



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

PRISCILA FERREIRA POLONI

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

TESE

Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahas

Botucatu

2018

PRISCILA FERREIRA POLONI

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

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus 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

**Botucatu
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Poloni, Priscila Ferreira.

O efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos em mulheres na pós-menopausa / Priscila Ferreira Poloni. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Eliana Aguiar Petri Nahás
Capes: 40101150

1. Menopausa. 2. Pós-menopausa. 3. Vitamina D. 4. Síndrome metabólica. 5. Sistema cardiovascular - Doenças.

Palavras-chave: menopausa; síndrome metabólica; vitamina D.

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pelo dom da vida e por me permitir vivenciar tantas experiências únicas.

Ao meu marido,

Marcelo Jesus Poloni, pelo companheirismo e paciência. Pelo homem exemplar que é e pelo amor pleno com que guia nossa família.

Aos meus pais,

Erenice e Luiz Candido Ferreira (*in memoriam*), por sonharem juntos comigo ainda que o sonho parecesse algo inatingível. Por todos os ensinamentos baseados no amor e na honrades. Meus exemplos de seres humanos íntegros.

Às minhas filhas,

Luiza e Isabela, minhas maiores inspirações para seguir em frente e acreditar nos sonhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

À minha orientadora Prof^a. Livre-Docente Eliana Aguiar Petri Nahás, pela maneira exemplar e inspiradora com que realiza seu trabalho, pelo respeito com que nos ensina e orienta.

Ao meu orientador no Mestrado Prof. Dr. Jorge Nahás Neto pela amizade e cuidado sempre. E ao meu co-orientador do Mestrado Dr Gilberto Uemura (*in memoriam*) que tanta saudade nos deixou. Meu agradecimento pelos primeiros ensinamentos.

Aos colegas da equipe Climatério e Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela verdadeira parceria em todo e qualquer momento tornando possível o “chegar mais longe”.

Ao meu irmão, André Luiz Ferreira, por seu apoio sempre incondicional.

Á todos os meus familiares, pelos votos de confiança e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, por todos os conhecimentos compartilhados.

Às enfermeiras e funcionárias do Ambulatório e Enfermaria de Ginecologia do HC-UNESP, por cuidarem com dedicação de nossas pacientes.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial a Solange Sako Cagliari, pela competência com que nos auxilia na resolução de problemas institucionais.

Ao escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu – 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 sempre atenciosas e prestativas.

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

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
Lista de Abreviaturas	9
Resumo	12
Abstract	14
1. Introdução	16
2. Objetivo	25
3. Métodos	26
4. Resultados	
4.1. Artigo Original	
<i>“Isolated vitamin D supplementation improves the metabolic syndrome risk profile in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial”</i>	36
5. Conclusões	68
6. Referências	69
7. Anexos	
7.1. Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	83
7.2. Anexo II- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB	85
7.3. Anexo III- <i>Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010</i>	91

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D - 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

EAP - Escritório de Apoio à Pesquisa

EUA - Estados Unidos da América

FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HPLC - *High-performance liquid chromatography*

IAM - Infarto agudo do miocárdio

IMC – Índice de massa corpórea

IOF - *International Osteoporosis Foundation*

ITT - *Intention-to-treat*

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

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

NHANES - *National Health and Nutrition Examination Survey*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAD - Pressão arterial diastólica

PAS - Pressão arterial sistólica

PCR - Proteína C-reativa

PTH – Paratormônio

RCQ- Relação cintura/quadril

REBEC - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

RI - Resistência insulínica

SM – Síndrome metabólica

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG – Triglicerídeos

TH - Terapia hormonal

UNESP - Universidade Estadual Paulista

UVB- Raios ultravioletas do tipo B

VD - Vitamina D

VDBP - Proteína de ligação à vitamina D

VDR – Receptor de 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 cardiometabólicos 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 ≥ 12 meses. Foram excluídas mulheres com histórico de doença cardiovascular, diabetes insulino dependente, doença renal crônica, doença hepática, disfunção da paratireóide e usuárias de suplementação de VD. 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 nove meses, com avaliações nos momentos inicial e final. Foram consideradas com síndrome metabólica (SM) as mulheres que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos: circunferência da cintura (CC) > 88 cm; TG ≥ 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial $\geq 130/85$ mmHg; glicose ≥ 100 mg/dL. Foram coletados dados clínicos, antropométricos e bioquímicos (colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose e insulina. Os valores séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] foram mensurados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise estatística foi por Intenção de Tratamento (ITT), empregando-se o Teste *t-student*, a Distribuição Gama (variáveis assimétricas), teste do Qui-quadrado, ANOVA e a regressão logística (odds ratio-OR).

