



**FACULDADE DE MEDICINA – FAMED**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E**  
**HEPATOLOGIA**

**NÍVEIS SÉRICOS DE 25 HIDROXIVITAMINA D EM PACIENTES COM  
CÂNCER DE ESÔFAGO, EM ALCOOLISTAS/TABAGISTAS SOB RISCO  
PARA CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO E EM INDIVÍDUOS  
SAUDÁVEIS RESIDENTES NO RIO GRANDE DO SUL**

**Rochele da Silva Boneti**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do  
título de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Renato Borges Fagundes**

**2013**

## CIP - Catalogação na Publicação

da Silva Boneti, Rochele

Níveis séricos de 25 hidroxivitamina D em pacientes com câncer de esôfago, em alcoolistas/tabagistas sob risco para carcinoma epidermóide do esôfago e em indivíduos saudáveis residentes no Rio Grande do Sul / Rochele da Silva Boneti. -- 2014.

51 f.

Orientador: Renato Borges Fagundes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. vitamina D. 2. câncer de esôfago . 3. alcool. 4. fumo. I. Borges Fagundes, Renato, orient. II. Título.

## **Dedicatória**

A minha mãe, Maria Francisca Machado que me ofereceu amor e carinho incondicional e que sempre esteve ao meu lado, sem ela nada disso seria possível.

Ao meu noivo, Marcus Fin, pelo amor, compreensão e companheirismo em todos os momentos.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Fagundes, por acreditar na minha capacidade para a realização deste trabalho por seu conhecimento, paciência e disponibilidade.

Ao Dr. Antônio Barros Lopes que colaborou na orientação e na logística do projeto.

A acadêmica de nutrição Mariana Zobot pelo auxílio e disponibilidade nas coletas e entrevistas com os pacientes.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela realização das dosagens séricas da vitamina D.

À Direção e funcionários do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio no recrutamento dos doadores.

Ao Programa de Pós Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A secretária da PPG: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Moema Goulart, e a estagiária Rosimeri Dall' Agnol pelo auxílio constante.

À Professora Dra. Sandra Maria Vieira por suas pertinentes e valiosas sugestões na formatação da dissertação.

Aos pacientes e doadores de sangue pela participação no estudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES: .....	7
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Metabolismo da vitamina D .....	13
2.2. Vitamina D e Câncer .....	18
2.3. Câncer de esôfago .....	20
2.4. Vitamina D e câncer de esôfago .....	22
JUSTIFICATIVA.....	25
QUESTÃO NORTEADORA DA PESQUISA .....	26
HIPÓTESES .....	26
OBJETIVO .....	26
REFERÊNCIAS.....	27
ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS.....	32
CONCLUSÕES .....	49
PERSPECTIVAS PARA FUTUTROS ESTUDOS .....	48
ANEXOS .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

CE	Câncer de esôfago
CEE	Carcinoma epidermóide do esôfago
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CCR	Câncer colorretal
DBPD	D Binding protein (Proteína carreadora da vitamina D)
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágica
FR	Fator de risco
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
IMC	Índice de massa corpórea
PTH	Parathyroid hormone (Paratormônio)
RS	Estado do Rio Grande do Sul
RXR	Receptores X – retinóico
SFR	Sem fator de risco
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UVB	Raios ultravioleta B
VDR	Receptor nuclear da vitamina D (Receptor da Vitamin D)
VDRE	Vitamin D response element(Respondedor específico de vitamina D)
25(OH)D	25 hidroxivitamina D ou calcidiol
1,25(OH)2D	Calcitriol

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

### FIGURAS

Figura 1. Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos .....	14
Figure 2 Metabolismo da vitamina D e sua participação no ciclo celular. ....	19

### QUADROS

Quadro 1. Níveis séricos diagnósticos do status da vitamina D).....	15
Quadro 2. Causas de hipovitaminose D .....	17
Quadro 3. Neoplasias não digestivas relacionadas ao status de Vitamina D .....	18
Quadro 4. Fatores de risco para câncer esofágico .....	21
Quadro 5. Estudos que relacionam a vitamina D e CEE .....	24

## RESUMO

A vitamina D é um composto lipossolúvel de origem vegetal (vitamina D2 ou ergocalciferol) ou animal (vitamina D3 ou colecalciferol), responsável principalmente pela manutenção do equilíbrio no metabolismo ósseo, encontrada em alguns alimentos e suplementos alimentares, porém sua maior fonte é proveniente da síntese cutânea, a partir da exposição à radiação ultravioleta B (UVB) da luz solar.

A vitamina D é absorvida no intestino delgado, mas é no fígado que ocorre sua metabolização tanto da vitamina ingerida ou daquela sintetizada pela pele, através da hidroxilação do carbono 25 pela enzima D325Hidroxilase (25-OHase), formando a 25-hidroxitamina D (25HOVD) ou calcidiol. A 25HOVD é a forma mais abundante deste hormônio no organismo, e sofre uma nova hidroxilação no rim que resulta na forma biologicamente ativa, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D ou calcitriol. Esta por sua vez interfere de forma direta ou indireta no controle de mais de 200 genes envolvidos na regulação do ciclo celular, podendo determinar diminuição da proliferação de células normais ou neoplásicas.

O status da vitamina D tem sido implicado como fator de risco no desenvolvimento de alguns tipos de câncer como o câncer de mama, câncer colo-retal, melanoma, câncer de ovário, câncer de próstata, e também com relação ao câncer de esôfago, porém os dados existentes são controversos. O Rio Grande do Sul apresenta as taxas mais elevadas de câncer esofágico no Brasil e os dados dos níveis de vitamina D em pacientes com câncer de esôfago e em indivíduos em risco para o carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) são inexistentes. Desta forma os autores se propõem a descrever os níveis séricos da vitamina D em pacientes com carcinoma epidermóide do esôfago, em indivíduos em risco para câncer de esôfago (alcoolistas/tabagista), e em pessoas residentes no Rio Grande do Sul, presumidamente saudáveis, sem evidências clínicas de doença.

Foram incluídos 40 indivíduos com diagnóstico de CEE, virgens de tratamento, recrutados entre maio de 2012 e junho de 2013. O grupo com fatores de risco para CEE foi constituído por 53 pacientes alcoolistas/tabagistas com consumo diário de álcool superior a 40 g de etanol e 10 ou mais cigarros, por mais de 10 anos, que compunham um banco de dados montado em 2011 para o estudo de lesões precursoras do câncer esofágico e o terceiro grupo foi composto por 40 indivíduos sem fatores de risco (SFR), sem história prévia de doenças crônicas e sem evidências clínicas de doença ativa, com idades entre 18 e 70 anos e IMC < 30, recrutados no banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os dois últimos grupos tiveram sangue coletado na primavera para evitar a superestimação dos níveis séricos de vitamina D no verão e subestimá-los no inverno. Os critérios de exclusão foram: 1) Idade inferior a 18 anos, 2) não-voluntariedade 3) Doença renal crônica 4) IMC > 30 5) Hepatopatia crônica 6) Fibrose cística 7) Gestantes e nutrízes 8) Enteropatias disabsortivas. O status da vitamina D foi determinado pela mensuração sérica da 25(OH)D.

A amostra global foi constituída de 133 pacientes que apresentaram 25(OH)D média igual a 24,03 ±8,9 ng/ml, classificada como insuficiente. O grupo com CEE (n=40) apresentou



valores médios de  $23 \pm 9,0$  ng/ml. O grupo FR (n=53) apresentou a média mais elevada dos três grupos ( $27,3 \pm 12$  ng/ml) e os valores médios de 25(OH)D nos indivíduos saudáveis (n=40) foram os mais baixos ( $21,8 \pm 5,8$  ng/ml).

Em conclusão, os níveis séricos de Vitamina D, mensurados pela dosagem de 25(OH)D, apresentaram-se dentro de valores considerados insuficientes para toda a amostra. Dentro dos parâmetros de insuficiência, a média mais elevada foi encontrada no grupo com fatores de risco para CEE. Estudos adicionais são necessários para inferir se o status da Vitamina D determina risco para CEE.

## ABSTRACT

Vitamin D is a fat-soluble compound of vegetable (vitamin D<sub>2</sub> or ergocalciferol) or animal origin (vitamin D<sub>3</sub> or cholecalciferol), responsible for bone metabolism balance. The vitamin D is found in some foods and dietary supplements, but its main source is the skin synthesis by ultraviolet B (UVB) radiation.

Vitamin D from the diet or dermal synthesis is biologically inactive and requires enzymatic conversion to active metabolites. Vitamin D is converted to 25-hydroxyvitamin D (25HOVD) or calcidiol, the major circulating form of vitamin D, and then to 1,25-dihydroxyvitamin D, the active form of vitamin D, by enzymes in the liver and kidney. A new hydroxylation results in biologically active form of vitamin D, the 1,25(OH)<sub>2</sub>D or calcitriol. Calcitriol is involved in the control of more than 200 genes that regulate cellular differentiation, apoptosis and angiogenesis.

Vitamin D deficiency is implicated as a risk factor in the development of some cancers such as breast cancer, colorectal cancer, melanoma, ovarian cancer, prostate cancer. Regarding esophageal cancer the existing data are controversial. There are evidences that inhabitants of Rio Grande do Sul (RS) have vitamin D deficiency and this state has the highest rates of esophageal cancer in Brazil. There are no data, from this area, relating vitamin D status in patients with esophageal cancer and in individuals at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus (SCCE). In this sense, the authors propose to study the serum levels of vitamin D in SCCE, in individuals at risk for esophageal cancer (alcoholics/smokers), and in a group of healthy people.

For the study were included 40 individuals with SCCE, with no treatment recruited between May 2012 and June 2013. The risk factors group comprised 53 alcoholics/smokers with daily consumption of more than 40g of ethanol and at least 10 cigarettes for over 10 years. They were part of a database assembled in 2011 for the study of precursor lesions of esophageal cancer. The third group consisted of 40 healthy blood donors, aged between 18 and 70 years, and Body Mass Index (BMI) < 30. We collected blood from the last two groups in the spring to avoid overestimation of serum vitamin D levels in summer and underestimate them in winter. Exclusion criteria were: 1) Age under 18 years; 2) non-voluntariness; 3) chronic kidney disease; 4) BMI > 30; 5) Cirrhosis; 6) Cystic Fibrosis; 7) Pregnancy and breastfeeding; 8) Malabsorption disease. Vitamina D status was measured by 25(OH)D in the serum.

We studied 133 individuals. Overall, the mean of 25(OH)D was 24,03 ± 8,9 ng/ml, classified as insufficient. SCCE group (n=40) presented intermediate mean (23 ± 9.0 ng / ml). The risk factor group (n=53) showed the highest mean (27.3 ± 12 ng/ml). The healthy subjects group (n=53) presented the lowest mean (21.8 ± 5.8 ng/ml).

In conclusion, serum levels of vitamin D, measured by 25(OH)D were insufficient for all sample with the highest average in the group with risk factors for SCCE. Additional studies are necessary to explore the association between vitamin D status and SCCE risk.

## 1) INTRODUÇÃO

A vitamina D é um composto lipossolúvel de origem vegetal (vitamina D2 ou ergocalciferol) ou animal (vitamina D3 ou colecalciferol), responsável principalmente pela manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo. A vitamina D pode ser encontrada em alguns alimentos e suplementos alimentares, como óleo de fígado de peixe, salmão, bacalhau, arenque, sardinha, atum, cogumelos comestíveis e na gema de ovos (1). Porém sua maior fonte é a síntese cutânea, a partir da adequada exposição à radiação ultravioleta B (UVB) da luz solar. Apenas cerca de 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação, fato que a torna diferente da maioria das demais vitaminas que geralmente precisam ser adquiridas através da dieta. Pelo seu papel central em múltiplas funções metabólicas, imunológicas e no processo inflamatório a vitamina D é conceituada como um hormônio (2).

