPs and the second to the rs7041 SNPs. The allele/haplotype frequencies were: CT, 0.246; CG, 0.488; and AT, 0.266. The three common haplotype variants (CT, CG and AT) combined to form six diplotypes: CT-CT, CT-CG, CG-CG, CG-AT, CT-AT and AT-AT with frequencies of 0.07, 0.22, 0.26, 0.24, 0.13, and 0.08 respectively.

Age, BMI and height percentiles, age at menarche or at thelarche, IGF-1 levels and daily calcium intake were similar among genotypes for both polymorphisms. In contrast, the polymorphic genotype of rs4588 (AA genotype) and the wild genotype of rs7041 (TT genotype) of the *GC* gene were significantly associated with lower 25(OH)D levels (rs4588  $p = 0.030$ ; rs7041  $p = 0.010$ ), even after adjustment for age and season at the time of blood collection (Figure 1). The rs4588 and rs7041 polymorphisms account for 3.5% and 4.6% of the variance in plasma 25(OH)D concentrations, respectively. In addition, for each A (rs4588) and T (rs7041) allele added to the genotype (heterozygosity or homozygosity) a variation of 1.6 ng/mL and 1.7 ng/mL respectively in 25(OH)D was recorded (rs4588  $p$  trend = 0.012; rs7041  $p$  trend = 0.002) (Figure 1).



**Fig 1.** 25(OH)D levels according to rs4588 (A) and rs7041 (B) SNPs in GC gene. Values are expressed as means (central circle) and standard deviation (lower and upper limit); p value by one-way analysis of variance (ANOVA); rs4588 Linear p trend = 0.012, B = 1.65; rs7041 Linear p trend=0.002, B = 1.74; rs4588 CC (n = 108), CA (n = 74) and AA (n = 16); rs7041 TT (n = 56), TG (n = 92) and GG (n = 50).

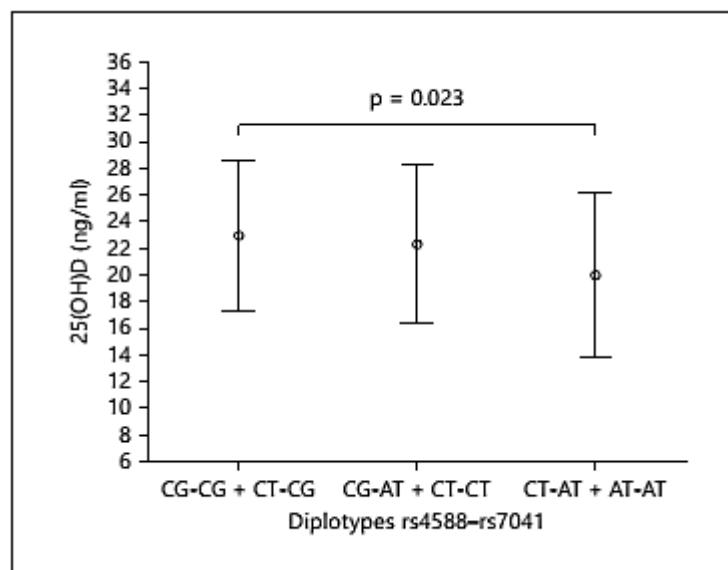
Regarding 25(OH)D tertiles and the presence of GC gene polymorphisms, the AA genotype (polymorphic genotype) of rs4588 SNP was more frequent in the lower tertile of 25(OH)D. The OR for being in the lower tertile of 25(OH)D among girls with AA genotype was 2.73 (95%CI: 0.94–7.93) in relation to girls with CC genotype (wild genotype). Concerning rs7041 SNP, the wild genotype (TT genotype) was more frequent in girls in the lower tertile of 25(OH)D than in those in the two higher tertiles of 25(OH)D. The OR for the lower tertile of 25(OH)D among girls with TT genotype was 3.47 (95%CI: 1.45–8.27) (Table 2).

**Table 2.** Genotype and haplotype distribution of GC gene variants according to 25(OH)D levels

Gene polymorphism		All n (%)	25(OH)D levels		p
			≤ 20.1 (66) n (%)	> 20.1 (132) n (%)	
rs4588					
Genotypes	CC	108 (54.5)	29 (43.9)	79 (59.8)	0.075
	CA	74 (37.4)	29 (43.9)	45 (34.1)	
	AA	16 (8.1)	8 (12.1)	8 (6.1)	
rs7041					
Genotypes	TT	56 (28.3)	26 (39.4)	30 (22.7)	0.015
	TG	92 (46.5)	30 (45.5)	62 (47.0)	
	GG	50 (25.3)	10 (15.2)	40 (30.3)	
Haplotypes					
	CG-CG + CT-CG	94 (47.5)	24 (36.4)	70 (53.0)	0.020
	CG-AT + CT-CT	62 (31.3)	21 (31.8)	41 (31.1)	
	CT-AT + AT-AT	42 (21.2)	21 (31.8)	21 (15.9)	

p value by Pearson Chi-Square Test.

Taking into consideration the results of individual polymorphism analyses, AT (GC-2) was considered as the risk haplotype, and CG (GC-1s) as the protective haplotype for circulating 25(OH)D levels. Patients with two copies of AT haplotype (diplotype AT-AT) presented lower 25(OH)D levels as compared to patients having two copies of CG haplotype (diplotype CG-CG) ( $18.9 \pm 4.4$  vs.  $24.0 \pm 5.4$  ng/mL,  $p = 0.034$ ), even after adjustment for age and season at the time of the blood collection. In addition, patients with three copies of AT haplotype (diplotype CT-AT + AT-AT) presented lower 25(OH)D levels as compared to patients having three copies of CG haplotype (diplotype CG-CG + CT-CG). These analyses were also adjusted for age and season at the time of the blood collection ( $p = 0.023$ ) (Figure 2). Haplotypes accounted for 6.0% of variance in plasma 25(OH)D concentrations. For each AT haplotype added, a variation of 1.39 ng/mL in 25(OH)D was recorded ( $p$  trend = 0.009) (Figure 2).



**Fig 2.** 25(OH)D levels according to diplotypes rs4588-rs7041 in GC gene grouped by the presence of risk haplotype. Values are expressed as means (central circle) and standard deviation (lower and upper limit);  $p$  value by one-way analysis of variance (ANOVA); Linear  $p$  trend = 0.009,  $B = 1.39$ ; 1f-1f (CT-CT)  $n = 14$ ; 1f-1s (CT-CG)  $n = 44$ ; 1s-1s (CG-CG)  $n = 50$ ; 1s-2 (CG-AT)  $n = 48$ ; 1f-2 (CT-AT)  $n = 26$  and 2-2 (AT-AT)  $n = 16$ .

The AT haplotype (GC-2) and the diplotype with three AT repeats (CT-AT + AT-AT) were more frequent in the lowest tertile of 25(OH)D, while the CG haplotype (GC 1s) and the diplotype with three CG repeats (CG-CG + CT-CG) were less frequent in the 25(OH)D lowest tertile than in the two higher tertiles of 25(OH)D ( $p = 0.011$ ) (Table 2). The OR for being in the lowest tertile of 25(OH)D among girls with diplotype CT-AT

+ AT-AT was 2.92 (95%CI: 1.36–6.25) as compared to girls with diplotype CG-CG + CT-CG.

## Discussion

In the present study, *GC* gene polymorphisms and the risk haplotypes were found to be associated with lower 25(OH)D levels in a specific population of healthy south Brazilian girls from the general population. These findings support previous reports of significant associations between *GC* gene polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in adult and old populations and also in small children [17].

In one previous study, including 750 healthy infants and toddlers 6 to 36 months old, circulating 25(OH)D was lower in AA genotype and in diplotypes containing the A allele from rs4588 SNP, but was not associated with the rs7041 polymorphism [17]. Regarding adult and old populations, two studies with Chinese participants have shown that both rs4588 and rs7041 SNPs, as well as the AT-AT diplotype, were related to lower 25(OH)D levels [16, 18]. Similar results were reported in young Canadian adults [15] and elderly Caucasians [24]. Finally, premenopausal white women [14] and early postmenopausal women [25] carrying the AA genotype and TT genotype (rs4588 and rs7041, respectively) have lower 25(OH)D concentrations.

The present study extends our investigation of girls from South Brazil regarding analysis of some genetic determinants for 25(OH)D levels. We have recently described that the BsmI, Apal and TaqI wild variants of the *VDR* gene and the GGT haplotype are associated with lower 25(OH)D levels [6]. Furthermore, we show that girls with precocious pubarche (PP) has lower 25(OH)D levels than in controls with normal pubertal development and Apal polymorphism of the *VDR* gene is more frequent in PP girls than in controls [19].

The studied sample included healthy, well-nourished girls, with normal growth, as established by anthropometric data and IGF-1 levels. Thus, in this cross-sectional study, no adverse clinical features were detected despite the high prevalence of low 25(OH)D levels. Further longitudinal studies are needed in order to observe whether adverse outcomes will occur, such as those related to bone mass, growth, and metabolic comorbidities.

The three major isoforms of DBP are distinguished by their amino acid composition and glycosylation patterns [26, 27]. GC-1f is a combination of aspartic acid at position 432 and threonine at 436; GC-1s has a combination of glutamic acid at

position 432 and threonine at 436, and GC-2 has a combination of aspartic acid at position 432 and lysine at 436 [9-11]. Previous research indicates that these differences in amino acid sequence are associated with variations in DBP affinity for 25(OH)D, with GC-1f having the highest, GC-1s having intermediate and GC-2 having the lowest affinity for 25(OH)D [10, 11, 27, 28]. However, the biologic importance of binding affinity is uncertain, since only small quantities of 25(OH)D appear as unbound hormone. Also, DBP is in huge excess over vitamin D ligands. In fact, most DBP circulates without any vitamin D ligands attached, unlike other hormone carrier proteins [11].

Interestingly, the GC-2 isoform of DBP (AT haplotype), that is associated with lower 25(OH)D levels and lower affinity for this ligand, is also related with higher free fraction of 25(OH)D [29], and a recent study suggests that some functions of vitamin D correlate more closely with free 25(OH)D levels rather than with total serum concentrations of this metabolite [30]. Therefore, the lower 25(OH)D levels associated to GC-2 isoform of DBP, we found in the present study, might not be directly related to low vitamin D clinical conditions and all its implications, since the free fraction tends to vary inversely.