Resultados: Após nove 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%, $p < .001$) no grupo VD, e diminuíram de $16,9 \pm 6,7$ ng/ml para $13,8 \pm 6,0$ ng/ml (-18,5%, $p = 0.049$) no placebo. No grupo VD, observou-se redução significativa nos triglicerídeos (-12,2%, $p = 0,001$), insulina (-13,7%, $p = 0,008$) e

HOMA-IR (-17,9%, $p=0,007$). No grupo placebo, houve aumento nos valores séricos de glicose (+6,2%, $p=0,009$). Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros antropométricos entre os grupos ($p > 0,05$). Na análise de risco ajustado para idade, tempo de menopausa e índice de massa corpórea, as mulheres suplementadas com VD apresentaram menor risco para SM (OR 0,42; IC 95%: 0,21-0,83), hipertrigliceridemia (OR 0,43; IC 95%: 0,22-0,85) e hiperglicemia (OR 0,23; IC 95%: 0,10-0,52) em comparação com ao grupo placebo ($p < 0,05$).

Conclusões: Em mulheres na pós-menopausa, a suplementação isolada de 1.000 UI de vitamina D3 por nove meses associou-se a menor risco cardiometabólico. As mulheres submetidas à suplementação de VD apresentaram menor risco de síndrome metabólica, hipertrigliceridemia e hiperglicemia que as mulheres no grupo placebo.

Abstract

Objective: To evaluate the effect of isolated vitamin D (VD) supplementation on cardiometabolic markers in postmenopausal women.

Methods: This is a double-blind, placebo-controlled trial. A total of 160 postmenopausal women with amenorrhea \geq 12 months and age 50-65 years were included. Those with established cardiovascular disease, insulin dependent diabetes, primary hyperparathyroidism, chronic renal failure, liver disorders, and previous use of VD supplementation were excluded. The participants were randomized into two groups: VD group, vitamin D₃ supplementation 1,000 IU / day/ orally (n=80) or placebo group (n=80). The intervention time was 9 months, with assessments at baseline and endpoint. Clinical and anthropometric data were collected. Diagnostic criteria for metabolic syndrome (MetS): waist circumference $>$ 88cm; triglycerides \geq 150mg/dL; HDL $<$ 50mg/dL; blood pressure \geq 130/85mmHg; glucose \geq 100mg/dL. The plasma concentration of 25-hydroxyvitamin D [25(OH) D] was measured by HPLC. Biochemical parameters, including total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, glucose, and insulin were measured. Statistical analysis was by intention-to-treat (ITT), using the Student's *t* test, the Gamma distribution (asymmetric), the chi-square test, ANOVA and the logistic regression (OR-odds ratio).

Results: After 9 months, there was a significant increase in the plasma 25(OH)D levels for VD group (+45.4%, $p < .001$), and a decrease (-18.5%, $p = 0.049$) in the placebo group. In the VD group, a significant reduction was observed in triglycerides (-12.2%, $p = 0.001$), insulin (-13.7%, $p = 0.008$) and HOMA-IR (-17.9%, $p = 0.007$). In the placebo group, there was an increase in glucose (+6.2%, $p = 0.009$). No significant differences were observed

in anthropometric parameters between groups ($p>0.05$). Analysis of the risk adjusted for age, time since menopause, and BMI showed that women supplemented with VD had a lower risk of MetS (OR 0.42; 95% CI 0.21-0.83), hypertriglyceridemia (OR 0.43; 95% CI 0.22-0.85) and impaired glucose (OR 0.23; 95% CI 0.10-0.52) compared to the placebo group ($p<0.05$).

Conclusions: In postmenopausal women, isolated supplementation with 1,000 IU of vitamin D3 for 9 months was associated with lower cardiometabolic risk. Women undergoing VD supplementation had a lower risk of MetS, hypertriglyceridemia and dysglycemia than women in the placebo group.

1. Introdução

1.1. 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 79,4 e 72,9 anos de idade, respectivamente, em comparação com 72,6 e 64,8 anos, apenas uma década atrás¹. 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 mama². Em mulheres, o envelhecimento e a menopausa podem ser considerados fatores de risco cardiovascular pela privação estrogênica decorrente da falência ovariana^{3,4}. 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)⁵⁻¹⁵.

O conceito de fator de risco cardiovascular é de fundamental importância no desenvolvimento de estratégias para prevenção da DAC. A estimativa do risco de doença aterosclerótica resulta da somatória de cada um dos fatores de risco mais a potencialização causada por sinergismos entre alguns desses fatores⁸. 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 apresenta sintomas prévios³. 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 saudável¹⁶⁻¹⁸. 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 melhorar o padrão alimentar e 48% apresentavam dieta de má qualidade, sendo que 75,7% estavam sobrepeso ou obesas e 73,2% com deposição abdominal aumentada de gordura¹⁹.

A prevalência de sobrepeso e obesidade em mulheres na pós-menopausa é superior a 80% em países desenvolvidos⁷. No Brasil, em mulheres na 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 anos¹. O excesso de peso e o acúmulo de gordura abdominal estão associados ao maior risco de DAC⁹. 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 normal²⁰. A obesidade abdominal contribui para o desenvolvimento da resistência a insulina (RI), diabetes, dislipidemia, e conseqüentemente a síndrome metabólica^{21,22}.