A vitamina D é absorvida no intestino delgado, incorporado por quilomicrons e levada por uma proteína carreadora da vitamina D (DPB) para vários órgãos alvos. Os seus principais sítios de estoque são o tecido adiposo e a musculatura estriada (3, 4). No fígado ocorre a metabolização tanto da vitamina D ingerida quanto daquela sintetizada pela pele. A enzima hepática D3 25 hidroxilase (25-OH) catalisa a hidroxilação do carbono 25, formando a 25 – hidroxivitamina D (25HOVD) ou calcidiol, forma mais abundante deste hormônio no organismo (5, 6). Além do fígado, outros tecidos, como pele, intestino e rins são capazes de promover a 25-hidroxilação da vitamina D, porém em menor proporção. No rim, ocorre uma nova hidroxilação que resulta na forma biologicamente ativa da vitamina, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D ou calcitriol (6).

A 25(OH)D (calcidiol) é a forma da vitamina D sem atividade biológica, porém seus níveis circulantes indicam a concentração de vitamina D no organismo. Os critérios de diagnósticos para avaliação do estado nutricional de vitamina D, baseados nos níveis de 25(OH)D, de acordo a Sociedade de Endocrinologia definem como *deficiência severa*: > 25nmol/L, *deficiência*: 25-49 nmol/L, *insuficiência* 50-74nmol/L, *saudável – ideal*: 75–150 nmol/L, *intoxicação* (indicado por hipercalcemia e hiperfosfatemia): > 250nmol/L (7, 8).

Os níveis séricos da vitamina D são influenciados por diversos fatores, como envelhecimento, estação climática, latitude, hiperpigmentação cutânea, tempo de exposição solar, ingestão alimentar e uso de bloqueador solar (8).

A relação da vitamina D e o câncer está associada a 1,25(OH)<sub>2</sub>D que interfere de forma direta ou indireta no controle de mais de 200 genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e angiogênese, podendo determinar diminuição da proliferação de células normais ou neoplásicas (9). Níveis séricos mais elevados de 25 (OH) D estão associados com taxas de incidências mais baixas para o câncer de colón, mama, ovário, próstata, renal e pancreáticas (10).

A deficiência de vitamina D tem sido relatada em aproximadamente 36% de adultos saudáveis jovens (11) em até 57% dos pacientes internados nos Estados Unidos e em

percentuais ainda maiores na Europa (12). Dados epidemiológicos recentes documentaram a alta prevalência de níveis inadequadamente baixos de vitamina D em pacientes idosos, especialmente na vigência de osteoporose. Estima-se que aproximadamente 1 bilhão de indivíduos apresentem deficiência ou níveis insuficientes de vitamina D (11).

No Brasil, existem poucos estudos sobre prevalência de hipovitaminose D. Um primeiro estudo, realizado em crianças, em Recife em 1984, não encontrou deficiência de vitamina D e os níveis séricos médios situaram-se entre 108nmol/L no verão e 106nmol/L no inverno(13).

No Rio Grande do Sul, devido as suas características climáticas espera-se uma maior probabilidade de deficiência de vitamina D. Em pacientes hospitalizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), foi investigada a prevalência da deficiência de vitamina D no primeiro mês da primavera, correlacionada aos níveis de paratormônio, cálcio e albumina séricos. O estudo considerou como deficiência severa níveis séricos de 25 (OH)D abaixo de 25nmol/ L e como deficiência moderada os valores entre 25nmol/L e 50nmol/ L. Os resultados demonstraram níveis inferiores a 50 nmol/L em 77,8 % e valores menores que 25nmol/L em 33% dos pacientes (14). A deficiência de Vitamina D (níveis abaixo de 50nmol/L) foi também observada em, 57,4% dos indivíduos jovens, aparentemente saudáveis estudados por Premaor e colaboradores (15).

Como o Rio Grande do Sul é uma área de risco elevado para câncer esofágico, buscamos estudar os níveis séricos da vitamina D em pacientes com câncer de esôfago, em alcoolistas/tabagistas, reconhecidamente um grupo de alto risco para câncer de esôfago e em uma amostra de indivíduos residentes no RS, presumidamente sadios.

## 2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Metabolismo da vitamina D

O caminho para a descoberta da vitamina D começou com o reconhecimento do raquitismo em 1650. Sniadecki foi o primeiro a reconhecer e relatar a associação de raquitismo com a falta de exposição à luz solar em meados de 1800 (16).

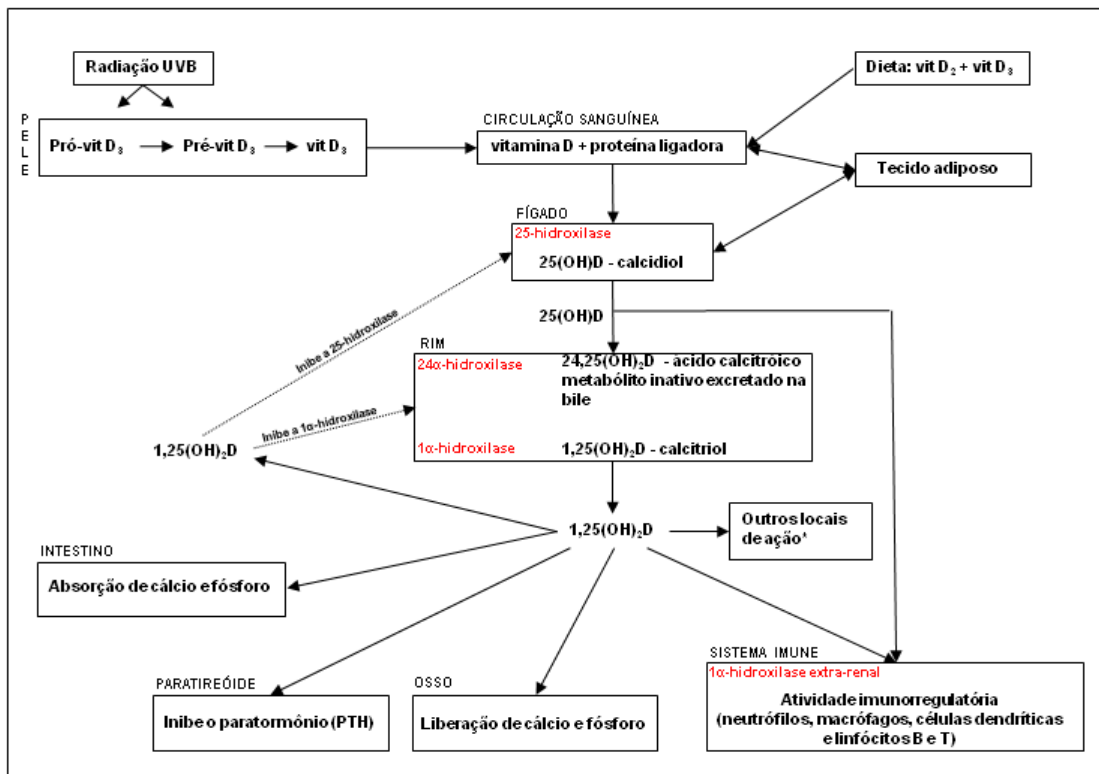
Nos seres humanos a vitamina D é produzida na pele através da exposição à radiação da luz ultravioleta B (UVB) (16). O precursor cutâneo da vitamina D, o 7-deidrocolesterol encontrado em altas concentrações na epiderme, mais especificamente na membrana basal e na camada espinhosa absorve esta radiação na faixa de comprimento de onda entre 290 nm e 315 nm. Esta energia absorvida faz com que ocorra uma clivagem fotoquímica de conjugações de duplas pontes de hidrogênio nos carbonos das posições 5 (C5) e 7 (C7) da molécula do 7 – deidrocolesterol, originando a pré- vitamina D3 (17).

Quando ingerida, a vitamina D é absorvida no intestino delgado, incorporada a quilomicrons e transportada ao fígado. A partir deste momento, o metabolismo é igual ao da vitamina D sintetizada pela pele(18).

O hormônio é então, transportado por meio do sistema linfático para o fígado, ligado á proteína transportadora da vitamina D (DBP) e em menor proporção à albumina. No fígado, a vitamina D proveniente das vias endógena e exógena, sofre a primeira hidroxilação pela ação da enzima 25-hidroxilase (CYP27A1), presente na mitocôndria dos hepatócitos. Esta enzima incorpora um radical hidroxila na posição 25 da molécula da vitamina D, originando a forma 25-hidroxivitamina D - 25(OH)D ou calcidiol- que, apesar de ter pouca atividade biológica, é a forma circulante mais abundante e por isso, considerada o marcador do estado nutricional da vitamina D em humanos (19).

Após a hidroxilação hepática, este hormônio circula ligado às proteínas carreadoras (DPB) e à albumina. Nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais do rim, sofre mais uma hidroxilação resultando na formação do metabolito biologicamente mais ativo: 1,25-dihidroxivitamina D [1,25 (OH)<sub>2</sub> D ou calcitriol], e também no metabólito inativo hidrossolúvel: 24,25 (OH)<sub>2</sub> D (ácido calcitróico) que é excretado pela bile, através da ação das enzima 25(OH) 1α – hidroxilase (CYP27B1) e 24 α – hidroxilase (CYP24A1) (1). Outros tecidos, como a pele e os intestinos são capazes de promover a 25-hidroxilação da vitamina D, porém em menor proporção(20).

A regulação da atividade enzimática da 1α-hidroxilase é dependente da homeostase do cálcio e do fosfato, do paratormônio (PTH), do fator de crescimento fibroblástico (FGF-23) e dos níveis circulantes de calcitriol. Este por sua vez, estimula a absorção intestinal e a reabsorção renal de cálcio. Níveis suficientes de vitamina D aumentam a absorção de cálcio e fósforo em 40% e 80% respectivamente, conforme mostra a figura 1 (21, 22).



**Figura 1. Metabolismo da vitamina D e principais efeitos biológicos** - *modificado de Valdivielso et al (20)*

### 2.1.1 Receptores da vitamina D

O calcitriol após sofrer as duas fases de hidroxilação descritas anteriormente, torna-se um hormônio ativo, desempenhando inúmeras funções, tais como: modulação da absorção intestinal dos níveis séricos de cálcio e fosfato I, a re-absorção de cálcio renal mobilização de cálcio ósseo, regulação das repostas imunológicas inatas e adaptativas, diferenciação e inibição da proliferação celular(23). Para exercer sua atividade, o calcitriol liga-se ao receptor VDR (*vitamin D receptor*), presente na maioria das células (24). O VDR nuclear que é uma proteína com 50 KDa, pertencente à superfamília dos receptores esteróides, ácido retinóico e hormônios tireóideos. Além do clássico VDR nuclear, postula-se a existência de um VDR de membrana que seria responsável por ações mais rápidas (1).

O calcitriol liga-se ao VDR nuclear e determina uma resposta genômica através da regulação da transcrição de alguns genes, onde as principais etapas envolvidas no controle da transcrição genética (25, 26).

### 2.1.2. Níveis séricos e deficiência da vitamina D

Os níveis séricos de vitamina D são mensurados a partir da quantificação da concentração de 25(OH)D (combinação de ergocalciferol mais colecalciferol). Esta é a forma circulante mais abundante do hormônio, como previamente descrito, apresenta meia vida de aproximadamente duas a três semanas e atinge concentrações séricas 1000 vezes superior àquela alcançada pela 1,25(OH)2D (27, 28).

Os pontos de corte que definem os valores normais da vitamina D têm sido historicamente discutidos e a despeito de não haver consenso, a maioria dos estudiosos do tema definem como níveis insuficientes aqueles inferiores a 50 nmol/L (20ng/ml) (2;7). As demais definições estão ilustradas no quadro 1 (29).