In this sense, one limitation of the present study is having no data on PTH levels. However, GC gene polymorphism seems to have no effect on the relationship between 25(OH)D and PTH [17]. Other possible limitations are the lack of data on dietary vitamin D intake and daily sun exposure, although no associations were found between 25(OH)D levels and season at the time of blood collection. One potential explanation for the lack of seasonal difference is that below a latitude of approximately 35°, UVB radiation is sufficient for vitamin D synthesis all year round [31]. While in the present study DBP measurements were not available, previous studies have shown that DBP levels are associated with GC gene polymorphisms [25, 32] and positively correlated with 25(OH)D levels [17].

In conclusion, data from this study suggest that the GC gene genotype may be related to the susceptibility to low 25(OH)D levels in female children and adolescents. The present results open new possibilities for further studies in this field, especially on the genotype-related mechanisms of calcium and vitamin D metabolism and prevention of 25(OH)D deficiency in young subjects.

## References

1. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM, Endocrine Society: Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-1930.
2. Arabi A, El Rassi R, El-Hajj Fuleihan G: Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes. *Nat Rev Endocrinol* 2010;6:550-561.
3. Harinarayan CV, Ramalakshmi T, Prasad UV, Sudhakar D: Vitamin D status in Andhra Pradesh: a population based study. *Indian J Med Res* 2008;127:211-218.
4. Kumar J, Muntner P, Kaskel FJ, Hailpern SM, Melamed ML: Prevalence and associations of 25-hydroxyvitamin D deficiency in US children: NHANES 2001-2004. *Pediatrics* 2009;124:e362-370.
5. Rajakumar K, de las Heras J, Chen TC, Lee S, Holick MF, Arslanian SA: Vitamin D status, adiposity, and lipids in black American and Caucasian children. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1560-1567.
6. Santos BR, Mascarenhas LPG, Satler F, Boguszewski MCS, Spritzer PM: Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatr* 2012;12:62.
7. Winzenberg T, Jones G: Vitamin D and bone health in childhood and adolescence. *Calcif Tissue Int* 2012. DOI: 10.1007/s00223-012-9615-4.
8. Speeckaert M, Huang GM, Delanghe JR, Taes YE: Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta* 2006;372:33-42.
9. Christiansen M, Jorgensen CS, Laursen I, Hirschberg D, Hojrup P, Houen G: Protein chemical characterization of Gc globulin (vitamin D-binding protein) isoforms; Gc-1f, gc-1s and gc-2. *Biochim Biophys Acta* 2007;1774:481-492.
10. Chun RF, Adams JS, Hewison M: Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J Endocrinol* 2008;198:261-269.
11. Chun RF: New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem Funct* 2012;30:445-456.
12. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, Jacobs EJ, Ascherio A, Helzlsouer K, Jacobs KB, Li QZ, Weinstein SJ, Purdue M, Virtamo J, Horst R, Wheeler W, Chanock S, Hunter DJ, Hayes RB, Kraft P, Albanes D: Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010;19:2739-2745.

13. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, Kiel DP, Streeten EA, Ohlsson C, Koller DL, Peltonen L, Cooper JD, O'Reilly PF, Houston DK, Glazer NL, Vandenput L, Peacock M, Shi J, Rivadeneira F, McCarthy MI, Anneli P, de Boer IH, Mangino M, Kato B, Smyth DJ, Booth SL, Jacques PF, Burke GL, Goodarzi M, Cheung CL, Wolf M, Rice K, Goltzman D, Hidiroglou N, Ladouceur M, Wareham NJ, Hocking LJ, Hart D, Arden NK, Cooper C, Malik S, Fraser WD, Hartikainen AL, Zhai G, Macdonald HM, Forouhi NG, Loos RJ, Reid DM, Hakim A, Dennison E, Liu Y, Power C, Stevens HE, Jaana L, Vasani RS, Soranzo N, Bojunga J, Psaty BM, Lorentzon M, Foroufard T, Harris TB, Hofman A, Jansson JO, Cauley JA, Uitterlinden AG, Gibson Q, Jarvelin MR, Karasik D, Siscovick DS, Econs MJ, Kritchevsky SB, Florez JC, Todd JA, Dupuis J, Hypponen E, Spector TD: Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376:180-188.
14. Sinotte M, Diorio C, Berube S, Pollak M, Brisson J: Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2009;89:634-640.
15. Gozdzik A, Zhu J, Wong BY, Fu L, Cole DE, Parra EJ: Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127:405-412.
16. Robien K, Butler LM, Wang R, Beckman KB, Walek D, Koh WP, Yuan JM: Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore. *Br J Nutr* 2012. DOI: 10.1017/S0007114512001675.
17. Carpenter TO, Zhang JH, Parra E, Ellis BK, Simpson C, Lee WM, Balko J, Fu L, Wong BY, Cole DE: Vitamin D Binding Protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers. *J Bone Miner Res* 2012. DOI: 10.1002/jbmr.1735.
18. Lu L, Sheng H, Li H, Gan W, Liu C, Zhu J, Loos RJ, Lin X: Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese Hans. *Hum Genet* 2012;131:505-512.
19. Santos BR, Mascarenhas LP, Satler F, Boguszewski MC, Spritzer PM: Vitamin D receptor gene polymorphisms and sex steroid secretion in girls with precocious pubarche in Southern Brazil: a pilot study. *J Endocrinol Invest* 2012;35:725-729.



20. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, Mei Z, Curtin LR, Roche AF, Johnson CL: CDC growth charts: United States. *Adv Data* 2000;1-27.
21. Holick MF: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266-281.
22. Sichieri R, Everhart JE: Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutr Res* 1998;18:1649-1659.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
24. Fang Y, van Meurs JB, Arp P, van Leeuwen JP, Hofman A, Pols HA, Uitterlinden AG: Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2009;85:85-93.
25. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, Nexø E: Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): A cross-sectional study on 595 - Early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005;77:15-22.
26. Borges CR, Jarvis JW, Oran PE, Nelson RW: Population studies of Vitamin D binding protein microheterogeneity by mass spectrometry lead to characterization of its genotype-dependent O-glycosylation patterns. *J Proteome Res* 2008;7:4143-4153.
27. Ravnsborg T, Olsen DT, Thysen AH, Christiansen M, Houen G, Hojrup P: The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:909-917.
28. Arnaud J, Constans J: Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet* 1993;92:183-188.
29. Chun RF, Peercy BE, Adams JS, Hewison M: Vitamin D Binding Protein and monocyte response to 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D: Analysis by mathematical modeling. *PLoS ONE* 2012;7:e30773.
30. Powe CE, Ricciardi C, Berg AH, Erdenesanaa D, Collerone G, Ankers E, Wenger J, Karumanchi SA, Thadhani R, Bhan I: Vitamin D–Binding Protein modifies the vitamin D–bone mineral density relationship. *J Bone Miner Res* 2011;26:1609-1616.
31. Webb AR, Kline L, Holick MF: Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not

promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:373-378.

32. Lauridsen AL, Vestergaard P, Nexø E: Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women. *Clin Chem* 2001;47:753-756.

**Artigo 2: Associations between Vitamin D Binding Protein gene variants, vitamin D levels and metabolic syndrome in PCOS women from Southern Brazil**

Betânia R. Santos<sup>a</sup>, Poli Mara Spritzer<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil. Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

short title: DBP gene variants and metabolic syndrome in PCOS

Corresponding author:

Poli Mara Spritzer, MD, PhD

Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003 - Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3359 8027

Fax: +55 51 3359 8777

E-mail: [spritzer@ufrgs.br](mailto:spritzer@ufrgs.br)

**Abstract**

**Background/Aims:** Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder, presenting polygenic traits as well as determined by environmental factors. Vitamin D deficiency has been recognized in PCOS women. In the circulation, vitamin D is bound to vitamin D binding protein (DBP), which is the main protein involved on vitamin D transport. We determined the genotype and haplotype distribution of the rs2282679, rs4588 and rs7041 polymorphisms of the *DBP* gene encoding DBP and investigated the associations between these gene variants and their haplotypes with PCOS, vitamin D levels and metabolic syndrome.

**Methods:** The sample comprised 291 women (191 with PCOS and 100 non-hirsute women with regular ovulatory cycles). Metabolic syndrome and the cutoffs for its isolated components were defined in accordance with the Joint Scientific Statement. Participants were genotyped for rs2282679, rs4588 and rs7041 by real-time PCR, with allelic discrimination assays. Haplotypes were constructed from the combination of rs4588 and rs7041 polymorphisms. Frequencies were inferred using PHASE 2.1.1 software.

**Results:** Women with PCOS were younger and had significantly higher BMI, waist circumference, blood pressure, insulin resistance, triglycerides, Ferriman and total testosterone, as well as a lower HDL-c than control group ( $p < 0.05$  for all). The prevalence of metabolic syndrome in PCOS and controls were 26.5% and 4.8%, respectively. Vitamin D levels were lower in PCOS with metabolic syndrome ( $p = 0.018$ ). Neither the polymorphisms nor their haplotypes were associated with PCOS. A higher frequency of TT genotype of rs7041 was found in PCOS with metabolic syndrome (OR: 2.21 95%CI: 1.08-4.52;  $p = 0.027$ ) and this same genotype was more frequent in PCOS with glucose  $> 100$  mg/dL than TG+GG genotype (OR: 2.96 and 95%CI: 1.07-8.20,  $p = 0.041$ ).

**Conclusions:** Our results indicated that vitamin D levels were lower in PCOS with metabolic syndrome and that *DBP* gene polymorphisms and their haplotypes were not related to PCOS, but suggest an association between the TT genotype of SNP rs7041 and metabolic syndrome and fasting glucose levels in PCOS women from southern Brazil.

**Key words**

PCOS; Vitamin D binding protein; gene polymorphisms; metabolic syndrome

## Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a heterogeneous disease characterized mainly by chronic anovulation and manifestations of hyperandrogenism (Asuncion, Calvo et al. 2000, Azziz, Woods et al. 2004) affecting between 9% to 18% of women of reproductive age, according to different diagnostic criteria (Asuncion, Calvo et al. 2000, Azziz, Woods et al. 2004, March, Moore et al. 2010).

Vitamin D deficiency has been recognized as a worldwide epidemic (Holick, Binkley et al. 2011), with high prevalence in developing countries (Arabi, El Rassi et al. 2010). Once in the circulation, vitamin D and its metabolites are bound to vitamin D binding protein (DBP), which is the main protein involved in vitamin D transport (Speeckaert, Huang et al. 2006, Chun 2012).

DBP is encoded by the *DBP* gene and there are two well-studied missense single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene, rs4588 and rs7041. The combination of these two SNPs are the molecular basis to three major isoforms of DBP serum that are distinguished by their amino acid composition and glycosylation patterns (Christiansen, Jorgensen et al. 2007, Chun, Adams et al. 2008, Chun 2012). These variants have been previously shown to be strongly associated with circulating 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] in genome wide association studies (Ahn, Yu et al. 2010, Wang, Zhang et al. 2010) and in diverse populations (Sinotte, Diorio et al. 2009, Gozdzik, Zhu et al. 2011, Carpenter, Zhang et al. 2012, Lu, Sheng et al. 2012, Robien, Butler et al. 2012, Santos, Mascarenhas et al. 2013).