A síndrome metabólica (SM) é definida por um conjunto de fatores de riscos metabólicos que incluem obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e hiperglicemia²³. Primeiramente, essa síndrome foi descrita por Gerald Reaven em 1988, e denominada de síndrome X, depois de quarteto da morte, síndrome plurimetabólica e síndrome dismetabólica. Acomete aproximadamente 30% da população de mulheres acima dos 50 anos, com aumento de três vezes o risco de morbimortalidade por DCV^{7,14,24}. Essa síndrome associa-se a desordem metabólica denominada resistência à insulina (RI) em que a ação normal da insulina está prejudicada. Fatores ambientais, particularmente dieta inadequada e inatividade física, estão amplamente implicados, mas alguns indivíduos são geneticamente predispostos à RI^{7,25,26}.

Várias organizações têm proposto classificações e definindo critérios para o diagnóstico da SM²⁷. Em 1999, a *World Health Organization (WHO) Diabetes Group* propôs a primeira definição para a SM, considerando o conjunto de fatores de risco para DCV, entre três ou mais dos seguintes critérios: elevação da pressão arterial (PA), aumento de triglicérides, redução do HDL, obesidade (índice de massa corpórea, IMC \geq 30kg/m²) ou aumento da relação cintura/quadril (RCQ) e RI, definida pela presença de diabetes ou intolerância a glicose ou hiperinsulinemia²⁸. Em 2001, o *National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III (NCEP/ATP III)* desenvolveu outra definição diagnóstica, que incluiu alguns dos critérios propostos pela WHO e excluiu o IMC e a RCQ²⁶. A identificação clínica da SM proposta pelo NCEP/ATP III considera três dos seguintes critérios diagnósticos: obesidade abdominal (aumento da circunferência da cintura), elevação da pressão arterial (PA), redução de HDL-colesterol, aumento de triglicérides e intolerância à glicose²⁵. A *International Diabetes Federation (IDF)* propôs nova definição em 2006 tendo a obesidade abdominal como essencial, associada a mais

dois critérios como aumento dos triglicérides, redução do HDL, elevação da PA ou aumento da glicemia de jejum²⁹. Apesar das várias classificações propostas, alguns consideram o critério utilizado pela NCEP/ATPIII mais útil e de fácil aplicação clínica²². É fundamental salientar que todos os critérios têm como foco o papel da RI no aumento de risco para DCV³⁰.

A obesidade abdominal reconhecidamente é uma característica importante no diagnóstico da SM²¹. Em 2009, Nahas *et al.*, avaliando 368 mulheres na pós-menopausa acompanhadas no Ambulatório de Climatério da FMB com idade entre 45-75 anos, observaram a ocorrência de SM em 39,6% das participantes, sendo a obesidade abdominal (cintura \geq 88cm) o principal critério diagnóstico, encontrado em 62,5% dos casos³¹. A obesidade é um estado pro-inflamatório que contribui para RI, condição sugerida como fator causal da dislipidemia, da intolerância à glicose e aumento da PA^{32,33}. Os fatores inflamatórios produzidos pelo tecido adiposo (adipocitocinas) induzem a RI por interferirem com o sinal de transcrição da insulina e, portanto, o transporte de glicose³⁴. O acúmulo central de gordura está associado ao aparecimento de outras alterações envolvidas com a SM: aumento da concentração de triglicérides e redução dos valores de HDL, além da elevação da glicemia e da insulinemia^{21,35}. A SM sabidamente associa-se com o aumento no risco de desenvolvimento de DCV em mulheres na pós-menopausa.^{36,37}

1.2. 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 D3). É adquirida pela 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 ocorre a ativação na pele (derme e epiderme), do composto 7-deidrocolesterol que se transforma em vitamina D₃, sendo armazenada e liberada pelas células de gordura³⁸. 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, 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, nos túbulos proximais dos rins, sob a ação da enzima 1 α -hidroxilase, transformando-se em 1,25-diidroxivitamina D [1,25(OH)2D] ou calcitriol, que é responsável pelos efeitos biológicos^{39,40}.

O nome 'vitamina D' é um equívoco histórico. A forma ativa, o calcitriol, pode ser considerada um “hormônio”, pois é sintetizada em humanos, e submetida a 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 paratireóide³⁸. A forma ativa da vitamina 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). Essa propriedade pode explicar a ação da VD na reabsorção óssea, no transporte intestinal de cálcio e na pele³⁸.

Atualmente, a dosagem de 25(OH)D é adequada para se avaliar e monitorizar o estado nutricional de VD no organismo humano, pois os valores plasmáticos são os principais indicadores das reservas corporais^{41,42}. 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)⁴³. Número crescente de estudos sugere que são necessários valores acima de 30ng/ml para garantir melhor disponibilidade de VD^{41,42,44,45}. 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 secreção normal de paratormônio (PTH) pelas paratireoides⁴³. Na insuficiência de VD evidencia-se elevação do PTH circulantes, traduzindo um hiperparatireoidismo secundário, com redução da fração ativa de 1,25(OH)2D, que aumenta a reabsorção óssea^{41,42}. 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 anos⁴⁶. 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^{41,42}.

