



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**FLÁVIA NEVES BUELONI DIAS**

**O efeito da suplementação isolada de vitamina D  
sobre os marcadores imune-inflamatórios em  
mulheres na pós-menopausa**

**DEFESA DE DOUTORADO**

**Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahas**

**Co-Orientador: Prof. Claudio Lera Orsatti**

**Botucatu**

**2017**

**FLÁVIA NEVES BUELONI-DIAS**

**O efeito da suplementação isolada de vitamina D  
sobre os marcadores imune-inflamatórios em  
mulheres na pós-menopausa**

Defesa apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu para obtenção do Título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

**Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahas**

**Co-Orientador: Prof. Claudio Lera Orsatti**

**Botucatu**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bueloni-Dias, Flavia Neves.

O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores imune-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa / Flavia Neves Bueloni-Dias. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliana Aguiar Petri Nahas

Coorientador: Claudio Lera Orsatti

Capes: 40101150

1. Vitamina D. 2. Menopausa. 3. Pós-menopausa. 4. Ensaio Clínico Controlado Aleatório. 5. Citocinas. 6. Inflamação - Aspectos imunológicos.

Palavras-chave: Citocinas; Ensaio clínico controlado; Mediadores inflamatórios; Menopausa; Vitamina D.

## **DEDICATÓRIA**

*À Deus,*

que definitivamente conhece o tempo de todas as coisas... Mantenho fé em sua sabedoria... E entrego nossas vidas em suas mãos.

*Ao meu marido,*

Daniel Spadoto Dias, companheiro de todas as horas! Nossa melhor aventura está pra começar e você é meu maior encorajador... Obrigada pela confiança, carinho e amor!

*À minha mãe,*

Silvia Marina Neves, que me ensinou a superar as dificuldades com alegria e leveza... Você é meu exemplo de força, garra e perseverança...

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Às pacientes do ambulatório de Climatério e Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que tornaram possível a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Livre-Docente Eliana Aguiar Petri Nahás pela amizade, idealização deste trabalho e pela confiança, incentivo e orientação durante a confecção do mesmo.

Ao meu co-orientador Claudio Lera Orsatti pelo suporte técnico e auxílio na realização deste trabalho.

À minha tia, Silvânia M. P. Neves, pelo exemplo e incentivo à pesquisa.

Aos meus avós Geraldo Neves e Maria Nazarena Peres Neves, Francisco Bueloni (*in memoriam*) e Rosali Elias Bueloni, por serem a base da minha formação.

Ao meu irmão, Raphael Neves Bueloni, pelo carinho, amor e companheirismo desde nossa existência.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelos conhecimentos partilhados, essenciais à confecção deste estudo.

Às enfermeiras e funcionárias do ambulatório e da enfermaria de Ginecologia do HC-UNESP, por cuidarem com dedicação exemplar de nossas pacientes.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial a Solange Sako Cagliari, pela competência e presteza no auxílio à resolução de problemas institucionais.

Ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, em especial a José Eduardo Corrente, pela assessoria estatística e análise dos resultados do estudo.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, por serem atenciosas, prestativas e queridas.

Às bibliotecárias da Biblioteca Central do Campus de Botucatu – UNESP pela elaboração da ficha catalográfica.

*“Àqueles que involuntariamente omitimos e que nos auxiliaram de alguma forma - a certeza de que este fato não diminuí a nossa gratidão.”*

*Esta pesquisa contou com o apoio financeiro:*

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP*

*Auxílio à Pesquisa- Processo nº 2014/19382-3*



## SUMÁRIO

	Página
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumo</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>8</b>
<b>2. Objetivo</b>	<b>23</b>
<b>3. Métodos</b>	<b>24</b>
<b>4. Publicação</b>	
<b>4.1. Artigo Original</b>	
<b>“Efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre marcadores imune- inflamatórios em mulheres na pós-menopausa: ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado”</b>	<b>33</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>64</b>
<b>6. Referências</b>	<b>65</b>
<b>7. Anexos</b>	
<b>7.1. Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.</b>	<b>74</b>
<b>7.2. Anexo II- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.</b>	<b>75</b>
<b>7.3. Anexo III- <i>Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010</i></b>	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)<sub>2</sub>D - 1,25-diidroxitamina D

25(OH)D – 25-hidroxitamina D

AVC - acidente vascular cerebral

CC – circunferência da cintura

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CONSORT - *Consolidated Standards of Reporting Trials*

CT – colesterol total

DAC - doença arterial coronariana

DCV - doença cardiovascular

DRC - doença renal crônica

EAP - Escritório de Apoio à Pesquisa

EUA - Estados Unidos da América

FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu

FR - fator de risco

HDL - lipoproteína de alta densidade

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography*)

IAM - infarto agudo do miocárdio

IFN- $\gamma$  - interferon gama

I $\kappa$ B $\alpha$  - inibidor de células B alfa

IL - interleucina

IMC – índice de massa corpórea

IOF - *International Osteoporosis Foundation*

ITT - intenção de tratamento (*intention-to-treat*)

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LED - *light emitting diode*

NCEP/ATP III - *National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III*

NF-kB - fator nuclear kappa B

NHANES - *National Health and Nutrition Examination Survey*

NK – *natural killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAD - pressão arterial diastólica

PAMP – padrões moleculares associados a patógenos

PAS - pressão arterial sistólica

PCR - proteína C-reativa

PTH – paratormônio

REBEC - Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos

RI - resistência insulínica

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG – triglicerídeos

TGF- $\beta$  - fator de crescimento tumoral beta

TH - terapia hormonal

TLR - receptor Toll Like

TM - tempo de menopausa em anos

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

UNESP - Universidade Estadual Paulista

VD - vitamina D

VDBP - proteína de ligação à vitamina D

VDR – receptor de vitamina D

VDRE - elemento de resposta à vitamina D

WHI - *Women's Health Initiative*

WHO - *World Health Organization*

WOMAN - *Woman On the Move through Activity and Nutrition*

## Resumo

*Objetivo:* Avaliar o efeito da suplementação isolada de vitamina D (VD) sobre os marcadores imune-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa.

*Métodos:* Foi conduzido ensaio clínico, duplo-cego, placebo-controlado envolvendo 160 mulheres com idade entre 50-65 anos e amenorréia  $\geq 12$  meses. Foram excluídas mulheres com histórico de doença cardiovascular, diabetes insulino dependente, doença renal crônica, doença hepática, doença autoimune, disfunção da paratireóide e usuárias de doses farmacológicas de VD ( $> 100$  UI/dia). As participantes foram randomizadas em dois grupos: grupo VD, ingestão de colicalciferol 1.000 UI/dia via oral (n=80) ou grupo placebo (n=80). O tempo de intervenção foi de 10 meses, com avaliações nos momentos inicial e final. Para avaliação da resposta inflamatória foram dosadas as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Os valores séricos de 25-hidroxitamina D [25(OH)D] foram mensurados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise estatística foi por Intenção de Tratamento (ITT), empregando-se medidas repetidas por meio da Distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald.

*Resultados:* Os grupos foram similares nos parâmetros clínicos e bioquímicos iniciais. A média de idade foi de  $58,8 \pm 6,6$  anos no grupo VD e de  $59,3 \pm 6,7$  anos no grupo placebo, com tempo de menopausa de  $12,0 \pm 8,8$  anos e  $12,3 \pm 8,4$  anos, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Após 10 meses, valores médios de 25(OH)D aumentaram de  $15,0 \pm 7,5$  ng/ml para  $27,5 \pm 10,4$  ng/ml (+45,4%) no grupo VD, e diminuíram de  $16,9 \pm 6,7$  ng/ml para  $13,8 \pm 6,0$  ng/ml (-18,5%) no placebo ( $p < 0,001$ ). No grupo de mulheres

suplementadas com VD observou-se redução significativa nos valores de IL-5 (-77,4%), IL-12p70 (-41%), IL-17 $\alpha$  (-57,1%), TNF- $\alpha$  (-24,1%) e IFN- $\gamma$  (-47,0%) ( $p < 0.05$ ). Na comparação entre os grupos no momento final, foi observada diferença significativa para IL-5 ( $0,7 \pm 0,9$  pg/mL vs  $2,0 \pm 7,1$  pg/mL,  $p = 0.005$ ) e IL-6 ( $1,3 \pm 2,5$  pg/mL vs  $2,0 \pm 3,6$  pg/mL,  $p = 0.029$ ) com valores finais inferiores para o grupo VD quando comparado ao grupo placebo. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de IL-1 $\beta$  e IL-10 após o período de intervenção, em ambos os grupos ( $p > 0.05$ ). A taxa de adesão foi de 92% para o estudo, sem diferenças entre os grupos de tratamento (VD ou placebo).

*Conclusão:* Em mulheres na pós-menopausa com deficiência de vitamina D, a suplementação diária e isolada de 1.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> por 10 meses associou-se com redução nos marcadores pró-inflamatórios.

**Palavras-chave:** citocinas, ensaio clínico controlado, mediadores inflamatórios, menopausa, vitamina D.

## Abstract

*Objective:* To evaluate the effect of supplementation of vitamin D (VD) alone on the immune-inflammatory biomarkers in postmenopausal women.

*Methods:* In this double-blind, placebo-controlled trial, 160 postmenopausal women were randomized into two groups: VD group, vitamin D<sub>3</sub> supplementation 1,000 IU/day orally (n=80) or placebo group (n=80). Women with amenorrhea  $\geq$  12 months and age 50-65 years were included. Those with established cardiovascular disease, insulin dependent diabetes, primary hyperparathyroidism, renal failure (or creatinine  $>1.4$  mg/dL), liver disorders, autoimmune diseases, and previous use of pharmacological doses of VD ( $> 100$  IU/day) were excluded. The intervention time was 10 months, with assessments at the start and end of treatment. Serum levels of interleukin IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) were determined. The plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] were measured by HPLC (high-performance liquid chromatography). Statistical analysis was by intention-to-treat (ITT), using Gamma distribution in repeated measures design followed by multiple comparison Wald's test.

*Results:* The two groups were similar at baseline in terms of clinical and laboratory parameters. The mean age of the patients included was  $58.8 \pm 6.6$  years in the VD group and  $59.3 \pm 6.7$  years in the placebo group, with time since menopause of  $12.0 \pm 8.8$  years and  $12.3 \pm 8.4$  years, respectively ( $p>0.05$ ). After 10 months, there was increase in the 25(OH)D concentrations from  $15.0 \pm 7.5$  ng/ml to  $27.5 \pm 10.4$  ng/ml (+45.4%) in VD group, and decrease from  $16.9 \pm 6.7$  ng/ml to  $13.8 \pm 6.0$  ng/ml (-18.5%)

in placebo group ( $p < 0.001$ ). At the end of the intervention, in VD group, there was significant decreased in IL-5 (-77.4%), IL-12p70 (-41%), IL-17 $\alpha$  (-57.1%), TNF- $\alpha$  (-24.1%) e IFN- $\gamma$  (-47.0%) values ( $p < 0.05$ ). In the comparison between groups, after 10 months, in VD group, there were significantly greater decreases in levels of IL-5 ( $0.7 \pm 0.9$  pg/mL vs  $2.0 \pm 7.1$  pg/mL,  $p = 0.005$ ) and IL-6 ( $1.3 \pm 2.5$  pg/mL vs  $2.0 \pm 3.6$  pg/mL,  $p = 0.029$ ) compared to those randomized to placebo. There were no significant intervention effects on serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-10 in both groups ( $p > 0.05$ ). For the participants who completed the study, adherence was 92% for the study intervention (vitamin D or placebo).

*Conclusion:* In postmenopausal women with vitamin D deficiency, daily isolated supplementation of 1,000 IU of vitamin D<sub>3</sub> for 10 months was associated with a reduction in pro-inflammatory biomarkers.

**Key-words:** cytokines, controlled clinical trial, inflammation mediators, menopause, vitamin D.



## 1. Introdução

### *Menopausa e Doença Cardiovascular*

A expectativa de vida está aumentando em todo o mundo, assim como no Brasil. Dados recentes mostram média de vida para mulheres e homens de 78,8 e 71,6 anos de idade, respectivamente, em comparação com 72,9 e 65,1 anos, apenas uma década atrás<sup>(1)</sup>. Este processo de envelhecimento da população apresenta importante impacto sobre a saúde e as políticas sociais. De acordo com dados do Ministério da Saúde, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC) são as principais causas de morte em mulheres acima de 50 anos de idade. No Brasil, IAM e AVC foram responsáveis por 189.191 mortes, sendo que 87.703 destas ocorreram em mulheres.

Apesar do risco de câncer de mama ser a principal preocupação das mulheres, a incidência de morte relacionada à doença cardiovascular (DCV) é maior, com um índice de 34% comparado a 3% do câncer de mama<sup>(2)</sup>. Em mulheres, o envelhecimento e a menopausa podem ser considerados fatores de risco (FRs) cardiovascular pela privação estrogênica decorrente da falência ovariana<sup>(3,4)</sup>. Além disso, estudos têm mostrado que o diabetes, o tabagismo, a hipertensão, a obesidade e a dislipidemia estão associados com o aumento do risco da doença arterial coronariana (DAC)<sup>(5-15)</sup>.

O conceito de FRs cardiovascular constitui-se de importância no desenvolvimento de estratégias para prevenção da DAC. A estimativa do risco de doença aterosclerótica resulta da somatória de cada um dos FRs mais a potenciação causada por sinergismos entre alguns desses fatores<sup>(8)</sup>. A ocorrência de um evento coronariano agudo pode ser a primeira manifestação da DAC em pelo menos metade

das pessoas. Em mulheres, a DAC é frequentemente fatal, sendo que mais da metade não apresentam sintomas prévios<sup>(3)</sup>. A identificação dos indivíduos assintomáticos, que estão mais predispostos, é crucial na prevenção efetiva com a correta definição de metas terapêuticas.

Na atualidade, grande parte das mulheres das sociedades urbanas apresenta fatores de risco para DCV. Esta “epidemia” deve-se ao aumento na proporção de mulheres acima dos 50 anos, na obesidade abdominal, no sedentarismo e no padrão alimentar moderno, caracterizado pelo elevado consumo de alimentos de maior densidade energética com baixos índices de alimentação saudável<sup>(16-18)</sup>. Em 2010, Tardivo *et al.*, avaliando a qualidade da dieta em 273 mulheres na pós-menopausa atendidas no Ambulatório de Climatério da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), demonstraram que apenas 3% destas apresentavam dieta de boa qualidade, 49% necessitavam de melhoras no padrão alimentar e 48% apresentavam dieta de pobre qualidade, sendo que 75,7% estavam sobrepeso ou obesas e 73,2% com deposição abdominal aumentada de gordura<sup>(19)</sup>.

A prevalência de sobrepeso e obesidade em mulheres na pós-menopausa é superior a 80% em países desenvolvidos<sup>(7)</sup>. No Brasil, em mulheres a partir da faixa etária de 35 a 44 anos a prevalência do excesso de peso (63,6%) ultrapassa a dos homens (62,3%), chegando a mais de 70,0% na faixa de 55 a 64 anos, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF<sup>(1)</sup>. O excesso de peso e o acúmulo de gordura abdominal estão associados ao maior risco de DAC<sup>(9)</sup>. O *Nurses’ Health Study* demonstrou que elevada medida da circunferência da cintura esteve significativamente associada com aumento na mortalidade por DAC em mulheres com peso normal<sup>(20)</sup>.

### ***Marcadores inflamatórios da doença cardiovascular***

Apesar de décadas de estudos epidemiológicos e experimentais, o conhecimento dos FRs é capaz de rastrear a DAC em apenas um terço dos casos. A detecção de marcadores precoces possibilitaria o reconhecimento da doença aterosclerótica subclínica com a intervenção precoce sobre os FRs modificáveis<sup>(21)</sup>. Como fator determinante no desenvolvimento da DAC está a presença de aterosclerose. Esta é definida como processo crônico, progressivo e sistêmico, consequente à resposta inflamatória e fibroproliferativa causada por uma agressão a superfície endotelial das artérias<sup>(22)</sup>. Essas alterações ocorrem lentamente e processam-se por meio de disfunção endotelial, inflamação, proliferação celular e alteração da matriz celular<sup>(23)</sup>. A aterosclerose é, portanto, doença generalizada da parede arterial, caracterizada por remodelamento e que pode permanecer silenciosa por muito tempo, ou manifestar-se como evento vascular agudo, tornando-se clinicamente aparente. Por ser um processo degenerativo, tem incidência aumentada com a idade, sendo difícil reconhecê-la em seu estágio inicial<sup>(24)</sup>.

Na DAC, convencionais fatores de risco – dislipidemia, hipertensão, diabetes, obesidade – permanecem importantes, mas diferenças individuais no perfil imunoinflamatório podem modular a severidade do processo<sup>(8,25,26)</sup>. A inflamação desempenha papel fundamental no desencadeamento, progressão e instalação da doença aterosclerótica<sup>(25)</sup>. Os principais mecanismos na instalação e evolução da resposta inflamatória sistêmica são compostos pela cascata do sistema complemento, pela ativação das células imunológicas, pela liberação de citocinas e pela disfunção endotelial<sup>(25)</sup>. Ambos componentes do sistema imunológico, celular e humoral, têm sido implicados na aterogênese. A interação entre a parede arterial e as células

sanguíneas circulantes, como os monócitos e os linfócitos T mediados pelas moléculas de adesão celular, passo importante no processo inflamatório<sup>(27)</sup>.

A aterosclerose pode ser desencadeada por injúria ao endotélio arterial atribuído a fatores como hipertensão, hiperinsulinemia, dislipidemia, e principalmente, pela deposição de moléculas oxidadas de LDL<sup>(22)</sup>. Após a agressão inicial, os monócitos e as células T são recrutados do sangue periférico para a parede arterial, e penetram na íntima dos vasos onde fagocitam o LDL oxidado, promovendo dessa maneira, a liberação de citocinas inflamatórias<sup>(25)</sup>. A identificação de macrófagos, células T, e citocinas pro-inflamatórias na lesão aterosclerótica suporta a hipótese que a resposta imunológica inata participa do mecanismo da aterogênese<sup>(28,29)</sup>. O macrófago é a principal fonte de citocinas na placa ateromatosa, incluindo as citocinas pro-inflamatórias, como as interleucinas (IL) 1, 6, 12, 15, 18 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); assim como as citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, IL-32 e fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), entretanto esses mecanismos não estão esclarecidos<sup>(29)</sup>.

A IL-1 e o TNF- $\alpha$  têm o papel de perpetuar a resposta inflamatória e modificar a superfície endotelial anticoagulante para um estado pró-trombótico. A IL-6 por sua vez estimula a produção hepática da proteína C-reativa (PCR), sendo esta última reconhecida proteína da fase aguda de processos inflamatórios<sup>(30)</sup>. A elevação sérica da PCR é considerada fator de risco independente para aterosclerose, particularmente em mulheres na pós-menopausa, além de ser fator de predição para IAM, AVC, doença arterial periférica e morte súbita<sup>(31-33)</sup>.