Few studies have evaluated the DBP polymorphisms in PCOS women, as well as in patients affected by excess androgens. In a single work done in PCOS, the genotype frequencies of the SNP rs2282679 did not differ between PCOS and controls. However, when analyzed PCOS women only weight, height, BMI, waist circumference, total cholesterol, HDL and Vitamin D levels differed between the genotypes of such polymorphisms (Wehr, Trummer et al. 2011). In other populations, polymorphisms of DBP gene were associated with several endocrine and metabolic parameters (Baier, Dobberfuhr et al. 1998, Hirai, Suzuki et al. 2000, Ye, Dubois-Laforgue et al. 2001).

Therefore, the aim of the present study was to evaluate vitamin D levels, assess whether the frequency of SNPs rs2282679, rs4588 and rs7041 in the *DBP* gene and their haplotypes differs between women with PCOS and healthy controls with regular cycles from Southern Brazil, and to investigate the relationship of these gene variants

with vitamin d levels, metabolic syndrome (MetS) and their components in PCOS women.

## **Methods**

### *Patients*

The study population included women of reproductive age recruited by advertisement in the local media and who met the inclusion criteria. The advertisement called for volunteers with hirsutism and irregular menses and also for volunteers without hirsutism and with regular menses. The study population comprised 291 women: 191 patients with PCOS and 100 non-hirsute women with regular, ovulatory cycles. All participants had attended a university hospital in Southern Brazil (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul).

PCOS was diagnosed according to the Rotterdam criteria as the presence of two out of three of the following signs: 1) Oligomenorrhoea and/or chronic anovulation ( $\leq 9$  cycles/year and/or luteal phase progesterone  $\leq 3.8$  ng/mL), 2) clinical and/or biochemical hyperandrogenism, and 3) polycystic ovary appearance on ultrasound examination. Diagnosis of PCOS also relied on exclusion of other hyperandrogenic disorders. None of the PCOS or control participants had received any drugs known to interfere with hormone levels (such as oral contraceptive pills, antiandrogens, metformin, fibrates, or statins) for at least 3 months before the study. The exclusion criteria were pregnancy, liver disease, or kidney disease

Approval for this study was obtained from the Institutional Review Boards and the local Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Written informed consent was obtained from every subject.

### *Study protocol*

Anthropometric measurements included body mass index (BMI) and waist circumference (measured at the midpoint between the lower rib margin and the iliac crest). Blood pressure was measured after a 10-minute rest, with the patient seated, with both feet on the floor, and the arm supported at heart level. Two measurements were obtained 10 min apart using an Omron HEM-742INT automatic blood pressure monitor (Rio de Janeiro, Brazil) with the correct cuff size for the arm diameter (Toscani, Mighavacca et al. 2007, Di Domenico, Wiltgen et al. 2013, Graff, Mario et al. 2013, Ramos and Spritzer 2015).

Hirsutism was defined as a modified Ferriman-Gallwey score (Ferriman and Gallwey 1961). Homeostasis model assessment index (HOMA index) was calculated by multiplying insulin (mIU/mL) by glucose (mmol/L) and dividing this product by 22.5 (Wallace, Levy et al. 2004). MetS and the cutoffs for its isolated components were defined in accordance with the Joint Scientific Statement (Alberti, Eckel et al. 2009).

#### *Laboratory measurements*

All samples were obtained between the 2nd and 10th days of the menstrual cycle, or on any day if the patient was amenorrheic, between 8:00 and 10:00 am, after a 12-h overnight fast. Blood samples were drawn from an antecubital vein for the determination of hormonal levels. Blood samples were also collected for genomic DNA extraction.

Total cholesterol, HDL-C, TG, and glucose levels were determined by colorimetric-enzymatic methods (Bayer 1650 Advia System). LDL-C was determined indirectly by using the formula: Total cholesterol - HDL - Triglycerides/5. Total Testosterone levels were measured by chemiluminescence (Siemens Advia Centaur XP), with a sensitivity of 0.10 ng/mL and intra- and interassay coefficients of variation (CVs) of 3.3% and 7.5%, respectively. Plasma insulin levels were measured by electrochemiluminescence (Siemens Advia Centaur XP), with a sensitivity of 0.50 U/mL and intra-assay and interassay CV of 2.8% and 2.1%, respectively. 25(OH)D levels were measured by chemiluminescence (Liaison, DiaSorin), with a intra-assay and interassay CV of 7.7% and 10.9%, respectively.

#### *Genotype analysis*

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes (Miller, Dykes et al. 1988). The DNA samples were diluted to 2 ng/mL. Molecular genotyping for the rs4588 SNP (change of the C→A) and rs7041 (change of the T→G) was performed through real-time polymerase chain reaction (7500 Fast Real-Time Polymerase Chain Reaction System, Applied Biosystems, CA, USA), using the allelic discrimination assay with TaqMan MGB primers and probes (Applied Biosystems, CA, USA).

To genotyping for the SNP rs4588 and SNP rs2282679 was added TaqMan Master mix (2.5µL), TaqMan assay (0.25 µL), and H<sub>2</sub>O (1.25µL) for a final volume of 4µL per sample, and 1µL of DNA for a total reaction volume of 5µL. Reaction conditions for the rs4588 and rs2282679 polymorphisms were: 10 min at 95°C after 50 cycles of

denaturation at 95°C (15 s) and annealing at 60°C (1 min). To genotyping for the SNP rs7041 was added TaqMan Master mix (5.0µL), TaqMan assay (0.50 µL), and H<sub>2</sub>O (3.5µL) for a final volume of 9µL per sample, and 1µL of DNA for a total reaction volume of 10µL. Reaction conditions for the rs7041 polymorphism were: 10 min at 95°C after 50 cycles of denaturation at 95°C (15 s) and annealing at 61°C (1 min).

Endpoint fluorescent readings were performed in the 7500 Fast System Sequence Detection Software version 1.4 environment. The internal quality of genotype data was assessed by typing 10% of blinded samples in duplicate.

Lewontin's D' statistic for linkage disequilibrium was calculated for each pair of polymorphisms. Haplotypes were constructed from the combination of the two DBP polymorphisms (rs4588 and rs7041), and their frequencies were inferred using the PHASE 2.1.1 program.

### *Statistical analysis*

The Kolmogorov–Smirnov test and descriptive statistics were used to evaluate the distribution of data. Results are presented as mean ± standard deviation for normally distributed variables, as median (interquartile range) for variables with a non-Gaussian distribution or percentages. Non-Gaussian variables were log-transformed for statistical analysis and reported as back-transformed into their original units. Comparisons between means were analyzed by the unpaired two-tailed Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc tests. Two-way ANOVA test was made for testing the interaction between diagnosis and genotypes groups. Categorical variables and the agreement of genotype frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium for each SNP were analyzed using the Pearson chi-square test [ $\chi^2$ ]. Data were considered as statistically significant at  $p < 0.05$ . The Statistical Package for the Social Sciences 18 (SPSS, Chicago, IL) was used for the analyses.

## **Results**

Participants were mostly Caucasian (93.9%), with the remaining participants having mixed African and European ancestry. Clinical characteristics of the sample are shown in Table 1. Mean chronological age of PCOS and controls were  $22.89 \pm 6.66$  years and  $25.18 \pm 7.72$ , respectively ( $p = 0.013$ ). As expected, women with PCOS had significantly higher BMI, waist circumference, blood pressure, insulin resistance



(HOMA-IR), triglycerides, Ferriman and total testosterone, as well as a lower HDL-c ( $p < 0.05$  for all). MetS was more frequent in PCOS women ( $p < 0.001$ ).

Table 1. Clinical and biochemical profile of PCOS and control women

Variable	Controls (100)	PCOS (191)	p
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.04±6.09	29.70±6.40	0.001
WC (cm)	78.04±11.51	89.23±15.08	<0.001
SBP (mmHg)	109.52±12.90	121.10±15.50	<0.001
DBP (mmHg)	70.83±9.39	78.06±11.53	<0.001
Glucose (mg/dL)	88.53±7.57	88.89±15.30	0.797
HOMA-IR	2.18 (1.42-3.14)	3.52 (1.96-6.36)	<0.001
TC (mg/dL)	170.11±30.72	174.69±38.31	0.290
HDL-c (mg/dL)	52.84±12.28	48.85±10.87	0.007
LDL-c (mg/dL)	101.70±26.30	104.51±31.82	0.443
Triglycerides (mg/dL)	66.00 (50.00-99.00)	89.00 (62.00-131.00)	<0.001
Ferriman	2.19±2.10	15.55±6.108	<0.001
TT (ng/mL)	0.55 (0.42-0.64)	0.82 (0.62-1.11)	<0.001
25(OH)D (ng/mL)	21.50±6.90	21.47±7.61	0.985
Metabolic Syndrome	4.8%	26.5%	<0.001

Data are expressed as mean ± SD, median (interquartile range) (Student t test) or percentage (Pearson chi-square test). WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; TC: total cholesterol, HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D.

Serum 25(OH)D levels were measured in a subsample of participants (54 PCOS and 48 controls). Mean 25(OH)D concentrations in the total sample was  $21.48 \pm 7.25$  ng/mL. Only 12.7% of the overall group had adequate circulating levels of 25(OH)D ( $\geq 30$  ng/mL), 45.1% was insufficient (20-29 ng/mL) and 42.2% was deficient ( $< 20$  ng/mL) in vitamin D. Sufficient vitamin D *status* was similar between PCOS and control groups (14.8% and 10.4%, respectively). When only PCOS group was analyzed, lower vitamin D levels were found in women with MetS, as well as with glucose  $\geq 100$  mg/dL, waist circumference  $\geq 88$  cm and triglycerides  $\geq 150$  mg/dL, when compared to PCOS women with neither of these characteristics (table 2).