Reconhece-se que a deficiência de VD é condição médica frequente em todo mundo⁴⁷. Mesmo moradores de regiões próximas a 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 inadequados⁴⁸. 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 alarmantes⁴⁹⁻⁵¹. O estado de hipovitaminose D é comumente

encontrado em mulheres na pós-menopausa. 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 gastrointestinal; e uso de múltiplas drogas que podem interferir na absorção e metabolização da VD. Outros fatores também influenciam a capacidade de produção de VD pela pele: uso de filtro solar, cor da pele, roupa e idade⁵².

Sabendo-se que as fontes dietéticas de vitamina D são inadequadas, é interessante que mulheres na pós-menopausa recebam suplementação para garantir a saúde óssea⁴². Em 2010, a *International Osteoporosis Foundation* publicou posicionamento sobre a VD, com base em dados observacionais, recomendando manutenção de valores séricos de 25(OH)D de 30ng/ml para pessoas idosas e afirmando que o consumo de VD de até 2000UI/dia pode ser necessário para atingir valor recomendável em alguns pacientes⁴⁴. Em contraste, *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 quedas⁵³. Contudo permanece incerta a dose apropriada de suplementação para atingir os valores desejados, embora se recomende dose de 600UI/dia para mulheres na pós-menopausa e doses superiores a 800UI/dia para aquelas com idade superior a 70 anos⁵³. A suplementação diária de 1000UI de VD (dentro de um período mínimo de seis meses) aumenta os valores séricos em torno de 10ng/ml, dose esta sugerida para pacientes com idade inferior a 65 anos. Já com idade superior deveriam receber dose diária de 2000UI⁵⁴. Em geral, para cada 100UI de VD suplementada há aumento de 1ng/ml a nível sérico de 25(OH)D e quanto menor os valores séricos basais, melhor a resposta a suplementação. A suplementação destina-se

a elevar valores séricos de 25(OH)D acima de 30ng/ml de modo a aproveitar o máximo os benefícios da VD⁵⁵.

A relevante função desempenhada pela VD sobre a massa óssea está bem definida, contudo efeitos extra-ósseos da VD sobre os marcadores cardiometabólicos estão sob investigação atual.

1.3. Vitamina D e Doença Cardiovascular

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^{56,57}. Uma redução biodisponibilidade é comumente detectada em indivíduos com sobrepeso e obesos, possivelmente devido ao maior sequestro no tecido adiposo, uma vez que a VD é lipossolúvel^{58,59}. Dessa forma, a deficiência de VD tem sido observada em várias condições relacionadas com a obesidade, tais como resistência insulínica, diabetes e DCV^{57,60,61}.

A deficiência de VD e o aumento na prevalência da obesidade são considerados importantes questões de saúde pública⁶². Evidências recentes sugerem o envolvimento da VD em diversas doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, hipertensão, diabetes, síndrome metabólica e DCV^{60,63-65}. 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^{58,66-68}. Os mecanismos envolvidos não estão completamente descritos, mas é possível que o sequestro de metabólitos da VD no tecido adiposo diminua sua biodisponibilidade^{59,69}.

A expressão tanto do receptor da vitamina D (VDR) como do gene da 25-hidroxivitamina D 1 α -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 adiposo⁶². 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 inflamação⁶⁵. Uma meta-análise de 28 estudos demonstrou que elevados níveis séricos de 25(OH)D estavam associados à redução de 55% no diabetes e risco diminuído de 33% de DCV⁷⁰.

Alguns estudos observacionais na população geral demonstraram uma relação inversa entre os valores de 25(OH)D e a síndrome metabólica (SM), a diabetes e a resistência à insulina⁷¹⁻⁷³. O receptor para VD (VDR) é expresso em células betas pancreáticas secretoras de insulina e em tecidos alvo periféricos como músculo esquelético e adiposo⁷⁴. A deficiência de VD pode dificultar a capacidade das células beta na conversão da pró-insulina a insulina. Polimorfismos dos genes do VDR em seres humanos têm sido associados com variação na secreção e sensibilidade da insulina⁷⁵. Além disso, diabetes e deficiência de VD compartilham fatores de risco, incluindo idade, etnia não-caucasiana, obesidade e inatividade física (menor tempo ao ar livre e exposição reduzida à luz solar)⁶⁰. Embora estudos observacionais suportem relação inversa entre os níveis séricos de VD e o risco de diabetes II, estudos de intervenção têm fornecido resultados inconclusivos, alguns com melhora da sensibilidade a insulina e outros sem alterações^{61,76-80}. No entanto, a maioria dos estudos de intervenção

apresenta pequeno tamanho amostral que pode ser responsável pela natureza contraditória dos resultados.