O estudo *Woman On the Move through Activity and Nutrition* (WOMAN) tratou de ensaio clínico randomizado que investigou a variação laboratorial de um painel de

citocinas e suas relações com fatores de risco para a DAC em 290 mulheres norte-americanas na pós-menopausa com excesso de peso. A maioria das citocinas foi detectável nas amostras, mas com grande variação biológica individual. Os tradicionais FRs para DAC, como idade, dislipidemia, circunferência da cintura e resistência insulínica (RI) estiveram associados com valores aumentados de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . A perda de peso foi associada à diminuição dos valores de IL-1, IL-6 e PCR. Para os autores, existe grande e inexplorada variabilidade nos valores de citocinas, provavelmente devido às associações genético-ambientais<sup>(33)</sup>.

Enquanto a deposição lipídica ateromatosa e o acúmulo de células espumosas (macrófagos ricos em LDL-oxidado) na íntima das artérias apresentem-se como a principal marca morfológica da aterosclerose, as alterações subliminares na parede arterial, estimulando o influxo de células inflamatórias e a produção local de citocinas e outros mediadores inflamatórios, são atualmente reconhecidos como fatores fundamentais da aterogênese<sup>(34,35)</sup>. Como existem evidências crescentes que as moléculas inflamatórias circulantes são marcadores biológicos para aterosclerose progressiva, a detecção e o monitoramento da inflamação vascular têm papel de destaque no diagnóstico precoce desta entidade<sup>(35)</sup>.

### ***Vitamina D***

A vitamina D (VD) é uma vitamina lipossolúvel, essencial para manutenção do esqueleto e para absorção de cálcio. Se proveniente da síntese em animais, é denominada de colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>). É adquirida na dieta pela ingestão de alimentos ricos em óleo de peixe, fígado e ovos. Entretanto, a maior fonte decorre da ativação na pele (derme e epiderme), a partir da exposição aos raios UVB do composto

7-deidrocolesterol que se transforma em vitamina D<sub>3</sub>, sendo armazenada e liberada pelas células de gordura<sup>(36)</sup>. Essa forma, cuja ativação não é metabólica, necessita das funções hepáticas e renais preservadas. É transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma hidroxilação no carbono 25, pelo citocromo P450 R21, tornando-se 25 hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol, forma inativa da VD. Para se tornar ativa, a 25(OH)D necessita ainda de uma hidroxilação na posição 1, pelo citocromo P450 27B1, nos túbulos proximais dos rins, sob a ação da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase, transformando-se em 1,25-diidroxivitamina D [1,25(OH)2D] ou calcitriol, que é responsável pelos efeitos biológicos<sup>(37-39)</sup>. A 1,25(OH)2D, produzida no rim, é secretada na circulação sanguínea, ligada à proteína de ligação à vitamina D (VDBP) e, em seguida, transportada para órgãos-alvo, onde induz respostas genômicas e não-genômicas através da interação com o receptor de vitamina D (VDR). Muitas células e tecidos expressam o citocromo P450 27B1 assim como VDR, o que implica que a conversão local de 25(OH)D para 1,25(OH)2D, a forma ativa, possa ocorrer em vários tecidos<sup>(39)</sup>.

O nome 'vitamina D' é um equívoco histórico. A forma ativa, o calcitriol, pode ser considerada um hormônio, pois é sintetizado em humanos, submetido à regulação autócrina e interage com receptor nuclear. A VD tem importante e reconhecido papel na mineralização óssea, na concentração de cálcio/fósforo e na regulação da paratireóide<sup>(36)</sup>. A forma ativa da VD regula a transcrição de um número expressivo de genes, os quais codificam proteínas transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea, estando envolvida em processos biológicos, tais como o metabolismo ósseo, a modulação da resposta imune e a regulação da proliferação e da diferenciação celular<sup>(40)</sup>. A VD também modula a transcrição de células durante o ciclo proteico,

diminuindo a proliferação celular e aumentando sua diferenciação (precursores de osteoclastos, enterócitos e queratinócitos). Essa propriedade pode explicar a ação da VD na reabsorção óssea, no transporte intestinal de cálcio e na pele<sup>(36,39,41)</sup>.

Atualmente, a dosagem de 25(OH)D é adequada para se avaliar e monitorizar o status nutricional de VD no organismo humano, pois os valores plasmáticos são os principais indicadores das reservas corporais<sup>(38,39)</sup>. Em diretriz clínica da *Task Force* Norte-Americana, a insuficiência de VD foi definida como valores entre 21–29 ng/ml (52,5–72,5 nmol/l) e a deficiência de VD como valores inferiores a 20 ng/ml (50 nmol/l)<sup>(39)</sup>. Número crescente de estudos sugere que são necessários valores acima de 30 ng/ml para garantir melhor disponibilidade de VD<sup>(38,42,43)</sup>.

Caracterizam-se como hipovitaminose D concentrações plasmáticas de 25(OH)D abaixo do limiar de 30 ng/ml, ou seja, do limiar considerado suficiente para manutenção da secreção normal de paratormônio (PTH) pelas paratireóides<sup>(44)</sup>. Na insuficiência de VD evidencia-se elevação do PTH circulante, traduzindo um hiperparatireoidismo secundário, com redução da fração ativa de 1,25(OH)2D, o que aumenta a reabsorção óssea<sup>(38,45)</sup>. A suplementação diária de VD é capaz de reverter esse quadro de hiperparatireoidismo e impedir a perda óssea em mulheres com idade superior a 50 anos<sup>(46)</sup>. A deficiência da VD pode ser confirmada pela aferição dos níveis séricos de 25(OH)D. Por outro lado, as concentrações de 1,25(OH)2D estão usualmente dentro dos valores normais de referência ou mesmo aumentada em pacientes deficientes / insuficientes, razão pela qual não são utilizadas como referência na prática clínica diária<sup>(38,45)</sup>.

Reconhece-se que a deficiência de VD é condição médica frequente em todo mundo<sup>(47)</sup>. Mesmo moradores de regiões próximas à linha do equador, com alta

incidência de sol, apresentam valores inadequados de VD. Estudo epidemiológico em 18 países de latitudes variadas, avaliando a prevalência de concentrações plasmáticas de 25(OH)D em mulheres na pós-menopausa, observou valores baixos em quase todo o planeta, sendo que em média 64% das participantes apresentavam valores inadequados<sup>(48)</sup>. Imaginava-se que o Brasil, por ser um país tropical e ensolarado, não apresentasse população exposta à deficiência de VD. No entanto, pesquisas brasileiras têm revelado números alarmantes, sendo que o estado de hipovitaminose D é comumente encontrado em mulheres na pós-menopausa<sup>(49-51)</sup>. Entre as prováveis causas descrevem-se: baixa exposição solar e capacidade reduzida de produção de VD; função renal diminuída; menor absorção de VD pelo trato gastrintestinal; e uso de múltiplas drogas que podem interferir com a absorção e a metabolização da VD. Outros fatores também influenciam a capacidade de produção de VD pela pele: uso de filtro solar, cor da pele, roupa e idade<sup>(52)</sup>.

Sabendo-se que as fontes dietéticas de VD são inadequadas, é interessante que mulheres na pós-menopausa recebam suplementação para garantir a saúde óssea<sup>(45)</sup>. Em 2010, a *International Osteoporosis Foundation* (IOF) publicou posicionamento sobre a VD, com base em dados observacionais, recomendando manutenção de valores séricos de 25(OH)D de 30 ng/ml para pessoas idosas e afirmando que o consumo de VD de até 2.000 UI/dia pode ser necessário para atingir valor recomendável em alguns pacientes<sup>(42)</sup>. Em contraste, o *Institute of Medicine* baseado em evidências, a partir de estudos observacionais e randomizados, sugere que nível sérico de 20 ng/ml protegeria 97,5% da população contra efeitos adversos na massa óssea, tais como fraturas e quedas<sup>(53)</sup>.



Contudo permanece incerta a dose apropriada de suplementação para atingir os valores desejados, embora se recomende dose de no mínimo 600 UI/dia para mulheres na pós-menopausa e doses superiores a 800 UI/dia para aquelas com idade superior a 70 anos<sup>(53)</sup>. A suplementação diária de 1.000 UI de VD (dentro de um período mínimo de seis meses) aumenta os valores séricos em torno de 10 ng/ml, sendo que esta dose é atualmente sugerida para pacientes com idade inferior a 65 anos. Já as mulheres com idade superior, deveriam receber dose diária de 2.000 UI<sup>(54)</sup>. Em geral, para cada 100 UI de VD suplementada há aumento de 1 ng/ml no nível sérico de 25(OH)D e quanto menor os valores séricos basais, melhor a resposta à suplementação. A suplementação destina-se a elevar os valores séricos de 25(OH)D acima de 30ng/ml de modo a aproveitar ao máximo os benefícios da VD<sup>(55)</sup>. A relevante função desempenhada pela VD sobre a massa óssea está bem definida, efeitos extra-ósseos da VD sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatórios estão sob investigação atual.

### ***Vitamina D e DCV***

A deficiência de vitamina D e o aumento na prevalência da obesidade são considerados importantes questões de saúde pública<sup>(56)</sup>. Evidências recentes sugerem o envolvimento da VD em diversas doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, hipertensão, diabetes e DCV<sup>(57-60)</sup>. Vários estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos obesos têm menores concentrações séricas de 25(OH)D, com associação inversa entre a concentração de VD e o índice de massa corpórea (IMC) e a circunferência da cintura<sup>(61-64)</sup>. Os mecanismos envolvidos não estão

completamente descritos, mas é possível que o sequestro de metabólitos da VD no tecido adiposo diminua sua biodisponibilidade<sup>(65,66)</sup>.

A expressão tanto do receptor da vitamina D (VDR) como do gene da 25-hidroxivitamina D 1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1) tem sido demonstrada em adipócitos humanos. Há evidências de que a VD afete a gordura corporal pela inibição dos fatores de transcrição adipogênicos e pelo acúmulo de lipídios durante a diferenciação dos adipócitos. Os metabólitos de VD também influenciam a produção de citocinas e a resposta inflamatória no tecido adiposo<sup>(56)</sup>. Sendo assim, a deficiência de VD pode comprometer o funcionamento metabólico normal do tecido adiposo, com impacto significativo na manutenção da saúde metabólica como um todo, diante da importância do tecido adiposo no balanço de energia, no metabolismo de lipídios e na inflamação<sup>(60)</sup>. Uma meta-análise de 28 estudos demonstrou que elevados níveis séricos de 25(OH)D estavam associados à redução de 55% na diabetes e risco diminuído de 33% de DCV<sup>(67)</sup>.

No sistema cardiovascular foram encontrados receptores de VD no músculo liso vascular, no endotélio, e nos cardiomiócitos<sup>(68)</sup>. Evidências sugerem que a deficiência de VD é potencial fator de risco para DCV<sup>(69-72)</sup>. No estudo Framingham Offspring foram avaliados prospectivamente 1.739 participantes para determinar se menores concentrações de VD poderiam prever o desenvolvimento de DCV. Valores de VD inferiores a 15 ng/mL foram consistentemente associados com aumento do risco de eventos cardiovasculares, mantendo significância após ajustes para conhecidos fatores de risco cardiovascular, incluindo pressão arterial, LDL, função renal e terapia medicamentosa. A taxa de desenvolvimento de um evento cardiovascular foi duas

vezes maior em pessoas com deficiência de VD quando comparadas aquelas com valores adequados de VD<sup>(73)</sup>.

A VD pode exercer efeito protetor sobre as paredes dos vasos por inibição de macrófagos na formação de células espumosas e pelo seu efeito anti-inflamatório<sup>(68)</sup>. Entretanto, uma clara associação entre o estado de VD e a ocorrência de infarto agudo do miocárdio e de doença arterial coronariana não foi firmemente estabelecida<sup>(73)</sup>. Apesar da deficiência de VD poder associar-se com elevado risco cardiometabólico, os resultados foram inconsistentes como demonstrado em três metanálises<sup>(74-76)</sup>.

### ***Vitamina D e Marcadores inflamatórios***

Acreditava-se que o papel biológico da VD fosse limitado à homeostase do cálcio e saúde óssea. No entanto, há considerável evidência sugerindo que a VD desempenhe vários papéis e possa afetar múltiplos órgãos e processos metabólicos<sup>(39,77)</sup>. Uma redução da sua biodisponibilidade é comumente detectada em indivíduos com sobrepeso e obesos, possivelmente devido ao seu maior sequestro no tecido adiposo, uma vez que a VD é lipossolúvel<sup>(62,65)</sup>. Dessa forma, a deficiência de VD tem sido observada em várias condições relacionadas com a obesidade, tais como resistência insulínica, diabetes e doença cardiovascular<sup>(58,77,78)</sup>.

Dados recentes sugerem que a obesidade esteja positivamente correlacionada com os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ ; assim como com a diminuição dos níveis de adiponectina, que apresenta importante papel na inibição do processo inflamatório e no aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10<sup>(77)</sup>. O volume celular de adipócitos subcutâneos e viscerais mostrou correlação positiva com os níveis séricos de TNF- $\alpha$  em adultos com sobrepeso / obesidade, comparados aos controles<sup>(79)</sup>. A

hipertrofia dos adipócitos parece resultar em um aumento da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6, etc.), aumentando assim seus níveis circulantes, via sistema porta, promovendo a inflamação dos tecidos<sup>(56,77,79)</sup>. O acúmulo de gordura visceral também tem sido fortemente associado com o aumento da PCR, bem como à deficiência de VD<sup>(77,80)</sup>. Segundo o National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), níveis de VD inferiores a 21 ng/ml (< 52,42 nmol/L) apresentaram uma associação inversa com os níveis de PCR<sup>(77,81)</sup>. Entretanto, níveis aumentados de IL-6 são muitas vezes correlacionados com aumento dos níveis de PCR, indicando que a IL-6 possa ser o principal fator estimulante para a produção hepática de PCR<sup>(82)</sup>.

Os marcadores de estresse oxidativo e de inflamação parecem também estar elevados em pessoas com baixa concentração sérica de 25(OH)D, mas os resultados ainda são controversos<sup>(77,83)</sup>. A VD parece interagir com o sistema imunológico através da supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias e por meio da regulação da atividade e diferenciação de células imunitárias como linfócitos, macrófagos, células dendríticas e natural killer (NK)<sup>(77,84-86)</sup>. A descoberta de receptores nucleares de vitamina D (VDR) em quase todas as células do sistema imunológico, permitiu que vários mecanismos fossem propostos para explicar a participação da VD no sistema imune, tais como: regulação da diferenciação e ativação de linfócitos CD4+; aumento da função das células T reguladoras (Treg); inibição *in vitro* da diferenciação de monócitos em células dendríticas; diminuição da produção das citocinas interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e TNF- $\alpha$ , a partir de células Th1 e estímulo da função de células Th2; inibição da produção de IL-17 a partir de células Th17; e estimulação de células T *in vivo e in vitro*<sup>(87-92)</sup>. Além disso, a enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase, responsável pelo passo final

de hidroxilação na síntese de 1,25(OH)<sub>2</sub>D, é expressa por macrófagos ativados, tornando-os capazes de sintetizar e secretar a 1,25(OH)<sub>2</sub>D de um modo regulado. Embora a enzima encontrada nos macrófagos seja idêntica à forma renal conhecida, sua expressão é regulada por vias distintas. Enquanto a 1 $\alpha$ -hidroxilase renal é principalmente regulada por mediadores de cálcio e homeostase óssea (hormônio paratireóide), sua versão nos macrófagos está predominantemente sob o controle de sinais imunológicos mediados pelo IFN- $\gamma$ <sup>(82)</sup>.

Em uma cascata inflamatória normal via fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), a indução de ativação dos receptores Toll Like (TLRs) por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Essa ligação PAMPs-TLRs ativa a via NF- $\kappa$ B, induzindo um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias<sup>(93)</sup>. A presença da VD, por sua vez, está relacionada com uma imunossupressão de citocinas inflamatórias<sup>(91)</sup>. A VD regula positivamente a via do fator nuclear amplificador do gene polipeptídico leve kappa no inibidor de células B alfa (I $\kappa$ B $\alpha$ ) em conjunto com VDR, formando o complexo VD/VDR. Este complexo liga-se ao elemento de resposta à vitamina D (VDRE), que é uma sequência de DNA que se encontra na região promotora de genes regulados pela vitamina D, aumentando a expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ . Com aumento da expressão de I $\kappa$ B $\alpha$  leva-se a diminuição da expressão da via NF- $\kappa$ B por atribuição e ligação de I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, conseqüentemente, diminuindo expressão de citocinas pró-inflamatórias<sup>(94)</sup>.

Poucas pesquisas com resultados controversos foram realizadas para avaliar a interação entre VD e marcadores inflamatórios, sendo que o efeito de sua suplementação ainda é incerto<sup>(95)</sup>. Karim *et al.* avaliaram concentrações plasmáticas de diversas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17, IL-8) em 39 pacientes com insuficiência de

VD submetidos à suplementação em dose única com 300.000 UI. Valores plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente após 3 meses de tratamento. Os autores concluem que existe associação entre VD e citocinas e que as citocinas podem ser influenciadas pelo nível de VD<sup>(96)</sup>. Chandler *et al.* realizaram estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado com a suplementação de VD, via oral (placebo, 1.000, 2.000, ou 4.000 UI/dia) por curto período de tratamento (3 meses) em 292 afro-americanos, ambos os sexos, idade 51 anos em média, para avaliar o impacto da VD sobre marcadores inflamatórios. Os autores relataram que não foi possível encontrar influência da suplementação de VD, no curto prazo, sobre os marcadores inflamatórios (PCR, IL-6, IL-10 e TNF) e sugerem que estudos futuros com maior duração da suplementação possam demonstrar a influência de VD sobre a PCR e outras citocinas inflamatórias<sup>(95)</sup>.

Entretanto, Chitalia *et al.* observaram uma diminuição significativa do biomarcador de disfunção endotelial E-selectina, após a administração de 300.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> durante oito semanas em 26 pacientes não diabéticos com doença renal crônica (DRC)<sup>(97)</sup>. Schleithoff *et al.* avaliando a suplementação de 2.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> ao longo de 9 meses em 123 pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, relataram níveis mais baixos de TNF- $\alpha$  e um aumento significativo nas concentrações plasmáticas da citocina anti-inflamatória IL-10<sup>(98)</sup>. Apesar da suplementação com VD mostrar diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  em vários ensaios clínicos, a redução nem sempre foi significativa quando comparada aos controles. Incoerências semelhantes são observadas em diversos estudos que avaliam o papel da 25-hidroxivitamina D nas citocinas inflamatórias<sup>(77)</sup>.