**Quadro 1. Níveis séricos diagnósticos do status da vitamina D (29)**

Estado e Terminologia	Níveis séricos 25(OH) D	
	ng/ml	nmol/L
Deficiência severa	< 10	<25
Deficiência	10 - 19	25 - 49
Insuficiência	20 - 29	50 - 74
Saudável	30 - 60	75 - 150

Estima-se que 1 bilhão de pessoas no mundo têm deficiência ou insuficiência de vitamina D. Isto é observado mais comumente na população de afro descendentes, nas regiões de maiores latitudes e portanto menos ensolaradas durante grande parte do ano, e nas estações do outono e do inverno. Estas características fazem com que alguns países industrializados adotem a prática da adição de vitamina D em alimentos como leite, iogurtes, sucos, margarina, fórmulas infantis e cereais matinais (7).

A deficiência de vitamina D nos EUA se situa em aproximadamente 36% dos adultos jovens, em 42 % das mulheres negras entre 15 e os 29 anos, em 41% dos pacientes ambulatoriais entre 49 e 83 anos e superior a 57% em pacientes internados (11;12).

Recente estudo realizado na região central da Arábia Saudita com 465 mulheres com idade entre 19-40 anos mostrou altas taxas de prevalência de hipovitaminose D. Todas incluídas no estudo apresentavam algum grau de deficiência, sendo que a frequência de insuficiência (níveis séricos de vitamina D entre 20-29ng/ml) ou de deficiência severa (níveis séricos de vitamina D <10ng/ml) correspondeu a 79% e 21%, respectivamente. O estudo ressalta que apesar da abundante luz solar da Arábia Saudita, a falta de exposição à luz solar devido às altas temperaturas e à ingestão inadequada de vitamina D são os principais fatores relacionadas aos resultados encontrados (30)

Recentemente, Maeda et al publicaram um interessante estudo, realizado na cidade de São Paulo-Brasil, envolvendo grupos de idosos e compararam os resultados destes com aqueles observados em indivíduos jovens. O grupo de idosos era assim distribuído: 177 institucionalizados (idade: 76,2 ± 9,0 anos), 243 residentes de uma mesma comunidade (idade: 79,6 ± 5,3 anos) e 99 inscritos regularmente em um programa de atividade física desenvolvido para idosos (idade: 67,6 ± 5,4 anos). Os jovens eram em número de 72 e possuíam média de

idade de  $23,9 \pm 2,8$  anos. Os níveis de 25 (OH) D foram significativamente menores nos indivíduos mais velhos. Os autores sugerem que estes resultados possivelmente estejam relacionados não só a diferença metabólica determinada pela idade mas também às diferenças relacionadas aos hábitos de exposição à luz solar. Realmente, o efeito sazonal sobre a concentração de 25 (OH) D foi observada em todos os grupos estudados, com exceção daquele institucionalizado(31).

A região sul do Brasil apresenta maior possibilidade para ocorrência de deficiência de vitamina D, devido à localização geográfica em latitude mais afastada da linha do Equador. Estudo realizado em Curitiba, Paraná (latitude – 25°), avaliou os níveis séricos da vitamina D em 234 mulheres jovens com idade entre 7 e 18 anos, dentre as quais apenas 9,4% apresentaram níveis adequados de 25(OH)D. Níveis insuficientes foram encontrados em 54,3% e em 36,3 % os níveis foram deficientes, sem variação significativa entre as temporadas de coleta. (32).

As causas relacionadas ao estado de deficiência de vitamina D são variadas como demonstrado no quadro 2. É fato que a falta de exposição à luz solar é uma dos principais fatores, determinada tanto pela latitude quanto pela variação sazonal, sendo a estação do inverno, aquela identificada como de maior risco para a hipovitaminose D. Alterações fisiológicas próprias do envelhecimento tais como a capacidade da pele em sintetizar pró-vitamina D e a reduzida ação intestinal da 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D são fatores adjuvantes de relevância (22, 33).



## Quadro 2. Causas de hipovitaminose D

<b>REDUÇÃO DA SÍNTESE CUTÂNEA:</b>
Uso de filtro solar- absorção radiação UVB pela melanina
Pigmentação da pele- absorção da radiação UVB pela melanina
Idade – redução do 7–dehidrocolesterol na pele
Estação do ano, latitude, hora do dia - quantidade de fótons UVB que atingem a pele.
Lesões por queimadura – redução do 7–dehidrocolesterol na pele
<b>REDUÇÃO NA BIODISPONIBILIDADE:</b>
Má absorção
Obesidade – “sequestro” de vitamina D para o tecido adiposo.
Aumento do Catabolismo
Anticonvulsivante, glicocorticóides, antiinflamatórios não esteróides, imunossupressores.
Amamentação
Baixa concentração de vitamina D no leite materno
<b>REDUÇÃO NA SÍNTESE DE 25(OH)D3:</b>
Insuficiência hepática
Síndrome nefrótica – perda de 25(OH)D
<b>REDUÇÃO DA SÍNTESE DE 1,25(OH)2D</b>
Insuficiência renal crônica:
<b>DOENÇAS HEREDITÁRIAS – RAQUITISMO:</b>
Raquitismo dependente de vitamina D Tipo 1 – mutação no gene da 25 hidroxivitamina D-1-α hidroxilase
Raquitismo dependente de vitamina D do tipo 2 – mutação no gene do receptor de vitamina D
Raquitismo dependente de vit D tipo 3 –proteínas ligadoras dos elementos responsivos ao hormônio
Raquitismo hipofostatêmico autossômico dominante – mutação no gene do FGF – 23
Raquitismo hipofosfatêmico ligado ao X – mutação no gene PHEX,
<b>DOENÇAS ADQUIRIDAS:</b>
Osteomalácia induzida por tumor – secreção pelo tumor de FGF-23 e outras fosfatôninas
Hiperparatireoidismo primário – aumento do PTH causando elevação na síntese de 1,25 (OH)2D
Doenças granulomatosas e linfomas- conversão pelos macrófagos da 25(OH)D para 1,25(OH)2D
Hipertireoidismo – estimula metabolismo da 25(OH)D3 Redução na concentração da 25 (OH)D

Modificado de Holick, M.F. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007 (22)

A recomendação para evitar a deficiência de vitamina D, de 1 ano e até 70 anos é de 600UI/dia, idosos acima dos 70anos: 800UI/dia. Atualmente a Sociedade de Endocrinologia Americana recomenda com o objetivo de prevenir e tratar deficiência e insuficiência de vitamina D, até 70 anos: 600 – 1000/ UI/dia e acima de 70 anos: 1500-2000UI/dia. Crianças e adultos obesos podem exigir doses de 2 a 3 vezes maiores da recomendação descrita acima (34) .

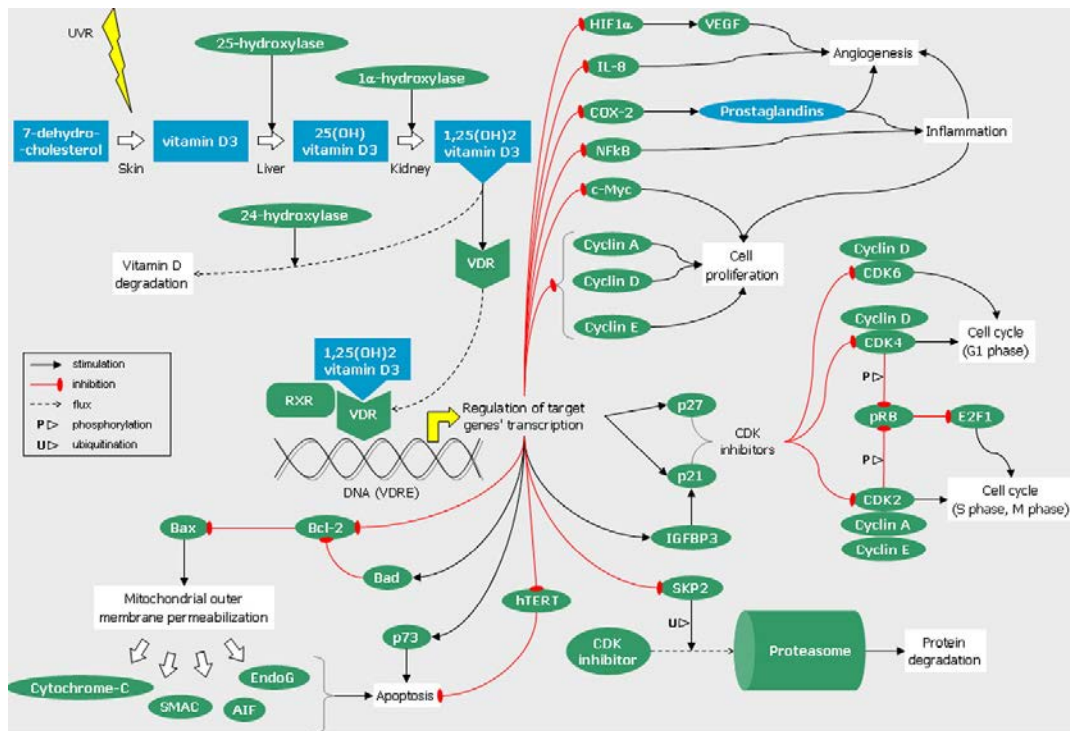
## 2.2. Vitamina D e Câncer

Em 1941, Apperly hipotetizou que viver em latitudes mais distantes da linha equatorial aumenta o risco de mortalidade por câncer, quando comparados com latitudes próximas ao Equador. Desde essa observação inicial, numerosos estudos relacionaram a deficiência de vitamina D e viver em latitudes mais distantes da linha equatorial com o aumento de risco para vários tipos de câncer, como câncer de cólon, próstata, esôfago, ovário ou mama (22, 35, 36) .

O potencial anticancerígeno da vitamina D se refere a sua capacidade de afetar direta ou indiretamente a expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento celular, no desenvolvimento de apoptose e na inibição dos processos de angiogênese e inflamação, quatro mecanismos fundamentais para o desenvolvimento e progressão do câncer (37). Corroborando este conceito, tem se observado o efeito anti-proliferativo da 1,25(OH)2D sobre algumas proteínas envolvidas no desenvolvimento do câncer (38). As ações inibitórias da angiogênese e da inflamação têm sido demonstradas mediante á redução da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*) e á inibição da expressão de citocinas inflamatórias como a interleucina 8 e do NFkB [37]. O quadro 3 resume os principais tipos de neoplasias relacionados ao status de vitamina D em humanos (quadro 3)

**Quadro 3. Neoplasias não digestivas relacionadas ao status de Vitamina D**

Neoplasia	Prováveis Mecanismos	Ref.
Pele	Níveis elevados de 1,25(OH)2D parecem inibir a proliferação de queratinócitos <i>in vitro</i> e promover a diferenciação destas células	(39)
Mama	Estimula apoptose induzida por TNF-alfa, inibição da proliferação de células mamárias neoplásicas, redução da expressão de VEGF	(40)
Próstata	1,25(OH)2D inibe o crescimento de duas das três linhagens de células neoplásicas da próstata	(41)
Ovário	Inibe a proliferação celular em linhagens de células de ovário neoplásicas, induz apoptose	(42)



**Figura 2. Metabolismo da vitamina D e sua participação no ciclo celular.**

As atividades biológicas da vitamina D são uma consequência da sua interação com o VDR. A 1,25(OH)D ligada ao VDR, se associa ao receptor do ácido retinóico (RXR). O complexo 1,25(OH)D–VDR–RXR, se combina com VDRE e interfere direta ou indiretamente na expressão dos genes envolvidos na regulação do crescimento celular, apoptose, angiogênese e inflamação, quatro mecanismos fundamentais para o desenvolvimento e progressão do câncer (43).

### Vitamina D e Câncer do Aparelho Digestivo

Giovannucci e colaboradores realizaram em 2006, estudo prospectivo que investigou a incidência de câncer e outras doenças crônicas nos EUA, em profissionais da saúde (*Health Professionals Follow - Up Study*). Neste estudo foram analisados os preditores dos níveis séricos da 25(OH)D (pigmentação da pele, obesidade, localização geográfica da residência, exposição solar e aporte dietético e suplementar de Vitamina D) em 47.800 homens com idade entre 40 e 75 anos e a relação destes níveis com o risco de câncer do sistema digestivo. Os resultados deste estudo evidenciaram que um incremento de 25nmol/L da 25(OH)D circulante esteve associado com a redução de 43% na incidência e 45 % na mortalidade por câncer do sistema digestivo (44).