A vitamina D pode atuar no sistema renina-angiotensina e na função vascular. A partir de dados de pesquisas experimentais que associam a deficiência da VD com aumento da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, vários estudos tentam correlacionar os níveis de VD com a pressão arterial em seres humanos. Entretanto, até o momento não se conseguiu estabelecer o papel da deficiência da VD na fisiopatologia da hipertensão^{47,60}. No *Framingham Heart Study*, reduzidas concentrações de 25(OH)D foram associadas com risco aumentado de eventos cardiovasculares apenas em participantes com hipertensão⁸¹. Estudo transversal retrospectivo com a participação de 2722 indivíduos de ambos os sexos, observou que aqueles com níveis séricos de 25(OH)D inferiores a 40 ng/mL apresentavam maiores taxas de hipertensão⁸². Revisão sistemática, analisando 13 estudos observacionais e 18 ensaios randomizados, demonstrou que embora nos estudos de coorte houvessem associação entre concentração reduzida de VD e ocorrência de hipertensão; nos ensaios clínicos com suplementação de VD houve tendência de redução da pressão sistólica, porém sem efeito sobre pressão diastólica⁸³. Assim, a associação entre VD e hipertensão não está firmemente estabelecida. Estudos randomizados de boa qualidade são necessários para elucidar o papel exato da deficiência da VD no desenvolvimento de hipertensão^{60,84}.

Estudos demonstraram correlação negativa entre os valores séricos de VD e a resistência à insulina^{45,85,86}. A resistência à insulina está entre os responsáveis pelos componentes da síndrome metabólica (SM). Ford *et al*, avaliando dados norte-americanos do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), de 2003-

2006, encontraram concentrações séricas de VD significativamente menores em indivíduos com SM⁸⁷. Maki *et al.*, utilizando os mesmos dados (NHANES, 2003-2006), estudaram a associação entre os valores de VD e a prevalência da SM em indivíduos adultos acima de 20 anos. Os autores demonstraram que elevada circunferência da cintura, baixo HDL-C e aumento na RI avaliado pelo HOMA (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*) esteve associado com a presença de valores séricos reduzidos de 25(OH)D⁸⁸. A deficiência de VD pode ser um fator de risco para SM, como mostrado em estudos observacionais⁸⁹⁻⁹³. Metanálise, avaliando a associação entre a VD e diabetes tipo II, RI e SM, incluiu 17 estudos prospectivos com 210.107 participantes de ambos os sexos e 15.899 eventos metabólicos e com tempo médio de seguimento de 10 anos. Os resultados demonstraram associação inversa entre as concentrações de VD e o risco para diabetes (OR 0,81), RI (OR 0,84) e SM (OR 0,86). Foi encontrada heterogeneidade moderada entre quatorze estudos sobre diabetes. Os autores concluem que intervenções destinadas a manter níveis adequados de VD, poderia ser medida preventiva útil para doenças metabólicas. No entanto, estudos de intervenção baseados em populações saudáveis são necessários para confirmar os resultados observacionais⁹².

Apesar das evidências sobre a associação de níveis séricos de vitamina D com SM na população geral, dados em mulheres na pós-menopausa são escassos. Em análise transversal foram avaliadas 292 mulheres na pós-menopausa com idade entre 50-79 anos participantes do estudo *Women's Health Initiative Calcium-Vitamin D*. Foi observado associação inversa entre os valores séricos de 25(OH)D com a adiposidade, triglicérides, relação triglicéridos:HDL e a presença de SM. Não houve associações com LDL, HDL, insulina, glicose e o HOMA-IR⁹⁴. Estudo que avaliou 778 mulheres coreanas na

pós-menopausa encontrou que baixos níveis séricos de 25(OH)D foram significativamente associados com a presença de SM e com os componentes metabólicos, especialmente hipertrigliceridemia e hipertensão arterial em mulheres na pós-menopausa⁹⁵. A partir de dados do *Korean NHANES* de 2008–2010 foram avaliadas 4.364 mulheres na pós-menopausa. Os autores não observaram associação significativa entre os níveis séricos de 25(OH)D e a prevalência de SM. Contudo, mulheres no percentil mais alto de concentração de VD mostraram menor prevalência de hipertensão, hipertrigliceridemia e redução de HDL, em comparação com aquelas de menor percentil⁹⁶. Recente pesquisa analisou a relação entre as concentrações séricas de 25(OH)D e distribuição de gordura corporal em 62 mulheres na pós-menopausa. Houve uma correlação negativa entre 25(OH)D e a circunferência da cintura, o HDL e o HOMA-IR, contudo sem associação com a presença da SM⁹⁷. Entretanto mais estudos clínicos devem ser realizados para confirmar a associação entre a SM e a deficiência de VD em mulheres na pós-menopausa.

No sistema cardiovascular foram encontrados receptores de VD no músculo liso vascular, no endotélio, e nos cardiomiócitos⁹⁸. 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-inflamatório⁹⁸. Evidências sugerem que a deficiência de VD é potencial fator de risco para DCV⁹⁹⁻¹⁰². 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 VD¹⁰³. Apesar da deficiência de VD poder associar-se com elevado risco cardiometabólico, os resultados foram inconsistentes como demonstrado em três metanálises^{83,104,105}. Assim, uma clara associação entre o estado de VD e a ocorrência de DCV não está firmemente estabelecida¹⁰³.