Em uma revisão sistemática com objetivo de avaliar o efeito da suplementação de VD na função endotelial e inflamação em adultos, foram reunidos 29 ensaios clínicos randomizados. Apenas 8 estudos relataram melhora significativa nos biomarcadores endoteliais/inflamatórios (citocinas Th1, Th2, marcadores endoteliais e bioquímicos). No entanto, em 2 dos 8 estudos a melhora foi temporária, sem persistência dos efeitos após a intervenção. Os 21 estudos restantes não mostraram alterações significativas nos biomarcadores. Os autores concluíram que as evidências destes estudos não demonstraram melhorias na circulação dos biomarcadores inflamatórios e das funções endoteliais<sup>(99)</sup>.

Outra revisão sistemática avaliou a associação entre suplementação de VD, os biomarcadores inflamatórios (citocinas Th1 e Th2, e adiponectinas) e o perfil glicêmico em adultos com sobrepeso e/ou obesos. Foram incluídos onze ensaios clínicos randomizados. A maioria dos resultados não foi significativa e incluía vieses consideráveis, com heterogeneidade no desenho dos estudos, nas características dos participantes e nos resultados observados<sup>(77)</sup>. Apenas dois estudos demonstraram alterações nos biomarcadores inflamatórios, porém não estatisticamente significativas e outros dois ensaios encontraram diferenças significativas na glicemia de jejum e resistência insulínica após suplementação de VD<sup>(77,100,101)</sup>. Os valores séricos basais parecem influenciar o efeito da suplementação da VD nos resultados. Os autores concluem que não está estabelecido o benefício da suplementação de VD sobre os biomarcadores inflamatórios entre adultos com sobrepeso ou obesidade. Assim, existe a necessidade de estudos de maior qualidade nesta área para compreender de forma mais conclusiva o papel da suplementação de VD nas vias inflamatórias<sup>(77,91)</sup>.

## **2. Objetivo**

Avaliar o efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores imune-inflamatórios do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.



### 3. Métodos

#### ***Desenho do estudo e Seleção da Amostra***

Trata-se de ensaio clínico, duplo-cego, placebo-controlado, randomizado, para avaliar o efeito isolado da suplementação de VD (1.000 UI/dia). O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Ambulatório de Climatério & Menopausa, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP. O cálculo do tamanho amostral foi embasado no estudo de Arnson *et al.* que demonstraram redução de 31% nos valores de IL-6 pós-suplementação de VD (pré  $6,5 \pm 7,9$  pg/ml e pós  $4,4 \pm 3,24$  pg/ml)<sup>(82)</sup>. Considerando a diferença entre os valores, para um coeficiente de 95% e margem de erro de 5%, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 60 mulheres por grupo. Considerando perda de seguimento ao redor de 20%, o tamanho amostral adotado foi de 80 mulheres por grupo. Foram incluídas mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade  $\geq 45$  anos que aceitaram participar do estudo. Os critérios de não-inclusão foram: presença de doença arterial coronariana (DAC) manifesta atual ou prévia; doença arterial cerebrovascular; doença aneurismática; doença arterial periférica; diabetes insulino dependente; doença renal crônica ou creatinina  $> 1,4$  mg/dl; doença hepática; doenças autoimunes; disfunção da paratireóide; obesidade grau III; usuárias de doses farmacológicas de VD ( $>100$  UI/dia); etilista ou drogaditas. Todas as voluntárias participantes do estudo foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, procedimentos e confidencialidade dos dados, sem quaisquer prejuízos para as mesmas. E foram solicitadas a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), de acordo com exigência da resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de

Ética e Pesquisa da FMB-UNESP em 30 de novembro de 2014 sob número do parecer 895.001 (Anexo II). O estudo foi registrado e aprovado pelo Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) sob o número de registro RBR-222wfk. Este ensaio clínico foi realizado de acordo com o *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) 2010 (Anexo III)<sup>(102)</sup>.

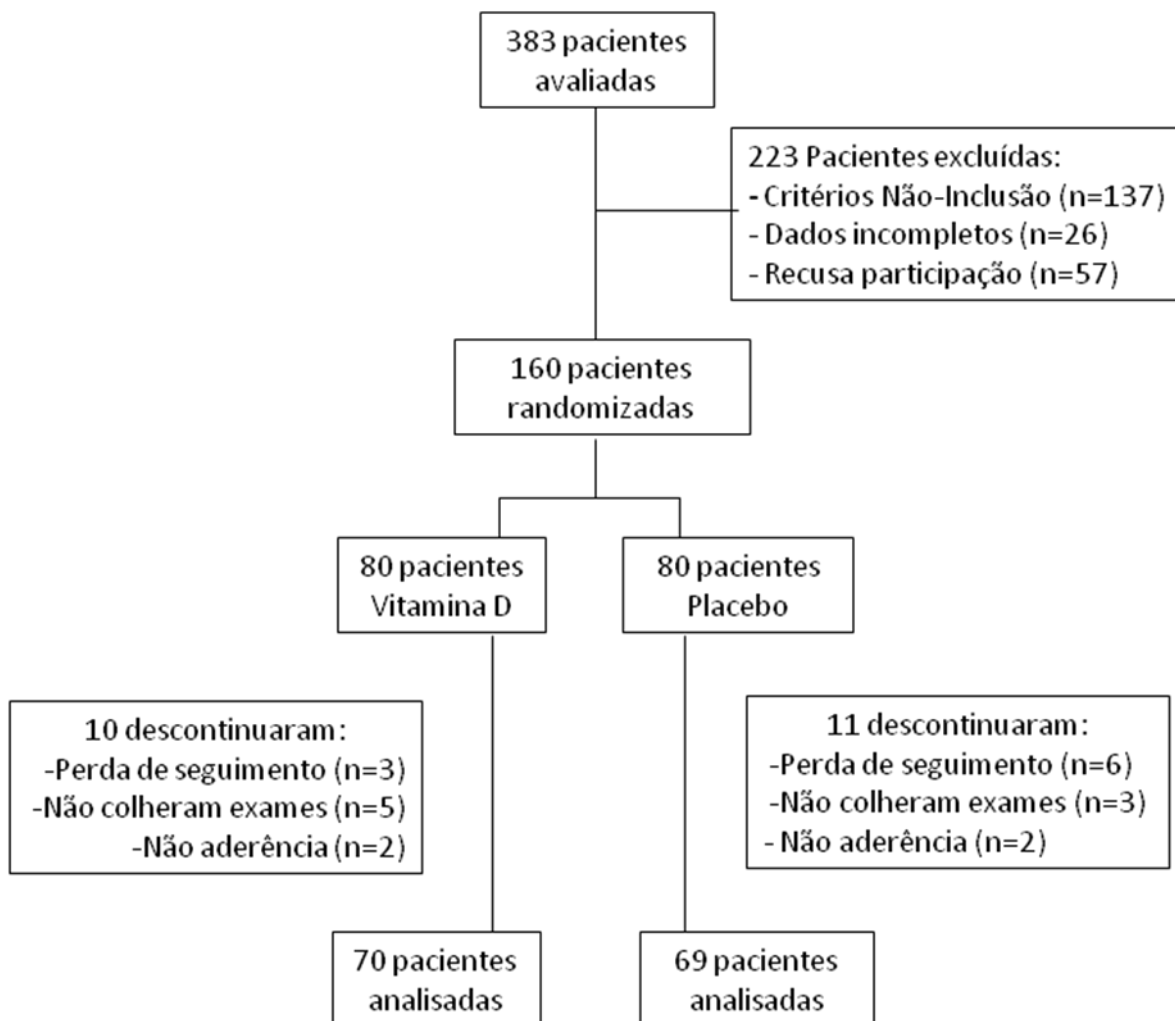
### ***Avaliação Dados Clínicos***

Inicialmente, no dia da consulta foram coletados por meio de entrevista os seguintes dados clínicos: idade, idade da menopausa, tempo de menopausa, paridade, tabagismo atual, uso de terapia hormonal, histórico de doenças crônicas (hipertensão, diabetes, doença cardiovascular), uso de medicamentos, atividade física e pressão arterial. A medida da pressão arterial foi aferida no braço direito com o antebraço apoiado no nível do precórdio, palma da mão para cima, com uso de esfigmomanômetro aneróide padrão, com a paciente na posição sentada. Foram definidas como tabagistas as pacientes com o hábito de fumar diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram consideradas ativas as mulheres que praticavam exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada, pelo menos 30 minutos, cinco vezes na semana (150/min/sem) ou exercícios de resistência três dias por semana (CDC). Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura, índice de massa corpórea ( $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ ) e circunferência da cintura. Para mensuração do peso, foi utilizada balança antropométrica eletrônica microdigital tipo plataforma (Filizola<sup>®</sup>, Brasil), com capacidade de 150 kg com precisão 0,1 Kg e 0,5 cm (peso e estatura), com a paciente descalça e com o mínimo de roupa. Para medir a

estatura, a paciente permaneceu com os braços ao longo do corpo ereto, mantendo os olhos fixos em plano horizontal paralelo ao chão, medida por haste vertical com graduação de 0,5 cm, acoplada à balança. Foram empregados os critérios da *World Health Organization* de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: menor que 18,5 kg/m<sup>2</sup> como baixo peso, de 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup> normal, de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> sobrepeso, de 30 a 34,9 kg/m<sup>2</sup> obesidade grau I, de 35 a 39,9 kg/m<sup>2</sup> obesidade grau II e maior ou igual a 40 kg/m<sup>2</sup> obesidade grau III. Para a medida da cintura foi empregada a menor circunferência entre a última costela e a crista íliaca ântero-superior, sendo a leitura feita no momento da expiração. Foi considerada aumentada acima de 88 cm<sup>(5)</sup>.

#### ***Protocolo de suplementação***

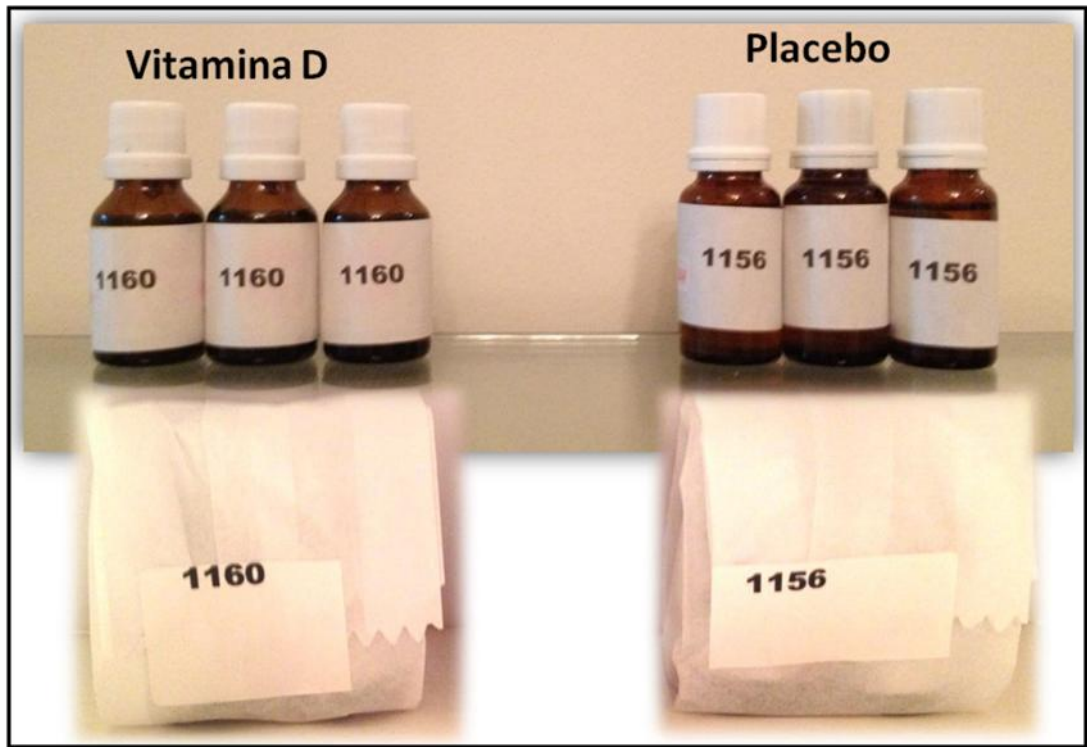
Após a seleção inicial, todas as participantes receberam uma numeração (1-160) de acordo com a ordem de inclusão no estudo. Um processo de randomização computadorizado centralizado foi conduzido empregando software específico para o protocolo do estudo (*SAS for Windows, v. 9.2 using Procedure Plan*). As pacientes foram randomizadas, em sequência de numeração pré-estabelecida, em dois grupos: VD, com suplementação de vitamina D<sub>3</sub> (n=80) e PL, usuárias de placebo (n=80) (Figura 1). Os investigadores e as pacientes não tinham conhecimento prévio dos referidos grupos e das diferentes numerações, apenas o farmacêutico responsável pela manipulação do placebo. Assim, 80 pacientes receberam 1.000 UI de VD (colecalférol), cinco gotas via oral (cada gota contém 200 UI, frasco de 20 ml), durante 10 meses. As outras 80 pacientes receberam placebo (composição de água e óleo mineral com essência de limão, em 20 ml), com mesma característica e sabor, cinco gotas, via oral.



**Figura 1-** Fluxograma das pacientes incluídas no estudo

Os frascos foram idênticos, embalados e numerados em código pelo farmacêutico para não identificação do grupo pelos participantes do estudo (Figura 2). Para o controle da suplementação, as pacientes foram orientadas a trazer os frascos a cada retorno para contabilizar a medicação usada e determinar a aderência. O tempo

de seguimento foi de 10 meses com avaliações clínicas em dois momentos, inicial e final.



**Figura 2** – A semelhança dos suplementos e a maneira como foi entregue para as pacientes.

### ***Avaliação Laboratorial***

Amostras sanguíneas foram colhidas nos momentos basal e 10 meses, pela manhã, após 12 horas de jejum. Por meio de punção venosa, em sistema fechado a vácuo (*Vacutainer®*, England), foram obtidos 30 ml de sangue, diretamente em dois tubos secos (10 ml) com gel separador de soro e um tubo heparinizado com EDTA (10 ml) para obtenção de plasma. Ao final de cada colheita, foram centrifugadas por 10 min (3.000 rpm). Um tubo com o soro obtido seguiu para dosagens bioquímicas

imediatas e outro tubo com soro e um tubo com plasma foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a dosagem dos marcadores inflamatórios (soro) e dosagem da VD (plasma).

Foi realizada avaliação do perfil lipídico pela mensuração de colesterol total (CT), HDL, LDL e triglicerídeos (TG), além de dosagens de glicose e creatinina. Todas as avaliações bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. As mensurações de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e glicose foram processadas pelo analisador bioquímico automático (*Technicon<sup>®</sup>, RA-XT System; Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA*) e quantificadas pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se reagentes comerciais específicos (*Sera-Pak<sup>®</sup>, Bayer Corporation, Diagnostics Division, NY, USA*). O método é linear até 800 mg/dL para TG e 900 mg/dL para CT. O LDL foi calculado pela fórmula de Friedewald *et al.*, que apresenta limitação de uso, quando os valores de TG são superiores a 400 mg/dL<sup>(103)</sup>. O LDL foi obtido, subtraindo-se o valor do CT, da soma do HDL e do TG dividido por cinco. Os valores considerados ótimos foram: CT < 200 mg/dL, HDL > 50mg/dL, LDL < 100 mg/dL, TG < 150 mg/dL, glicose < 100mg/dL<sup>(5)</sup>. Para dosagem de creatinina foi empregado o método da química seca com equipamento de automatização, modelo Vitros 950<sup>®</sup> (Johnson-Johnson, Rochester, NY, USA). Os valores da concentração sérica da creatinina foram considerados dentro do limite da normalidade de 0,7 a 1,2 mg/dL.

### **Análise de Vitamina D**

Os valores de 25(OH)D foram dosados no momento basal e aos 10 meses (para avaliar a biodisponibilidade e aderência ao tratamento). A 25(OH)D foi dosada por

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), pelo sistema HPLC Isocrático com injetor manual Rheodyne®, modelo 7725i, com loop de 20 µL e detector de UV-VIS Waters, modelo M-484, com coluna RP 18 com 4.0 mm x 15 cm e partículas de 5 micros (Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, MO, USA). O limite de detecção foi de 2,5 ng/ml e o coeficiente de variação < 7,0%. Foram considerados suficientes valores de 25(OH)D ≥ 30 ng/mL, insuficiência de 21 a 29 ng/mL e deficiência < 20 ng/mL<sup>(38,55)</sup>. Todas as dosagens foram realizadas em único momento para minimizar variações inter-ensaios.

### ***Análise dos Marcadores Inflamatórios***

Para avaliação da resposta inflamatória foram analisados citocinas inflamatórias como interleucina IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17α, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e o interferon gama (IFN-γ). As citocinas foram quantificadas utilizando o instrumento de teste analítico Magpix®, que utiliza a tecnologia xMAP® (Luminex Corp., Austin, TX, USA) e o software xPONENT 4.2 (Luminex), seguindo os protocolos específicos dos Kits fornecidos por Millipore (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). A tecnologia xMAP (*Multi-Analyte Profiling*) usa microesferas magnéticas codificadas por fluorescência revestidas com anticorpos de captura específicos para medir simultaneamente múltiplos analitos em uma amostra. Depois que as microesferas capturaram os analitos, um anticorpo de detecção biotinizado liga-se a esse complexo. A estreptavidina PE liga-se então como uma molécula de sinalização. Dentro do instrumento de leitura, as microesferas magnéticas são mantidas em uma monocamada por um íman, onde dois LEDs (*Light Emitting*

*Diode*) são usados para excitar o corante interno de microesfera e o corante da molécula de sinalização, respectivamente. Uma câmera captura essas imagens, que são analisadas pelo software Milliplex Analyst (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)<sup>(104)</sup>. As concentrações de citocinas foram determinadas com base no ajuste de uma curva padrão para a intensidade média de fluorescência em pg/ml. Foram realizados dois controles de qualidade para cada ensaio (controle 1, nível baixo e controle 2, nível elevado). Todas as citocinas encontravam-se dentro da curva de controle de qualidade. Todas as dosagens foram realizadas pelo mesmo pesquisador biomédico especializado (Orsatti CL) para minimizar variações intra-ensaios.

### ***Análise Estatística***

O método de análise estatística utilizado foi por Intenção de Tratamento (ITT). A partir dos dados foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados. As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e porcentagem para variáveis qualitativas. Foram analisadas as seguintes variáveis clínicas (idade e tempo de menopausa, pressão arterial, peso, altura, IMC, exercício físico, tabagismo e doenças) e laboratoriais [25(OH)D, bioquímicos e perfil inflamatório].

