

## Artigo original

# Hipovitaminose D em idosos institucionalizados tratados com anticonvulsivantes, uma associação frequente

Hypovitaminosis D in institutionalized elders treated with anticonvulsants, a common association

PAULA LOURES VALLE LIMA<sup>1</sup>, GUILHERME BICALHO CIVINELLI DE ALMEIDA<sup>2</sup>, LEONARDO MENDES BELLA<sup>3</sup>, ANDRÉ NETTO BASTOS<sup>4</sup>, HELOINA LAMHA MACHADO BONFANTE<sup>5</sup>, HERVAL DE LACERDA BONFANTE<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Programa de Imunologia Genética e Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

<sup>2</sup> Curso de Medicina pela UFJF.

<sup>3</sup> Curso de Farmácia e Bioquímica pela UFJF.

<sup>4</sup> Departamento de Morfologia da UFJF.

<sup>5</sup> Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (Suprema).

<sup>6</sup> Departamento de Farmacologia da UFJF.

Recebido: 16/4/2012 – Aceito: 12/9/2012

## Resumo

**Contexto:** A população idosa apresenta alta prevalência de hipovitaminose D, sendo provável que, exposta ao uso de anticonvulsivantes, ocorra agravamento dessa condição. **Objetivo:** Avaliar a interferência do uso crônico de fármacos anticonvulsivantes nos níveis séricos de vitamina D em idosos institucionalizados com idade acima de 65 anos. **Métodos:** Foram estudados 18 idosos institucionalizados tratados com anticonvulsivantes, por no mínimo 12 meses, comparados a 16 idosos não tratados. **Resultados:** O estudo demonstrou que os dois grupos cursaram com deficiência de vitamina D, sendo mais pronunciada no grupo tratado com anticonvulsivantes. Embora não houvesse diferença estatisticamente significativa nos valores de paratormônio, nos idosos tratados foi observada uma tendência de níveis mais elevados,  $53,44 \pm 28,92$  pg/ml em comparação aos idosos não tratados,  $38,5 \pm 10,08$  pg/ml ( $P = 0,42$ ). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D nas pacientes do sexo feminino tratadas de  $9,22 \pm 3,80$  ng/ml versus não tratadas,  $18,78 \pm 7,62$  ng/ml ( $P = 0,03$ ). **Conclusão:** Nossos achados sugerem que idosos institucionalizados apresentam menores níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, configurando um estado de deficiência, e diferença significativa foi detectada nas mulheres tratadas com fármacos anticonvulsivantes.

Lima PLV, et al. / Rev Psiq Clín. 2012;39(5):172-5

**Palavras-chave:** Vitamina D, anticonvulsivantes, idoso, epilepsia.

## Abstract

**Background:** Elderly people have a high prevalence of hypovitaminosis D, especially when they are exposed to anticonvulsants. **Objective:** The present study evaluated the influence of chronic use of anticonvulsants on serum levels of vitamin D in institutionalized elders aged above 65 years. **Methods:** Eighteen elderly subjects treated with anticonvulsants were studied for at least 12 months and compared to 16 untreated elders. **Results:** Vitamin D deficiency was observed in both groups, but the group treated with anticonvulsants showed a more remarkable deficiency. Although there was no statistically significant difference in serum parathyroid hormone levels, elderly patients in treatment had a higher value ( $53.44 \pm 28.92$  pg/ml) compared to untreated elders ( $38.5 \pm 10.8$  pg/ml;  $p = 0.42$ ). Statistically significant difference was observed between serum 25-hydroxyvitamin D in treated female patients ( $9.22 \pm 3.80$  ng/ml) compared to untreated female patients ( $18.78 \pm 7.62$  ng/ml;  $p = 0.03$ ). **Discussion:** The observed deficiency in both groups suggests that elderly subjects have lower serum 25-hydroxyvitamin D. Compared to untreated elderly women, elderly women treated with anticonvulsants showed a significantly lower serum level of vitamin D.