Table 2: 25(OH)D levels according metabolic syndrome and theirs components in PCOS women

Variable	25(OH)D levels	P
MetS		
yes	17.17±5.46	0.018
no	22.83±7.74	
Glu≥100 mg/dL		
yes	14.83±6.24	0.025
no	22.22±7.47	
BP≥130/85 mmHg		
yes	23.25±7.80	0.318
no	20.78±7.61	
WC≥88 cm		
yes	19.28±5.92	0.040
no	23.46±8.47	
HDL-c <50 mg/dL		
yes	21.50±7.66	0.974
no	21.42±7.74	
Trig ≥150 mg/dL		
yes	17.84±4.37	0.011
no	22.71±7.85	

Data are expressed as mean ± SD. P value by Student t test. Glu: Glucose; BP: Blood pressure; WC: waist circumference; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol. Trig: Triglycerides

Regarding *DBP* gene polymorphisms, all three SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in the subgroups. Only three, two and one participants were not genotyped to rs2282679, rs7041 and rs4588, respectively. Table 3 shows genotype and allele frequencies to SNPs in the sample. The rs4588 (C→A) polymorphism was in linkage disequilibrium with the rs7041 (T→G) polymorphism ( $|D'| = 1$ ;  $r^2 = 0.44$ ). Three haplotypes were inferred in the sample: CT, CG and AT, formally called GC-1f, GC-1s and GC-2 respectively. The first letter of each haplotype refers to rs4588 SNPs and the second to the rs7041 SNPs. The haplotype frequencies were: CT, 0.21; CG, 0.53; and AT, 0.26. The three common haplotype variants (CT, CG and AT) combined to form six diplotypes: CT-CT, CT-CG, CG-CG, CG-AT, CT-AT and AT-AT with frequencies of 0.06, 0.21, 0.30, 0.25, 0.09, and 0.09 respectively. Taking into

consideration the literature data, AT (GC-2) was considered as the risk haplotype, and CG (GC-1s) as the protective haplotype.

Table 3: Genotype, allele and haplotype frequencies of *BDP* gene variants in PCOS and control women

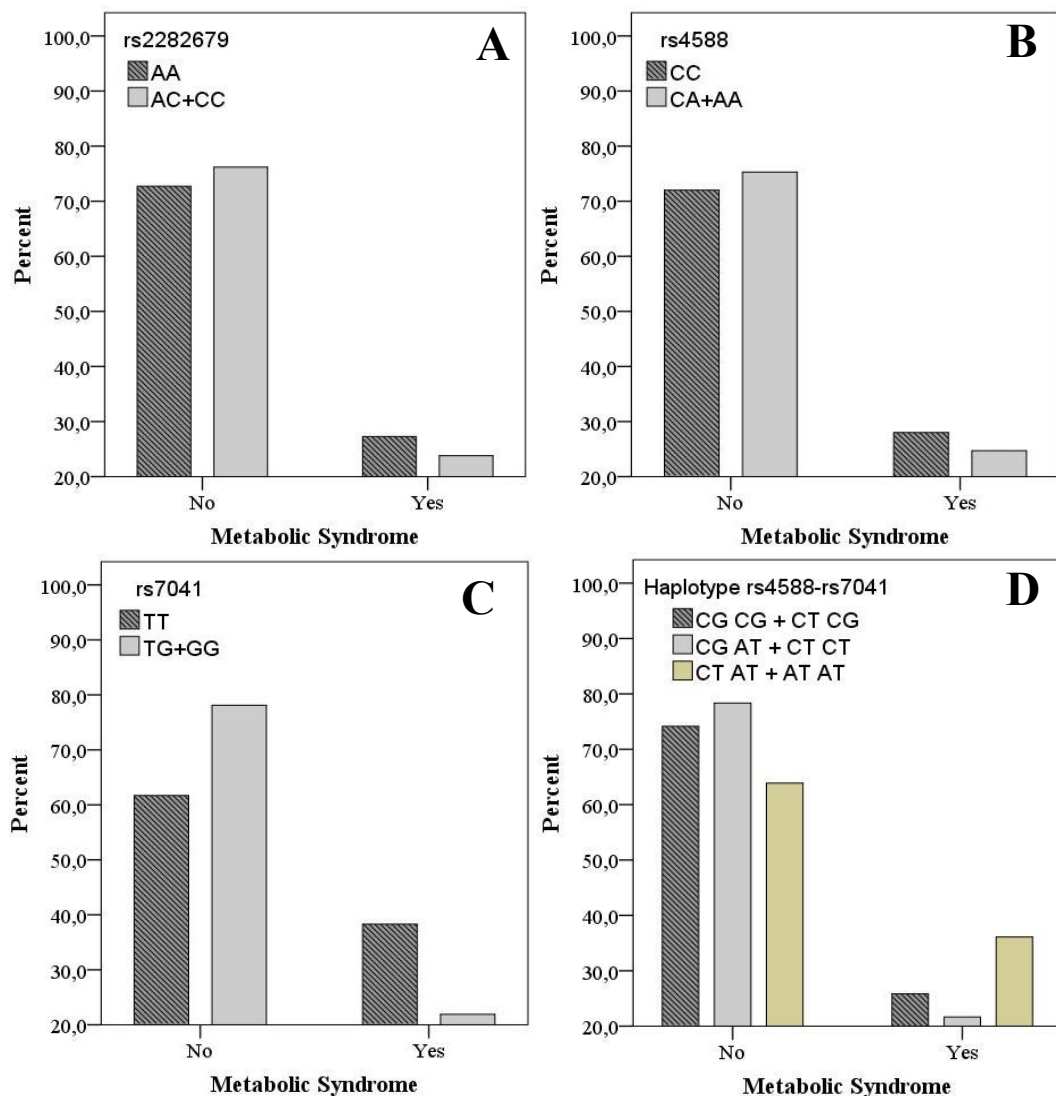
SNP	Controls n (%)	PCOS n (%)	p
<b>rs2282679</b>			
AA	61 (61.0%)	103 (54.8%)	0.360
AC	33 (33.0%)	65 (34.6%)	
CC	6 (6.0%)	20 (10.6%)	
A	155 (77.5%)	271 (72.1%)	0.159
C	45 (22.5%)	105 (27.9%)	
<b>rs4588</b>			
CC	61 (61.0%)	104 (54.7%)	0.479
CA	32(32.0%)	66 (34.7%)	
AA	7 (7.0%)	20 (10.5%)	
C	154 (77.0%)	274 (72.1%)	0.203
A	46 (23.0%)	106 (27.9%)	
<b>rs7041</b>			
TT	24 (24.0%)	47 (24.9%)	0.911
TG	45 (45.0%)	88 (46.6%)	
GG	31 (31.0%)	54 (28.6%)	
T	93 (46.5%)	182 (48.1%)	0.706
G	107 (53.5%)	196 (51.9%)	
<b>Haplotypes</b>			
CG CG + CT	54 (54.0%)	94 (49.3%)	0.740
CG			
CG AT + CT CT	29 (29.0%)	61 (31.9%)	
CT AT + AT AT	17 (17.0%)	36 (18.8%)	

Data are expressed as percentage. p value by Pearson Chi-Square Test. The rs4588-rs7041 haplotype grouped by the presence of risk haplotype.

No association was observed between the polymorphisms and their haplotypes with PCOS (table 3). In the analyses with the PCOS group, we found a higher frequency of TT genotype of rs7041 in PCOS with MetS (OR: 2.21 95%CI: 1.08-4.52; p=0.027). Regarding rs2282679, rs4588 and the haplotype rs4588-rs4071 the frequencies were similar between PCOS with or without MetS (figure 1). Taking into consideration the cutoffs for isolated components of MetS, the TT genotype of rs7041 SNP was more frequent in PCOS with glucose  $\geq 100$  mg/dL that TG+GG genotype

(glucose  $\geq 100$  mg/dL: TT= 17.0%; TG+GG=6.5%; glucose  $< 100$  mg/dL: TT=83.0%; TG+GG=93.5%; OR: 2.96, 95%CI: 1.07-8.20;  $p=0.041$ ). Haplotype CTAT+ATAT was more frequent in in PCOS with glucose  $\geq 100$  mg/dL (glucose  $\geq 100$  mg/dL: CGCG+CTCG=8.8%; CGAT+CTCT=3.3%; CTAT+ATAT=19.4%; glucose  $< 100$  mg/dL: CGCG+CTCG=91.2%; CGAT+CTCT=96.7%; CTAT+ATAT=80.6%,  $p=0.021$ ). Considering rs2282679 and rs4588 polymorphisms and their haplotypes frequencies were similar between cutoffs for isolated components of MetS.

Figure 1: Genotype and haplotype distribution of *DBP* gene according to metabolic syndrome in PCOS women



Data are expressed as percentage. p value by Pearson Chi-Square Test. The rs4588-rs7041 haplotype grouped by the presence of risk haplotype. Frequencies values:

**A:** rs2282679: No - AA: 72.7%; AC+CC: 76.2% / Yes - AA:27.3%; AC+CC:23.8%.  $p=0.593$

**B:** rs4588: No - CC: 72.0%; CA+AA: 75.3% / Yes - CC: 28.0%; AC+CC: 24.7%.  $p=0.613$

**C:** rs7041: No - TT: 61.7%; TG+GG: 78.1% / Yes - TT: 38.3%; TG+GG: 21.9%.  $p=0.027$

**D:** Haplotype rs4588-rs7041: No - CG CG+CT CG: 74.2%; CG AT +CT CT: 78.3%; CT AT+AT AT: 63.9% / Yes - CG CG+CT CG: 25.8%; CG AT +CT CT:21.7%; CT AT+AT AT:36.1%.  $p=0.294$

Tables 4, 5, 6 and 7 present MetS isolated components and 25(OH)D levels in PCOS and control groups, stratified according to the genotypes and haplotypes of *DBP* gene. Significant interaction between cases and controls was found on triglycerides levels among rs7041 genotypes (Two-way ANOVA,  $p$  interaction=0.001) and haplotype rs4588-rs7041 (ANOVA two way,  $p$  interaction=0.019). The TT genotype of rs7041 was associated with lower 25(OH)D level in both PCOS and control. No association was observed for rs2282679 and rs4588 polymorphisms

Table 4: Components of MetS according to different genotypes for SNP rs2282679

Variable	PCOS		Controls		P <sub>Gen</sub>	P <sub>Diag</sub>	P <sub>INT</sub>
	AA	AC+CC	AA	AC+CC			
WC (cm)	90.00±15.78	88.11±14.37	77.53±10.77	78.83±12.72	0.883	<0.001	0.421
SBP (mmHg)	120.79±17.28	120.44±10.98	109.31±12.48	109.89±13.80	0.953	<0.001	0.810
DBP (mmHg)	78.52±12.25	76.80±9.69	71.03±9.70	70.47±8.98	0.425	<0.001	0.688
Glucose (mg/dL)	90.14±17.61	87.32±12.28	87.86±7.25	89.63±8.06	0.779	0.993	0.218
HDL-c (mg/dL)	49.10±10.77	48.68±11.21	51.30±12.26	55.24±12.09	0.243	0.004	0.149
Triglycerides (mg/dL)	93.50 (63.25-132.50)	85.00 (62.00-125.25)	67.00 (53.00-103.50)	54.50 (40.00-88.25)	0.059	<0.001	0.259
25(OH)D (ng/mL)	22.17±7.01	20.53±8.42	21.77±6.67	21.05±7.43	0.433	0.968	0.758

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile range). Two-way ANOVA test. WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D.