Para comparação entre os grupos em relação às características iniciais foi empregado o Teste *t-student* (variáveis quantitativas), distribuição Gama (variáveis quantitativas assimétricas) e o teste do Qui-quadrado (variáveis qualitativas). Na comparação dos valores de 25(OH)D entre os momentos (basal e 10 meses) e entre os



grupos, utilizou-se o delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento. E na comparação dos marcadores inflamatórios (variáveis assimétricas) foi empregado o mesmo delineamento em medidas repetidas através da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald. As correlações entre as variáveis foram realizadas por análise de correlação bivariada de Pearson ( $r$ ). Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o P-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System (SAS)*, versão 9.2, pelo Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu que deu o atendimento metodológico e conduziu os procedimentos estatísticos.

## **4. Publicação**

### **4.1. Artigo Original**

**Efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre marcadores imune-  
inflamatórios em mulheres na pós-menopausa: ensaio clínico  
randomizado, duplo-cego, placebo-controlado**

*Effect of isolated vitamin D supplementation on immune-inflammatory biomarkers in  
postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled trial*

Bueloni-Dias FN, Orsatti CL, Poloni PF, Schmidtt EMB, Spadoto-Dias D,  
Cangussu L, Nahas-Neto J, Nahas EAP

## Resumo

*Objetivo:* Avaliar o efeito da suplementação isolada de vitamina D (VD) sobre os marcadores imune-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa.

*Métodos:* Foi conduzido ensaio clínico, duplo-cego, placebo-controlado envolvendo 160 mulheres com idade entre 50-65 anos e amenorréia  $\geq 12$  meses. Foram excluídas mulheres com histórico de doença cardiovascular, diabetes insulino dependente, doença renal crônica, doença hepática, doença autoimune, disfunção da paratireóide e usuárias de doses farmacológicas de VD ( $> 100$  UI/dia). As participantes foram randomizadas em dois grupos: grupo VD, ingestão de colicalciferol 1.000 UI/dia via oral (n=80) ou grupo placebo (n=80). O tempo de intervenção foi de 10 meses, com avaliações nos momentos inicial e final. Para avaliação da resposta inflamatória foram dosadas as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Os valores séricos de 25-hidroxitamina D [25(OH)D] foram mensurados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise estatística foi por Intenção de Tratamento (ITT), empregando-se medidas repetidas por meio da Distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald.

*Resultados:* Os grupos foram similares nos parâmetros clínicos e bioquímicos iniciais. A média de idade foi de  $58,8 \pm 6,6$  anos no grupo VD e de  $59,3 \pm 6,7$  anos no grupo placebo, com tempo de menopausa de  $12,0 \pm 8,8$  anos e  $12,3 \pm 8,4$  anos, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Após 10 meses, valores médios de 25(OH)D aumentaram de  $15,0 \pm 7,5$  ng/ml para  $27,5 \pm 10,4$  ng/ml (+45,4%) no grupo VD, e diminuíram de  $16,9 \pm 6,7$  ng/ml para  $13,8 \pm 6,0$  ng/ml (-18,5%) no placebo ( $p < 0,001$ ). No grupo de mulheres

suplementadas com VD observou-se redução significativa nos valores de IL-5 (-77,4%), IL-12p70 (-41%), IL-17 $\alpha$  (-57,1%), TNF- $\alpha$  (-24,1%) e IFN- $\gamma$  (-47,0%) ( $p < 0.05$ ). Na comparação entre os grupos no momento final, foi observada diferença significativa para IL-5 ( $0,7 \pm 0,9$  pg/mL vs  $2,0 \pm 7,1$  pg/mL,  $p = 0.005$ ) e IL-6 ( $1,3 \pm 2,5$  pg/mL vs  $2,0 \pm 3,6$  pg/mL,  $p = 0.029$ ) com valores finais inferiores para o grupo VD quando comparado ao grupo placebo. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de IL-1 $\beta$  e IL-10 após o período de intervenção, em ambos os grupos ( $p > 0.05$ ). A taxa de adesão foi de 92% para o estudo, sem diferenças entre os grupos de tratamento (VD ou placebo).

*Conclusão:* Em mulheres na pós-menopausa com deficiência de vitamina D, a suplementação diária e isolada de 1.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> por 10 meses associou-se com redução nos marcadores pró-inflamatórios.

**Palavras-chave:** citocinas, ensaio clínico controlado, mediadores inflamatórios, menopausa, vitamina D.

## **Abstract**

*Objective:* To evaluate the effect of supplementation of vitamin D (VD) alone on the immune-inflammatory biomarkers in postmenopausal women.

*Methods:* In this double-blind, placebo-controlled trial, 160 postmenopausal women were randomized into two groups: VD group, vitamin D<sub>3</sub> supplementation 1,000 IU/day orally (n=80) or placebo group (n=80). Women with amenorrhea  $\geq$  12 months and age 50-65 years were included. Those with established cardiovascular disease, insulin dependent diabetes, primary hyperparathyroidism, renal failure (or creatinine  $>1.4$  mg/dL), liver disorders, autoimmune diseases, and previous use of pharmacological doses of VD ( $> 100$  IU/day) were excluded. The intervention time was 10 months, with assessments at the start and end of treatment. Serum levels of interleukin IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) were determined. The plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] were measured by HPLC (high-performance liquid chromatography). Statistical analysis was by intention-to-treat (ITT), using Gamma distribution in repeated measures design followed by multiple comparison Wald's test.

*Results:* The two groups were similar at baseline in terms of clinical and laboratory parameters. The mean age of the patients included was  $58.8 \pm 6.6$  years in the VD group and  $59.3 \pm 6.7$  years in the placebo group, with time since menopause of  $12.0 \pm 8.8$  years and  $12.3 \pm 8.4$  years, respectively ( $p>0.05$ ). After 10 months, there was increase in the 25(OH)D concentrations from  $15.0 \pm 7.5$  ng/ml to  $27.5 \pm 10.4$  ng/ml (+45.4%) in VD group, and decrease from  $16.9 \pm 6.7$  ng/ml to  $13.8 \pm 6.0$  ng/ml (-18.5%) in placebo group ( $p<0.001$ ). At the end of the intervention, in VD group, there was significant decreased in IL-5 (-77.4%), IL-12p70 (-41%), IL-17 $\alpha$  (-57.1%), TNF- $\alpha$  (-24.1%)

e IFN- $\gamma$  (-47.0%) values ( $p < 0.05$ ). In the comparison between groups, after 10 months, in VD group, there were significantly greater decreases in levels of IL-5 ( $0.7 \pm 0.9$  pg/mL vs  $2.0 \pm 7.1$  pg/mL,  $p = 0.005$ ) and IL-6 ( $1.3 \pm 2.5$  pg/mL vs  $2.0 \pm 3.6$  pg/mL,  $p = 0.029$ ) compared to those randomized to placebo. There were no significant intervention effects on serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-10 in both groups ( $p > 0.05$ ). For the participants who completed the study, adherence was 92% for the study intervention (vitamin D or placebo).

*Conclusion:* In postmenopausal women with vitamin D deficiency, daily isolated supplementation of 1,000 IU of vitamin D<sub>3</sub> for 10 months was associated with a reduction in pro-inflammatory biomarkers.

**Key-words:** cytokines, controlled clinical trial, immune-inflammation mediators, menopause, vitamin D.

## Introdução

A vitamina D (VD) tem importante e reconhecido papel na mineralização óssea, na concentração de cálcio/fósforo e na regulação da paratireóide, entretanto, efeitos extra-ósseos da VD sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatórios estão sob investigação atual<sup>(1)</sup>. Evidências recentes sugerem o envolvimento da VD em diversas doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, hipertensão, diabetes e doença cardiovascular (DCV)<sup>(2-5)</sup>. A deficiência de VD pode comprometer o funcionamento metabólico normal do tecido adiposo, com impacto significativo na manutenção da saúde metabólica e na inflamação<sup>(5)</sup>. No sistema cardiovascular foram encontrados receptores de VD no músculo liso vascular, no endotélio e nos cardiomiócitos, sendo que, evidências sugerem que a deficiência de VD é potencial fator de risco para DCV<sup>(6-10)</sup>, principal causa de morte em mulheres na pós-menopausa.

A VD pode exercer efeito protetor no sistema cardiovascular sobre as paredes dos vasos por inibição de macrófagos na formação de células espumosas (macrófagos ricos em LDL-oxidado) e pelo seu efeito anti-inflamatório<sup>(8)</sup>. A inflamação desempenha papel fundamental no desencadeamento, progressão e instalação da aterosclerose<sup>(11)</sup>. A identificação de macrófagos, células T, e citocinas pro-inflamatórias na lesão aterosclerótica suporta a hipótese de que a resposta imunológica inata participe do mecanismo da aterogênese<sup>(12,13)</sup>. O macrófago é a principal fonte de citocinas, incluindo as citocinas pro-inflamatórias, como as interleucinas (IL) 1, 6, 12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); assim como as citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), entretanto esses mecanismos não estão totalmente esclarecidos<sup>(13)</sup>. A VD parece interagir com o sistema imunológico através da supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias e por meio da regulação da

atividade e diferenciação de células imunitárias como linfócitos, macrófagos, células dendríticas e natural killer (NK)<sup>(14-17)</sup>.

Em uma revisão sistemática com objetivo de avaliar o efeito da suplementação de VD na função endotelial e inflamação em adultos, foram reunidos 29 ensaios clínicos randomizados. De forma geral, apenas oito estudos relataram melhora significativa nos biomarcadores endoteliais/inflamatórios (citocinas Th1 e Th2, e marcadores endoteliais). Os demais estudos não mostraram alterações significativas nos biomarcadores. Os autores concluíram que as evidências destes estudos não demonstraram melhora na circulação dos biomarcadores inflamatórios (citocinas Th1 e Th2) e da função endotelial (marcadores de endotélio)<sup>(18)</sup>. Sendo assim, mais estudos são necessários para compreendermos de forma mais conclusiva o efeito da suplementação de VD nas vias inflamatórias<sup>(15,19)</sup>. Baseado nesses dados, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores imune-inflamatórios do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.

## **Métodos**

### ***Desenho do estudo e Seleção da Amostra***

Trata-se de ensaio clínico, duplo-cego, placebo-controlado, randomizado, para avaliar o efeito isolado da suplementação de VD (1.000 UI/dia). O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Ambulatório de Climatério & Menopausa, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP. O cálculo do tamanho amostral foi embasado no estudo de Arnson *et al.* que demonstraram redução de 31% nos valores de IL-6 pós-suplementação de VD (pré  $6,5 \pm 7,9$  pg/ml e pós  $4,4 \pm 3,24$  pg/ml)<sup>(20)</sup>.



Considerando a diferença entre os valores, para um coeficiente de 95% e margem de erro de 5%, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 60 mulheres por grupo. Considerando perda de seguimento ao redor de 20%, o tamanho amostral adotado foi de 80 mulheres por grupo. Foram incluídas mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade  $\geq 45$  anos que aceitaram participar do estudo. E os critérios de exclusão foram: presença doença arterial coronariana (DAC) manifesta atual ou prévia; doença arterial cerebrovascular; doença aneurismática; doença arterial periférica; diabetes insulino dependente; doença renal crônica ou creatinina  $> 1,4$  mg/dl; doença hepática; doenças autoimunes; disfunção da paratireóide; obesidade grau III; usuárias de doses farmacológicas de VD ( $> 100$  UI/dia); etilistas ou drogaditas. Todas as voluntárias participantes do estudo foram solicitadas a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. O estudo foi registrado e aprovado pelo Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) sob o número de registro RBR-222wfk. Este ensaio clínico foi realizado de acordo com o *Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010*<sup>(21)</sup>.

### ***Avaliação Dados Clínicos***

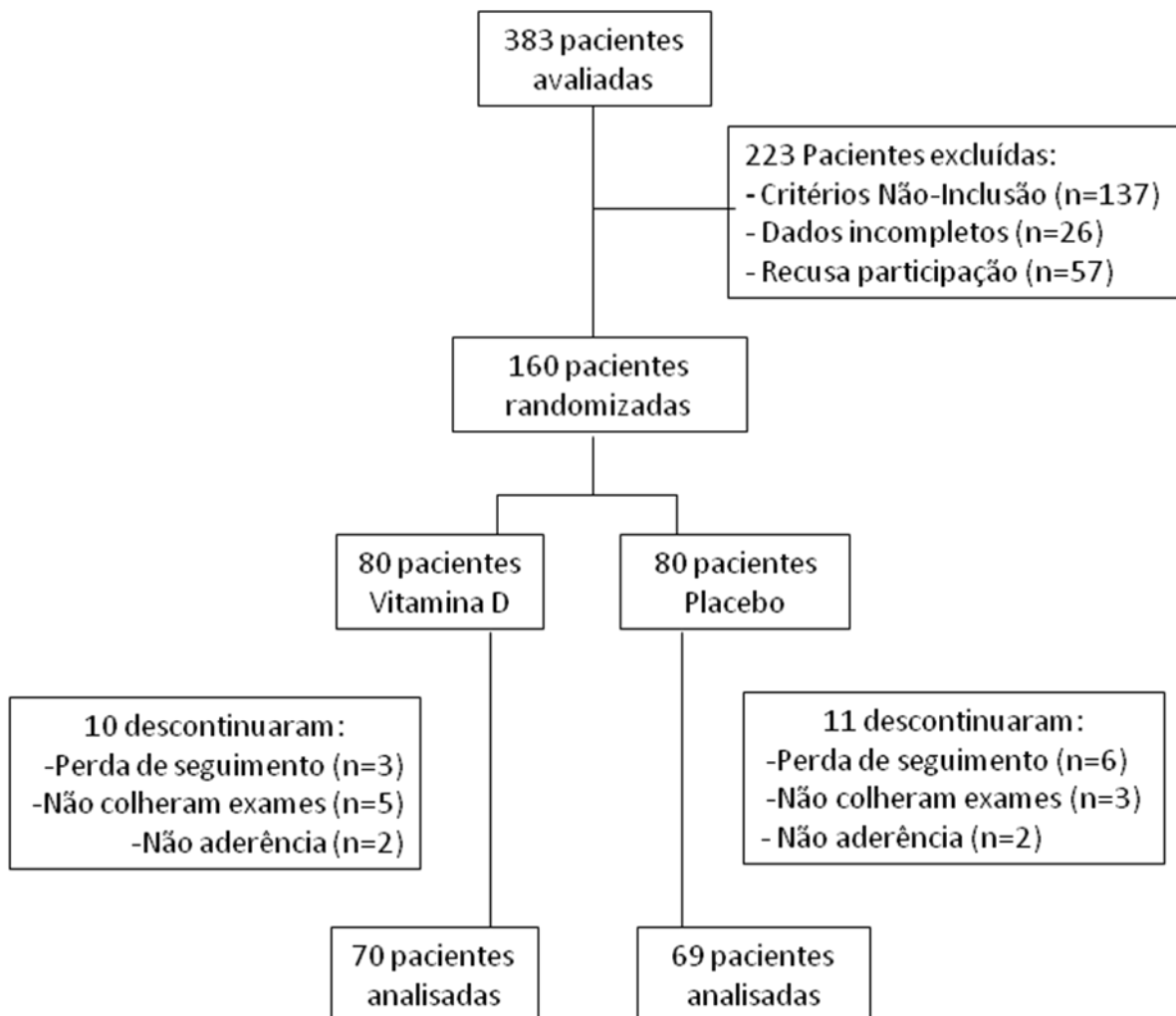
Inicialmente, no dia da consulta foram coletados por meio de entrevista os seguintes dados clínicos: idade, idade da menopausa, tempo de menopausa, paridade, tabagismo atual, uso de terapia hormonal, histórico de doenças crônicas (hipertensão, diabetes, doença cardiovascular), uso de medicamentos, atividade física e pressão arterial. Foram definidas como tabagistas as pacientes com o hábito de fumar

diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram consideradas ativas as mulheres que praticarem exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada, pelo menos 30 minutos, cinco vezes na semana (150/min/sem) ou exercícios de resistência três dias por semana (CDC). Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura, índice de massa corpórea (IMC= peso/altura<sup>2</sup>) e circunferência da cintura. Foram empregados os critérios da *World Health Organization* de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: menor que 18,5 kg/m<sup>2</sup> como baixo peso, de 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup> normal, de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> sobrepeso, de 30 a 34,9 kg/m<sup>2</sup> obesidade grau I, de 35 a 39,9 kg/m<sup>2</sup> obesidade grau II e maior ou igual a 40 kg/m<sup>2</sup> obesidade grau III. Para a medida da cintura foi empregada a menor circunferência entre a última costela e a crista íliaca ântero-superior, sendo a leitura feita no momento da expiração. Foi considerada aumentada acima de 88 cm<sup>(22)</sup>.

### **Protocolo de suplementação**

Após a seleção inicial, todas as participantes receberam uma numeração (1-160) de acordo com a ordem de inclusão no estudo. Um processo de randomização computadorizado centralizado foi conduzido empregando software específico para o protocolo do estudo (*SAS for Windows, v. 9.2 using Procedure Plan*). As pacientes foram randomizadas, em sequência de numeração pré-estabelecida, em dois grupos: VD, com suplementação de vitamina D (n=80) e PL, usuárias de placebo (n=80) (Figura 1). Os investigadores e as pacientes não tinham conhecimento prévio dos referidos grupos e das diferentes numerações, apenas o farmacêutico responsável pela manipulação do placebo. Assim, 80 pacientes receberam 1.000 UI de VD (colecalfiferol), cinco gotas via oral (cada gota contém 200 UI, frasco de 20 ml),

durante 10 meses. As outras 80 pacientes receberam placebo (composição de água e óleo mineral com essência de limão, em 20 ml), com mesma característica e sabor, cinco gotas, via oral. Os frascos foram idênticos, embalados e numerados em código pelo farmacêutico para não identificação do grupo pelos participantes do estudo. Para o controle da suplementação, as pacientes foram orientadas a trazer os frascos a cada retorno para contabilizar a medicação usada e determinar a aderência. O tempo de seguimento foi de 10 meses com avaliações clínicas em dois momentos, inicial e final.



**Figura 1-** Fluxograma das pacientes incluídas no estudo

### ***Avaliação Laboratorial***

Amostras sanguíneas foram colhidas nos momentos basal e 10 meses, pela manhã, após 12 horas de jejum. Foi realizada avaliação do perfil lipídico pela mensuração de colesterol total (CT), HDL, LDL e triglicerídeos (TG), além de dosagens de glicose e creatinina. Todas as avaliações bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. As mensurações de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e glicose foram processadas pelo analisador bioquímico automático (*Technicon<sup>®</sup>, RA-XT System; Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA*) e quantificadas pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se reagentes comerciais específicos (*Sera-Pak<sup>®</sup>, Bayer Corporation, Diagnostics Division, NY, USA*). O LDL foi obtido, subtraindo-se o valor do CT, da soma do HDL e do TG dividido por cinco. Os valores considerados ótimos foram: CT < 200 mg/dL, HDL > 50mg/dL, LDL < 100 mg/dL, TG < 150 mg/dL, glicose > 100mg/dL<sup>(22)</sup>. Para dosagem de creatinina foi empregado o método da química seca com equipamento de automatização, modelo Vitros 950<sup>®</sup> (Johnson-Johnson, Rochester, NY, USA). Os valores da concentração sérica da creatinina foram considerados dentro do limite da normalidade de 0,7 a 1,2 mg/dL.