Lima PLV, et al. / Rev Psiq Clín. 2012;39(5):172-5

**Keywords:** Vitamin D, anticonvulsants, elderly, epilepsy.

## Introdução

A epilepsia é um dos maiores problemas de saúde pública mundial que acomete aproximadamente 50 milhões de pessoas. Normalmente a terapia é crônica e realizada com drogas anticonvulsivantes (DAC), as quais são apontadas como um fator de risco independente para a redução da densidade mineral óssea e possível causa de osteoporose densitométrica<sup>1-3</sup>. A terapia com DAC interfere significativamente no metabolismo do cálcio e da vitamina D, eleva os níveis do paratormônio (PTH), diminui a força muscular, aumenta a propensão à perda óssea e eleva o risco de fraturas<sup>2-6</sup>. A politerapia com a utilização associada de DAC eleva ainda mais o risco de anormalidades no metabolismo mineral ósseo<sup>7,8</sup>.

A vitamina D pode ser obtida por meio de alimentos como salmão, sardinha, ovos, leite, azeite, manteiga, oleaginosas e cereais, embora a fonte principal seja a sua formação na pele pela exposição aos raios solares UVB<sup>9</sup>.

O presente estudo avaliou a interferência do uso de DAC nos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] em indivíduos institucionalizados, com idade superior a 65 anos.

## Métodos

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora e todos os participantes foram orientados quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, obtendo-se a concordância deles ou, na impossibilidade, dos familiares. Após seleção, foram incluídos 18 idosos, com idade superior a 65 anos e institucionalizados. Definiu-se institucionalização como a residência em casas de repouso para idosos por no mínimo 12 meses. Os indivíduos participantes do estudo foram recrutados de duas casas de repouso na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais (latitude: 21° 45' 51" S), que abrigavam idosos que permaneciam por causa de

senilidade e relato de impossibilidade de convivência com familiares por vários motivos, entre eles a necessidade de cuidador em regime permanente. Não foram detectadas doenças sérias na população avaliada e, após seleção, foi restringida a entrada de indivíduos com insuficiência renal ou hepática ou que utilizavam suplementação de cálcio ou vitamina D (incluindo polivitamínicos). A condição exigida era a de utilização de monoterapia com DAC (fenitoína, carbamazepina ou fenobarbital) por no mínimo 12 meses. O grupo controle foi constituído por 16 indivíduos de mesma faixa etária que não faziam uso dessa classe de fármacos como mostrado na tabela 1. Indivíduos com insuficiência renal ou hepática ou que utilizavam suplementação de cálcio ou vitamina D (incluindo polivitamínicos) foram excluídos do estudo.

**Tabela 1.** Características demográficas da população estudada

Características demográficas	Tratados com DAC (n = 18)	Não tratados com DAC (n = 16)	P
Sexo (feminino/masculino)	10/8	12/4	NS**
Raça (branca/negra)	14/4	16/0	NS**
Idade (anos)	76,89 ± 2,25	76,38 ± 3,52	NS**
Peso (kg)	64,06 ± 5,15	54,16 ± 3,75	NS**
Altura (m)	1,63 ± 0,02	1,56 ± 0,02	NS**
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	24,17 ± 2,04	22,46 ± 1,75	NS**

IMC\*: índice de massa corporal.

NS\*\*: não significativo.

Uma entrevista com as seguintes perguntas foi realizada: presença de comorbidades (hipertensão arterial, endocrinopatias, doenças reumáticas e neoplásicas), ocorrência de eventos cardiovasculares (infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico), ocorrência prévia de fraturas e presença de dor crônica (definida pela duração acima de três meses).

Os participantes apresentavam atividade física limitada, não realizavam caminhadas regularmente e a exposição aos raios solares não era prática habitual.