Table 5: Components of MetS according to different genotypes for SNP rs4588

Variable	PCOS		Controls		P <sub>Gen</sub>	P <sub>Diag</sub>	P <sub>INT</sub>
	CC	CA+AA	CC	CA+AA			
WC (cm)	90.30±15.53	87.95±14.52	77.77±10.60	78.47±12.96	0.674	<0.001	0.439
SBP (mmHg)	122.10±17.96	119.94±12.09	109.50±12.41	109.56±13.92	0.600	<0.001	0.577
DBP (mmHg)	79.17±12.63	76.68±10.05	70.85±9.81	70.80±8.77	0.386	<0.001	0.410
Glucose (mg/dL)	90.43±17.37	87.03±12.40	87.88±7.33	89.55±7.94	0.641	0.992	0.170
HDL-c (mg/dL)	48.91±10.66	48.79±11.24	51.81±11.83	54.44±12.96	0.404	0.005	0.360
Triglycerides (mg/dL)	95.00 (65.00-134.00)	83 (62.00-124.50)	70.00 (53.00-103.50)	54.50 (40.00-88.25)	0.036	<0.001	0.336
25(OH)D (ng/mL)	22.13±6.97	20.43±8.61	21.77±6.67	21.05±7.43	0.423	0.932	0.743

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile range). Two-way ANOVA test. WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D.

Table 6: Components of MetS according to different genotypes for SNP rs7041

Variable	PCOS		Controls		P <sub>Gen</sub>	P <sub>Diag</sub>	P <sub>INT</sub>
	TT	TG+GG	TT	TG+GG			
WC (cm)	91.03±14.49	88.52±15.32	76.45±10.69	78.65±11.85	0.941	<0.001	0.281
SBP (mmHg)	122.62±12.73	120.09±15.33	107.72±12.63	110.15±13.03	0.980	<0.001	0.245
DBP (mmHg)	78.83±11.32	77.43±11.11	70.82±8.16	70.83±9.85	0.666	<0.001	0.659
Glucose (mg/dL)	90.51±14.77	88.28±15.58	90.42±8.21	87.93±7.33	0.918	0.267	0.952
HDL-c (mg/dL)	49.81±10.24	48.58±11.15	57.74±14.25	51.08±11.09	0.019	0.001	0.104
Triglycerides (mg/dL)	92.00 (67.00-126.00)	86.00 (61.24-131.00)	50.00 (36.00-60.00)	72.50 (54.25-104.25)	0.028	<0.001	0.001
25(OH)D (ng/mL)	18.44±7.73	22.53±7.38	16.87±4.16	22.57±6.99	0.005	0.653	0.638

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile range). Two-way ANOVA test. WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D.



Table 7: Components of MetS according to different genotypes for haplotypes rs4588-rs7041

Variable	PCOS			Controls			P <sub>Gen</sub>	P <sub>Diag</sub>	P <sub>INT</sub>
	CG CG + CT CG	CG AT + CT CT	CT AT + AT AT	CG CG + CT CG	CG AT + CT CT	CT AT + AT AT			
SBP (mmHg)	121.40±17.85	120.67±14.34	121.08±10.57	110.25±12.41	108.02±14.41	109.31±12.95	0.812	<0.001	0.948
DBP (mmHg)	78.80±12.54	77.23±10.51	77.64±10.69	71.00±9.93	70.12±9.58	71.25±7.86	0.770	<0.001	0.930
WC (cm)	89.84±15.55	87.73±14.99	90.15±14.26	78.17±10.81	78.55±13.31	77.00±11.39	0.928	<0.001	0.765
Glucose (mg/dL)	90.65±17.70	85.03±10.11	91.00±15.19	87.22±7.19	90.08±7.47	89.67±8.83	0.576	0.963	0.107
HDL-c (mg/dL)	48.91±10.51	47.98±12.01	50.14±9.84	50.60±10.84	54.71±13.35	56.47±13.92	0.177	0.002	0.249
Trig (mg/dL)	97.00 (64.50-131.50)	81.50 (61.25-136.25)	91.50 (66.25-121.75)	71.00 (55.00-107.00)	70.00 (50.00-90.00)	47.00 (34.00-57.00)	0.035	<0.001	0.019
25(OH)D (ng/mL)	22.76±7.02	20.75±7.88	18.80±8.78	22.73±6.29	20.38±8.61	18.75±3.55	0.126	0.928	0.994

Data are expressed as mean ± SD or median (interquartile range). Two-way ANOVA test. WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol. The rs4588-rs7041 haplotype grouped by the presence of risk haplotype; Trig: Triglycerides; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D.

## Discussion

In the present study 25(OH)D levels were lower in PCOS with MetS or their isolated components, such as higher glucose, waist circumference or triglycerides. No association was found between *DBP* gene polymorphisms rs2282679, rs4588 and rs7041 and their haplotypes and risk for PCOS. In turn, women with PCOS carrying the TT genotype of rs7041 were twice and three times more likely to present MetS and glucose above 100mg/dL, respectively. To the best of our knowledge, this is the first report to show that association between MetS and rs7041 gene polymorphism in a PCOS population.

Similar to our results, a recent meta-analysis reported that vitamin D levels are related to metabolic and hormonal disturbances in PCOS women. In that study women with PCOS and with vitamin D deficiency were more likely to have dysglycemia compared to those without vitamin D deficiency (He, Lin et al. 2015). In addition, a study comparing PCOS and controls showed that vitamin D levels were lower in participants with both PCOS and metabolic syndrome compared to those with PCOS and without metabolic syndrome. Furthermore, the vitamin d levels decrease as add up risk factors for MetS (Joham, Teede et al. 2015).

Only few studies are available on literature assessing rs4588 and rs704 SNPs in relation to metabolic parameters. Some studies have shown an association of polymorphisms of exon 11 with circulating levels of insulin and HOMA-IR (Hirai, Suzuki et al. 2000) and glucose levels (Baier, Dobberfuhl et al. 1998) in non-diabetic individuals. On the other hand, these polymorphisms were not associated with type 2 diabetes (Baier, Dobberfuhl et al. 1998, Ye, Dubois-Laforgue et al. 2001).

Few studies are available on literature regarding rs4588 and rs7041 polymorphisms and vitamin D levels in PCOS. One study reported no interaction between 25(OH)D with SNPs of *DBP* (Michos, Misialek et al. 2015) and other showed a marginal interaction for 25(OH)D deficiency with rs7041 among white subjects (Takiar, Lutsey et al. 2015). In adult and old populations, two studies with Chinese participants have shown that both rs4588 and rs7041 SNPs, as well as the ATAT haplotype, were related to lower 25(OH)D levels (Lu, Sheng et al. 2012, Robien, Butler et al. 2012). Similar results were reported in young Canadian adults (Fang, van Meurs et al. 2009, Gozdzik, Zhu et al. 2011) and elderly Caucasians. Finally, premenopausal white women (Sinotte, Diorio et al. 2009) and early postmenopausal women

(Lauridsen, Vestergaard et al. 2005) carrying the AA genotype and TT genotype (rs4588 and rs7041, respectively) have lower 25(OH)D concentrations.

In a previous study with 545 Austrian women with PCOS aged 16–45 years, no higher risk to PCOS was found, according the genotypes of rs2282679. However, weight, height, BMI, WC and lipid profile were significantly different between rs2282679 genotypes (Wehr, Trummer et al. 2011). In contrast, we did not find associations between components of MetS and rs2282679 polymorphisms. This may be occurred due to ethnic differences among the two populations as well as because of the age of participants that were older in the study of Wehr et al.

The *DBP* gene encodes a multifunctional plasma protein DBP, also known as a group-specific component, a protein that is synthesized in the liver, binds and transports vitamin D and its metabolites. Apart from its specific sterol binding capacity, DBP exerts several other important biological functions such as actin scavenging, fatty acid transport, macrophage activation, and chemotaxis (Speeckaert, Huang et al. 2006).

Of note, a major function of DBP is the binding of mainly monounsaturated and saturated fatty acids (Speeckaert, Huang et al. 2006). The link of obesity with vitamin D has been described in PCOS (Wehr, Pilz et al. 2009) as well as in other populations (Reinchr, de Sousa et al. 2007, Alemzadeh, Kichler et al. 2008, Ashraf, Alvarez et al. 2009, Reis, von Muhlen et al. 2009, Delvin, Lambert et al. 2010, Johnson, Nader et al. 2010), the relationship with DBP is, however, less clear. In elderly men, a positive relationship was described between DBP concentrations and BMI (Taes, Goemaere et al. 2006). However, the same association was not confirmed in women aged 18 to 44 years (Winters, Chennubhatla et al. 2009). Overall, the underlying mechanisms of this association are not known so far but deserve further investigation.

It is also important to point out that the two polymorphisms (rs4588 and rs7041), which are located in exon 11, are in linkage disequilibrium, making it difficult to discern the best single SNP surrogate to fully capture genetic variability for this region. Indeed, the rs4588 and rs7041 were previously described as being in linkage disequilibrium in healthy girl population from southern Brazil, and were associated with 25(OH)D levels (Santos, Mascarenhas et al. 2013).

One limitation of this study was the relatively small sample size of 291 participants does not allowing to make some complementary analysis. However, the effect sizes observed in our sample are similar to those reported in other PCOS

populations. Other limitation is having no data on DBP levels of participants. However, *DBP* gene polymorphism seems to have no effect on the relationship between 25(OH)D and PTH in infants and toddlers (Carpenter, Zhang et al. 2012). Other possible limitations are the lack of data on dietary vitamin D intake and daily sun exposure. However, it is well recognized that below a latitude of approximately 35°, UVB radiation is sufficient for vitamin D synthesis all year round (Webb, Kline et al. 1988). While in the present study DBP measurements were not available, previous studies have shown that DBP levels are associated with *DBP* gene polymorphisms (Lauridsen, Vestergaard et al. 2001, Lauridsen, Vestergaard et al. 2005) and positively correlated with 25(OH)D levels (Carpenter, Zhang et al. 2012).

In conclusion, the present study was the first to assess *DBP* gene variants and PCOS susceptibility in Brazilian women. Our results indicated that rs2282679, rs4588 and rs7041 polymorphisms in *DBP* gene, and its haplotypes, were not related to PCOS, but suggest an association between vitamin D levels, the TT genotype of SNP rs7041 and MetS and fasting glucose levels in PCOS women from southern Brazil.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from Brazilian National Institute of Hormones and Women's Health, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq INCT 573747/2008-3], Porto Alegre, Brazil. We thank Sheila Lecke for their support with 25(OH)D assays.