### ***Análise de Vitamina D***

Os valores de 25(OH)D foram dosados no momento basal e aos 10 meses (para avaliar a biodisponibilidade e aderência ao tratamento). A 25(OH)D foi dosada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), pelo sistema HPLC Isocrático com injetor manual Rheodyne<sup>®</sup>, modelo 7725i, com loop de 20 µL e detector de UV-VIS

Waters, modelo M-484, com coluna RP 18 com 4.0 mm x 15 cm e partículas de 5 micros (Sigma-Aldrich® Co. LLC, St. Louis, MO, USA). O limite de detecção foi de 2,5 ng/ml e o coeficiente de variação < 7,0%. Foram considerados suficientes valores de 25(OH)D  $\geq$  30 ng/mL, insuficiência de 21 a 29 ng/mL e deficiência < 20 ng/mL<sup>(23,24)</sup>. Todas as dosagens foram realizadas em único momento para minimizar variações inter-ensaios.

### ***Análise dos Marcadores Inflamatórios***

Para avaliação da resposta inflamatória foram analisados citocinas inflamatórias como interleucina IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ). As citocinas foram quantificadas utilizando o instrumento de teste analítico Magpix<sup>®</sup>, que utiliza a tecnologia xMAP<sup>®</sup> (Luminex Corp., Austin, TX, USA) e o software xPONENT 4.2 (Luminex), seguindo os protocolos específicos dos Kits fornecidos por Millipore (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). A tecnologia xMAP (*Multi-Analyte Profiling*) usa microesferas magnéticas codificadas por fluorescência revestidas com anticorpos de captura específicos para medir simultaneamente múltiplos analitos em uma amostra<sup>(25)</sup>. As concentrações de citocinas foram determinadas com base no ajuste de uma curva padrão para a intensidade média de fluorescência em pg/ml. Foram realizados dois controles de qualidade para cada ensaio (controle 1, nível baixo e controle 2, nível elevado). Todas as citocinas encontravam-se dentro da curva de controle de qualidade. Todas as dosagens foram realizadas pelo mesmo pesquisador biomédico especializado (Orsatti CL) para minimizar variações intra-ensaios.

### **Análise Estatística**

O método de análise estatística utilizado foi por Intenção de Tratamento (ITT). A partir dos dados foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados. As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e porcentagem para variáveis qualitativas. Foram analisadas as seguintes variáveis clínicas (idade e tempo de menopausa, pressão arterial, peso, altura, IMC, exercício físico, tabagismo e doenças) e laboratoriais [25(OH)D, bioquímicos e perfil inflamatório].

Para comparação entre os grupos em relação às características iniciais foi empregado o Teste *t-student* (variáveis quantitativas), distribuição Gama (variáveis quantitativas assimétricas) e o teste do Qui-quadrado (variáveis qualitativas). Na comparação dos valores de 25(OH)D entre os momentos (basal e 10 meses) e entre os grupos, utilizou-se o delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento. E na comparação dos marcadores inflamatórios (variáveis assimétricas) foi empregado o mesmo delineamento em medidas repetidas através da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald. As correlações entre as variáveis foram realizadas por análise de correlação bivariada de Pearson ( $r$ ). Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o P-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System (SAS)*, versão 9.2.

## Resultados

A comparação das características clínicas, antropométricas e laboratoriais iniciais entre as mulheres submetidas à suplementação de VD (n=80) ou ao placebo (n=80) está apresentada na Tabela 1. Observa-se que os grupos foram homogêneos para as todas as variáveis avaliadas ( $p > 0,05$ ). A média de idade das pacientes incluídas foi de  $58,8 \pm 6,6$  anos para o grupo VD e de  $59,3 \pm 6,7$  anos para o grupo placebo, com tempo de menopausa  $12,0 \pm 8,8$  anos e  $12,3 \pm 8,4$  anos, respectivamente. Em ambos os grupos, as pacientes foram classificadas, em média, como sobrepeso (IMC de 25 a  $29,9 \text{ kg/m}^2$ ) e com deposição central de gordura (CC > 88 cm). Em ambos os grupos os valores médios de 25(OH)D indicavam insuficiência de VD ( $< 20,0 \text{ ng/mL}$ ). Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos avaliados (Tabela 1). Na análise de correlação no momento basal, o valor de 25(OH)D foi negativamente associado com IMC ( $r = -0.18$ ), circunferência da cintura ( $r = -0.21$ ) e IFN- $\gamma$  ( $r = -0.23$ ) e positivamente associado com IL-10 ( $p < 0.05$ ). A idade se associou positivamente com IL-6, enquanto o IMC com o IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) (Tabela 2).

A Tabela 3 demonstra a comparação das características laboratoriais entre grupos e entre momentos. No momento inicial não foram observadas diferenças entre os grupos em todos os marcadores inflamatórios avaliados. Na avaliação final, observou-se aumento significativo na concentração plasmática de 25(OH)D para o grupo suplementado com VD, com variação positiva de 45,4%. E para o grupo placebo houve diminuição dos valores de 25(OH)D, com variação negativa de 18,5%, com diferença significativa entre os grupos ( $p = 0.049$ ) e entre o momento final ( $p < 0.001$ ). No momento final, pela estratificação dos valores plasmáticos de 25(OH)D

demonstrou-se que 62,5% das pacientes do grupo placebo apresentavam insuficiência de VD contra 26,3% daquelas do grupo suplementado. A deficiência de VD foi encontrada apenas no grupo placebo em 21,3% (dados não demonstrados).

Na comparação dos resultados dos marcadores inflamatórios, no grupo de mulheres suplementadas com VD, observou-se redução significativa entre os momentos inicial e final para IL-5 (-77.4%), IL-12p70 (-41%), IL-17 $\alpha$  (-57.1%), TNF- $\alpha$  (-24.1%) e IFN- $\gamma$  (-47.0%) ( $p < 0.05$ ). Na comparação entre os grupos no momento final, foi observada diferença significativa para IL-5 ( $0.7 \pm 0.9$  pg/mL vs  $2.0 \pm 7.1$  pg/mL,  $p = 0.005$ ) e IL-6 ( $1.3 \pm 2.5$  pg/mL vs  $2.0 \pm 3.6$  pg/mL,  $p = 0.029$ ) com valores finais inferiores para o grupo VD quando comparado ao grupo placebo. Não foram observadas diferenças entre grupos e entre momentos nos valores de IL1 $\beta$  e IL-10 (Tabela 3).

A taxa de adesão foi de 92% para o estudo, sem diferenças entre os grupos de tratamento (VD ou placebo). Das 160 mulheres analisadas, 21 descontinuaram o estudo antes de 10 meses (Figura 1). Os eventos adversos notificados foram leves e igualmente distribuídos entre os grupos de suplementação e do placebo. No grupo VD, duas participantes, e no grupo placebo, três participantes, descontinuaram o estudo por queixas gastrointestinais e dor epigástrica. Nenhum outro efeito adverso foi relatado.



**Tabela 1.** Comparação das características clínicas, antropométricas e laboratoriais iniciais entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação de vitamina D (n=80) ou placebo (n=80).

<b>Parâmetros</b>	<b>Vitamina D</b>	<b>Placebo</b>	<b>Valor de P*</b>
Idade (anos)	58.8 (6.6)	59.3 (6.7)	0.654 <sup>a</sup>
Idade menopausa (anos)	46.8 (6.2)	46.9 (5.6)	0.882 <sup>a</sup>
Tempo de Menopausa (anos)	12.0 (8.8)	12.3 (8.4)	0.804 <sup>b</sup>
PAS (mmHg)	134.3 (19.8)	136.5 (21.0)	0.499 <sup>a</sup>
PAD (mmHg)	81.5 (12.6)	81.0 (10.8)	0.794 <sup>a</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.4 (5.4)	29.9 (4.7)	0.505 <sup>a</sup>
CC (cm)	94.0 (12.1)	94.1 (10.3)	0.994 <sup>a</sup>
25(OH)D (ng/mL)	15.0 (7.5)	16.9 (6.7)	0.086 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	0.7 (0.2)	0.7 (0.1)	0.955 <sup>a</sup>
Glicose (mg/dL)	92.5 (10.6)	93.5 (10.9)	0.564 <sup>a</sup>
Colesterol Total (mg/dL)	211.3 (48.6)	210.0 (39.7)	0.855 <sup>a</sup>
HDL (mg/dL)	51.2 (12.2)	50.6 (12.3)	0.762 <sup>a</sup>
LDL (mg/dL)	128.9 (39.7)	129.7 (35.0)	0.885 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	155.5 (92.7)	165.3 (71.1)	0.399 <sup>b</sup>
Tabagismo n(%)	21 (26.2)	19 (23.8)	0.457 <sup>c</sup>

Exercício físico n(%)	25 (31.2)	21 (26.2)	0.428 <sup>c</sup>
Hipertensão n(%)	44 (55.0)	49 (61.2)	0.423 <sup>c</sup>
Diabetes n(%)	12 (15.0)	16 (20.0)	0.405 <sup>c</sup>

---

Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) ou número (%).

PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; IMC, índice de massa corporal; CC, circunferência da cintura; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; 25(OH)D, 25-hidroxivitamina D.

\*Diferença significativa se  $P < 0,05$  (<sup>a</sup>Teste *t-Student*, <sup>b</sup>Teste de Distribuição Gama ou <sup>c</sup>Teste do Qui-Quadrado).

**Tabela 2-** Correlação entre os valores plasmáticos de 25(OH)D, parâmetros antropométricos e epidemiológicos com os marcadores inflamatórios em 160 mulheres na pós-menopausa no momento inicial.

Variáveis	25(OH)D	IL-1 $\beta$	IL-5	IL-6	IL-10	IL-12p70	IL-17 $\alpha$	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
25(OH)D	1.00	0.08	0.11	0.04	0.27*	0.09	0.12	0.02	-0.23*
Idade	-0.10	0.02	-0.08	0.19*	0.04	-0.01	-0.01	0.63	-0.08
TM	-0.04	0.12	0.02	0.11	0.02	0.08	0.07	0.03	0.03
IMC	-0.18*	0.02	0.06	0.04	0.04	-0.04	-0.03	0.10	0.29*
CC	-0.21*	0.04	0.04	0.05	0.33	0.02	-0.02	0.08	0.08

25(OH)D, 25-hidroxivitamina D em ng/mL; TM, tempo de menopausa em anos; IMC, índice de massa corpórea em Kg/m<sup>2</sup>; CC, circunferência da cintura em cm.

Coeficiente de Correlação de Pearson (r). \* p < 0.05.

**Tabela 3.** Comparação do perfil de marcadores inflamatórios entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação de vitamina D (n=80) ou associada ao placebo (n=80) nos momentos basal e após 10 meses de intervenção (valores médios  $\pm$  desvio padrão).

Indicador/Grupo	Basal	10 meses	Variação (%)	Valor de p*
<i>25(OH)D (ng/mL)</i>				
Placebo	16.9 (6.7) <sup>a</sup>	13.8 (5.9) <sup>a</sup>	-3.2 (-18.5%)	<b>0.049<sup>#</sup></b>
Vitamina D	15.0 (7.5) <sup>a</sup>	27.5 (10.4) <sup>b</sup>	12.5 (45.4%)	<b>&lt;0.001<sup>#</sup></b>
<i>IL-1<math>\beta</math> (pg/mL)</i>				
Placebo	1.5 (2.7) <sup>a</sup>	2.7 (5.2) <sup>a</sup>	1.2 (44.4%)	0.089
Vitamina D	1.4 (2.3) <sup>a</sup>	2.0 (3.8) <sup>a</sup>	0.6 (30.0%)	0.135
<i>IL-5 (pg/mL)</i>				
Placebo	2.7 (6.5) <sup>a</sup>	2.0 (7.1) <sup>a</sup>	-0.7 (-25.9%)	0.563
Vitamina D	3.1 (6.4) <sup>a</sup>	0.7 (0.9) <sup>b</sup>	-2.4 (-77.4%)	<b>&lt;0.001</b>
<i>IL-6 (pg/mL)</i>				
Placebo	1.8 (5.0) <sup>a</sup>	2.0 (3.6) <sup>a</sup>	0.2 (10.0%)	0.238
Vitamina D	1.6 (3.2) <sup>a</sup>	1.3 (2.5) <sup>b</sup>	-0.3 (-18.7%)	0.538
<i>IL-10 (pg/mL)</i>				
Placebo	2.1 (4.4) <sup>a</sup>	2.0 (2.2) <sup>a</sup>	-0.1 (-4.8%)	0.944
Vitamina D	1.6 (2.0) <sup>a</sup>	1.7 (2.2) <sup>a</sup>	0.1 (5.9%)	0.155
<i>IL-12p70 (pg/mL)</i>				
Placebo	3.2 (4.4) <sup>a</sup>	2.5 (2.9) <sup>a</sup>	-0.7 (-21.8%)	0.061
Vitamina D	3.9 (5.9) <sup>a</sup>	2.3 (2.6) <sup>a</sup>	-1.6 (-41.0%)	<b>0.003</b>
<i>IL-17<math>\alpha</math> (pg/mL)</i>				
Placebo	2.6 (3.3) <sup>a</sup>	2.0 (2.2) <sup>a</sup>	-0.6 (-23.1%)	0.067

Vitamina D	2.8 (3.5) <sup>a</sup>	1.6 (1.9) <sup>a</sup>	-1.2 (-57.1%)	<b>0.002</b>
<i>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</i>				
Placebo	11.0 (5.4) <sup>a</sup>	9.3 (5.7) <sup>a</sup>	-1.7 (-15.4%)	0.094
Vitamina D	10.4 (6.6) <sup>a</sup>	7.9 (5.2) <sup>a</sup>	-2.5 (-24.1%)	<b>0.049</b>
<i>IFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)</i>				
Placebo	6.0 (9.9) <sup>a</sup>	4.8 (5.0) <sup>a</sup>	-1.2 (-20.0%)	0.083
Vitamina D	6.6 (11.2) <sup>a</sup>	3.5 (4.4) <sup>a</sup>	-3.1 (-47.0%)	<b>0.001</b>

Valores médios (desvio padrão). IL, interleucina; TNF- $\alpha$ , Fator de necrose tumoral alfa; INF- $\gamma$ , Interferon gama.

Varição Absoluta: valores finais subtraídos dos valores basais.

\*p-valor mostra a diferença significativa entre momentos ( $p < 0.05$ ) e (a,b) mostram diferenças significante entre grupos e (a,a) sem diferença ( $p > 0,05$ ) (ANOVA seguida de Teste de Tukey<sup>#</sup> e medidas repetidas por meio da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald\*).

## Discussão

No presente estudo, em mulheres na pós-menopausa com deficiência de vitamina D, observou-se redução nos marcadores inflamatórios com a suplementação isolada de VD. Mulheres na pós-menopausa podem ser consideradas como população de risco para deficiência de VD devido a modificações no receptor de vitamina D (VDR)<sup>(26)</sup>. Com o hipoestrogenismo, o número de VDRs diminui, levando a alterações na sua funcionalidade e na resposta das células-alvo<sup>(18)</sup>. Reduzidos valores séricos de 25-hidroxivitamina D estão ligados à presença de doenças autoimunes, metabólicas e cardiovascular<sup>(6,20,27-30)</sup>. Esses achados são apoiados por uma metanálise mostrando que a suplementação oral com VD está associada à redução da mortalidade por todas as causas, em especial ao diminuir mortes por DCV<sup>(31)</sup>.

Os marcadores imune-inflamatórios parecem estar elevados em pessoas com baixa concentração sérica de 25(OH)D<sup>(15,32)</sup>. A VD poderia interagir com o sistema imunológico através da supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias e por meio da regulação da atividade e diferenciação de células imunitárias como linfócitos, macrófagos, células dendríticas e natural killer (NK)<sup>(14-17)</sup>. A descoberta de receptores nucleares de vitamina D (VDR) em quase todas as células do sistema imunológico permitiu que vários mecanismos fossem propostos para explicar a participação da VD no sistema imune-inflamatório, tais como: regulação da diferenciação e ativação de linfócitos CD4+; aumento da função das células T reguladoras (Treg); inibição *in vitro* da diferenciação de monócitos em células dendríticas; diminuição da produção das citocinas interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e TNF- $\alpha$ , a partir de células Th1 e estímulo da função de células Th2; inibição da produção de IL-17 a partir de células Th17<sup>(19,29,33-36)</sup>. Assim, a presença da VD estaria relacionada com imunossupressão de citocinas

inflamatórias<sup>(19,37)</sup>. Entretanto, poucas pesquisas e com resultados controversos foram realizadas para avaliar a interação entre VD e marcadores inflamatórios, sendo que o efeito de sua suplementação ainda é incerto<sup>(38)</sup>.

Os resultados deste estudo sugerem que em mulheres na pós-menopausa com deficiência de 25(OH)D, a suplementação de VD possa desempenhar papel na redução dos biomarcadores imune-inflamatórios de risco cardiovascular. Nesta pesquisa observou-se redução significativa em algumas citocinas inflamatórias como IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Os estudos em mulheres na pós-menopausa são escassos e contraditórios para que se possa realizar comparação com os resultados desta pesquisa. Wood *et al.*, em estudo clínico, duplo-cego, placebo-controlado, avaliaram o efeito de doses diárias de vitamina D<sub>3</sub> sobre marcadores convencionais de risco de doença cardiovascular (DCV). Um total de 265 mulheres na pós-menopausa, idade entre 60-70 anos foram randomizadas para receber uma cápsula diária de 400 ou 1.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> ou placebo durante 12 meses. Entre os diversos parâmetros avaliados, os marcadores inflamatórios (proteína C-reativa, IL-6 e a molécula de adesão intracelular-1) permaneceram inalterados com a suplementação de VD<sup>(39)</sup>. O estudo *Vitamin D diet and Activity* (ViDA) randomizou 218 mulheres na pós-menopausa, idade entre 50-75 anos, com sobrepeso/obesidade e insuficiência de 25(OH)D, para suplementação oral diária com 2.000 UI de VD, por período de um ano, comparativamente ao placebo. Mulheres de ambos os grupos foram simultaneamente submetidas a um programa de perda de peso (dieta + exercício), com objetivo de redução em 10% do peso corporal. Adiponectina, leptina, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-10 foram avaliadas. Em análise estratificada, as participantes randomizadas para a suplementação de vitamina D<sub>3</sub> e que perderam 5-10% do peso basal apresentaram

redução significativamente maior nos valores de IL-6 quando comparadas ao placebo (-37.3% vs -17.2%, respectivamente). Não houve efeitos de intervenção sobre a IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, adiponectina e leptina quando estratificados por perda de peso<sup>(40)</sup>.