Após a obtenção dos dados expostos neste estudo piloto, o trabalho continuará com aumento da amostra avaliada, o estudo das alterações em nível de receptor de vitamina D e a inclusão das dosagens séricas das DAC e de um grupo controle de idosos não institucionalizados.

As coletas de sangue foram realizadas durante o outono, após jejum de 12 horas, entre 6 e 9 horas da manhã. Foram dosados, além da 25(OH)D, o paratormônio (PTH), cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, albumina, creatinina e as aminotransferases.

A dosagem da 25(OH)D foi realizada pelo método de quimioluminescência utilizando o *kit* comercial LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL Assay (310600 – RIA; DiaSorin, Minnesota, USA). O limite de detecção foi 4,0 ng/ml. As variações inter e intraensaios foram, respectivamente, 7,0% e 5,0%. Níveis séricos de 25(OH)D superiores a 30 ng/ml foram considerados normais, de 20 a 30 ng/ml indicavam insuficiência, abaixo de 20 ng/ml, deficiência e abaixo de 10 ng/ml, deficiência severa.

O PTH intacto foi dosado no soro pelo método de quimioluminescência utilizando o *kit* IMMULITE® 2000 Intact PTH, DPC® (Diagnostic Products Co, Los Angeles, Ca, USA), com limite de detecção de 0,3 pg/ml e variações inter e intraensaios, respectivamente, de 4,7% e 7,5% (valores de referência: 7-53 pg/ml).

As dosagens de cálcio (*kit* Biotécnica®), fósforo (*kit* Labtest®) e fosfatase alcalina (*kit* Analisa®) foram realizadas no soro, e o limite de detecção do cálcio foi de 0,27 mg/dl, com variação intraensaio de 4,01% e interensaio de 2,56% (valores de referência: 8,5-10,5 mg/dl). A dosagem de fósforo apresentou limite de detecção de 0,14 mg/dl, variação intraensaio de 1,85% e interensaio de 3,4% (valores de referência: 2,5-4,8 mg/dl). A fosfatase alcalina apresentou variação intraensaio de 2,25% e interensaio de 0,85% (valores de referência: 26-117 U/l).

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade. Utilizaram-se o teste t-Student, quando houve evidência de normalidade, e o teste não paramétrico de Mann-Whitney, quando a variável não apresentou distribuição normal. O programa utilizado para a análise estatística foi o GRAPHPAD PRISM® versão 5. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para P < 0,05.

## Resultados

Não houve diferença quanto à idade dos participantes do estudo e aos valores de índice de massa corpórea (IMC) nos dois grupos, conforme demonstrado na tabela 1.

Entre os indivíduos tratados, todos estavam em uso de monoterapia, quatro utilizavam carbamazepina, seis fenobarbital e oito fenitoína nas doses médias diárias de 200, 225 e 200 mg, respectivamente.

Os resultados das dosagens bioquímicas analisadas estão descritos na tabela 2 e 3.

**Tabela 2.** Dosagens bioquímicas dos idosos tratados e não tratados com anticonvulsivantes

Parâmetros	Tratados com DAC (n = 18)		Não tratados com DAC (n = 16)		P	Referência
	Média	DP*	Média	DP*		
25(OH)D (ng/ml)	11,96	6,00	17,03	7,24	0,93 (NS**)	> 30
Cálcio (mg/dl)	9,02	0,83	9,06	0,38	0,81 (NS**)	8,5-10,5
Fósforo (mg/dl)	3,92	0,71	4,00	0,73	0,96 (NS**)	2,5-4,8
PTH (pg/ml)	53,44	28,92	38,50	10,08	0,42 (NS**)	7-53
Fosfatase alcalina (U/l)	114,3	38,98	109,4	28,64	0,88 (NS**)	26-117

\*DP: desvio-padrão.

\*\*NS: não significativo.