2. Objetivo

Avaliar o efeito da suplementação isolada de vitamina D sobre os marcadores cardiometabólicos 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 da suplementação isolada de VD (1.000 UI/dia). O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Ambulatório de Climatério e Menopausa, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP. O cálculo do tamanho amostral foi embasado no estudo de Zittermann *et al.* que demonstraram redução nos níveis médios de triglicerídeos após suplementação com vitamina D (125 ± 59 mg/dL basal e 104 ± 50 mg/dL final)¹⁰⁶. Assumindo um intervalo de confiança de 95%, potência do teste de 80%, um mínimo de 119 mulheres foi estimado. Considerando uma perda de seguimento de 20%, o tamanho da amostra foi de 80 mulheres por grupo, total de 160 mulheres.

Foram incluídas mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade entre 50 a 65 anos que aceitaram participar do estudo. Os critérios de exclusão foram: uso atual ou prévio de TRH, 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; disfunção da paratireóide; obesidade grau III; usuárias de suplementação de VD; etilista ou usuárias de drogas. 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-4MHS32. Este ensaio clínico foi realizado de acordo com o *Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010*¹⁰⁷(Anexo III).

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, ou exercícios de resistência três dias por semana¹⁰⁸. Foram consideradas com síndrome metabólica as mulheres que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos propostos pelo *US National Cholesterol Education Program (NCEP) / Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III)*²⁵: circunferência da cintura > 88 cm; triglicerídeos \geq 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial sanguínea \geq 135/85 mmHg; e glicemia de jejum \geq 100 mg/dL.

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 participantes foram randomizadas, em sequência de numeração pré-estabelecida, em dois grupos: VD, com suplementação de vitamina D₃ (n=80) e PL, usuárias de placebo (n=80). Os investigadores e as participantes não tinham conhecimento prévio dos referidos grupos e das diferentes numerações, apenas o farmacêutico responsável pela manipulação do placebo. Assim, 80 mulheres receberam 1.000 UI de VD (colecalfiferol), cinco gotas via oral (cada gota contém 200 UI, frasco de 20 ml), durante nove meses. As outras 80 mulheres 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 (**Figura 1**). 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 9 meses com avaliações clínicas em dois momentos, inicial e final. O fluxograma mostra o recrutamento e randomização das participantes (**Figura 2**).

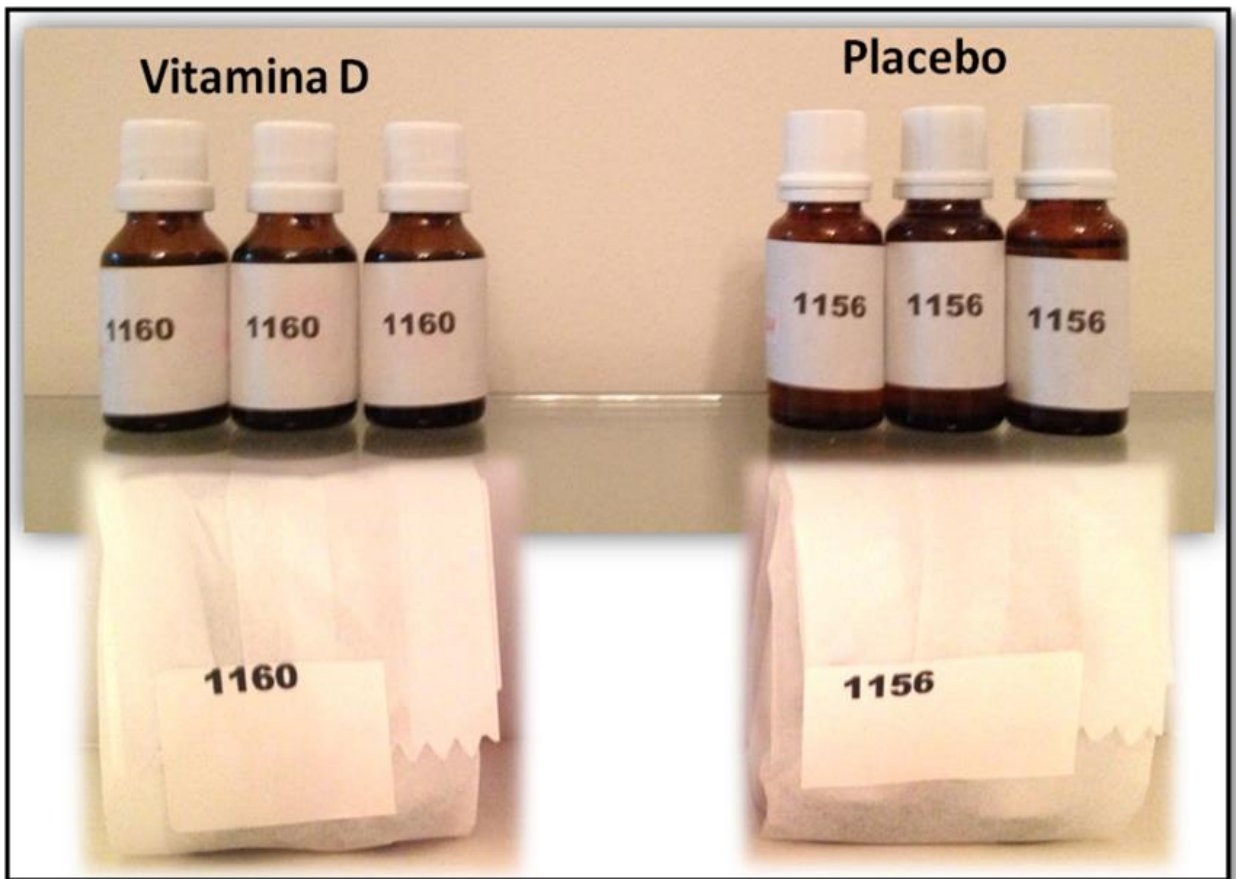


Figura 1 – A semelhança dos suplementos e a maneira como foi entregue para as pacientes.