Recente revisão sistemática avaliou a associação entre suplementação de VD e os biomarcadores inflamatórios (citocinas Th1 e Th2, e adiponectinas) e o perfil glicêmico em adultos de ambos os sexos, sobrepesos e obesos. Foram incluídos onze ensaios clínicos randomizados. A maioria dos resultados dos ensaios analisados não foi significativa e incluíam vieses consideráveis, com heterogeneidade no desenho dos estudos, nas características dos participantes e nos resultados observados. Apenas dois estudos demonstraram alterações nos biomarcadores inflamatórios, porém não estatisticamente significativas e outros dois ensaios encontraram diferenças significativas na glicemia de jejum e resistência insulínica após suplementação de VD. Os valores séricos basais parecem influenciar o efeito da suplementação da VD nos resultados. Os autores concluem que não está estabelecido o benefício da suplementação VD sobre os biomarcadores inflamatórios entre adultos com sobrepeso ou obesidade<sup>(15)</sup>.

Vários estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos obesos têm menores concentrações séricas de 25(OH)D, com associação inversa entre a concentração de VD e o índice de massa corpórea (IMC) e a circunferência da cintura<sup>(41-44)</sup>. Os mecanismos envolvidos não estão completamente descritos, mas é possível que o sequestro de metabólitos da VD no tecido adiposo diminua sua biodisponibilidade<sup>(45,46)</sup>. A expressão tanto do VDR como do gene da 25-hidroxivitamina D 1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1) tem sido demonstrada em adipócitos humanos. Os metabólitos de VD influenciam a produção de citocinas e a resposta



inflamatória no tecido adiposo<sup>(47)</sup>. No momento inicial do presente estudo, o valor sérico basal de 25(OH)D foi positivamente associado com IL-10 e negativamente associado com IMC, circunferência da cintura e com IFN- $\gamma$ .

O IFN- $\gamma$ , uma citocina que regula as vias de células tipo Th1, assim como a IL-5 e a IL-10, que regulam as vias de células tipo Th2, podem ser influenciados pela VD<sup>(48)</sup>. Baixas concentrações séricas de 25(OH)D durante o inverno, em adultos saudáveis, estiveram associadas a aumento da produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, mas foi ineficaz na modulação de IFN- $\gamma$ , IL-5 ou IL-10 em indivíduos com sobrepeso e obesos<sup>(27,48,49)</sup>. A IL-12, uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel central na ativação e diferenciação de células T CD4+ em células Th1 secretoras de IFN- $\gamma$ , também parece sofrer um processo de supressão de sua expressão em vigência de tratamento com VD<sup>(50,51)</sup>.

A IL-5 é essencial para promover o crescimento, diferenciação, sobrevivência e ativação de eosinófilos, sendo frequentemente expressa com outras citocinas do tipo Th2<sup>(48)</sup>. Barker *et al.*, ao analisarem a resposta ao tratamento diário com 200 UI e 4.000 UI de VD, comparativamente a um grupo placebo, observaram diminuição transitória da IL-5 no grupo placebo e em contraste, houve aumento e ausência de modificação nos níveis da IL-5 nos grupos suplementados com 200 UI e 4.000 UI, respectivamente<sup>(48)</sup>. Yusupov *et al.* também demonstraram que a suplementação de 2.000 UI/dia de colecalciferol durante três meses foi ineficaz na alteração das concentrações circulantes de IL-5 em adultos jovens saudáveis<sup>(52)</sup>. Em contraste, uma análise observacional sugeriu que a suplementação com VD possa aumentar os níveis de citocinas tanto pró- quanto antiinflamatórias em pessoas com níveis séricos de 25(OH)D inicialmente baixos<sup>(53)</sup>.

Esses dados sugerem que a propriedade moduladora da VD nas citocinas pode ser dependente de características genético-ambientais individuais, de fatores dietéticos e reprodutivos, do padrão imunológico, da presença de doenças crônicas e da dose e duração de suplementação<sup>(48,54)</sup>. A forma mais comum de suplementação usada hoje é o colecalciferol ou vitamina D<sub>3</sub>, sendo que a maioria dos adultos saudáveis atinge valores de 20 ng/mL com 600 a 800 UI de VD por dia. No entanto, uma faixa alvo de pelo menos 30 ng/mL pode exigir de 1.000 UI a 4.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> por dia<sup>(51)</sup>. Recomenda-se a utilização de dose diária mais elevada ( $\geq 5.000$  UI) em populações com risco de desenvolver deficiência de VD e em indivíduos com valores de 25(OH)D inferiores a 20 ng/ml (55 nmol/L)<sup>(18)</sup>. Entretanto, a suplementação de VD em doses muito elevadas pode apresentar um caráter prejudicial na imunoexpressão de algumas citocinas<sup>(53)</sup>.

Os pontos fortes do presente estudo incluem seu desenho prospectivo, duplo-cego e placebo-controlado e um amplo conjunto de marcadores imune-inflamatórios que foram avaliados em mulheres saudáveis. Conseqüentemente, nossos resultados podem ser mais relevantes para a população de mulheres na pós-menopausa residentes na comunidade do que os estudos focados em pessoas com doenças específicas. A duração da intervenção e a dose administrada também foram suficientes para provocar aumentos mensuráveis nos valores séricos de 25(OH)D. Este estudo também apresentou altas taxas de adesão (92% das participantes), sem diferenças entre os grupos de intervenção (VD ou placebo).

Entre as limitações deste estudo, relaciona-se a representatividade da amostra. Por tratar de um grupo de mulheres na pós-menopausa atendidas em serviço público de saúde, entende-se que estão em contato periódico com profissionais médicos e em

cuidado permanente com a saúde em geral. E por tratar-se de uma população de estudo relativamente homogênea, nossos resultados não podem ser generalizados para outros grupos raciais/étnicos.

Em conclusão, a suplementação diária e isolada de 1.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> por 10 meses em mulheres na pós-menopausa com deficiência de vitamina D, associou-se com redução nos marcadores inflamatórios. A hipótese de que a suplementação com VD possa levar a uma redução dos marcadores imune-inflamatórios circulantes, propõe um papel potencial da VD como terapia antiinflamatória na prevenção e no tratamento das doenças cardiometabólicas<sup>(18)</sup>. Sendo assim, outros estudos nesta área são necessários, a fim de compreendermos de forma mais conclusiva o efeito da suplementação de VD nas vias inflamatórias e seu real papel na prevenção da DCV.

## Referências

1. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *The New England journal of medicine*. 2011 Jan 20;364(3):248-54. PubMed PMID: 21247315.
2. Forman JP, Curhan GC, Taylor EN. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension among young women. *Hypertension*. 2008 Nov;52(5):828-32. PubMed PMID: 18838623. Pubmed Central PMCID: 2747298.
3. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008 Jan 29;117(4):503-11. PubMed PMID: 18180395. Pubmed Central PMCID: 2726624.
4. Vacek JL, Vanga SR, Good M, Lai SM, Lakkireddy D, Howard PA. Vitamin D deficiency and supplementation and relation to cardiovascular health. *The American journal of cardiology*. 2012 Feb 01;109(3):359-63. PubMed PMID: 22071212.
5. Strange RC, Shipman KE, Ramachandran S. Metabolic syndrome: A review of the role of vitamin D in mediating susceptibility and outcome. *World journal of diabetes*. 2015 Jul 10;6(7):896-911. PubMed PMID: 26185598. Pubmed Central PMCID: 4499524.

6. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine*. 2008 Jun 23;168(12):1340-9. PubMed PMID: 18574092.
7. Katsiki N, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Vitamin D deficiency, statin-related myopathy and other links with vascular risk. *Current medical research and opinion*. 2011 Sep;27(9):1691-2. PubMed PMID: 21740109.
8. Motiwala SR, Wang TJ. Vitamin D and cardiovascular risk. *Current hypertension reports*. 2012 Jun;14(3):209-18. PubMed PMID: 22457243.
9. Siadat ZD, Kiani K, Sadeghi M, Shariat AS, Farajzadegan Z, Kheirmand M. Association of vitamin D deficiency and coronary artery disease with cardiovascular risk factors. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2012 Nov;17(11):1052-5. PubMed PMID: 23833580. Pubmed Central PMCID: 3702087.
10. Kienreich K, Tomaschitz A, Verheyen N, Pieber T, Gaksch M, Grubler MR, et al. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients*. 2013 Jul 31;5(8):3005-21. PubMed PMID: 23912328. Pubmed Central PMCID: 3775239.
11. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. PubMed PMID: 12490960.
12. Rose N, Afanasyeva M. Autoimmunity: busting the atherosclerotic plaque. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):641-2. PubMed PMID: 12778153.
13. Sommer G, Kralisch S, Stangl V, Vietzke A, Kohler U, Stepan H, et al. Secretory products from human adipocytes stimulate proinflammatory cytokine secretion from human endothelial cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2009 Mar 01;106(4):729-37. PubMed PMID: 19173302.
14. Mangge H, Weghuber D, Prassl R, Haara A, Schnedl W, Postolache TT, et al. The Role of Vitamin D in Atherosclerosis Inflammation Revisited: More a Bystander than a Player? *Current vascular pharmacology*. 2015;13(3):392-8. PubMed PMID: 24329737.
15. Zuk A, Fitzpatrick T, Rosella LC. Effect of Vitamin D3 Supplementation on Inflammatory Markers and Glycemic Measures among Overweight or Obese Adults: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *PloS one*. 2016;11(4):e0154215. PubMed PMID: 27116227. Pubmed Central PMCID: 4846157.
16. Paul K, Franke S, Nadal J, Schmid M, Yilmaz A, Kretzschmar D, et al. Inflammation, vitamin D and dendritic cell precursors in chronic kidney disease. *Clinical and experimental immunology*. 2016 Oct;186(1):86-95. PubMed PMID: 27414487. Pubmed Central PMCID: 5011369.
17. Goncalves de Carvalho CM, Ribeiro SM. Aging, low-grade systemic inflammation and vitamin D: a mini-review. *European journal of clinical nutrition*. 2017 Apr;71(4):434-40. PubMed PMID: 27677370.
18. Agbalalah T, Hughes SF, Freeborn EJ, Mushtaq S. Impact of vitamin D supplementation on endothelial and inflammatory markers in adults: A systematic review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017 Jan 23. PubMed PMID: 28126565.

19. Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2012 Feb;71(1):50-61. PubMed PMID: 21849106.
20. Arnson Y, Itzhaky D, Mosseri M, Barak V, Tzur B, Agmon-Levin N, et al. Vitamin D inflammatory cytokines and coronary events: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2013 Oct;45(2):236-47. PubMed PMID: 23314982.
21. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Annals of internal medicine*. 2010 Jun 01;152(11):726-32. PubMed PMID: 20335313.
22. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001 May 16;285(19):2486-97. PubMed PMID: 11368702.
23. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2005 Jul;16(7):713-6. PubMed PMID: 15776217.
24. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Jul;84(1):18-28. PubMed PMID: 16825677.
25. Shetty G, Beasley GM, Sparks S, Barfield M, Masoud M, Mosca PJ, et al. Plasma cytokine analysis in patients with advanced extremity melanoma undergoing isolated limb infusion. *Annals of surgical oncology*. 2013 Apr;20(4):1128-35. PubMed PMID: 23456379. Pubmed Central PMCID: 4222579.
26. Bortman P, Folgueira MA, Katayama ML, Snitcovsky IM, Brentani MM. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells: a mini review. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2002 Jan;35(1):1-9. PubMed PMID: 11743608.
27. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Apr;83(4):754-9. PubMed PMID: 16600924.
28. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepany T, et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Annals of the rheumatic diseases*. 2010 Jun;69(6):1155-7. PubMed PMID: 20439290.
29. Cutolo M, Pizzorni C, Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity reviews*. 2011 Dec;11(2):84-7. PubMed PMID: 21864722.

30. Agmon-Levin N, Kivity S, Tzioufas AG, Lopez Hoyos M, Rozman B, Efes I, et al. Low levels of vitamin-D are associated with neuropathy and lymphoma among patients with Sjogren's syndrome. *Journal of autoimmunity*. 2012 Sep;39(3):234-9. PubMed PMID: 22835660.
31. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of internal medicine*. 2007 Sep 10;167(16):1730-7. PubMed PMID: 17846391.
32. Mellenthin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Volzke H, Nauck M, Hannemann A. Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population. *Metabolism: clinical and experimental*. 2014 Aug;63(8):1056-62. PubMed PMID: 24928661.
33. Cutolo M, Otsa K. Review: vitamin D, immunity and lupus. *Lupus*. 2008 Jan;17(1):6-10. PubMed PMID: 18089676.
34. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scandinavian journal of immunology*. 2008 Sep;68(3):261-9. PubMed PMID: 18510590.
35. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, Amado JA, Cacho PM, Martinez-Taboada VM. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *Journal of leukocyte biology*. 2012 May;91(5):829-38. PubMed PMID: 22345707.
36. Aly MG, Opelz G, Daniel V. Vitamin D and Th17 Lymphocytes. *Transplantation*. 2017 Mar 22. PubMed PMID: 28333864.
37. Szymczak I, Pawliczak R. The Active Metabolite of Vitamin D3 as a Potential Immunomodulator. *Scandinavian journal of immunology*. 2016 Feb;83(2):83-91. PubMed PMID: 26678915.
38. Chandler PD, Scott JB, Drake BF, Ng K, Manson JE, Rifai N, et al. Impact of vitamin D supplementation on inflammatory markers in African Americans: results of a four-arm, randomized, placebo-controlled trial. *Cancer prevention research*. 2014 Feb;7(2):218-25. PubMed PMID: 24327720. Pubmed Central PMCID: 4038929.
39. Wood AD, Secombes KR, Thies F, Aucott L, Black AJ, Mavroei A, et al. Vitamin D3 supplementation has no effect on conventional cardiovascular risk factors: a parallel-group, double-blind, placebo-controlled RCT. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Oct;97(10):3557-68. PubMed PMID: 22865902.
40. Duggan C, de Dieu Tapsoba J, Mason C, Imayama I, Korde L, Wang CY, et al. Effect of Vitamin D3 Supplementation in Combination with Weight Loss on Inflammatory Biomarkers in Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *Cancer prevention research*. 2015 Jul;8(7):628-35. PubMed PMID: 25908506. Pubmed Central PMCID: 4491001.
41. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003 Jan;88(1):157-61. PubMed PMID: 12519845.

42. Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, et al. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Mar;89(3):1196-9. PubMed PMID: 15001609.
43. McGill AT, Stewart JM, Lithander FE, Strik CM, Poppitt SD. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutrition journal*. 2008 Jan 28;7:4. PubMed PMID: 18226257. Pubmed Central PMCID: 2265738.
44. Taheri E, Saedisomeolia A, Djalali M, Qorbani M, Madani Civi M. The relationship between serum 25-hydroxy vitamin D concentration and obesity in type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2012 Sep 21;11(1):16. PubMed PMID: 23497722. Pubmed Central PMCID: 3598176.
45. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2000 Sep;72(3):690-3. PubMed PMID: 10966885.
46. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*. 2008 Feb;33(1):90-4. PubMed PMID: 18338271. Pubmed Central PMCID: 2839878.
47. Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *The British journal of nutrition*. 2012 Dec 14;108(11):1915-23. PubMed PMID: 23046765.
48. Barker T, Martins TB, Hill HR, Kjeldsberg CR, Henriksen VT, Dixon BM, et al. Different doses of supplemental vitamin D maintain interleukin-5 without altering skeletal muscle strength: a randomized, double-blind, placebo-controlled study in vitamin D sufficient adults. *Nutrition & metabolism*. 2012 Mar 09;9(1):16. PubMed PMID: 22405472. Pubmed Central PMCID: 3325895.
49. Khoo AL, Chai LY, Koenen HJ, Sweep FC, Joosten I, Netea MG, et al. Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clinical and experimental immunology*. 2011 Apr;164(1):72-9. PubMed PMID: 21323660. Pubmed Central PMCID: 3074219.
50. Gynther P, Toropainen S, Matilainen JM, Seuter S, Carlberg C, Vaisanen S. Mechanism of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-dependent repression of interleukin-12B. *Biochimica et biophysica acta*. 2011 May;1813(5):810-8. PubMed PMID: 21310195.
51. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Stocklin E, Sidelnikov E, Willett WC, Edel JO, et al. Oral supplementation with 25(OH)D3 versus vitamin D3: effects on 25(OH)D levels, lower extremity function, blood pressure, and markers of innate immunity. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2012 Jan;27(1):160-9. PubMed PMID: 22028071.
52. Yusupov E, Li-Ng M, Pollack S, Yeh JK, Mikhail M, Aloia JF. Vitamin d and serum cytokines in a randomized clinical trial. *International journal of endocrinology*. 2010;2010. PubMed PMID: 20871847. Pubmed Central PMCID: 2943086.

53. Waterhouse M, Tran B, Ebeling PR, English DR, Lucas RM, Venn AJ, et al. Effect of vitamin D supplementation on selected inflammatory biomarkers in older adults: a secondary analysis of data from a randomised, placebo-controlled trial. *The British journal of nutrition*. 2015 Sep 14;114(5):693-9. PubMed PMID: 26206095.
54. Clendenen TV, Koenig KL, Arslan AA, Lukanova A, Berrino F, Gu Y, et al. Factors associated with inflammation markers, a cross-sectional analysis. *Cytokine*. 2011 Dec;56(3):769-78. PubMed PMID: 22015105. Pubmed Central PMCID: 3245985.



## **5. Conclusão**

Em mulheres na pós-menopausa com deficiência de vitamina D, a suplementação diária e isolada de 1.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> por 10 meses associou-se com redução nos marcadores pró-inflamatórios.

## 6. Referências

1. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil: tábua completa de mortalidade - 2014. Coordenação de População e Indicadores Sociais - COPIS, editor. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica - GEADD.
2. DATASUS. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. IBGE Dados do Censo 2010 Rio de Janeiro: IBGE; 2010. Disponível em: [www.censo2010.ibge.gov.br](http://www.censo2010.ibge.gov.br).
3. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation*. 2007 Mar 20;115(11):1481-501. PubMed PMID: 17309915.
4. He L, Tang X, Li N, Wu YQ, Wang JW, Li JR, et al. Menopause with cardiovascular disease and its risk factors among rural Chinese women in Beijing: a population-based study. *Maturitas*. 2012 Jun;72(2):132-8. PubMed PMID: 22445219.
5. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001 May 16;285(19):2486-97. PubMed PMID: 11368702.
6. Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG, Liu S, Willett WC, Speizer FE, et al. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. *Archives of internal medicine*. 2001 Jul 23;161(14):1717-23. PubMed PMID: 11485504.
7. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes care*. 2004 Oct;27(10):2444-9. PubMed PMID: 15451914.
8. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004 Sep 11-17;364(9438):937-52. PubMed PMID: 15364185.
9. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005 Nov 05;366(9497):1640-9. PubMed PMID: 16271645.
10. Ezzati M, Oza S, Danaei G, Murray CJ. Trends and cardiovascular mortality effects of state-level blood pressure and uncontrolled hypertension in the United States. *Circulation*. 2008 Feb 19;117(7):905-14. PubMed PMID: 18268146.
11. Correa PC, Barreto SM, Passos VM. Smoking-attributable mortality and years of potential life lost in 16 Brazilian capitals, 2003: a prevalence-based study. *BMC public health*. 2009 Jun 26;9:206. PubMed PMID: 19558658. Pubmed Central PMCID: 2711948.
12. Orsatti FL, Nahas EA, Orsatti CL, de Oliveira EP, Nahas-Neto J, da Mota GR, et al. Muscle mass gain after resistance training is inversely correlated with trunk adiposity gain in postmenopausal women. *Journal of strength and conditioning research*. 2012 Aug;26(8):2130-9. PubMed PMID: 21986696.