**Tabela 3.** Dosagens bioquímicas no sexo feminino

Parâmetros	Tratadas (n = 10)		Não tratadas (n = 12)		P
	Média	DP*	Média	DP*	
25(OH)D (ng/ml)	9,22	3,80	18,78	7,62	0,03**
Cálcio (mg/dl)	8,66	0,21	8,96	0,37	0,25
Fósforo (mg/dl)	4,22	0,69	4,23	0,74	0,93
PTH (pg/ml)	56,20	29,11	37,83	11,32	0,33
Fosfatase alcalina (U/l)	124,4	50,65	109,67	24,81	0,79

\* DP: desvio-padrão.

\*\* P < 0,05.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas dosagens de albumina, ureia, creatinina, aminotransferases e creatinquinase entre os dois grupos.

Quanto à diferença dos níveis de 25(OH)D entre os usuários de DAC, apesar do pequeno número de indivíduos em cada grupo, o que não permitiu a realização de análise estatística, houve uma tendência de menores níveis séricos de 25(OH)D nos indivíduos em uso de fenobarbital e fenitoína em comparação com a carbamazepina.

## Discussão

Epilepsia é o mais frequente transtorno neurológico, predomina nos países em desenvolvimento e pode se originar de uma variedade de situações e mecanismos fisiopatológicos, além da possibilidade de associação com transtornos mentais<sup>10-12</sup>. O tratamento clínico pode se estender por tempo indeterminado e as DAC constituem a principal forma de abordagem farmacológica, entretanto podem ocasionar alterações no metabolismo da vitamina D e consequente osteomalácia, osteopenia e risco aumentado de fraturas<sup>1</sup>.

Os resultados encontrados corroboram os dados existentes na literatura, ratificando a grande prevalência de hipovitaminose D na população idosa. Segundo Holick<sup>13,14</sup>, com o envelhecimento, a capacidade de síntese de vitamina D pela pele diminui. Em seu estudo, jovens expostos à luz artificial produziram quase quatro vezes mais 7-deidrocolesterol quando comparados a indivíduos idosos durante o mesmo período de exposição.

A indução enzimática pelas DAC fenitoína, carbamazepina e fenobarbital reduz os níveis séricos de vitamina D, e essa redução está associada à indução, pelas DAC, do receptor nuclear órfão do pregnane X, que possui 60% de homologia dos domínios de ligação do DNA com o receptor de vitamina D. A maior ativação do receptor do pregnane X é responsável por induzir a enzima do citocromo P 450 (CYP24), que metaboliza a 25(OH)D em ácido calcitroico, inativando-a<sup>7,15,16</sup>.

Pack e Morel demonstraram que homens e mulheres em tratamento com DAC podem ter os níveis séricos de PTH aumentados, tendência evidenciada em nosso estudo, embora sem significância estatística, o que sugere a presença de hiperparatireoidismo secundário decorrente da hipovitaminose D e hipocalcemia<sup>8</sup>.

Pacientes tratados com fenobarbital e fenitoína apresentaram tendência a menores níveis de 25(OH)D em relação aos tratados com carbamazepina. Tais achados foram demonstrados por Menon e Harinarayan<sup>7</sup>.

O presente trabalho demonstrou redução mais proeminente dos níveis séricos de vitamina D em pacientes do sexo feminino, assim como relatado por DeLappe *et al.*, indicando que as mulheres na pós-menopausa passam a formar um grupo de risco para hipovitaminose D e devem ser especialmente acompanhadas quando em uso de DAC<sup>15</sup>. Gennari *et al.* encontraram que a deficiência de estrógeno leva a menores índices de 25(OH) VITD seguidos de menor absorção intestinal de cálcio, favorecendo um quadro de hiperparatireoidismo secundário<sup>16</sup>. Segundo Premaor *et al.*, esse fato pode aumentar em 6,6 vezes a chance de hospitalização e/ou morte em um indivíduo idoso institucionalizado<sup>17</sup>. Outro fator preocupante é que as mulheres, após a menopausa, apresentam maiores níveis séricos de IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral, que aumentam a meia-vida dos osteoclastos. O maior tempo de atividade osteoclástica eleva a reabsorção e desmineralização óssea, ocasionando um risco ainda maior de fragilidade óssea<sup>17,18</sup>.