### References

- Ahn, J., et al. (2010). "Genome-wide association study of circulating vitamin D levels." Human Molecular Genetics **19**(13): 2739-2745.
- Alberti, K., et al. (2009). "Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." Circulation **120**(16): 1640-1645.
- Alemzadeh, R., et al. (2008). "Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season." Metabolism-Clinical and Experimental **57**(2): 183-191.
- Arabi, A., et al. (2010). "Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes." Nature Reviews Endocrinology **6**(10): 550-561.

Ashraf, A., et al. (2009). "Threshold for Effects of Vitamin D Deficiency on Glucose Metabolism in Obese Female African-American Adolescents." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **94**(9): 3200-3206.

Asuncion, M., et al. (2000). "A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(7): 2434-2438.

Azziz, R., et al. (2004). "The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(6): 2745-2749.

Baier, L. J., et al. (1998). "Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) are associated with oral glucose tolerance in nondiabetic Pima Indians." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **83**(8): 2993-2996.

Carpenter, T. O., et al. (2012). "Vitamin D Binding Protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers." Journal of Bone and Mineral Research.

Christiansen, M., et al. (2007). "Protein chemical characterization of Gc globulin (vitamin D-binding protein) isoforms; Gc-1f, gc-1s and gc-2." Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1774**(4).

Chun, R. F. (2012). "New perspectives on the vitamin D binding protein." Cell Biochemistry and Function **30**(6).

Chun, R. F., et al. (2008). "Back to the future: a new look at 'old' vitamin D." Journal of Endocrinology **198**(2).

Delvin, E. E., et al. (2010). "Vitamin D Status Is Modestly Associated with Glycemia and Indicators of Lipid Metabolism in French-Canadian Children and Adolescents." Journal of Nutrition **140**(5): 987-991.

Di Domenico, K., et al. (2013). "Cardiac autonomic modulation in polycystic ovary syndrome: does the phenotype matter?" Fertility and Sterility **99**(1): 286-292.

Fang, Y., et al. (2009). "Vitamin D Binding Protein Genotype and Osteoporosis." Calcified Tissue International **85**(2): 85-93.

Ferriman, D. and J. D. Gallwey (1961). "CLINICAL ASSESSMENT OF BODY HAIR GROWTH IN WOMEN." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **21**(11): 1440-&.

Gozdzik, A., et al. (2011). "Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **127**(3-5): 405-412.

Graff, S. K., et al. (2013). "Dietary glycemic index is associated with less favorable anthropometric and metabolic profiles in polycystic ovary syndrome women with different phenotypes." Fertility and Sterility **100**(4): 1081-1088.

He, C. L., et al. (2015). "Serum Vitamin D Levels and Polycystic Ovary syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis." Nutrients **7**(6): 4555-4577.

Hirai, M., et al. (2000). "Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(5): 1951-1953.

Holick, M. F., et al. (2011). "Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **96**(7): 1911-1930.

Joham, A. E., et al. (2015). Vitamin D in polycystic ovary syndrome: Relationship to obesity and insulin resistance. *Molecular Nutrition & Food Research*. **Epub ahead of print**.

Johnson, M. D., et al. (2010). "Relationships between 25-Hydroxyvitamin D Levels and Plasma Glucose and Lipid Levels in Pediatric Outpatients." Journal of Pediatrics **156**(3): 444-U146.

Lauridsen, A. L., et al. (2005). "Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): A cross-sectional study on 595 - Early postmenopausal women." Calcified Tissue International **77**(1).

Lauridsen, A. L., et al. (2001). "Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women." Clinical Chemistry **47**(4): 753-756.

Lu, L., et al. (2012). "Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese Hans." Human Genetics **131**(3).

March, W. A., et al. (2010). "The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria." Human Reproduction **25**(2): 544-551.

Michos, E. D., et al. (2015). "25-hydroxyvitamin D levels, vitamin D binding protein gene polymorphisms and incident coronary heart disease among whites and blacks: The ARIC study." Atherosclerosis **241**(1): 12-17.

Miller, S. A., et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Research **16**(3): 1215-1215.

Ramos, R. B. and P. M. Spritzer (2015). "FTO gene variants are not associated with polycystic ovary syndrome in women from Southern Brazil." Gene **560**(1): 25-29.

Reinchr, T., et al. (2007). "Vitamin D status and parathyroid hormone in obese children before and after weight loss." European Journal of Endocrinology **157**(2): 225-232.

Reis, J. P., et al. (2009). "Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population." Pediatrics **124**(3): E371-E379.

Robien, K., et al. (2012). "Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore." British Journal of Nutrition.

Santos, B. R., et al. (2013). "Variations in the Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene Are Related to Lower 25-Hydroxyvitamin D Levels in Healthy Girls: A Cross-Sectional Study." Hormone Research in Paediatrics **79**(3): 162-168.

Sinotte, M., et al. (2009). "Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women." American Journal of Clinical Nutrition **89**(2): 634-640.

Speeckaert, M., et al. (2006). "Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism." Clinica Chimica Acta **372**(1-2): 33-42.

Taes, Y. E. C., et al. (2006). "Vitamin D binding protein, bone status and body composition in community-dwelling elderly men." Bone **38**(5): 701-707.

Takiar, R., et al. (2015). "The associations of 25-hydroxyvitamin D levels, vitamin D binding protein gene polymorphisms, and race with risk of incident fracture-related hospitalization: Twenty-year follow-up in a bi-ethnic cohort (the ARIC Study)." Bone **78**: 94-101.

Toscani, M., et al. (2007). "Estimation of truncal adiposity using waist circumference or the sum of trunk skinfolds: a pilot study for insulin resistance screening in hirsute patients with or without polycystic ovary syndrome." Metabolism-Clinical and Experimental **56**(7): 992-997.

Wallace, T. M., et al. (2004). "Use and abuse of HOMA modeling." Diabetes Care **27**(6): 1487-1495.

Wang, T. J., et al. (2010). "Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study." Lancet **376**(9736): 180-188.

Webb, A. R., et al. (1988). "Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin-D3 - exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin-D3 synthesis in human-skin." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **67**(2): 373-378.

Wehr, E., et al. (2009). "Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome." European Journal of Endocrinology **161**(4): 575-582.

Wehr, E., et al. (2011). "Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome." European Journal of Endocrinology **164**(5): 741-749.

Winters, S. J., et al. (2009). "Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women." Metabolism-Clinical and Experimental **58**(4): 438-442.

Ye, W. Z., et al. (2001). "Variations in the vitamin D-Binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians." Metabolism: Clinical and Experimental **50**(3): 366-369.



## 5. DISCUSSÃO

No primeiro estudo da presente Tese verificou-se a associação entre os polimorfismos rs4588 e rs7041, bem como seu haplótipo, com níveis séricos de vitamina D em uma população de meninas do sul do Brasil. Salienta-se que a amostra estudada incluiu meninas adolescentes saudáveis, bem nutridas e com crescimento normal, de acordo com dados antropométricos e os níveis de IGF-1. Nesse estudo transversal, nenhum aspecto clínico adverso foi detectado, apesar da alta prevalência de baixos níveis de 25(OH)D. O resultado encontrado estende nossa investigação sobre polimorfismos genéticos em meninas sem doença aparente ou relatada e níveis circulante de Vitamina D, uma vez que recentemente nosso grupo descreveu a associação dos polimorfismos BsmI, ApaI e Taq-I no gene do VDR com hipovitaminose D (Santos, Mascarenhas et al. 2012).

Nossos resultados sustentam dados prévios de associação dos polimorfismos da DBP com níveis séricos de Vitamina D em adultos e também em crianças. Em um estudo de 2012, incluindo 750 crianças de 6 meses a 3 anos de idade, Carpenter e colaboradores demonstraram que os níveis de 25(OH)D são inferiores naqueles indivíduos que carregam o genótipo AA do SNP rs4588, mas não encontraram associação com os genótipos do SNP rs7041 (Carpenter, Zhang et al. 2012). Em relação a populações adultas, dois estudos com população chinesa demonstraram que tanto o rs4588 quanto o rs7041, bem como o haplótipo ATAT, foram relacionados com níveis mais baixos de 25(OH)D (Lu, Sheng et al. 2012, Robien, Butler et al. 2012). Resultados similares foram descritos em jovens adultos canadenses (Gozdzik, Zhu et al. 2011) e idosos de origem caucasiana (Fang, van Meurs et al. 2009). Finalmente, mulheres brancas na pré-menopausa (Sinotte, Diorio et al. 2009) e na pós-menopausa recente (Lauridsen, Vestergaard et al. 2005) que carregam os genótipos AA e TT (rs4588 e rs7041, respectivamente) apresentam menores concentrações de 25(OH)D.

Sabe-se que as três principais isoformas proteicas da DBP são determinadas pela combinação alélica dos polimorfismos rs4588 e rs7041, e são distinguidas pela sequência de amino ácido e padrão de glicosilação (Borges, Jarvis et al. 2008, Ravnsborg, Olsen et al. 2010). A isoforma GC-1f é a combinação de um ácido aspártico na posição 432 com uma treonina na posição 436, a GC-1s resulta da combinação de um ácido glutâmico na posição 432 com uma treonina na posição 436 e a isoforma GC-2 é a combinação de um ácido aspártico na posição 432 e uma lisina na posição 436 (Christiansen, Jorgensen et al. 2007, Chun, Adams et al. 2008, Chun 2012). Já foi demonstrado que essas diferenças na sequência de aminoácidos são relacionadas com a afinidade de ligação da DBP a 25(OH)D, sendo que a GC-1f possui maior afinidade, a GC-1s possui afinidade intermediária e a GC-2 apresenta menor afinidade de ligação (Arnaud and Constans 1993, Chun, Adams et al. 2008, Chun 2012). Contudo, a importância biológica desse padrão de afinidade de ligação não está totalmente clara, uma vez que pequenas quantidades de 25(OH)D circulam na forma livre. Além disso, observa-se na circulação uma concentração em excesso da DBP em relação a Vitamina D, sendo que a maior parte da DBP circula sem estar transportando esse ligante, diferente do que ocorre com outras proteínas transportadoras (Chun 2012).

Interessante observar que a isoforma GC-2 (haplótipo AT), que é associada com menores níveis de 25(OH)D e menor afinidade por esse ligante, é também relacionada com maiores níveis de 25(OH)D livre (Chun, Peercy et al. 2012), e estudos sugerem que algumas funções da Vitamina D são mais fortemente correlacionadas com a sua concentração na forma livre do que com a sua concentração total (ligada e livre) (Powe, Ricciardi et al. 2011). Portanto, os baixos níveis de 25(OH)D associados a isoforma GC-2 da DBP que encontramos podem não ser diretamente relacionados com a hipovitaminose D e suas implicações, uma vez que a sua fração livre tende a variar inversamente.