Em 1980, Garland & Garland relacionaram a incidência de câncer colorretal (CCR) com regiões em que a população tem pouca exposição solar, sugerindo que a vitamina D é um fator de proteção contra o CCR [10]. Outro estudo nos Estados Unidos, Califórnia, verificou que indivíduos que ingeriam mais que 1.000 UI por dia de vitamina D ou apresentavam nível sérico de 25(OH)D igual ou maior que 82,5 nmol/L apresentaram redução no risco para CCR em aproximadamente 50% (45).

Estudos ecológicos sugerem associação da exposição ao sol com menores taxas de mortalidade com câncer de pâncreas (46), japoneses (47) e populações europeia (48). Células das ilhotas, do ducto pancreático e de adenocarcinomas pancreáticos expressam 1,25(OH)<sub>2</sub>D e a enzima que a catalisa, a 24-hidroxilase/CYP24A1, sugerindo que o crescimento de linhagens celulares de câncer de pâncreas possa ser inibido por 25(OH)D (49). Também foi demonstrado *in vitro* que a 25(OH)D inibe a proliferação de células neoplásicas pancreáticas, induzindo a diferenciação e promovendo a apoptose(50). Estudo prospectivo realizado com profissionais da saúde mostrou evidências que níveis mais elevados de vitamina D estiveram associados com menor incidência total de câncer, incluindo o câncer de pâncreas (44).

### **2.3. Câncer de esôfago**

O câncer de esôfago é uma neoplasia extremamente letal. É a sexta maior causa de mortalidade relacionada ao câncer e classificada segundo a histologia, em carcinoma epidermóide (ou escamoso) e adenocarcinoma. O primeiro é derivado do epitélio estratificado não queratinizado, característico da mucosa normal do esôfago. É o tipo histológico mais comum e ocorre mais freqüentemente em homens a partir dos 50 anos e comumente se localiza no esôfago médio e distal (51). O adenocarcinoma está associado ao epitélio de Barrett, que consiste na metaplasia intestinal do epitélio colunar e surge na parte distal do esôfago à partir do epitélio colunar displásico. Os fatores de risco para ambos os tipos histológicos estão listados no quadro 2 (52).

O carcinoma esofágico tem início insidioso e na fase avançada o sintoma mais comum é a disfagia decorrente da obstrução progressiva do esôfago o que determina déficit calórico-proteico importante (53), independente de seu tipo histológico.

O diagnóstico do câncer esofágico é realizado por endoscopia digestiva alta e biópsia. O tratamento é definido conforme a grau de extensão da doença. Quando abordado com intenção curativa o tratamento eletivo é cirúrgico e pode ser complementado com terapias adjuvantes como quimioterapia ou radioterapia. A abordagem paliativa geralmente se restringe a abordagem da disfagia com medidas cirúrgicas ou endoscópicas e circunstancialmente radio e quimioterapia(54). Com taxas de mortalidade e incidência próximas, o câncer de esôfago apresenta um prognóstico reservado, devido, principalmente ao diagnóstico tardio (55).

#### **2.3.1 Epidemiologia do câncer de esôfago**

O adenocarcinoma é mais comum nos dos países desenvolvidos do ocidente: Europa, e America do Norte apresentando tendência ascendente. O CEE ainda é o tipo mais comum no mundo mesmo após o aumento de 400% na prevalência do ACE nos EUA e alguns países da Europa ocidental. O CEE predomina no sudeste da África, e apresenta as maiores taxas de incidência em uma área que se estende desde a fronteira do Mar Cáspio a Turquia, norte da

China (24 casos/100.00 habitantes), abrangendo partes do Irã, Ásia central, Afeganistão, Sibéria e Mongólia, constituindo o chamado “cinturão do câncer esofágico”. Lixian, província no norte da China apresenta as mais altas taxas mundiais de incidência de CE (115 casos/100.000 para o sexo masculino e 80 casos /100.000 habitantes para o sexo feminino) (56-58).

A alta variabilidade geográfica observada mundialmente na incidência de câncer de esôfago também ocorre no Brasil onde representa a 6ª neoplasia entre homens e a 9ª entre as mulheres, com taxas de 8,10 e 2,67 casos/100.000 habitantes respectivamente. A Região Sul apresenta as taxas mais altas 18,01 casos/100.000 para homens e 6,6 casos/ 100.000 para mulheres e algumas áreas no RS podem chegar a 29,4 casos/100.000. Outros estados no Brasil apresentam incidência próxima a zero para o cancer de esofago. Estes números são bastante superiores aos observados na maioria dos países ocidentais. As diferenças epidemiológicas sugerem o envolvimento de fatores ambientais e alimentares, com uma predisposição genética pouco definida(55).

**Quadro 4. Fatores de risco para câncer esofágico**

FATOR DE RISCO	CA EPIDERMÓIDE	ADENOCARCINOMA
Geografia	China, África, Irã e America do.Sul (Cone sul)	Eur Ocidental/America do Norte
Raça	P > B	B > P
Sexo	H> M	H> M
Álcool	++++	-
Tabaco	++++	++
Obesidade	-	+++
DRGE	-	++++
Baixo consumo F&V	++	++
Bebidas quentes	++	-
Exposição HAPs	+++	-
Condições SE	Baixas /não urbana	Alta/urbana/industrializada

P: pretos; B: brancos; H: homens; M: mulheres; DRGE: doença do refluxo gastroesofágica F&V: frutas e vegetais

Os dois principais fatores de risco para o CEE são o tabaco e o álcool. Fumantes apresentam 5 vezes mais chances de desenvolver CEE do que não fumantes, e as chances passam a ser 10 vezes maiores para fumantes pesados (59). A principal atividade carcinogênica do tabaco parece estar relacionada com a deglutição de compostos

nitrogenados como a fração do alcatrão acumulados na saliva, porém os iniciadores primários podem ser os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na fumaça do cigarro e as nitrosaminas voláteis também presentes em alguns alimentos (60).

O consumo de álcool e o tabagismo cada um tem um efeito individual sobre o risco de câncer de esôfago, porém quando combinados, agem sinergicamente e interagem de forma multiplicativa no risco para carcinoma de epidermóide de esôfago (61). TUYNS e colaboradores, em 1977, em estudo considerado clássico, na província francesa da Bretagne, demonstraram um efeito independente, mas sinérgico do álcool e do tabaco e determinaram risco 40 vezes maior para o desenvolvimento de carcinoma esofágico quando se compara tabagistas com consumo diário de álcool em doses crescentes com abstêmios não fumantes (62).

No Rio Grande do Sul, onde mais de 80% dos casos de câncer esofágico são do tipo histológico de células escamosas, a população está exposta a altos níveis de HAP, provenientes da fumaça produzida pelo tabaco e pelo preparo do churrasco, e do consumo de chimarrão. Este último, provavelmente está associado à ingestão de carcinógenos (HAP) presentes na erva mate, adicionados durante o seu processamento, e à lesão térmica da mucosa esofágica causada pelas altas temperaturas em que o chimarrão é consumido. Além disso, o consumo excessivo de álcool no sul do Brasil é maior do que em outras áreas de alto risco para CCEE no mundo (60, 63, 64).

Estima-se que 70% dos pacientes são inoperáveis quando procuram os sistemas de saúde sendo apenas candidatos ao tratamento paliativo como a radioterapia e/ou colocação de próteses esofágicas. Entre os 30% submetidos à cirurgia, apenas um terço serão curados ou, em outras palavras, apenas entre 5 a 10% estarão vivos 5 anos após o diagnóstico inicial. Mais de noventa por cento dos pacientes com esse tipo de câncer terão uma baixa qualidade de vida e irão ao óbito entre 12 e 24 meses após o diagnóstico (65).

#### **2.4. Vitamina D e câncer de esôfago**

Em uma coorte de 29.558 chineses de área rural com baixa ingestão de vitamina D, com idades entre 40 – 69 anos seguidos durante 5,25 anos, houve a ocorrência de 640 novos casos de CEE, 435 adenocarcinoma da cárdia e 104 adenocarcinomas gástricos não cárdicos. Esta população apresentava baixos níveis de 25(OH)D. As concentrações séricas mais altas estiveram associadas com risco aumentado de CEE em homens, mas não em mulheres. Não foi encontrada associação dos níveis de 25(OH)D com carcinoma gástrico tanto cárdico como não cárdico (66)

Em recente estudo de caso–controle os autores investigaram a associação entre os níveis circulantes de 25(OH)D e o risco de câncer do trato gastrointestinal superior. Casos e controles foram pareados dentro de oito coortes da China, Finlândia e Estados Unidos. Globalmente, a concentração sérica de 25(OH)D não apresentou associação com risco para câncer do trato gastrointestinal superior. Porém em análise estratificada observou-se que taxas

mais baixas, menores que 25 nmol/L de 25(OH)D, estiveram associadas com redução do risco de câncer do trato gastrointestinal superior em asiáticos. Em caucasianos não foi observada nenhuma associação significativa entre os níveis de 25(OH)D circulantes e risco para câncer do tubo digestivo superior. Não fumantes com concentrações séricas de 25(OH)D menores que 25nmol/L apresentaram baixo risco para câncer do trato digestivo superior (67). Quanto ao consumo de álcool duas tendências opostas foram observadas. Indivíduos com baixo consumo alcoólico e com baixas concentrações de Vitamina D apresentaram risco reduzido para a ocorrência de câncer enquanto naqueles com ingestão alcoólica superior a 14 gramas de álcool/dia, baixos níveis de vitamina D estiveram associados com risco mais alto de câncer (67).

Abnet e colaboradores em estudo transversal de 720 indivíduos em Linxian, avaliando as concentrações de 25(OH)D e o risco de displasia escamosa do esôfago identificaram que os indivíduos portadores de displasia apresentavam maiores concentrações séricas de 25(OH) D do que os indivíduos sem displasia (68).

Em estudo de caso–controle conduzido no norte da Itália, para estudar a associação da vitamina D da dieta com câncer do trato aerodigestivo superior, foram coletadas informações sobre características sócio demográficas, estilo de vida, fumo, consumo de álcool, atividade física, e hábitos alimentares concluiu que a vitamina D na dieta esteve relacionada como fator de proteção em alcoolistas e tabagistas (69).

Os dados sobre os níveis circulantes de Vitamina D no RS mostram evidências de deficiência de Vitamina D (70). O Rio Grande do Sul apresenta as taxas mais elevadas de câncer esofágico no Brasil e inexistem dados sobre os níveis de Vitamina D em pacientes com câncer de esôfago e em indivíduos com fatores de risco para este tipo de câncer. Os dados existentes na literatura mundial sobre a associação dos níveis séricos da Vitamina D e CEE são controversos desta forma é importante a obtenção de dados sobre esta associação no Rio Grande do Sul.

**Quadro 5. Estudos que relacionam a vitamina D e câncer esofágico**

<b>Estudo</b>	<b>País</b>	<b>Avaliação Status vitamina D</b>	<b>Conclusões do estudo</b>
Abnet et al 2010 (67)	China, Finlândia, US	25 (OH)D	Fator protetor para CEE. (N/S)
Lipworth et al 2009 (69)	Itália	QFA	Maior ingestão de vit D: F. protetor
Chen et al 2007 (66)	China	25(OH)D	Níveis + elevados: + risco para homens.
Chen et al 2010 (71)	China	Exposição UVB	Mortalidade inversamente associada com exposição UVB
Abnet et al 2007 (68)	China	25(OH)D	Níveis + elevados: displasia esofágica
Giovannuci et al 2006 (44)	EUA	25(OH)D+ cor da pele	Níveis elevados: fator de proteção
Tran et al, 2005 (72)	Austrália	Exposição UVB	Sem associação com CEE
Mulholland et al, 2005 (73)	Irlanda	QFA	Alto consumo de Vit D: FR para ACE
Boscoe & Shimura, 2006 (74)	USA	Exposição UVB	Exposição solar: fator protetor



### **3) JUSTIFICATIVA**

Estudos observacionais e randomizados têm enfatizado o papel da suplementação vitamínica sobre a redução do risco de câncer. Neste contexto, o status de deficiência de vitamina D tem sido demonstrado em diversas situações relacionadas ao desenvolvimento de neoplasias malignas. Dentre os tipos de câncer que acometem o aparelho digestivo, destacam-se o câncer de cólon e esôfago.