13. Campbell PT, Newton CC, Patel AV, Jacobs EJ, Gapstur SM. Diabetes and cause-specific mortality in a prospective cohort of one million U.S. adults. *Diabetes care*. 2012 Sep;35(9):1835-44. PubMed PMID: 22699290. Pubmed Central PMCID: 3425000.
14. Nahas EA, Andrade AM, Jorge MC, Orsatti CL, Dias FB, Nahas-Neto J. Different tools for estimating cardiovascular risk in Brazilian postmenopausal women. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2013 Oct;29(10):921-5. PubMed PMID: 23895300.
15. Nahas EA, Nahas-Neto J, Orsatti CL, Tardivo AP, Uemura G, Peracoli MT, et al. The 60- and 70-kDa heat-shock proteins and their correlation with cardiovascular risk factors in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Cell stress & chaperones*. 2014 Jul;19(4):559-68. PubMed PMID: 24327239. Pubmed Central PMCID: 4041947.
16. Drewnowski A. Nutrition transition and global dietary trends. *Nutrition*. 2000 Jul-Aug;16(7-8):486-7. PubMed PMID: 10906531.
17. De Caterina R, Zampolli A, Del Turco S, Madonna R, Massaro M. Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Feb;83(2):421S-6S. PubMed PMID: 16470006.
18. Pines A. Lifestyle and diet in postmenopausal women. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2009;12 Suppl 1:62-5. PubMed PMID: 19811244.
19. Tardivo AP, Nahas-Neto J, Nahas EA, Maesta N, Rodrigues MA, Orsatti FL. Associations between healthy eating patterns and indicators of metabolic risk in postmenopausal women. *Nutrition journal*. 2010 Dec 08;9:64. PubMed PMID: 21143838. Pubmed Central PMCID: 3004808.
20. Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, Li TY, Hu FB. Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women. *Circulation*. 2008 Apr 01;117(13):1658-67. PubMed PMID: 18362231.
21. Burke GL, Bertoni AG, Shea S, Tracy R, Watson KE, Blumenthal RS, et al. The impact of obesity on cardiovascular disease risk factors and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Archives of internal medicine*. 2008 May 12;168(9):928-35. PubMed PMID: 18474756. Pubmed Central PMCID: 2931579.
22. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006 Jul;37(7):1923-32. PubMed PMID: 16741184.
23. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nature medicine*. 2002 Nov;8(11):1249-56. PubMed PMID: 12411952.
24. Orlandi A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Spagnoli LG. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006 Oct;188(2):221-30. PubMed PMID: 16487530.
25. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. PubMed PMID: 12490960.

26. Olivieri F, Antonicelli R, Cardelli M, Marchegiani F, Cavallone L, Mocchegiani E, et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and myocardial infarction in the elderly. Mechanisms of ageing and development. 2006 Jun;127(6):552-9. PubMed PMID: 16516951.
27. Lu X, Kakkar V. The role of heat shock protein (HSP) in atherosclerosis: Pathophysiology and clinical opportunities. Current medicinal chemistry. 2010;17(10):957-73. PubMed PMID: 20156167.
28. Rose N, Afanasyeva M. Autoimmunity: busting the atherosclerotic plaque. Nature medicine. 2003 Jun;9(6):641-2. PubMed PMID: 12778153.
29. Sommer G, Kralisch S, Stangl V, Vietzke A, Kohler U, Stepan H, et al. Secretory products from human adipocytes stimulate proinflammatory cytokine secretion from human endothelial cells. Journal of cellular biochemistry. 2009 Mar 01;106(4):729-37. PubMed PMID: 19173302.
30. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. The American journal of cardiology. 2006 Jul 01;98(1):121-8. PubMed PMID: 16784934.
31. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. Circulation. 2003 Jan 28;107(3):363-9. PubMed PMID: 12551853.
32. Wilson AM, Ryan MC, Boyle AJ. The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: risk marker or pathogen. International journal of cardiology. 2006 Jan 26;106(3):291-7. PubMed PMID: 16337036.
33. Wong E, Freiberg M, Tracy R, Kuller L. Epidemiology of cytokines: the Women On the Move through Activity and Nutrition (WOMAN) Study. American journal of epidemiology. 2008 Aug 15;168(4):443-53. PubMed PMID: 18579536. Pubmed Central PMCID: 2727275.
34. Jawien J. New insights into immunological aspects of atherosclerosis. Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej. 2008 Mar;118(3):127-31. PubMed PMID: 18476459.
35. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clinical chemistry. 2008 Jan;54(1):24-38. PubMed PMID: 18160725.
36. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. The New England journal of medicine. 2011 Jan 20;364(3):248-54. PubMed PMID: 21247315.
37. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. The American journal of clinical nutrition. 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S. PubMed PMID: 15585789.
38. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2005 Jul;16(7):713-6. PubMed PMID: 15776217.
39. Holick MF. Vitamin D deficiency. The New England journal of medicine. 2007 Jul 19;357(3):266-81. PubMed PMID: 17634462.

40. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004 May;89-90(1-5):187-93. PubMed PMID: 15225770.
41. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKey reports*. 2014;3:495. PubMed PMID: 24605212. Pubmed Central PMCID: 3944126.
42. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, Boonen S, Burckhardt P, Fuleihan GE, et al. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010 Jul;21(7):1151-4. PubMed PMID: 20422154.
43. Hanley DA, Cranney A, Jones G, Whiting SJ, Leslie WD, Cole DE, et al. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2010 Sep 07;182(12):E610-8. PubMed PMID: 20624868. Pubmed Central PMCID: 2934850.
44. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011 Jul;96(7):1911-30. PubMed PMID: 21646368.
45. Holick MF. The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clinical chemistry*. 2010 May;56(5):729-31. PubMed PMID: 20348405.
46. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet*. 2007 Aug 25;370(9588):657-66. PubMed PMID: 17720017.
47. Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *The British journal of nutrition*. 2014 Jan 14;111(1):23-45. PubMed PMID: 23930771.
48. Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *Journal of internal medicine*. 2006 Sep;260(3):245-54. PubMed PMID: 16918822.
49. Russo LA, Gregorio LH, Lacativa PG, Marinheiro LP. [Concentration of 25-hydroxyvitamin D in postmenopausal women with low bone mineral density]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009 Dec;53(9):1079-87. PubMed PMID: 20126865. Concentracao plasmatica de 25 hidroxivitamina D em mulheres na pos-menopausa com baixa densidade mineral ossea.
50. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhaes MC, Sasaki AL, dos Reis LM, et al. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? *Clinical nutrition*. 2010 Dec;29(6):784-8. PubMed PMID: 20637530.
51. 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 endocrine disorders*. 2013 Apr 29;13:14. PubMed PMID: 23627369. Pubmed Central PMCID: 3645955.

52. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S-88S. PubMed PMID: 15585788.
53. Rosen CJ, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Apr;97(4):1146-52. PubMed PMID: 22442278.
54. Mason RS. Vitamin D: a hormone for all seasons. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2011 Apr;14(2):197-203. PubMed PMID: 20964549.
55. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Jul;84(1):18-28. PubMed PMID: 16825677.
56. Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *The British journal of nutrition*. 2012 Dec 14;108(11):1915-23. PubMed PMID: 23046765.
57. Forman JP, Curhan GC, Taylor EN. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension among young women. *Hypertension*. 2008 Nov;52(5):828-32. PubMed PMID: 18838623. Pubmed Central PMCID: 2747298.
58. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008 Jan 29;117(4):503-11. PubMed PMID: 18180395. Pubmed Central PMCID: 2726624.
59. Vacek JL, Vanga SR, Good M, Lai SM, Lakkireddy D, Howard PA. Vitamin D deficiency and supplementation and relation to cardiovascular health. *The American journal of cardiology*. 2012 Feb 01;109(3):359-63. PubMed PMID: 22071212.
60. Strange RC, Shipman KE, Ramachandran S. Metabolic syndrome: A review of the role of vitamin D in mediating susceptibility and outcome. *World journal of diabetes*. 2015 Jul 10;6(7):896-911. PubMed PMID: 26185598. Pubmed Central PMCID: 4499524.
61. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003 Jan;88(1):157-61. PubMed PMID: 12519845.
62. Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, et al. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Mar;89(3):1196-9. PubMed PMID: 15001609.
63. McGill AT, Stewart JM, Lithander FE, Strik CM, Poppitt SD. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutrition journal*. 2008 Jan 28;7:4. PubMed PMID: 18226257. Pubmed Central PMCID: 2265738.
64. Taheri E, Saedisomeolia A, Djalali M, Qorbani M, Madani Civi M. The relationship between serum 25-hydroxy vitamin D concentration and obesity in type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2012 Sep 21;11(1):16. PubMed PMID: 23497722. Pubmed Central PMCID: 3598176.

65. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2000 Sep;72(3):690-3. PubMed PMID: 10966885.
66. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*. 2008 Feb;33(1):90-4. PubMed PMID: 18338271. Pubmed Central PMCID: 2839878.
67. Parker J, Hashmi O, Dutton D, Mavrodaris A, Stranges S, Kandala NB, et al. Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2010 Mar;65(3):225-36. PubMed PMID: 20031348.
68. Motiwala SR, Wang TJ. Vitamin D and cardiovascular risk. *Current hypertension reports*. 2012 Jun;14(3):209-18. PubMed PMID: 22457243.
69. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine*. 2008 Jun 23;168(12):1340-9. PubMed PMID: 18574092.
70. Katsiki N, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Vitamin D deficiency, statin-related myopathy and other links with vascular risk. *Current medical research and opinion*. 2011 Sep;27(9):1691-2. PubMed PMID: 21740109.
71. Siadat ZD, Kiani K, Sadeghi M, Shariat AS, Farajzadegan Z, Kheirmand M. Association of vitamin D deficiency and coronary artery disease with cardiovascular risk factors. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2012 Nov;17(11):1052-5. PubMed PMID: 23833580. Pubmed Central PMCID: 3702087.
72. Kienreich K, Tomaschitz A, Verheyen N, Pieber T, Gaksch M, Grubler MR, et al. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients*. 2013 Jul 31;5(8):3005-21. PubMed PMID: 23912328. Pubmed Central PMCID: 3775239.
73. Wang C. Role of vitamin d in cardiometabolic diseases. *Journal of diabetes research*. 2013;2013:243934. PubMed PMID: 23671861. Pubmed Central PMCID: 3647592.
74. Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, et al. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Annals of internal medicine*. 2010 Mar 02;152(5):307-14. PubMed PMID: 20194237. Pubmed Central PMCID: 3211092.
75. Elamin MB, Abu Elnour NO, Elamin KB, Fatourechi MM, Alkatib AA, Almandoz JP, et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011 Jul;96(7):1931-42. PubMed PMID: 21677037.
76. Brondum-Jacobsen P, Benn M, Jensen GB, Nordestgaard BG. 25-hydroxyvitamin d levels and risk of ischemic heart disease, myocardial infarction, and early death: population-based study and meta-analyses of 18 and 17 studies. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012 Nov;32(11):2794-802. PubMed PMID: 22936341.
77. Zuk A, Fitzpatrick T, Rosella LC. Effect of Vitamin D3 Supplementation on Inflammatory Markers and Glycemic Measures among Overweight or Obese Adults: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *PloS one*. 2016;11(4):e0154215. PubMed PMID: 27116227. Pubmed Central PMCID: 4846157.

78. Frouhi NG, Luan J, Cooper A, Boucher BJ, Wareham NJ. Baseline serum 25-hydroxy vitamin d is predictive of future glycemic status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. *Diabetes*. 2008 Oct;57(10):2619-25. PubMed PMID: 18591391. Pubmed Central PMCID: 2551670.
79. Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sapi Z, Ory I, Salamon F, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *European journal of endocrinology*. 2003 Aug;149(2):129-35. PubMed PMID: 12887290.
80. Cheng S, Massaro JM, Fox CS, Larson MG, Keyes MJ, McCabe EL, et al. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):242-8. PubMed PMID: 19833894. Pubmed Central PMCID: 2797928.
81. Amer M, Qayyum R. Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006). *The American journal of cardiology*. 2012 Jan 15;109(2):226-30. PubMed PMID: 21996139.
82. Arnsen Y, Itzhaky D, Mosseri M, Barak V, Tzur B, Agmon-Levin N, et al. Vitamin D inflammatory cytokines and coronary events: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2013 Oct;45(2):236-47. PubMed PMID: 23314982.
83. Mellenthin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Volzke H, Nauck M, Hannemann A. Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population. *Metabolism: clinical and experimental*. 2014 Aug;63(8):1056-62. PubMed PMID: 24928661.
84. Mangge H, Weghuber D, Prassl R, Haara A, Schnedl W, Postolache TT, et al. The Role of Vitamin D in Atherosclerosis Inflammation Revisited: More a Bystander than a Player? *Current vascular pharmacology*. 2015;13(3):392-8. PubMed PMID: 24329737.
85. Paul K, Franke S, Nadal J, Schmid M, Yilmaz A, Kretzschmar D, et al. Inflammation, vitamin D and dendritic cell precursors in chronic kidney disease. *Clinical and experimental immunology*. 2016 Oct;186(1):86-95. PubMed PMID: 27414487. Pubmed Central PMCID: 5011369.
86. Goncalves de Carvalho CM, Ribeiro SM. Aging, low-grade systemic inflammation and vitamin D: a mini-review. *European journal of clinical nutrition*. 2017 Apr;71(4):434-40. PubMed PMID: 27677370.
87. Cutolo M, Otsa K. Review: vitamin D, immunity and lupus. *Lupus*. 2008 Jan;17(1):6-10. PubMed PMID: 18089676.
88. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scandinavian journal of immunology*. 2008 Sep;68(3):261-9. PubMed PMID: 18510590.
89. Cutolo M, Pizzorni C, Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity reviews*. 2011 Dec;11(2):84-7. PubMed PMID: 21864722.



90. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, Amado JA, Cacho PM, Martinez-Taboada VM. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *Journal of leukocyte biology*. 2012 May;91(5):829-38. PubMed PMID: 22345707.
91. Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2012 Feb;71(1):50-61. PubMed PMID: 21849106.
92. Aly MG, Opelz G, Daniel V. Vitamin D and Th17 Lymphocytes. *Transplantation*. 2017 Mar 22. PubMed PMID: 28333864.
93. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009 Dec;1(6):a001651. PubMed PMID: 20457564. Pubmed Central PMCID: 2882124.
94. Szymczak I, Pawliczak R. The Active Metabolite of Vitamin D3 as a Potential Immunomodulator. *Scandinavian journal of immunology*. 2016 Feb;83(2):83-91. PubMed PMID: 26678915.
95. Chandler PD, Scott JB, Drake BF, Ng K, Manson JE, Rifai N, et al. Impact of vitamin D supplementation on inflammatory markers in African Americans: results of a four-arm, randomized, placebo-controlled trial. *Cancer prevention research*. 2014 Feb;7(2):218-25. PubMed PMID: 24327720. Pubmed Central PMCID: 4038929.
96. Karim Y, Turner C, Dalton N, Roplekar R, Sankaralingam A, Ewang M, et al. The relationship between pro-resorptive inflammatory cytokines and the effect of high dose vitamin D supplementation on their circulating concentrations. *International immunopharmacology*. 2013 Nov;17(3):693-7. PubMed PMID: 24007780.
97. Chitalia N, Ismail T, Tooth L, Boa F, Hampson G, Goldsmith D, et al. Impact of vitamin D supplementation on arterial vasomotion, stiffness and endothelial biomarkers in chronic kidney disease patients. *PloS one*. 2014;9(3):e91363. PubMed PMID: 24646518. Pubmed Central PMCID: 3960127.
98. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Apr;83(4):754-9. PubMed PMID: 16600924.
99. Agbalalah T, Hughes SF, Freeborn EJ, Mushtaq S. Impact of vitamin D supplementation on endothelial and inflammatory markers in adults: A systematic review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017 Jan 23. PubMed PMID: 28126565.
100. Mousa A, Misso M, Teede H, Scragg R, de Courten B. Effect of vitamin D supplementation on inflammation: protocol for a systematic review. *BMJ open*. 2016 Apr 05;6(4):e010804. PubMed PMID: 27048637. Pubmed Central PMCID: 4823456.
101. Ilincic B, Stokic E, Stosic Z, Kojic NE, Katsiki N, Mikhailidis DP, et al. Vitamin D status and circulating biomarkers of endothelial dysfunction and inflammation in non-diabetic obese individuals: a pilot study. *Archives of medical science : AMS*. 2017 Feb 01;13(1):53-60. PubMed PMID: 28144255. Pubmed Central PMCID: 5206365.

102. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Annals of internal medicine*. 2010 Jun 01;152(11):726-32. PubMed PMID: 20335313.

103. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*. 1972 Jun;18(6):499-502. PubMed PMID: 4337382.

104. Shetty G, Beasley GM, Sparks S, Barfield M, Masoud M, Mosca PJ, et al. Plasma cytokine analysis in patients with advanced extremity melanoma undergoing isolated limb infusion. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(4):1128-35.

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Você esta sendo convidada a participar do estudo “O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa” que será realizado sob a responsabilidade das Dras. Flávia Bueloni Dias e Priscila Ferreira Poloni e do biomédico Claudio Lera Orsatti. Este estudo deseja conhecer se o uso da vitamina D tem benefício para o coração. Como a senhora já participou de estudo anterior em que usou a Vitamina D, agora está sendo convidada a participar desta pesquisa. Sua participação será de responder a um questionário, com duração de 10 minutos. E será coletado material de sua boca com um cotonete de algodão que será passado duas vezes na bochecha. No estudo em que a senhora participou foi colhido sangue, que se encontra congelado, e com a sua autorização será utilizado para este novo estudo. Para seu conhecimento, seus dados serão confidenciais e apenas dados em conjunto serão divulgados nas publicações em revistas médicas, sem identificação da sua pessoa. Os pesquisadores responsáveis estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e sua participação é voluntária e tem o direito de receber informações adicionais sobre o estudo se achar necessário. A senhora pode retirar-se deste estudo, sem perder seus cuidados médicos. Caso não se sinta satisfeita poderá entrar em contato com os médicos responsáveis pela pesquisa e com Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu pelo telefone 14-38801608.