Considerando o segundo estudo dessa tese, onde avaliou-se os níveis séricos de vitamina D, a associação dos polimorfismos da DBP com vitamina D, SMet e seus componentes em mulheres com PCOS, observamos que mulheres com PCOS e SMet possuem concentrações menores de vitamina D e que a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos foi similar entre as PCOS e controles, mas o genótipo TT do SNP rs7041 foi associado com níveis circulantes menores de vitamina D. Por outro lado, observou-se também uma associação do genótipo TT do SNP rs7041 com

SMet e com níveis séricos de glicose acima de 100mg/dL nas mulheres com PCOS. Nesse sentido, as PCOS que carregam esse genótipo apresentam duas vezes mais chances de desenvolver SMet e aproximadamente três vezes mais chances de apresentar uma glicose acima de 100mg/dL. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a demonstrar a associação entre SMet e o polimorfismo rs7041 em uma população de mulheres com PCOS.

Semelhante ao nosso resultado, uma recente meta-análise demonstrou que os níveis séricos de vitamina D se relacionam com alterações metabólicas e hormonais em mulheres com PCOS. Nesse estudo mulheres com PCOS e com deficiência de vitamina D foram mais propensas a ter disglucemia em comparação com aquelas sem deficiência de vitamina D (He, Lin et al. 2015). Em outro estudo comparando PCOS e controles foi observado que a concentração de vitamina D foi mais baixa nas participantes com PCOS e SMet comparada aquelas sem SMet. Além disso, os níveis de vitamina D diminuem conforme se somam fatores de risco para SMet (Joham, Teede et al. 2015).

São escassos os estudos que tenham avaliado a associação dos SNPs rs4588 e rs7041 com parâmetros metabólicos. Alguns estudos demonstraram essa associação com níveis séricos de insulina e medidas de resistência insulínica (HOMA-IR) (Hirai, Suzuki et al. 2000) e níveis de glicose (Baier, Dobberfuhl et al. 1998) em indivíduos sem diabetes. Por outro lado, esses polimorfismos não parecem estar associados com o diagnóstico de diabetes tipo 2 (Baier, Dobberfuhl et al. 1998, Ye, Dubois-Laforgue et al. 2001).

São poucos os estudos na literatura que avaliaram os polimorfismos rs4588 e rs7041 e vitamina D em PCOS. Um estudo não encontrou interação entre a concentração de 25(OH)D e os polimorfismos da DBP (Michos, Misialek et al. 2015) e outro estudo mostrou uma interação marginal entre a deficiência de 25(OH)D e o rs7041 em população branca (Takiar, Lutsey et al. 2015). Por outro lado, e como já citado nessa discussão, outros estudos apontam a associação desses polimorfismos com população chinesa (Lu, Sheng et al. 2012, Robien, Butler et al. 2012), jovens (Goździk, Zhu et al. 2011), idosos (Fang, van Meurs et al. 2009), mulheres na pré-menopausa (Sinotte, Diorio et al. 2009) e na pós-menopausa (Lauridsen, Vestergaard et al. 2005).

Um estudo incluindo 545 mulheres australianas com PCOS, com idade entre 16 e 45 anos, o risco para PCOS não se mostrou elevado de acordo com os genótipos

do polimorfismo rs2282679. No entanto, peso, altura, IMC, circunferência da cintura e perfil lipídico foram diferentes (Wehr, Trummer et al. 2011). Contrastando com esses resultados, não encontramos associação entre os componentes da SMet e o SNP rs2282679. Isso pode ter ocorrido pelas diferenças étnicas entre as duas populações estudadas. Também pode ser explicado pela idade das participantes, sendo que as avaliadas por Wehr e colaboradores possuem idade mais avançada.

A DBP é sintetizada no fígado e possui diferentes isoformas, como já mencionado, que ligam e transportam a Vitamina D e seus metabólitos. Além da sua capacidade de ligação aos esteroides, a DPB exerce outras importantes funções fisiológicas, tais como transporte de ácidos graxos, ativação de macrófagos e quimiotaxia (Speeckaert, Huang et al. 2006).

É importante salientar que uma das principais funções da DBP é ligar ácidos graxos (Speeckaert, Huang et al. 2006). A relação entre obesidade e Vitamina D em PCOS já foi descrita (Wehr, Pilz et al. 2009), bem como em outras populações (Reinchr, de Sousa et al. 2007, Alemzadeh, Kichler et al. 2008, Ashraf, Alvarez et al. 2009, Reis, von Muhlen et al. 2009, Delvin, Lambert et al. 2010, Johnson, Nader et al. 2010), mas a relação da obesidade com a DBP não é clara. Em homens idosos foi descrita uma relação positiva entre a concentração da DBP e IMC (Taes, Goemaere et al. 2006), no entanto essa mesma associação não é confirmada em mulheres entre 18 e 44 anos (Winters, Chennubhatla et al. 2009). Porém, os mecanismos subjacentes desta associação não são conhecidos até agora, e merecem uma investigação mais aprofundada.

Um ponto que deve ser destacado, é que os polimorfismos rs4588 e rs7041, localizados no exon 11, estão em desequilíbrio de ligação, e isso acaba dificultando o conhecimento da real variabilidade genética dessa região e a contribuição de cada polimorfismo. Ainda, os SNPs rs4588 e rs7041 também se apresentaram em desequilíbrio de ligação na população do estudo 1 dessa tese e foram associados com níveis séricos de 25(OH)D.

Nossos estudos apresentam limitações como a falta de dados sobre dieta e exposição solar. No entanto, sabe-se que abaixo de uma latitude de aproximadamente 35°, a radiação UVB é suficiente para a síntese da vitamina D durante todo o ano (Webb, Kline et al. 1988). Outra possível limitação é não ter mensurado os níveis de DBP. Mas estudos prévios mostraram que os níveis de DBP são associados com seus polimorfismos (Lauridsen, Vestergaard et al. 2001, Lauridsen, Vestergaard et al. 2005)

e positivamente correlacionados com os níveis de 25(OH)D (Carpenter, Zhang et al. 2012).

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos sugerem que os baixos níveis séricos de vitamina D estão associados com SMet e componentes em mulheres com PCOS. Também indicam que os genótipos dos polimorfismos rs4588 e rs7041 do gene da DBP estão relacionados com a susceptibilidade a baixos níveis de 25(OH)D em crianças e adolescentes do sexo feminino, bem como em mulheres adultas com e sem PCOS. Também que os SNPs estudados não conferem risco para PCOS, mas apresentam uma associação entre o genótipo TT de rs7041 e SMet e os níveis de glicose em jejum em mulheres com PCOS do sul do Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS

Ahn, J., et al. (2009). "Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk." Carcinogenesis **30**(5): 769-776.

Ahn, J., et al. (2010). "Genome-wide association study of circulating vitamin D levels." Human Molecular Genetics **19**(13): 2739-2745.

Alberti, K., et al. (2009). "Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." Circulation **120**(16): 1640-1645.

Alemzadeh, R., et al. (2008). "Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season." Metabolism-Clinical and Experimental **57**(2): 183-191.

Alvarez, J. A. and A. Ashraf (2010). "Role of Vitamin D in Insulin Secretion and Insulin Sensitivity for Glucose Homeostasis." International Journal of Endocrinology: 18.

Arabi, A., et al. (2010). "Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes." Nature Reviews Endocrinology **6**(10): 550-561.

Arnaud, J. and J. Constans (1993). "Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP)." Hum Genet **92**(2): 183-188.

Arnaud, J. and J. Constans (1993). "Affinity Differences for Vitamin-D Metabolites Associated with the Genetic Isoforms of the Human Serum Carrier Protein (DBP)." Human Genetics **92**(2): 183-188.

Ashraf, A., et al. (2009). "Threshold for Effects of Vitamin D Deficiency on Glucose Metabolism in Obese Female African-American Adolescents." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **94**(9): 3200-3206.

Asuncion, M., et al. (2000). "A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(7): 2434-2438.

Aydin, Y., et al. (2015). "What is the Risk of Metabolic Syndrome in Adolescents with Normal BMI who have Polycystic Ovary Syndrome?" Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology **28**(4): 271-274.

Azziz, R., et al. (2004). "The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(6): 2745-2749.

- Baier, L. J., et al. (1998). "Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) are associated with oral glucose tolerance in nondiabetic Pima Indians." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **83**(8): 2993-2996.
- Bland, R., et al. (2004). "Expression of 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase in pancreatic islets." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **89-90**(1-5): 121-125.
- Bojikian, L. P., et al. (2002). "Auto-avaliação puberal feminina por meio da utilização de desenhos e fotos." Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde **7**(2): 24 - 34.
- Borges, C. R., et al. (2008). "Population studies of Vitamin D binding protein microheterogeneity by mass spectrometry lead to characterization of its genotype-dependent O-glycosylation patterns." Journal of Proteome Research **7**(9): 4143-4153.
- Boucher, B. J. (1998). "Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome 'X'?" British Journal of Nutrition **79**(4): 315-327.
- Brumbaugh, P. F. and M. R. Haussler (1974). "1 alfa,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine .1. Association of 1 alfa,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal-mucosa chromatin" Journal of Biological Chemistry, **249**, 1251-1257.
- Carpenter, T. O., et al. (2012). "Vitamin D Binding Protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers." Journal of Bone and Mineral Research.
- Christiansen, M., et al. (2007). "Protein chemical characterization of Gc globulin (vitamin D-binding protein) isoforms; Gc-1f, gc-1s and gc-2." Biochim Biophys Acta **1774**(4): 481-492.
- Chun, R. F. (2012). "New perspectives on the vitamin D binding protein." Cell Biochem Funct **30**(6): 445-456.
- Chun, R. F., et al. (2008). "Back to the future: a new look at 'old' vitamin D." J Endocrinol **198**(2): 261-269.
- Chun, R. F., et al. (2012). "Vitamin D Binding Protein and Monocyte Response to 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D: Analysis by Mathematical Modeling." Plos One **7**(1).
- Cole, T. J., et al. (2000). "Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey." British Medical Journal **320**(7244): 1240-1243.
- Delvin, E. E., et al. (2010). "Vitamin D Status Is Modestly Associated with Glycemia and Indicators of Lipid Metabolism in French-Canadian Children and Adolescents." Journal of Nutrition **140**(5): 987-991.
- Di Domenico, K., et al. (2013). "Cardiac autonomic modulation in polycystic ovary syndrome: does the phenotype matter?" Fertility and Sterility **99**(1): 286-292.