A coleta das amostras ocorreu no outono, período de maior concentração sérica de 25(OH)D. Segundo Adams e Hewison, a maior concentração de 25(OH)D ocorre 30 a 60 dias após término do verão, coincidindo com o período de coleta, fato que pode ter ocasionado uma dosagem superior à média anual dos indivíduos estudados<sup>9</sup>.

Os indivíduos não tratados com DAC apresentaram níveis de 25(OH)D superiores a 10 ng/ml, indicando que nenhum deles apresentava deficiência severa de vitamina D. Em oito (44%) dos indivíduos tratados, os níveis séricos de 25(OH)D foram inferiores a 10 ng/ml, configurando deficiência severa, sendo na sua totalidade

do sexo feminino. É provável que o aumento da amostra possibilite resultados mais expressivos.

Yetley, avaliando a realização de exercícios físicos e níveis séricos de vitamina D, encontrou que mulheres ativas apresentavam maiores concentrações séricas de vitamina D<sup>19</sup>. Hamilton defende que a vitamina D tem papel na prevenção do declínio muscular senil e que idosos com hipovitaminose D e hiperparatireoidismo secundário apresentam menor massa muscular<sup>20</sup>. No estudo de Samaniego e Sheth, a inatividade física foi o maior preditor para a redução da densidade mineral óssea<sup>21</sup>. Como exposto, a atividade física era limitada nos dois grupos avaliados no presente estudo, restringindo a pequenas caminhadas sem regularidade.

A hipovitaminose D ocasiona redução da força muscular e aumenta a morbimortalidade do idoso por predispor a quedas e fraturas que estão associadas com hospitalização, perda de autonomia e morte<sup>8</sup>. Annweiler *et al.* encontraram que a suplementação de vitamina D previne a ocorrência de quedas e suas complicações na população idosa<sup>22</sup>.

Dentre os 34 idosos estudados, 28 concederam entrevista, e dos seis restantes não foi possível obter informações confiáveis por causa da alteração do estado de consciência. Dos 28 entrevistados, 100% deles relataram dor crônica, caracterizada por mialgia difusa em membros superiores e membros inferiores (12 do grupo tratado e 16 do grupo não tratado), sendo afastada a possibilidade de polimialgia reumática como causa. A relação entre dor crônica e hipovitaminose D é sugerida na literatura. Há uma ligação bem estabelecida relacionando hipovitaminose D e dor crônica devidas à osteomalácia; em outros tipos de dor crônica os mecanismos não são bem estabelecidos<sup>23</sup>. Fratura prévia foi relatada por 25%, sendo duas de um idoso do grupo controle e quatro entre idosos tratados. Acidente vascular encefálico prévio foi referido por 41%, sendo quatro do grupo controle e seis do grupo tratado. A correlação positiva entre hipovitaminose D e ocorrência de acidente vascular encefálico é estabelecida e citada por Wang *et al.*<sup>24</sup>.

Em trabalho recente, Holick *et al.* preconizam que pacientes em uso crônico de anticonvulsivantes recebam doses entre duas e três vezes o valor de vitamina D recomendado para a faixa etária<sup>25</sup>.

O estudo em questão teve como objetivo principal avaliar apenas a relação entre DAC e níveis séricos de vitamina D em indivíduos idosos institucionalizados, e no seu seguimento será incluído um grupo controle de idosos não institucionalizados, o que permitirá obter melhor informação em relação aos níveis de vitamina D na população idosa local.