O Rio Grande do Sul apresenta as taxas mais elevadas de câncer esofágico no Brasil, predominando o carcinoma epidermóide (CEE). No que se refere aos níveis séricos de vitamina D na população gaúcha, estudos epidemiológicos sugerem uma prevalência não desprezível do estado de deficiência de Vitamina D circulante [70]. Apesar disso, inexistem no nosso meio, dados sobre os níveis de Vitamina D em pacientes com câncer de esôfago e em indivíduos com fatores de risco para este tipo de câncer. Os dados existentes na literatura mundial sobre a associação dos níveis séricos da Vitamina D e CEE são controversos e inexistentes em nossa população. Desta forma é importante a obtenção de dados sobre esta associação no Rio Grande do Sul.

#### **4) QUESTÃO NORTEADORA DA PESQUISA:**

Como se apresentam os níveis séricos de vitamina D em indivíduos alcoolistas/tabagistas (com risco para câncer esofágico) e em pacientes com carcinoma epidermóide do esôfago residentes no Rio Grande do Sul (área de risco para CEE)?

#### **5) HIPÓTESES:**

- a)** Os níveis séricos de vitamina D nos indivíduos com fatores de risco e nos pacientes com CEE são mais baixos do que nos indivíduos da população geral
- b)** Os níveis de vitamina D são mais elevados nos indivíduos com fatores de risco e nos pacientes com CEE em comparação com a população geral

#### **6) OBJETIVO:**

Identificar e comparar os níveis séricos de Vitamina D, através da dosagem de 25(OH)D em pacientes com CEE, em alcoolistas/tabagistas sob risco para CEE e em indivíduos sem evidências de doenças.

## 7) REFERÊNCIAS

- (1) Deluca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S.
- (2) Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006 Mar;81(3):353-73.
- (3) Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003 Feb 1;88(2):296-307.
- (4) Krall EA, Sahyoun N, Tannenbaum S, Dallal GE, Dawson-Hughes B. Effect of vitamin D intake on seasonal variations in parathyroid hormone secretion in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1989 Dec 28;321(26):1777-83.
- (5) Quesada JM, Coopmans W, Ruiz B, Aljama P, Jans I, Bouillon R. Influence of vitamin D on parathyroid function in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 Aug;75(2):494-501.
- (6) Boonen S, Aerssens J, Dequeker J. Age-related endocrine deficiencies and fractures of the proximal femur. I implications of growth hormone deficiency in the elderly. *J Endocrinol* 1996 Apr;149(1):7-12.
- (7) Wimalawansa SJ. Vitamin D in the new millennium. *Curr Osteoporos Rep* 2012 Mar;10(1):4-15.
- (8) Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Jul;96(7):1911-30.
- (9) Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006 Dec;102(1-5):156-62.
- (10) Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 2009 Jul;19(7):468-83.
- (11) Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 2002 Jun 1;112(8):659-62.
- (12) Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998 Mar 19;338(12):777-83.
- (13) Linhares ER, Jones DA, Round JM, Edwards RH. Effect of nutrition on vitamin D status: studies on healthy and poorly nourished Brazilian children. *Am J Clin Nutr* 1984 Apr;39(4):625-30.
- (14) Premaor MO, Alves GV, Crossetti LB, Furlanetto TW. Hyperparathyroidism secondary to hypovitaminosis D in hypoalbuminemic is less intense than in normoalbuminemic patients: a prevalence study in medical inpatients in southern Brazil. *Endocrine* 2004 Jun;24(1):47-53.
- (15) Premaor MO, Paludo P, Manica D, Paludo AP, Rossatto ER, Scalco R, et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest* 2008 Nov;31(11):991-5.
- (16) Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 2004 Jun;134(6):1299-302.

- (17) Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 2011 Mar;91(2):115-24.
- (18) Marques CD, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte AL. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Rev Bras Reumatol* 2010 Jan;50(1):67-80.
- (19) Premaor MO, Furlanetto TW. [Vitamin D deficiency in adults: to better understand a new presentation of an old disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006 Feb;50(1):25-37.
- (20) Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006 Sep;371(1-2):1-12.
- (21) Leventis P, Patel S. Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008 Nov;47(11):1617-21.
- (22) Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
- (23) Plum LA, Deluca HF. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010 Dec;9(12):941-55.
- (24) White JH. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. *Rev Endocr Metab Disord* 2012 Mar;13(1):21-9.
- (25) Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res* 2009 Sep;29(9):3511-36.
- (26) Yamada S, Yamamoto K, Masuno H, Choi M. Three-dimensional structure-function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model. *Steroids* 2001 Mar;66(3-5):177-87.
- (27) Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 2012 Apr;97(4):1153-8.
- (28) Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD. Effects of age and serum 25-OH-vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2012 Nov;97(11):3989-95.
- (29) Collins A. Practice implications for preventing population vulnerability related to vitamin D status. *J Am Assoc Nurse Pract* 2013 Mar;25(3):109-18.
- (30) Al-Mogbel ES. Vitamin D status among Adult Saudi Females visiting Primary Health Care Clinics. *Int J Health Sci (Qassim)* 2012 Jun;6(2):116-26.
- (31) Maeda SS, Saraiva GL, Kunii IS, Hayashi LF, Cendoroglo MS, Ramos LR, et al. Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of Sao Paulo, Brazil: the Sao Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). *BMC Endocr Disord* 2013 Apr 29;13(1):14.
- (32) Santos BR, Mascarenhas LP, Satler F, Boguszewski MC, Spritzer PM. Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatr* 2012;12:62.
- (33) Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Sr., et al. Genetic and non-genetic correlates of vitamins K and D. *Eur J Clin Nutr* 2009 Apr;63(4):458-64.

- (34) Yates AA, Schlicker SA, Suitor CW. Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J Am Diet Assoc* 1998 Jun;98(6):699-706.
- (35) Cavalier E, Delanaye P, Chapelle JP, Souberbielle JC. Vitamin D: current status and perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(2):120-7.
- (36) Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S182-S194.
- (37) Mocellin S. Vitamin D and cancer: deciphering the truth. *Biochim Biophys Acta* 2011 Dec;1816(2):172-8.
- (38) Li P, Li C, Zhao X, Zhang X, Nicosia SV, Bai W. p27(Kip1) stabilization and G(1) arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2004 Jun 11;279(24):25260-7.
- (39) Reddy KK. Vitamin D level and basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma risk. *J Invest Dermatol* 2013 Mar;133(3):589-92.
- (40) Lopes N, Paredes J, Costa JL, Ylstra B, Schmitt F. Vitamin D and the mammary gland: a review on its role in normal development and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012;14(3):211.
- (41) Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Actions of vitamin D3, analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 1995 Jan;136(1):20-6.
- (42) Grant DJ, Hoyo C, Akushevich L, Iversen ES, Whitaker R, Marks J, et al. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and risk of ovarian cancer in Caucasian and African American women. *Gynecol Oncol* 2013 Apr;129(1):173-8.
- (43) Monticeli OA, Teixeira TM, Chies JA, Brenol JC, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2012 Oct;31(10):1411-21.
- (44) Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 2006 Apr 5;98(7):451-9.
- (45) Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 Oct;97(1-2):179-94.
- (46) Kinoshita S, Wagatsuma Y, Okada M. Geographical distribution for malignant neoplasm of the pancreas in relation to selected climatic factors in Japan. *Int J Health Geogr* 2007;6:34.
- (47) Mizoue T. Ecological study of solar radiation and cancer mortality in Japan. *Health Phys* 2004 Nov;87(5):532-8.
- (48) Grant WB. An ecologic study of cancer mortality rates in Spain with respect to indices of solar UVB irradiance and smoking. *Int J Cancer* 2007 Mar 1;120(5):1123-8.
- (49) Schwartz GG, Eads D, Rao A, Cramer SD, Willingham MC, Chen TC, et al. Pancreatic cancer cells express 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and their proliferation is inhibited by the prohormone 25-hydroxyvitamin D3. *Carcinogenesis* 2004 Jun;25(6):1015-26.

- (50) Schwartz GG, Eads D, Naczki C, Northrup S, Chen T, Koumenis C. 19-nor-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D2 (paricalcitol) inhibits the proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008 Mar;7(3):430-6.
- (51) Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD. Oesophageal carcinoma. *Lancet* 2013 Feb 2;381(9864):400-12.
- (52) Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999 Mar 18;340(11):825-31.
- (53) Miller KR, Bozeman MC. Nutrition therapy issues in esophageal cancer. *Curr Gastroenterol Rep* 2012 Aug;14(4):356-66.
- (54) Faigel DO, Deveney C, Phillips D, Fennerty MB. Biopsy-negative malignant esophageal stricture: diagnosis by endoscopic ultrasound. *Am J Gastroenterol* 1998 Nov;93(11):2257-60.
- (55) Instituto Nacional do Cancer. 2010 Câncer no Brasil: Dados dos Registros de base populacional. 2013.
- (56) Wheeler JB, Reed CE. Epidemiology of esophageal cancer. *Surg Clin North Am* 2012 Oct;92(5):1077-87.
- (57) Qiao YL, Hou J, Yang L, He YT, Liu YY, Li LD, et al. [The trends and preventive strategies of esophageal cancer in high-risk areas of Taihang Mountains, China]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2001 Feb;23(1):10-4.
- (58) Cook MB, Chow WH, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. *Br J Cancer* 2009 Sep 1;101(5):855-9.
- (59) Blot WJ, McLaughlin JK. The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin Oncol* 1999 Oct;26(5 Suppl 15):2-8.
- (60) Fagundes RB, Abnet CC, Strickland PT, Kamangar F, Roth MJ, Taylor PR, et al. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer* 2006;6:139.
- (61) Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut* 2010 Jan;59(1):39-48.
- (62) Tuyns AJ, Pequignot G, Jensen OM. [Esophageal cancer in Ille-et-Vilaine in relation to levels of alcohol and tobacco consumption. Risks are multiplying]. *Bull Cancer* 1977;64(1):45-60.
- (63) Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006 May 10;24(14):2137-50.
- (64) de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Komlos F, et al. [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* 1999 Jan;36(1):32-6.
- (65) Lopes AB, Fagundes RB. Esophageal squamous cell carcinoma - precursor lesions and early diagnosis. *World J Gastrointest Endosc* 2012 Jan 16;4(1):9-16.