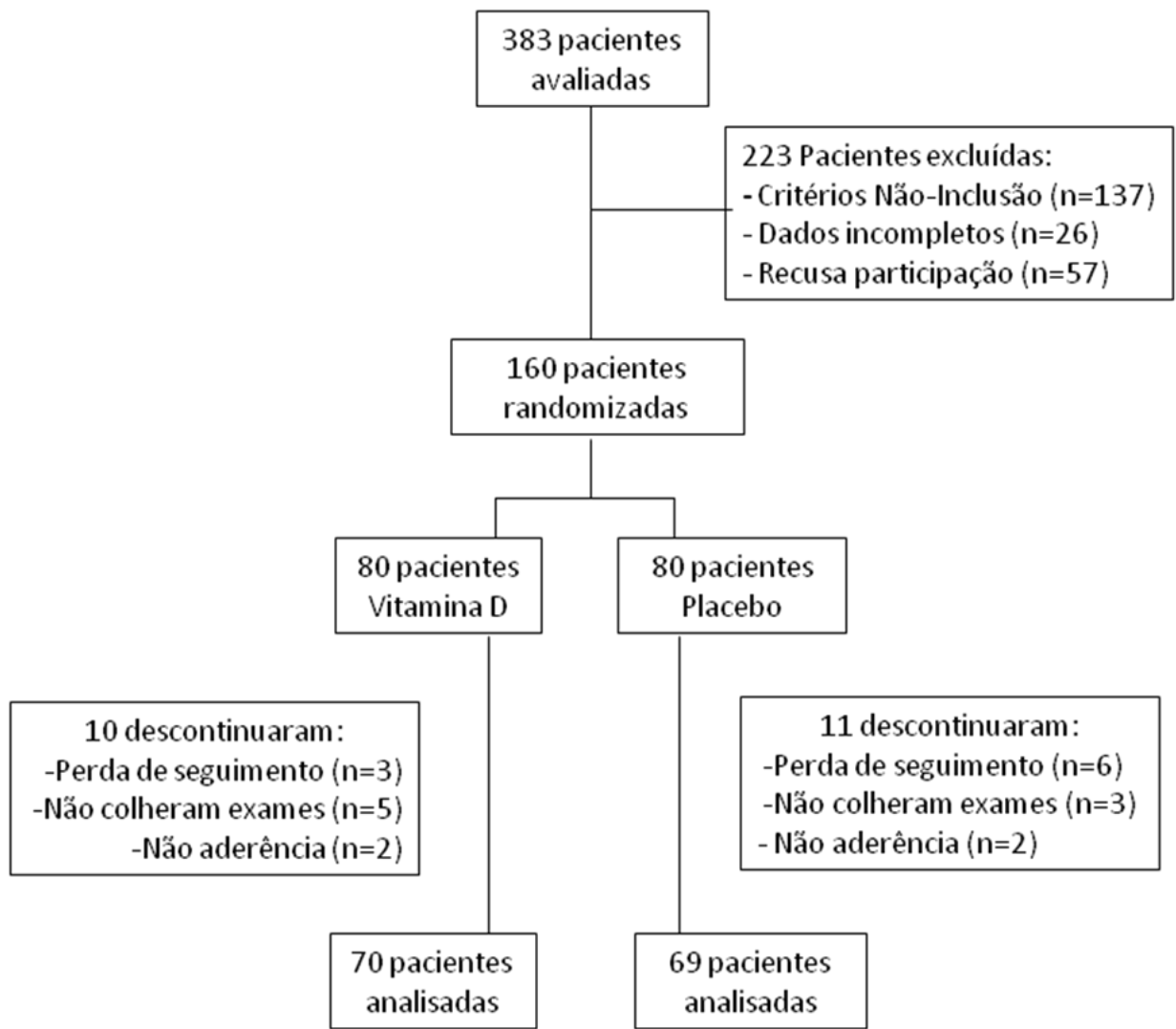


Figura 2- Fluxograma das pacientes incluídas no estudo

Avaliação antropométrica

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®, 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/m² como baixo peso, de 18,5 a 24,9 kg/m² normal, de 25 a 29,9 kg/m² sobrepeso, de 30 a 34,9 kg/m² obesidade grau I, de 35 a 39,9 kg/m² obesidade grau II e maior ou igual a 40 kg/m² obesidade grau III. Para a medida da cintura foi empregada a menor circunferência entre a última costela e a crista ilíaca ântero-superior, sendo a leitura feita no momento da expiração. Foi considerada aumentada acima de 88 cm¹⁰⁹.