## Conclusão

Em nossa amostra foi demonstrado que existe deficiência dos níveis séricos de 25(OH)D em pacientes idosos institucionalizados independentemente do uso de DAC. Entretanto, especialmente nas pacientes do sexo feminino tratadas com DAC, foi detectada deficiência severa. Ressalta-se a limitação em se fazer tal conclusão nesse subgrupo em virtude da pequena amostra avaliada. Os valores indicam uma tendência desses fármacos em reduzir os níveis séricos da vitamina D. De acordo com o que foi encontrado, seria importante a adoção de políticas públicas visando à reposição de vitamina D para a prevenção de hipovitaminose D em indivíduos institucionalizados, principalmente no sexo feminino, que utilizam cronicamente DAC.

Acredita-se que seria importante a realização de dosagens séricas de 25(OH)D em todo idoso, principalmente institucionalizado e que esteja em uso de DAC, visando ao eventual tratamento de reposição.

São necessários estudos com maior casuística para definir o real valor da deficiência da vitamina D na população idosa institucionalizada e, em especial, nos indivíduos tratados com DAC.

## Referências

- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
- Scott RA, Lhatoo SD, Sander JW. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? *Bull World Health Organ.* 2001;79(4):344-51.

3. Fulton JP. New guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis. National Osteoporosis Foundation. *Med Health R I*. 1999;82:110-1.
4. Sheth RD. Metabolic concerns associated with antiepileptic medications. *Neurology*. 2004;63:S24-9.
5. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(3):353-73.
6. Petty SJ, O'Brien TJ, Wark JD. Anti-epileptic medication and bone health. *Osteoporos Int*. 2007;18:129-42.
7. Menon B, Harinarayan CV. The effect of antiepileptic drug therapy on serum 25-hydroxyvitamin D and parameters of calcium and bone metabolism – a longitudinal study. *Seizure*. 2010;19(3):153-8.
8. Pack AM, Morel MJ. Epilepsy and bone health in adults. *Epilepsy Behav*. 2004;5:S24-9.
9. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):471-8.
10. March RL, Castro APW, Kurcgant D, Cremonese E, Neto JG. Transtornos mentais associados à epilepsia. *Rev Psiq Clín*. 2005;32(3):170-82.
11. Ventura ALM, Abreu PA, Freitas RCC, Sathler PC, Loureiro N, Castro HC. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Rev Psiq Clín*. 2010;37(2):66-72.
12. Freitas RM. Vigabatrina aumenta atividade da superóxido dismutase no corpo estriado de ratos após crises convulsivas induzidas pela pilocarpina. *Rev Psiq Clín*. 2010;37(1):36-40.
13. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009;19(2):73-8.
14. Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D – new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr*. 1994;60(4):619-30.
15. DeLappe E, McGreevy C, Ni Chadhain N, Grimes H, O'Brien T, Mul-kerrin E. Vitamin D insufficiency in older female community-dwelling acute hospital admissions and the response to supplementation. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60:1009-15.
16. Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R. Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71:1288-93.
17. Premaor MO, Scalco R, Da Sila MJS. Secondary hyperparathyroidism is associated with increased risk of hospitalization or death in elderly adults living in a geriatric institution. *Gerontology*. 2009;55:405-10.
18. Kenny AM, Prestwood KM. Osteoporosis. Pathogenesis, diagnosis and treatment in older adults. *Rheum Dis Clin North Am*. 2000;26(3):569-91.
19. Yetley EA. Assessing the vitamin D status of the US population. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):558S-64S.
20. Hamilton B. Vitamin D and human skeletal muscle. *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20:182-90.
21. Samaniego EA, Sheth RD. Bone consequences of epilepsy and antiepileptic medications. *Semin Pediatr Neurol*. 2007;14:196-200.
22. Annweiler C, Montero-Odasso M, Schott AM, Berrut G, Fantino B, Beauchet O. Fall prevention and vitamin D in the elderly: an overview of the key role of the non-bone effects. *J Neuroeng Rehabil*. 2010;11:7-50.
23. Straube S, Moore RA, Derry S, McQuay HJ. Vitamin D and chronic pain. *Pain*. 2009;141:10-3.
24. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117:503-11.
25. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.