Dusso, A. S., et al. (2005). "Vitamin D." American Journal of Physiology-Renal Physiology **289**(1): F8-F28.

Engelman, C. D., et al. (2008). "Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **93**(9): 3381-3388.

Enjuanes, A., et al. (2003). "Regulation of CYP19 gene expression in primary human osteoblasts: effects of vitamin D and other treatments." European Journal of Endocrinology **148**(5): 519-526.

Fang, Y., et al. (2009). "Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis." Calcif Tissue Int **85**(2): 85-93.

Fang, Y., et al. (2009). "Vitamin D Binding Protein Genotype and Osteoporosis." Calcified Tissue International **85**(2): 85-93.

Ferriman, D. and J. D. Gallwey (1961). "Clinical Assessment of Body Hair Growth in Women." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **21**(11): 1440-&.

Gharaibeh, M. A. and B. J. Stoecker (2009). "Assessment of serum 25(OH)D concentration in women of childbearing age and their preschool children in Northern Jordan during summer." European Journal of Clinical Nutrition **63**(11): 1320-1326.

Glintborg, D., et al. (2005). "Higher bone mineral density in Caucasian, hirsute patients of reproductive age. Positive correlation of testosterone levels with bone mineral density in hirsutism." Clinical Endocrinology **62**(6): 683-691.

Gozdzik, A., et al. (2011). "Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry." J Steroid Biochem Mol Biol **127**(3-5): 405-412.

Graff, S. K., et al. (2013). "Dietary glycemic index is associated with less favorable anthropometric and metabolic profiles in polycystic ovary syndrome women with different phenotypes." Fertility and Sterility **100**(4): 1081-1088.

Hahn, S., et al. (2006). "Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome." Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes **114**(10): 577-583.

Harinarayan, C. V., et al. (2008). "Vitamin D status in andhra pradesh: A population based study." Indian Journal of Medical Research **127**(3): 211-218.

Haussler, M. R., G. K. Whitfield, C. A. Haussler, J. C. Hsieh, P. D. Thompson, S. H. Selznick, C. E. Dominguez and P. W. Jurutka (1998). "The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed." Journal of Bone and Mineral Research, **13**, 325-349.

He, C. L., et al. (2015). "Serum Vitamin D Levels and Polycystic Ovary syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis." Nutrients **7**(6): 4555-4577.

He, J. H., et al. (2010). "Minireview: Nuclear Receptor-Controlled Steroid Hormone Synthesis and Metabolism." Molecular Endocrinology **24**(1): 11-21.

Hirai, M., et al. (2000). "Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(5): 1951-1953.

Holick, M. F. (2007). "Vitamin D deficiency." New England Journal of Medicine **357**(3): 266-281.

Holick, M. F. and H. F. Deluca (1974). "Vitamin-D Metabolism." Annual Review of Medicine **25**: 349-367.

Irani, M. and Z. Merhi (2014). "Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review." Fertility and Sterility **102**(2): 460-U191.

Janssens, W., et al. (2010). "Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene." Thorax **65**(3): 215-220.

Joham, A. E., et al. (2015). Vitamin D in polycystic ovary syndrome: Relationship to obesity and insulin resistance. Molecular Nutrition & Food Research. **Epub ahead of print**.

Johnson, M. D., et al. (2010). "Relationships between 25-Hydroxyvitamin D Levels and Plasma Glucose and Lipid Levels in Pediatric Outpatients." Journal of Pediatrics **156**(3): 444-U146.

Kinuta, K., et al. (2000). "Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads." Endocrinology **141**(4): 1317-1324.

Krishnan, A. V., et al. (2010). "Vitamin D and breast cancer: Inhibition of estrogen synthesis and signaling." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **121**(1-2): 343-348.

Kuczarski, R. J., et al. (2000). "CDC growth charts: United States." Advance data from vital and health statistics of the Centers for Disease Control and Prevention/National Center for Health Statistics.(314): 1 - 27.

Lauridsen, A. L., et al. (2005). "Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): A cross-sectional study on 595 - Early postmenopausal women." Calcified Tissue International **77**(1).

Lauridsen, A. L., et al. (2005). "Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding

protein): A cross-sectional study on 595 - Early postmenopausal women." Calcif Tissue Int **77**(1): 15-22.

Lauridsen, A. L., et al. (2001). "Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women." Clinical Chemistry **47**(4): 753-756.

Lu, L., et al. (2012). "Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese Hans." Hum Genet **131**(3): 505-512.

Madar, A. A., et al. (2009). "Vitamin D status among immigrant mothers from Pakistan, Turkey and Somalia and their infants attending child health clinics in Norway." British Journal of Nutrition **101**(7): 1052-1058.

Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR Heterodimers and Orphan Receptors". Cell, **83**, 841-850.

March, W. A., et al. (2010). "The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria." Human Reproduction **25**(2): 544-551.

Marshall, W. A. and J. M. Tanner (1969). "Variations in Pattern of Pubertal Changes in Girls." Archives of Disease in Childhood **44**(235): 291-&.

Matsudo, S. M. M. and V. K. R. Matsudo (1994). "Self-Assessment and Physician Assessment of Sexual-Maturation in Brazilian Boys and Girls - Concordance And Reproducibility." American Journal of Human Biology **6**(4): 451-455.

Melamed, M. L. and J. Kumar (2010). "Low levels of 25-hydroxyvitamin D in the pediatric populations: prevalence and clinical outcomes." Pediatric Health **4**(1): 89-97.

Michos, E. D., et al. (2015). "25-hydroxyvitamin D levels, vitamin D binding protein gene polymorphisms and incident coronary heart disease among whites and blacks: The ARIC study." Atherosclerosis **241**(1): 12-17.

Miller, S. A., et al. (1988). "A Simple Salting Out Procedure for Extracting DNA From Human Nucleated Cells." Nucleic Acids Research **16**(3): 1215-1215.

Palomer, X., et al. (2008). "Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." Diabetes Obesity & Metabolism **10**(3): 185-197.

Peters, B. S. E., et al. (2009). "Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents." Annals of Nutrition and Metabolism **54**(1): 15-21.

Pike, J. W. and M. B. Meyer (2010). "The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D-3." Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, **39**, 255-269.

Pittas, A. G. and B. Dawson-Hughes (2010). "Vitamin D and diabetes." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **121**(1-2): 425-429.

Pittas, A. G., et al. (2007). "Review: The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **92**(6): 2017-2029.

Powe, C. E., et al. (2011). "Vitamin D-Binding Protein Modifies the Vitamin D-Bone Mineral Density Relationship." Journal of Bone and Mineral Research **26**(7): 1609-1616.

Querales, M. I., et al. (2010). "Association between vitamin D deficiency and metabolic syndrome." Revista Medica De Chile **138**(10): 1312-1318.

Ramos, R. B. and P. M. Spritzer (2015). "FTO gene variants are not associated with polycystic ovary syndrome in women from Southern Brazil." Gene **560**(1): 25-29.

Ravnsborg, T., et al. (2010). "The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor." Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1804**(4): 909-917.

Reinchr, T., et al. (2007). "Vitamin D status and parathyroid hormone in obese children before and after weight loss." European Journal of Endocrinology **157**(2): 225-232.

Reis, J. P., et al. (2009). "Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population." Pediatrics **124**(3): E371-E379.

Robien, K., et al. (2012). "Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore." Br J Nutr.

Santos, B. R., et al. (2012). "Vitamin D receptor gene polymorphisms and sex steroid secretion in girls with precocious pubarche in Southern Brazil: a pilot study." Journal of Endocrinological Investigation **35**(8): 725-729.

Santos, B. R., et al. (2013). "Variations in the Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene Are Related to Lower 25-Hydroxyvitamin D Levels in Healthy Girls: A Cross-Sectional Study." Hormone Research in Paediatrics **79**(3): 162-168.

Santos, B. R., et al. (2012). "Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants." BMC Pediatrics **12**(1): 62-68.

Sergeev, I. N. and W. B. Rhoten (1995). "1,25-dihydroxyvitamin d-3 evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line." Endocrinology **136**, 2852-2861.

Sinotte, M., et al. (2009). "Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women." Am J Clin Nutr **89**(2): 634-640.

Sinotte, M., et al. (2009). "Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women." American Journal of Clinical Nutrition **89**(2): 634-640.

Speeckaert, M., et al. (2006). "Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism." Clinica Chimica Acta **372**(1-2): 33-42.

Speeckaert, M., et al. (2014). "Vitamin D Binding Protein: A multifunctional protein of clinical importance." Advances in Clinical Chemistry **63**: 1-57.

Taes, Y. E. C., et al. (2006). "Vitamin D binding protein, bone status and body composition in community-dwelling elderly men." Bone **38**(5): 701-707.

Takiar, R., et al. (2015). "The associations of 25-hydroxyvitamin D levels, vitamin D binding protein gene polymorphisms, and race with risk of incident fracture-related hospitalization: Twenty-year follow-up in a bi-ethnic cohort (the ARIC Study)." Bone **78**: 94-101.

Takiishi, T., et al. (2010). "Vitamin D and Diabetes." Endocrinology and Metabolism Clinics of North America **39**(2): 419-+.

Teede, H., et al. (2010). "Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan." Bmc Medicine **8**: 10.

Toscani, M., et al. (2007). "Estimation of truncal adiposity using waist circumference or the sum of trunk skinfolds: a pilot study for insulin resistance screening in hirsute patients with or without polycystic ovary syndrome." Metabolism-Clinical and Experimental **56**(7): 992-997.

Wang, G., et al (2014). " Association of the vitamin D binding protein polymorphisms with the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis". BMJ Open **4**(11): 1-7

Wang, T. J., et al. (2010). "Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study." Lancet **376**(9736): 180-188.

Webb, A. R., et al. (1988). "Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin-D3 - exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin-D3 synthesis in human-skin." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **67**(2): 373-378.

Wehr, E., et al. (2009). "Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome." European Journal of Endocrinology **161**(4): 575-582.

Wehr, E., et al. (2011). "Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome." European Journal of Endocrinology **164**(5): 741-749.

Winters, S. J., et al. (2009). "Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women." Metabolism-Clinical and Experimental **58**(4): 438-442.

Witke, W. F., et al. (1993). "Complete Structure of the Human GC Gene - Differences and Similarities Between Members of the Albumin Gene Family." Genomics **16**(3): 751-754.

Ye, W. Z., et al. (2001). "Variations in the vitamin D-Binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians." Metabolism: Clinical and Experimental **50**(3): 366-369.

Yildizhan, R., et al. (2009). "Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome." Archives of Gynecology and Obstetrics **280**(4): 559-563.

[www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)