- (66) Chen W, Dawsey SM, Qiao YL, Mark SD, Dong ZW, Taylor PR, et al. Prospective study of serum 25(OH)-vitamin D concentration and risk of oesophageal and gastric cancers. *Br J Cancer* 2007 Jul 2;97(1):123-8.
- (67) Abnet CC, Chen Y, Chow WH, Gao YT, Helzlsouer KJ, Le ML, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of esophageal and gastric cancer: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *Am J Epidemiol* 2010 Jul 1;172(1):94-106.
- (68) Abnet CC, Chen W, Dawsey SM, Wei WQ, Roth MJ, Liu B, et al. Serum 25(OH)-vitamin D concentration and risk of esophageal squamous dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007 Sep;16(9):1889-93.
- (69) Lipworth L, Rossi M, McLaughlin JK, Negri E, Talamini R, Levi F, et al. Dietary vitamin D and cancers of the oral cavity and esophagus. *Ann Oncol* 2009 Sep;20(9):1576-81.
- (70) Scalco R, Premaor MO, Froehlich PE, Furlanetto TW. High prevalence of hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in elders living in nonprofit homes in South Brazil. *Endocrine* 2008 Feb;33(1):95-100.
- (71) Chen W, Clements M, Rahman B, Zhang S, Qiao Y, Armstrong BK. Relationship between cancer mortality/incidence and ambient ultraviolet B irradiance in China. *Cancer Causes Control* 2010 Oct;21(10):1701-9.
- (72) Tran B, Lucas R, Kimlin M, Whiteman D, Neale R. Association between ambient ultraviolet radiation and risk of esophageal cancer. *Am J Gastroenterol* 2012 Dec;107(12):1803-13.
- (73) Mulholland HG, Murray LJ, Anderson LA, Cantwell MM. Vitamin D, calcium and dairy intake, and risk of oesophageal adenocarcinoma and its precursor conditions. *Br J Nutr* 2011 Sep;106(5):732-41.
- (74) Boscoe FP, Schymura MJ. Solar ultraviolet-B exposure and cancer incidence and mortality in the United States, 1993-2002. *BMC Cancer* 2006;6:264.

**8) ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS**

**TARGET JOURNAL:** *Nutrition and Cancer*



**VITAMIN D IN INDIVIDUALS AT RISK FOR ESOPHAGEAL CANCER IN SOUTH  
AMERICA HIGH-RISK AREA**

Rochele Silva Boneti (1), Joíza Lins Camargo (2), Antonio Barros Lopes (1,3), Renato B. Fagundes (1,4)

1. Post-Graduate Program: Sciences in Gastroenterology and Hepatology. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
2. Endocrinology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA).
3. Gastroenterology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
4. Department of Internal Medicine. Universidade Federal de Santa Maria

Keywords: Vitamin D, 25(OH)D, esophageal cancer.

Corresponding author:

Rochele da Silva Boneti

Rua Dr. Murtinho 979 /207

Alto Petrópolis CEP: 91420-070 Porto Alegre/RS/Brasil

E-mail: rocheleboneti@hotmail.com

## **Abstract**

Vitamin D has direct and indirect effects on the control of more than 200 genes involved in cell cycle regulation, and its serum levels have been associated with the development of some cancers. The state of Rio Grande do Sul has the highest rates of esophageal cancer in Brazil, although data on the association between vitamin D and this type of cancer are nonexistent in this region. The present study therefore sought to evaluate the serum levels of 25(OH)D in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), in individuals at risk for esophageal cancer and in people with no clinical evidence of disease.

The 25(OH)D levels were assessed in three groups: 1) 40 individuals diagnosed with ESCC, who had not received any treatment at the time of inclusion (ESCC group); 2) 53 patients with risk factors for ESCC (RF group). They were alcoholics and smokers with a daily consumption of more than 40 g of ethanol and 10 cigarettes or more, for over 10 years ; and 3) 40 individuals without risk factors with no previous history of chronic disease and no clinical evidence of active disease (WRF group). All these subjects were recruited among blood donors, they were between 18 and 70 years and had a body mass index (BMI) < 30 and.

The global sample consisted of 133 patients who had mean 25(OH)D levels classified as insufficient (mean  $\pm$  SD = 24.03  $\pm$  8.9 ng/mL). The ESCC group exhibited mean values of 23  $\pm$  9.0 ng/mL. The RF group showed the highest mean level among the three groups (27.3  $\pm$  12 ng/mL), whereas the WRF group showed the lowest mean level (21.8  $\pm$  5.8 ng/mL).

In conclusion, the serum vitamin D levels, measured by 25(OH)D, were within the values considered insufficient for all patient groups. The group with risk factors for ESCC presented highest mean. Additional studies are necessary to explore the association between vitamin D status and ESCC.

## **Introduction**

The relationship between vitamin D and cancer is associated with 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D), which can have a direct or indirect effect on the control of more than 200 genes involved in the regulation of the cell cycle, differentiation, apoptosis and angiogenesis. In addition, (25(OH)D) may lead to decreased proliferation of normal or neoplastic cells (1), and high serum 25(OH)D levels are associated with lower incidence rates of colon, breast, ovarian, prostate, kidney and pancreatic cancer (2).

The association between vitamin D and esophageal cancer has been studied in populations at high risk for this type of cancer, although the existing data are controversial (3). The extreme south of Brazil is part of a high-risk area for esophageal cancer in South America (4), and due to its climate characteristics, there is evidence of vitamin D deficiency in this population (5). The present study sought to determine the serum vitamin D levels in patients with esophageal cancer, in individuals at high risk for esophageal cancer (alcoholics and smokers) and in a sample of healthy individuals.

## **Patients and methods**

This cross-sectional study assessed the following predictor variables: clinical condition, age, body mass index (BMI), phototype, physical activity, use of dietary supplements, sun exposure, smoking and alcohol intake. These variables were assessed using a questionnaire and then related to the serum vitamin D levels. Sun exposure was considered adequate when participants reported daily sun exposure for approximately 20 minutes 3 to 4 times per week. The phototype was defined by the skin color and reaction to sun exposure, according to the Fitzpatrick scale (6).

Patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) were recruited from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Patients in this group were included before receiving any form of treatment. Alcoholics and smokers, selected from Alcoholics Anonymous formed the risk factor group (RF). This group was part of a previous study to identify precursor lesions of esophageal cancer (7). All of the participants had a daily alcohol intake greater than 40 g of ethanol and a tobacco consumption of 10 or more cigarettes per day for more than 10

years. The group without risk factors (WRF) consisted of people without clinical evidence of disease. They were recruited among blood donors and this group was used to estimate the normal vitamin D levels in a population sample.

Individuals under 18 years of age, with the cognitive inability to provide informed consent, chronic kidney disease, BMI  $\geq$  30, chronic liver disease, cystic fibrosis or malabsorption syndrome, as well as pregnant and lactating women were excluded from the study.

Venipuncture was performed to collect blood for measuring the 25(OH)D levels, and 5 mL of whole blood without anticoagulant was obtained from each patient. The samples were placed in tubes wrapped in aluminum foil to avoid exposure to sunlight, and after at least 20 minutes of rest, the tubes were centrifuged at 3,250 rpm for 5 minutes. The supernatant serum was manually pipetted and placed in two Eppendorf tubes, frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (approximately 3 mL of serum per sample). In patients with ESCC, blood was collected before surgery or any other type of treatment. In the RF and WRF groups, blood was collected during the spring, from October to December, to avoid the seasonal variation in serum vitamin D levels.

For the quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D, a chemiluminescent immunoassay was performed using a LIAISON device (DiaSorin, Inc., Stillwater, Minnesota). In short, this assay uses a specific anti-vitamin D antibody to coat magnetic particles (solid phase), and vitamin D is linked to an isoluminol derivative. The 25-hydroxyvitamin D is dissociated from the binding protein and competes with vitamin D for the binding sites of the antibody during incubation. The unbound material is removed with a wash cycle after incubation. Then the starter reagents are added to induce a chemiluminescence reaction, and the light signal is measured by a photomultiplier in relative light units (RLU) and is inversely proportional to the 25-hydroxyvitamin D concentration in the calibrators, controls or samples. The 25(OH)D levels were classified according to the standards of the Endocrine Society as follows:  $<10$  ng/mL – *severe deficiency*; from 10 to 19.9 ng/mL – *deficiency*; from 20 to 29.9 ng/mL – *insufficiency*; from 30 to 60 ng/mL – *healthy/optimal*; and  $>100$  ng/mL – *toxicity* (as indicated by hypercalcemia and hyperphosphatemia) (8,9).

Data were analyzed with SPSS software version 18.0. We described categorical variables as absolute and relative frequencies. Quantitative variables were expressed by mean

and standard deviation. To compare means between the groups, t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) complemented by Tukey's test were used. To compare proportions, we used Pearson's chi-square test or Fisher's exact test. The significance level was set at 5%. The study protocol was approved by the HCPA Research Ethics Committee and under the number 11-406.

## Results

We studied 133 participants with a mean age of  $51 \pm 15$  years, and 70% of them were male. The overall mean serum 25(OH)D concentration was  $10 \pm 24.57$  ng/mL. We recruited 40 patients with ESCC. The mean serum 25(OH)D level was  $23 \pm 9.0$  ng/mL. The initial sample for RF group was 64 patients but we excluded eleven patients due to  $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ; thus, this group consisted of 53 participants. The mean serum 25(OH)D level in this group was  $27.3 \pm 12.0$  ng/mL. The WRF group consisted of 40 participants, with a mean serum 25(OH)D level of  $21.8 \pm 5.8$  ng/mL. The characteristics of the patients for all groups and their serum 25(OH)D levels are detailed in Table 1.

The age of the patients with ESCC ( $62.6 \pm 9.2$  years) was significantly higher than that of the patients in the other two groups (RF =  $55.1 \pm 8.8$  years and WRF =  $33.8 \pm 10.4$  years,  $p < 0.001$ ). No correlation was observed between age and serum 25(OH)D level. The BMI of the ESCC group was significantly lower than the BMI of the other two groups ( $p = 0.001$ ).

Comparison of the mean serum 25(OH)D levels between the three groups in the analysis of variance showed a significant difference between the groups ( $p = 0.007$ ), with higher 25(OH)D levels observed in the RF group compared to the ESCC group ( $p = 0.047$ ) and the WRF group ( $p = 0.01$ ) (Table 1, Figure 1).

The groups also differed regarding gender, with more females in the WRF group ( $p < 0.001$ ). In the RF group and the ESCC group, there was a predominance of males, whereas in the ESCC group, the number of women was higher than that in the RF group ( $p = 0.05$ ).

By grouping subjects with skin phototypes I to IV in one category and subjects with darker skin phototypes (V and VI) in a second category, we did not observe significant differences between the groups. Similarly, we did not observe differences regarding the level

of reported sun exposure. A small number of participants reported the occasional use of sunscreen.

A small number of individuals had vitamin D supplementation and most of them in the ESCC group. No correlation was observed between the 25(OH)D levels and the number of cigarettes smoked. Alcoholics exhibited adequate levels of vitamin D, whereas non-alcoholics demonstrated insufficient levels, although vitamin D deficiency was similar between alcoholics and non-alcoholics (Table 2).

### **Discussion**

The overall mean serum vitamin D level found in the sample was classified as insufficient, which is similar to the findings reported by other studies conducted in southern Brazil (5, 10). Healthy subjects exhibited the lowest mean values for vitamin D, whereas the RF group displayed the highest levels, and the group with cancer showed intermediate levels. Therefore, the results of the present study are consistent with hypovitaminosis D, which predominates in the studied region. Regarding demographic data, sun exposure and use of sunscreen, these individuals showed similar characteristics of the population they belong. Despite the associated clinical conditions, the most pronounced levels of hypovitaminosis D were identified in the group of healthy individuals. This finding suggests that age, alcohol consumption and smoking did not have influence on the serum vitamin D levels of this sample.

However, when we stratified the sample according to alcohol consumption and smoking, we observed that the RF group (alcoholics/smokers) showed higher mean 25(OH)D levels when compared with the other two groups, although these values were still within the range considered insufficient. Alcohol consumption and smoking were the variables selected to form the RF group and most of the patients with ESCC were also alcoholics and smokers. These variables may be associated with the low 25(OH)D levels in these two groups because excessive alcohol consumption is related to malabsorption and/or a low dietary intake. Alcohol also may cause decreased levels of vitamin D-binding protein and a decreased ability of the liver to hydroxylate vitamin D. Moreover, excess alcohol may compete with nutrient absorption and utilization, and greater levels of alcohol in the diet are associated with a lower density and nutritional quality of the food ingested, especially fat-soluble and B-complex vitamins (11).