Eu.....tendo sido satisfatoriamente informada, concordo em participar deste estudo. Declaro ter lido e compreendido este consentimento, na qual me foram informados os dados importantes sobre este estudo. Foi-me oferecida ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram totalmente. Estou ciente de que este consentimento será produzido em duas vias iguais, em que uma será entregue a mim e outra será arquivada pelos pesquisadores.

Botucatu, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

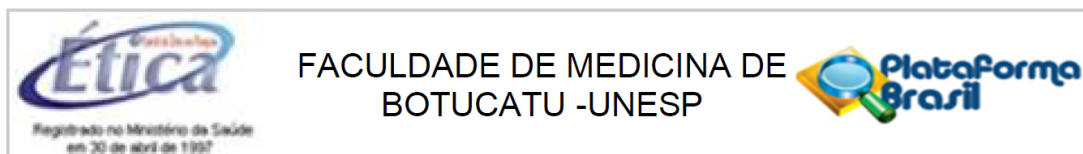
\_\_\_\_\_  
Assinatura da Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

**Flávia Bueloni Dias – email: [flaviabueloni@hotmail.com](mailto:flaviabueloni@hotmail.com) Fone 38801402**

**Priscila Ferreira Poloni- e-mail: [priscilaferr2@yahoo.com.br](mailto:priscilaferr2@yahoo.com.br) Fone:38801377**

## 7.2. Anexo II – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** O papel da Vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa - Coordenadora Eliana Aguiar Petri Nahas  
Subprojeto 1- O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores imuno-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa.  
Subprojeto 2- O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos em mulheres na pós-menopausa.  
Subprojeto 3- Associação entre a deficiência de vitamina D e os marcadores da síndrome metabólica em mulheres na pós-menopausa.

**Pesquisador:** Eliana Aguiar Petri Nahas

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 38486914.0.0000.5411

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 895.001

**Data da Relatoria:** 30/11/2014

#### Apresentação do Projeto:

A vitamina D (VD) é uma vitamina lipossolúvel, essencial para manutenção do esqueleto e para absorção de cálcio. A maior fonte de VD decorre da ativação na pele do composto 7-deidrocolesterol a partir da exposição aos raios UVB. A forma ativa da VD, a 1,25-diidroxivitamina D, regula a transcrição de número expressivo de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea. A VD também modula a

transcrição de células do ciclo protéico que diminuem a proliferação celular e aumentam sua diferenciação (precursores de osteoclastos, enterócitos e queratinócitos). A dosagem de 25(OH)D é adequada para se avaliar e monitorizar o status nutricional de VD no organismo humano, pois os valores plasmáticos são os principais indicadores das reservas corporais. Reconhece-se que a deficiência de VD é condição médica frequente em

todo mundo. Caracterizam-se como hipovitaminose D concentrações plasmáticas de 25(OH)D abaixo do limiar de 30ng/ml, ou seja, do limiar considerado suficiente para manutenção da

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Telefone:** (14)3880-1608

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

secreção normal de paratormônio (PTH) pelas paratireóides. A relevante função desempenhada pela VD sobre a massa óssea está bem definida, contudo efeitos extra-ósseos da VD sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatórios estão sob investigação atual. A deficiência de vitamina D e o aumento na prevalência da obesidade são considerados importantes questões de saúde pública. Evidências recentes sugerem o envolvimento da VD em diversas doenças crônicas não transmissíveis com obesidade, hipertensão, diabetes e conseqüentemente a síndrome metabólica e a doença cardiovascular (DCV), principal causa de morte em mulheres na pós-menopausa.

No sistema cardiovascular foram encontrados receptores de VD no músculo liso vascular, no endotélio, e nos cardiomiócitos. Evidências que sugerem que a deficiência de VD é potencial fator de risco DCV. Os metabólitos de VD também influenciam a produção de adipocitocinas e a resposta inflamatória no tecido adiposo. Assim, a deficiência de VD pode comprometer o funcionamento metabólico normal do tecido adiposo. E pela

importância do tecido adiposo no balanço de energia, no metabolismo de lipídios e na inflamação da obesidade, a concentração de VD pode ter impacto significativo na manutenção da saúde cardiometabólica. Apesar de algumas evidências sobre a associação de níveis séricos de vitamina D com síndrome metabólica na população geral, dados em mulheres na pós-menopausa são escassos. A VD parece interagir com o sistema

imunológico através da regulação e diferenciação de células como linfócitos, macrófagos e células natural killer (NK), além de interferir na produção de citocinas in vivo e in vitro. O efeito da suplementação de VD sobre marcadores imuno-inflamatórios é incerto. Poucas pesquisas com resultados controversos foram realizados para avaliar a interação entre VD e marcadores inflamatórios.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Geral: avaliar o papel da Vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatório em mulheres na pós-menopausa

Subprojeto 1- "O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores imuno-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa". Flávia Bueloni Dias (Doutorado), Claudio Lera Orsatti (Pós-Doutorado e Co-orientador), Eliana Aguiar Petri Nahas (Orientadora e Supervisora).

Objetivos específicos: Avaliar a presença de polimorfismos do gene do receptor de vitamina D (VDR) e o efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores imuno-inflamatórios do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.

Subprojeto 2- "O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores

<b>Endereço:</b> Chácara Butignolli , s/n	
<b>Bairro:</b> Rubião Junior	<b>CEP:</b> 18.618-970
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BOTUCATU
<b>Telefone:</b> (14)3880-1608	<b>E-mail:</b> capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 895.001

cardiometabólicos em mulheres na pós-menopausa”. Priscila Ferreira Poloni (Doutorado) e Eliana Aguiar Petri Nahas (Orientadora).

Objetivo específico: Investigar o efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores metabólicos do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.

Subprojeto 3- “Associação entre a deficiência de vitamina D e os marcadores da síndrome metabólica em mulheres na pós-menopausa”. Eneida Boteon Schmitt (Mestrado) e Eliana Aguiar Petri Nahas (Orientadora).

Objetivo específico: Estudar a associação entre a deficiência de vitamina D e os marcadores da síndrome metabólica em mulheres na pós-menopausa.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Para os subprojetos 1 e 2, risco de desconforto relacionado a coleta das células bucais pelo swab de algodão. Para o subprojeto 3 não se observam riscos inerentes ao estudo proposto por tratar-se de estudo retrospectivo de análise de dados de prontuário.

Benefícios:

Espera-se que com o projeto de associação entre suplementação de vitamina D e os marcadores de doença cardiovascular em mulheres na pós-menopausa possamos identificar os efeitos da suplementação sobre o perfil cardiometabólico e imune-inflamatório da doença cardiovascular em mulheres na pós-menopausa. E poderemos associar a presença de polimorfismos do gene VDR aos componentes da síndrome metabólica. Assim, tentar avaliar qual a concentração de 25(OH)D que se relaciona aos efeitos extra-ósseos da vitamina D.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Para os sub-projetos 1 e 2, serão utilizados dados coletados de 160 mulheres participantes de ensaio clínico, duplo-cego, placebo-controlado, randomizado, que avaliou o efeito da suplementação isolada de VD (1000IU/dia) já realizado e aprovado pelo CEP em 3/10/2011, Of. 456/2011. E o sub-projeto 3 trata-se de estudo de retrospectivo de corte transversal com análise de dados dos prontuários de aproximadamente 250 pacientes atendidas no Ambulatório de Climatério & Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP nos anos de 2012 a 2014. No ensaio clínico já realizado foram incluídas 160 mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade 45 anos que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE. E foram

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 895.001

excluídas aquelas com DAC manifesta atual ou prévia; doença arterial cerebrovascular; doença aneurismática; doença arterial periférica; doença renal crônica; diabetes insulínica; doença hepática; doenças autoimunes; etilista ou

drogaditas; uso de doses farmacológicas de VD. Foram preenchidos protocolos e coletados por meio de entrevista dados clínicos que serão utilizados nos sub-projetos 1 e 2: idade, idade da menopausa, tempo de menopausa, paridade, tabagismo atual, uso de terapia hormonal, histórico de doenças crônicas (hipertensão, diabetes, doença cardiovascular), uso de medicamentos, atividade física, pressão arterial, peso e altura. As

pacientes do projeto aprovado pelo CEP em 3/10/2011, Of. 456/2011, foram randomizadas, em seqüência de numeração pré-estabelecida, em dois grupos: VD, com suplementação de vitamina D (n=80) e PL, usuárias de placebo (n=80). Os investigadores e as pacientes não tiveram conhecimento prévio dos referidos grupos e das diferentes numerações, apenas o farmacêutico responsável pela manipulação do placebo. Assim, 80 pacientes receberam 1000UI de VD, 5 gotas via oral (cada gota contém 200UI), durante 6 meses. As outras 80 pacientes receberam placebo (composição de água e óleo mineral com essência de limão), com mesma característica e sabor, 5 gotas, via oral. Os frascos foram idênticos, embalados e numerados em código pelo farmacêutico para não identificação do grupo pelos participantes do estudo. O tempo de seguimento foi de 9 meses. Foi realizada avaliação do perfil lipídico e glicídico pela mensuração do colesterol total (CT), HDL,

LDL, triglicerídeos (TG), glicemia de jejum e 25(OH)D. A partir desses dados serão preenchidos os protocolos dos sub-projetos 1 e 2 com os valores laboratoriais constantes nos prontuários. Assim como foram obtidos 20 ml de sangue, que foram centrifugadas por 10 min (3.000 rpm). O soro obtido foi separado em 2 amostras congeladas a -80C, e que serão utilizadas nos atuais sub-projetos 1 e 2 para determinação do perfil imuno-inflamatório,

que constará da dosagem de citocinas, HSP 60 e 70, RBP4, moléculas de adesão celular (ICAM-1 e VCAM-1) e óxido nítrico (NO). Para essas 160 participantes do estudo anterior, será agendada nova entrevista em que serão coletadas células bucais com swabs de algodão e estocadas (-80°C) para posterior avaliação do polimorfismo da receptor de vitamina D (VDR). Para o sub-projeto 3 será realizada análise de prontuários das mulheres que foram atendidas entre 2012 a 2014. Serão incluídas 250 mulheres na pós-menopausa com diagnóstico de síndrome metabólica (SM) de acordo com os critérios diagnósticos do NCEP/ATP III: circunferência da cintura > 88 cm; triglicerídeos > 150 mg/dL; HDL colesterol 50 mg/dL; pressão arterial sanguínea > 135/85 mmHg; glicemia de jejum > 100 mg/dL ou sob terapia; e 150 mulheres sem SM, que realizaram

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br





Continuação do Parecer: 895.001

dosagem de 25-OHvitamina

D, na rotina ambulatorial. O projeto foi encaminhado a FAPESP como projeto regular auxílio a pesquisa (Processo 2014/19382-3) e bolsa de pós-doutorado (Processo 2014/15767-8).

**Critério de Inclusão:**

Para os sub-projetos 1 e 2 serão incluídas as 160 mulheres que participaram do ensaio clínico, duplo-cego, placebo-controlado, randomizado, que avaliou o efeitos da suplementação isolada de VD (1000IU/dia) já realizado e aprovado pelo CEP em 3/10/2011, Of. 456/2011. Para o subprojeto 3 serão avaliados os prontuários de 250 mulheres atendidas no Ambulatório de Climatério & Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu

(FMB) – UNESP nos anos de 2012 a 2014, com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade 45 anos, com ou sem diagnóstico de síndrome metabólica.

**Critério de Exclusão:**

Para os sub-projetos 1 e 2 foram excluídas mulheres com DAC manifesta atual ou prévia; doença arterial cerebrovascular; doença aneurismática; doença arterial periférica; doença renal crônica; diabetes insulínica; doença hepática; doenças autoimunes; etilista ou drogaditas; uso de doses farmacológicas de VD. Para o sub-projeto 3 serão excluídos da avaliação dos prontuários, mulheres na perimenopausa, idade 45 anos e que não apresentem todos os dados avaliados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Constam anexados ao processo os termos necessários à aprovação do estudo.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto tem fundamentação científica e está adequado à Resolução CNS/MS 466/12.

Sugiro sua aprovação sem necessidade de envio à Conep.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP em reunião de 01 de Dezembro de 2.014 APROVOU o presente projeto de pesquisa na seguinte conformidade:

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br





FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 895.001

Projeto Mãe: O papel da Vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa sobre Coordenação da Profª Eliana Aguiar Petri Nahas. Este Projeto contém 3 sub-projetos à saber:

Subprojeto 1- O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores imuno-inflamatórios em mulheres na pós-menopausa, a ser conduzido por Flávia Bueloni Dias (Doutorado), orientada pela Profª Eliana Aguiar Petri Nahas, (Pós Doutorado e Co-orientador) - Claudio Lera Orsatti.

Subprojeto 2- O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos em mulheres na pós-menopausa, a ser conduzido por Priscila Ferreira Poloni (Doutorado), orientada pela Profª Eliana Aguiar Petri Nahas.

Subprojeto 3- Associação entre a deficiência de vitamina D e os marcadores da síndrome metabólica em mulheres na pós-menopausa, a ser conduzido por Eneida Boteon Schmidt, (Mestrado), orientada pela Profª Eliana Aguiar Petri Nahas.

O CEP solicita aos pesquisadores que ao final de cada projeto seu enviado para análise seus respectivos "Relatórios Finais de Atividades".

BOTUCATU, 02 de Dezembro de 2014

---

Assinado por:

**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

## 7.2. Anexo III – CONSORT 2010



### Lista de informações CONSORT 2010 para incluir no relatório de um estudo randomizado

Seção/Tópico	Item No	Itens da Lista	Relatado na pg No
<b>Título e Resumo</b>			
	1a	Identificar no título como um estudo clínico randomizado	_____
	1b	Resumo estruturado de um desenho de estudo, métodos, resultados e conclusões para orientação específica, consulte CONSORT para resumos	_____
<b>Introdução</b>			
Fundamentação e objetivos	2a	Fundamentação científica e explicação do raciocínio	_____
	2b	Objetivos específicos ou hipóteses	_____
<b>Métodos</b>			
Desenho do estudo	3a	Descrição do estudo clínico (como paralelo, factorial) incluindo a taxa de alocação	_____
	3b	Alterações importantes nos métodos após ter iniciado o estudo clínico (como critérios de elegibilidade), com as razões	_____
Participantes	4a	Crítérios de elegibilidade para participantes	_____
	4b	Informações e locais de onde foram coletados os dados	_____
Intervenções	5	As intervenções de cada grupo com detalhes suficientes que permitam a replicação, incluindo como e quando eles foram realmente administrados	_____
Desfechos	6a	Medidas completamente pré-especificadas definidas de desfechos primários e secundários, incluindo como e quando elas foram avaliadas	_____
	6b	Quaisquer alterações nos desfechos após o estudo clínico ter sido iniciado, com as razões	_____
Tamanho da amostra	7a	Como foi determinado o tamanho da amostra	_____
	7b	Quando aplicável, deve haver uma explicação de qualquer análise de interim e diretrizes de encerramento	_____
<b>Randomização:</b>			
Seqüência geração	8a	Método utilizado para geração de seqüência randomizada de alocação	_____
	8b	Tipos de randomização, detalhes de qualquer restrição (tais como randomização por blocos e tamanho do bloco)	_____
Alocação mecanismo de ocultação	9	Mecanismo utilizado para implementar a seqüência de alocação randomizada (como recipientes numerados seqüencialmente), descrevendo os passos seguidos para a ocultação da seqüência até as intervenções serem atribuídas	_____
Implementação	10	Quem gerou a seqüência de alocação randomizada, quem inscreveu os participantes e quem atribuiu as intervenções aos participantes	_____
Cegamento	11a	Se realizado, quem foi cegado após as intervenções serem atribuídas (ex. Participantes, cuidadores, assessores de resultado) e como	_____
	11b	Se relevante, descrever a semelhança das intervenções	_____
Métodos estatísticos	12a	Métodos estatísticos utilizados para comparar os grupos para desfechos primários e secundários	_____
	12b	Métodos para análises adicionais, como análises de subgrupo e análises ajustadas	_____
<b>Resultados</b>			
Fluxo de participantes (é fortemente recomendado a utilização de um diagrama)	13a	Para cada grupo, o número de participantes que foram randomicamente atribuídos, que receberam o tratamento pretendido e que foram analisados para o desfecho primário	_____
	13b	Para cada grupo, perdas e exclusões após a randomização, junto com as razões	_____
Recrutamento	14a	Definição das datas de recrutamento e períodos de acompanhamento	_____
	14b	Dizer os motivos de o estudo ter sido finalizado ou interrompido	_____
Dados de Base	15	Tabela apresentando os dados de base demográficos e características clínicas de cada grupo	_____
	16	Para cada grupo, número de participantes (denominador) incluídos em cada análise e se a análise foi realizada pela atribuição original dos grupos	_____
Desfechos e estimativa	17a	Para cada desfecho primário e secundário, resultados de cada grupo e o tamanho efetivo estimado e sua precisão (como intervalo de confiança de 95%)	_____
	17b	Para desfechos binários, é recomendada a apresentação de ambos os tamanhos de efeito, absolutos e relativos	_____
Análises auxiliares	18	Resultados de quaisquer análises realizadas, incluindo análises de subgrupos e análises ajustadas, distinguindo-se as pré-especificadas das exploratórias	_____
Danos	19	Todos os importantes danos ou efeitos indesejados em cada grupo (observar a orientação específica CONSORT para danos)	_____
<b>Discussão</b>			
Limitações	20	Limitações do estudo clínico, abordando as fontes dos potenciais vieses, imprecisão, e, se relevante, relevância das análises	_____
Generalização	21	Generalização (validade externa, aplicabilidade) dos achados do estudo clínico	_____
	22	Interpretação consistente dos resultados, balanço dos benefícios e danos, considerando outras evidências relevantes	_____
<b>Outras informações</b>			
Registro	23	Número de inscrição e nome do estudo clínico registrado	_____
Protocolo	24	Onde o protocolo completo do estudo clínico pode ser acessado, se disponível	_____
Fomento	25	Fontes de financiamento e outros apoios (como abastecimento de drogas), papel dos financiadores	_____

\* Recomendamos fortemente a leitura desta norma em conjunto com o CONSORT 2010. Explicação e Elaboração de esclarecimentos importantes de todos os itens. Se relevante, também recomendamos a leitura das extensões do CONSORT para estudos cluster randomizados, estudos de não-inferioridade e de equivalência, tratamentos não-farmacológicos, intervenções de ervas e estudos pragmáticos. Extensões adicionais estão por vir: para aquelas e até dados de referências relevantes a esta lista de informações, ver [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org).