The relationship between smoking and vitamin D levels is more complex. Nicotine, in addition of being highly toxic, has a stimulant as well as depressive effect on the central nervous system. The effects of nicotine are mediated by catecholamine release, which influence appetite regulation or eating behavior and may lead to weight loss with consequent nutritional deficiencies (12). The study by Brot et al. (13) supports the effects of smoking on serum vitamin D levels, as this study found an association between insufficient vitamin D levels and smoking habits. However, our results did not show any association between smoking and 25(OH)D levels. Nonetheless, although alcohol and tobacco consumption may have produced insufficient vitamin D levels in the ESCC and RF groups, these factors were absent in the WRF group.

Another factor that could have contributed to hypovitaminosis D in the WRF group is the higher BMI in this group. It is estimated that for each unit increase in BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), there is a 1.5% decrease in the 25(OH)D concentration (14). To minimize BMI effect, we did not include individuals with a BMI  $> 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ . Nonetheless, the BMI showed an uneven distribution among the groups. In addition, other possible determinants of hypovitaminosis D, namely advanced age and low sun exposure, were also absent in this group.

Although most of the participants reported having adequate sun exposure, the mean vitamin D levels indicated insufficiency, suggesting that the solar radiation in the region could be a determinant of this condition. Previous studies have shown evidence that areas of lower solar radiation have higher rates of esophageal cancer and have suggested that a low sun exposure, which causes hypovitaminosis D, could lead to an increased risk for this type of cancer (15, 16). The results of studies on the association between esophageal cancer and vitamin D status are controversial. From the nine existing studies reported to date (16-24), four suggested that higher vitamin D levels represented a protective factor for ESCC (16, 21, 22, 24), whereas three suggested that higher vitamin D levels were associated with a higher risk for developing esophageal cancer (17, 20, 23).

Among the studies showing that higher serum 25(OH)D levels were associated with a higher risk for esophageal cancer, one was conducted in Ireland (21) and correlated the vitamin D level with esophageal adenocarcinoma, which has epidemiological characteristics markedly different from those of squamous cell carcinoma. The other two studies were conducted in Linxian, in China, which is the highest risk area for ESCC (17, 19). In these

studies, the population showed low vitamin D levels, and individuals with higher serum 25(OH)D levels were at an increased risk for squamous dysplasia, which is considered a precursor lesion of ESCC (17). Our study did not aim to identify the association between serum vitamin D levels and precursor lesions, but our results indicate that alcoholics and smokers are at a high risk for this type of lesion (25). The effect of smoking on the esophageal mucosa is likely due to the action of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Phase I and II enzymes act in the PAH metabolism. These enzymes are induced by the active vitamin D metabolite 1,25(OH)D<sub>3</sub> (26). Thus, it is possible that in smokers with vitamin D deficiency, higher vitamin levels may lead to increased activity of these enzymes, thus potentiating the adverse effects of polycyclic aromatic hydrocarbons.

The reduced activity of 25-hydroxylase in the liver may be another factor contributing to the low vitamin D status in alcoholic patients (11). However, we must consider that despite the fact that the individuals included in the RF group were heavy alcoholics, they had abstained from alcohol for less than one year. Abstinence from alcohol can be a key determinant of a better nutrient intake, and the non-interference of alcohol in the metabolic pathway of vitamin D may explain the higher levels observed in this group.

Protein-calorie malnutrition in patients with ESCC occurs in up to 80% of cases (27). Malnutrition and the inflammatory process may negatively affect the plasma levels of some proteins such as albumin, and consequently the absorption of vitamin D (28). Therefore, the lower vitamin D levels in the group with ESCC, when compared with the RF group, may be due to the malnourished state of these patients.

The highlight of our study is that it is the first report to measure serum vitamin D levels in a Western risk area for ESCC. Moreover, we assessed patients with established disease, individuals with risk factors for this type of cancer and healthy individuals who live in this risk area.

The limitations of our study include its cross-sectional design and small sample size. The use of a historical group also represents one of the study's limitations, although this bias was minimized the blood collection at an appropriate time for the proposed objective. The patients with ESCC were evaluated throughout the study period; therefore, for this group, the 25(OH)D measurements were performed at different times of the year. However, some studies



do not show significant differences when considering the period of blood collection (29) and suggest the collection of more than one vitamin D measurement per year.

The comparison between the existing studies has the limitation of the method used to estimate vitamin D status. Only three of the nine publications previously mentioned used 25(OH)D as a marker of the vitamin D status. Although a single blood sample obtained during the spring or the autumn provides a reasonable estimate of 25(OH)D for the year, this measurement does not assess the impact on carcinogenesis, which is an event that occurs in multiple stages in a long period of time.

In summary, the mean vitamin D levels were insufficient in all the three groups studied. The group with risk factors for ESCC presented the higher level. Our results do not allow us to make inferences about the vitamin D levels detected and do not show whether they can be considered protective factor or risk determinants for ESCC. For this purpose, further studies with a prospective design and larger samples are needed, which also include periodic assessment of the esophageal mucosa and vitamin D status related to some form of measurement of sun exposure.

### **Conclusions**

The vitamin D status, estimated by serum 25(OH)D level, was deemed insufficient in all three groups evaluated. The RF group (alcoholics/smokers) showed the highest mean level among the three groups, ESCC patients showed intermediate mean values, and the group of healthy participants showed the lowest mean value. Additional studies are necessary to explore the association between vitamin D and ESCC risk.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The authors thanks to the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) and the Research Support Fund/HCPA (Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) for the financial support. They also thanks to Dr. Sandra Maria Vieira for their comments and suggestions in the earlier drafts of this paper.

## References

- (1) Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006 Dec;102(1-5):156-62.
- (2) Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 2009 Jul;19(7):468-83.
- (3) Trowbridge R, Mittal SK, Agrawal DK. Vitamin D and the epidemiology of upper gastrointestinal cancers: a critical analysis of the current evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013 Jun;22(6):1007-14.
- (4) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
- (5) Premaor MO, Paludo P, Manica D, Paludo AP, Rossatto ER, Scalco R, et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest* 2008 Nov;31(11):991-5.
- (6) Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988 Jun;124(6):869-71.
- (7) Lopes AB, Muller LB, Reichert R, Moraes CM, Capra AM, Prolla JC, et al. Detecting p53 immunoexpression in esophageal mucosa with exfoliative cytology in individuals at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Acta Cytol* 2010 Jan;54(1):31-8.
- (8) Wimalawansa SJ. Vitamin D in the new millennium. *Curr Osteoporos Rep* 2012 Mar;10(1):4-15.
- (9) Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Jul;96(7):1911-30.
- (10) Premaor MO, Alves GV, Crossetti LB, Furlanetto TW. Hyperparathyroidism secondary to hypovitaminosis D in hypoalbuminemic is less intense than in normoalbuminemic patients: a prevalence study in medical inpatients in southern Brazil. *Endocrine* 2004 Jun;24(1):47-53.
- (11) Bjorneboe GE, Johnsen J, Bjorneboe A, Rousseau B, Pedersen JI, Norum KR, et al. Effect of alcohol consumption on serum concentration of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, retinol, and retinol-binding protein. *Am J Clin Nutr* 1986 Nov;44(5):678-82.
- (12) Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 2008 Apr;87(4):801-9.
- (13) Brot C, Jorgensen NR, Sorensen OH. The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *Eur J Clin Nutr* 1999 Dec;53(12):920-6.
- (14) Vimalaswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 2013;10(2):e1001383.
- (15) Grant WB. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation. *Cancer* 2002 Mar 15;94(6):1867-75.
- (16) Boscoe FP, Schymura MJ. Solar ultraviolet-B exposure and cancer incidence and mortality in the United States, 1993-2002. *BMC Cancer* 2006;6:264.

- (17) Abnet CC, Chen W, Dawsey SM, Wei WQ, Roth MJ, Liu B, et al. Serum 25(OH)-vitamin D concentration and risk of esophageal squamous dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007 Sep;16(9):1889-93.
- (18) Abnet CC, Chen Y, Chow WH, Gao YT, Helzlsouer KJ, Le ML, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of esophageal and gastric cancer: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *Am J Epidemiol* 2010 Jul 1;172(1):94-106.
- (19) Chen W, Dawsey SM, Qiao YL, Mark SD, Dong ZW, Taylor PR, et al. Prospective study of serum 25(OH)-vitamin D concentration and risk of oesophageal and gastric cancers. *Br J Cancer* 2007 Jul 2;97(1):123-8.
- (20) Chen W, Clements M, Rahman B, Zhang S, Qiao Y, Armstrong BK. Relationship between cancer mortality/incidence and ambient ultraviolet B irradiance in China. *Cancer Causes Control* 2010 Oct;21(10):1701-9.
- (21) Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 2006 Apr 5;98(7):451-9.
- (22) Lipworth L, Rossi M, McLaughlin JK, Negri E, Talamini R, Levi F, et al. Dietary vitamin D and cancers of the oral cavity and esophagus. *Ann Oncol* 2009 Sep;20(9):1576-81.
- (23) Mulholland HG, Murray LJ, Anderson LA, Cantwell MM. Vitamin D, calcium and dairy intake, and risk of oesophageal adenocarcinoma and its precursor conditions. *Br J Nutr* 2011 Sep;106(5):732-41.
- (24) Tran B, Lucas R, Kimlin M, Whiteman D, Neale R. Association between ambient ultraviolet radiation and risk of esophageal cancer. *Am J Gastroenterol* 2012 Dec;107(12):1803-13.
- (25) Fagundes RB, de Barros SG, Putten AC, Mello ES, Wagner M, Bassi LA, et al. Occult dysplasia is disclosed by Lugol chromoendoscopy in alcoholics at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Endoscopy* 1999 May;31(4):281-5.
- (26) Kutuzova GD, Deluca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates genes responsible for detoxification in intestine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007 Jan 1;218(1):37-44.
- (27) Rivadeneira DE, Evoy D, Fahey TJ, III, Lieberman MD, Daly JM. Nutritional support of the cancer patient. *CA Cancer J Clin* 1998 Mar;48(2):69-80.
- (28) Premaor MO, Furlanetto TW. [Vitamin D deficiency in adults: to better understand a new presentation of an old disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006 Feb;50(1):25-37.
- (29) Al-Mogbel ES. Vitamin D status among Adult Saudi Females visiting Primary Health Care Clinics. *Int J Health Sci (Qassim )* 2012 Jun;6(2):116-26.

## Tables

Table 1. Characteristics of the groups

Variables	WRF(n=40)	RF(n=53)	ESCC(n=40)	P
Age in years, mean $\pm$ SD*	33,8 $\pm$ 10,4	55,1 $\pm$ 8,8	62,6 $\pm$ 9,2	< 0,001
BMI, mean $\pm$ SD*	25,8 $\pm$ 2,8	23,3 $\pm$ 3,2	20,5 $\pm$ 4,5	< 0,001
Underweight – n (%)	0	6 (11,32)	21 (52,5)	<0,01*
Normal range – n (%)	22 (55)	28 (52,83)	14 (35,0)	<0,05*
Overweight – n (%)	18 (45)	19 (35,84)	5 (12,5)	<0,01*
25 (OH)D ng/ml - mean $\pm$ SD*	21,8 $\pm$ 5,8	27,3 $\pm$ 12,0	23 $\pm$ 9,0	0,007
Sex				
Men – n (%)	16(40)	48(90,6)	29(73)	
Women – n (%)	24(60)	5(9,4)	11(27)	<0,001
Phototype (I - III) – n (%)	35(88)	53(100)	26(65)	0,141
Sun exposure – n (%)	31(78)	41(78)	32(80)	0,947
Supplements Vit. D – n (%)	7 (17,5)	2 (3,8)	10 (25)	n/a
Alcohol intake ** – n (%)	0	53 (100)	30 (75)	< 0,001
Smoking - n (%)	0	53 (100)	13 (33)	< 0,001

- \* SD= Standard deviation;
- \*\* Pearson chi-square with adjustable residuals
- \*\*\* Alcohol consumption  $\geq$  40 g ethanol / day

Table 2. Comparison of levels of 25 (OH) D in alcoholics and non-alcoholics

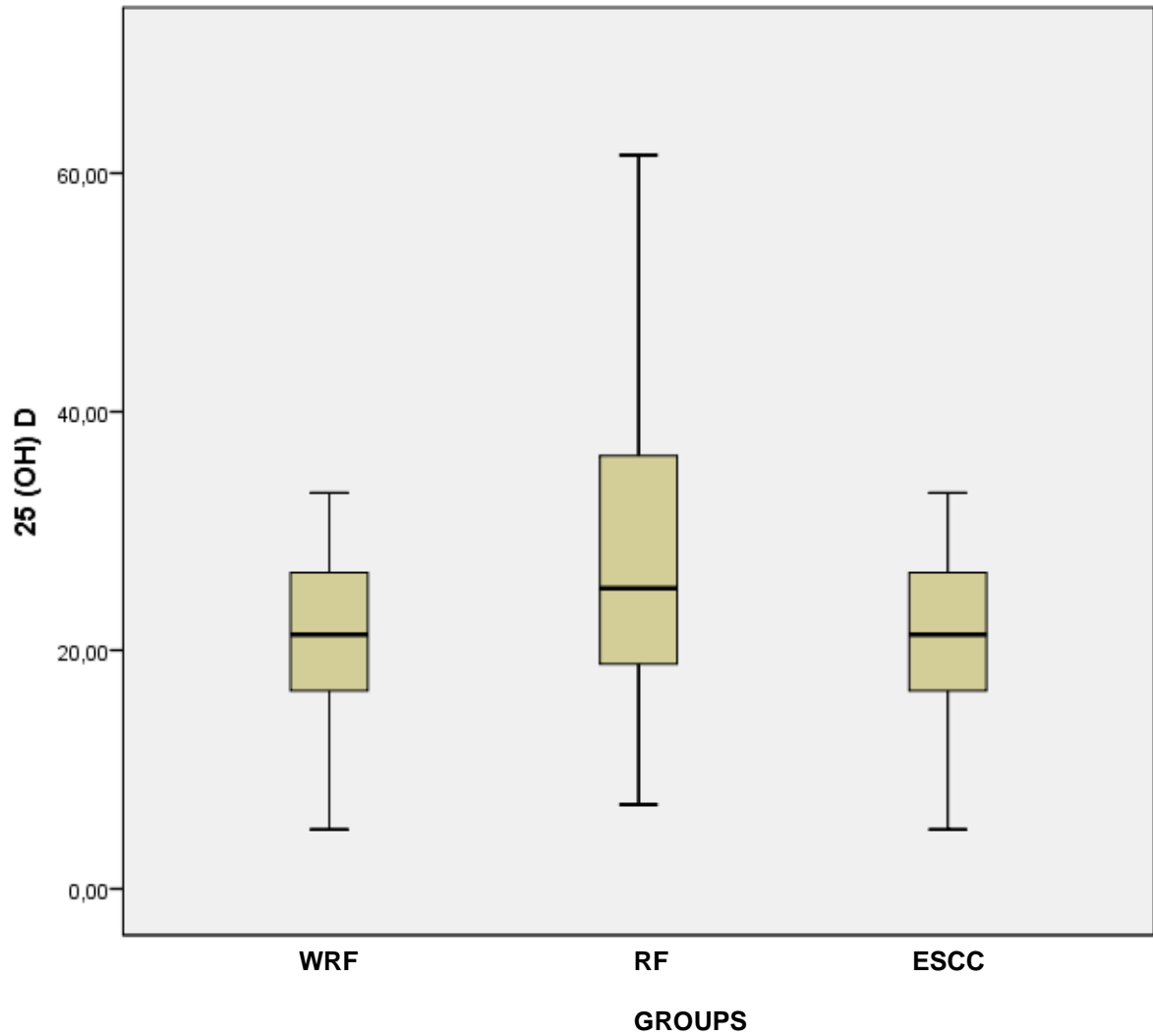
Vit. D levels	Alcoholics*		Non- alcoholic		P**
	N	%	n	%	
Deficiency	28	33,7	18	36,7	0,7
Insufficiency	24	29,0	29	59,2	0,001
Appropriate	31	37,3	3	6,1	0,000
Total	83	100	49	100	

\* Alcoholics  $\geq$  40 g ethanol / day

\*\* Pearson chi-square with adjustable residuals

**Figure**

Figure 1. Comparison of mean serum 25 (OH) D between the three groups



## 9) CONCLUSÕES

- O status da vitamina D estimado pela média dos níveis séricos de 25(OH)D se apresentou em níveis insuficientes, nos três grupos.
- O grupo FR (alcoolistas/tabagistas) apresentou a média mais elevada dos três grupos
- Pacientes com CEE apresentaram valores médios intermediários.
- O grupo de participantes presumidamente saudáveis apresentou a média mais baixa.

## **10) PERSPECTIVAS PARA FUTUTROS ESTUDOS**

- Reavaliação anual dos pacientes com fatores de risco para CEE por 5 anos, com mensuração dos níveis de vitamina D e estudo endoscópico e histológico da mucosa esofágica.
- Constituir uma coorte de indivíduos alcoolistas/tabagistas com um braço exposto à suplementação de vitamina D e aferir níveis séricos da vitamina em diferentes épocas do ano, e seguir ao longo do tempo para observação do desfecho displasia esofágica.



## 11) ANEXOS

### Anexo 1: FICHA AVALIAÇÃO CLÍNICA

FIXA DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES:

DATA:

NOME: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

#### DADOS DE ANAMNESE:

1- IDADE: \_\_\_\_\_ ANOS

2- SEXO: ( ) M ( ) F

3- PESO ATUAL: \_\_\_\_\_ Kg ALTURA: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ Kg/ m

4- FOTOTIPOS I/II ( ) III/IV ( ) V/VI ( )

5- DOENÇAS ASSOCIADAS:

6- PROFISSÃO: \_\_\_\_\_

7- NATURALIDADE: \_\_\_\_\_

8- MEDICAMENTOS EM USO:

9- SE EXPÕE AO SOL POR PELO MENOS 20 MINUTOS POR DIA OU PELO MENOS 3-4 HORAS POR SEMANA? ( ) SIM ( ) NÃO

10 – UTILIZA PROTETOR SOLAR DIARIAMENTE? ( ) SIM ( ) NÃO

11- PERMANECE DENTRO DE CASA OU NO TRABALHO (SEM LUZ SOLAR) NA MAIORIA DOS DIAS? ( ) SIM ( ) NÃO

12- TABAGISMO ATUAL? ( ) SIM ( ) NÃO

QUANTOS CIGARROS/DIA? \_\_\_\_\_

13- TABAGISMO NO PASSADO? ( ) SIM ( ) NÃO QUANTOS CIGARROS/DIA?

14- USO DE ALCÓOL? ( ) SIM ( ) NÃO, SE SIM :  
SOCIALMENTE ( ) 1 – 2 X / SEMANA ( )  
3 – 4 X / SEMANA ( ) 5 – 7 X / SEMANA ( )

15- UTILIZA ALGUM TIPO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR ( ) SIM ( ) NÃO

16- EXERCÍCIO FÍSICO? ( ) SIM ( ) NÃO

## **Anexo 2:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Grupo 1 e 2 (pacientes com câncer de esôfago e alcoolistas/tabagistas):

O câncer de esôfago é uma doença bastante comum no Rio Grande do Sul. As pessoas que já tiveram câncer de boca ou de garganta, ou aquelas pessoas que fumam, bebem ou tomam chimarrão diariamente têm maior chance de desenvolver o câncer de esôfago. Em algumas regiões do mundo foi encontrada associação do câncer de esôfago com os níveis sanguíneos da vitamina D.

Estamos realizando um trabalho onde queremos conhecer aqui no Rio Grande do Sul os níveis sanguíneos desta vitamina, e assim verificar se a quantidade de vitamina D no sangue pode determinar risco para o aparecimento de câncer de esôfago ou se representa um fator que protege para este tipo de câncer. Portanto ao participar do estudo você estará nos ajudando a conhecer melhor o papel desta vitamina neste tipo de câncer.

Para realizar a pesquisa é necessário tirar um pouco do seu sangue, que normalmente é retirado da parte interna do cotovelo ou parte posterior da mão, o local da retirada do sangue é limpo com um anti-séptico e é colocado no seu braço um garrote suficientemente apertado para distender a veia, sem causar desconforto. Coloca-se uma agulha na veia, e o sangue é coletado em um frasco, após a coleta do sangue, o garrote e a agulha são retirados, e o local da punção é coberto para deter o sangramento.

Este estudo apresenta risco muito pequeno por causa da retirada para coleta de sangue, tais como uma dor moderada, sensação de ferroadada ou picada no momento da punção ou pequena hemorragia que pode causar mancha arroxada na pele. Após o procedimento, pode haver certo latejamento.

Eu,....., fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre o procedimento, no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou dos riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados, como também fui informado que não receberei remuneração por minha participação na pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, a qualquer momento, sem prejuízo de meu atendimento

O profissional.....,..... certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

O documento será elaborado em duas vias, permanecendo uma com participante e outra com o pesquisador responsável.

Local

,...../...../.....

-----  
Assinatura do Paciente

-----  
Assinatura do Pesquisador

*Programa de Pós Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia- UFRGS .  
Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar Fone/FAX: (51) 3308 5616  
Dr. Renato B. Fagundes (51) 81018818 (pesquisador responsável)  
Rochele da Silva Boneti (51)3086 42 73 e (51)95161921 – Porto Alegre RS  
Contato do Comitê de ética em Pesquisa (51) 3308.4085*

### Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Grupo 3 (indivíduos saudáveis) :

O câncer de esôfago é uma doença bastante comum no Rio Grande do Sul. As pessoas que já tiveram câncer de boca ou de garganta, ou aquelas pessoas que fumam, bebem ou tomam chimarrão diariamente têm maior chance de desenvolver o câncer de esôfago. Em algumas regiões do mundo foi encontrada associação do tabagismo, alcoolismo e o câncer de esôfago com os níveis sanguíneos da vitamina D.

Estamos realizando um trabalho onde queremos conhecer aqui no Rio Grande do Sul os níveis sanguíneos desta vitamina, e assim determinar risco para o aparecimento de câncer de esôfago ou se representam fator de proteção para este tipo de câncer. Portanto ao participar do estudo você estará nos ajudando a conhecer os níveis desta vitamina em indivíduos saudáveis para que possamos comparar com indivíduos com fatores de risco para este tipo de câncer e com câncer de esôfago.

Para realizar a pesquisa é necessário tirar um pouco do seu sangue, que normalmente é retirado da parte interna do cotovelo ou parte posterior da mão, o local da punção é limpo com um anti-séptico e é colocado no seu braço um garrote suficientemente apertado para distender a veia, sem causar desconforto. Insere-se uma agulha na veia, e o sangue é coletado em um frasco, após a coleta do sangue, o garrote é retirado para o relaxamento da circulação e a agulha é retirada, e o local da punção é coberto para deter o sangramento.

Este estudo apresenta risco muito pequeno por causa da punção para coleta de sangue, tais como uma dor moderada, sensação de ferroadada ou picada no momento da punção ou pequena hemorragia que pode causar mancha arroxada na pele. Após o procedimento, pode haver algum latejamento.

Eu,....., fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento, no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou dos riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados, como também fui informado que não receberei remuneração por minha participação na pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

O profissional....., certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

O documento será elaborado em duas vias, permanecendo uma com participante e outra com o pesquisador responsável.

Local

,...../...../.....

-----  
Assinatura do Paciente

-----  
Assinatura do Pesquisador

*Programa de Pós Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia- UFRGS .  
Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar Fone/FAX: (51) 3308 5616  
Dr. Renato B. Fagundes (51) 81018818 (pesquisador responsável)  
Rochele da Silva Boneti (51)3086 42 73 e (51)95161921 – Porto Alegre RS  
Contato do Comitê de ética em Pesquisa (51) 3308.4085*