Para o estudo da composição corporal foi utilizado a absorptometria radiológica de feixes duplos de energia (DXA) no momento inicial e após nove meses, pelo densitômetro Lunar Prodigy Primo (General Electric®, Madison, USA). A precisão para avaliação da massa livre de gordura é 1% e para a massa gordurosa 2%.¹¹⁰ Para minimizar a variação inter-avaliador, todos os exames foram realizados pelo mesmo observador. Foram avaliadas a massa muscular total e a porcentagem de gordura corporal, determinado em gramas sobre área ou volume (g/cm²). Os valores de referência satisfatórios são $\geq 38,9$ kg para massa muscular total, e 37,3% para gordura corporal total, em indivíduos com idade acima de 50 anos¹¹¹. A região do membro superior foi

definida como a região que estende da cabeça do úmero à falange distal dos dedos. O ponto de referência entre a cabeça do úmero e a escápula foi posicionado na fossa glenóide. A região de perna foi definida como a região que estende da borda inferior da tuberosidade isquiática à falange distal dos dedos do pé. A massa gorda e a massa livre de gordura foram definidas como a região que estende dos ombros até a falange distal dos pés.

Avaliação Laboratorial

Amostras sanguíneas foram colhidas nos momentos basal e 9 meses, pela manhã, após 12 horas de jejum. Por meio de punção venosa, em sistema fechado a vácuo (*Vacutainer®*, *England*), foram obtidos 20 ml de sangue, diretamente em um tubo seco (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 plasma foi congelado a -80°C até a 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, insulina 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®*, *RA-XT System*; *Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA*) e quantificadas pelo método enzimático colorimétrico, utilizando-se reagentes comerciais específicos (*Sera-Pak®*, *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.*¹¹² que apresenta limitação de uso, quando os valores de TG são superiores a 400 mg/dL. 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.²⁵ Para dosagem de creatinina foi empregado o método da química seca com equipamento de automatização, modelo Vitrus 950[®] (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. A insulina foi quantificada pelo Sistema Immulite[®] (DPC[®], USA), que emprega imunoensaio, em fase sólida, por quimioluminescência, para uso em analisador automático, designado para leitura quantitativa. A taxa de normalidade segundo o método empregado foi de 6,0 a 27,0 µU/ml. Para a avaliação da resistência insulínica (RI) foi utilizado método baseado em medida estática com dois constituintes plasmáticos (insulina e glicose de jejum). O HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistant*) foi calculado pela fórmula: Insulina (µUI/mL) x glicose de jejum (mg/dl) / 405. Valores que indicam RI foi definido como HOMA-IR > 2,71.¹¹³

Análise de Vitamina D

Os valores de 25(OH)D foram dosados no momento basal e aos 9 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 \geq 30 ng/mL, insuficiência de 21 a 29 ng/mL e deficiência < 20 ng/mL.^{41,55} Todas as dosagens foram realizadas em único momento para minimizar variações inter-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 foram calculados a média e o desvio-padrão para variáveis quantitativas e, a frequência e a porcentagem para variáveis qualitativas. 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 parâmetros antropométricos e bioquímicos entre os momentos (basal e 9 meses) e entre os grupos, utilizou-se o delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA) seguido pelo Teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento.

Análise multivariada por regressão logística binária foi realizada considerando um intervalo de confiança (IC) de 95% e calculando os respectivos odds ratios (OR). O grupo de mulheres suplementado com VD foi considerado como resposta (variável dependente) em comparação as mulheres do grupo placebo, para avaliar a possível associação entre as variáveis que influenciam o risco da SM (variáveis dependentes) e os grupos de intervenção, ajustados pela idade, tempo de menopausa e IMC (variáveis confundidoras). 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. Resultados

4.1. Artigo Original 1.

Isolated vitamin D supplementation improves the metabolic syndrome risk profile in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial

Entrada Live 2017-OG-20703 Under Re... X

Arquivo Editar Ver (X) Ir Mensagem Eventos e tarefas Ferramentas Ajuda

Receber mensagens Nova msg Bate-papo Catálogo Tags Filtrar

Responder Encaminhar Arquivar Spam Excluir Mais

De bjog@editorialoffice.co.uk

Assunto **2017-OG-20703 Under Review** 15/12/2017 15:47

Para Mim

Dear Prof. Nahas,

This note is to inform you that your manuscript, entitled "Isolated vitamin D supplementation improves the metabolic syndrome risk profile in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial", by authors Priscila Poloni, Luciana Cangussu, Flavia Bueloni-Dias, Claudio Orsatti, Eneida Schmitt, Jorge Nahas-Neto, and Eliana Nahas is currently under review.

Your manuscript has been assigned the Paper #: 2017-OG-20703.

I will contact you as soon as this process is complete.

In the interim, you may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link on the following URL:

<http://bjog.allentrack.net/cgi-bin/main.plex?el=A7q5NAw6A7ZwB3F1A9ftddSfN3e00wuP8IojNQHZkQZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your best work to BJOG.

Sincerely,

Dave Atha
Editorial Assistant
bjog@editorialoffice.co.uk

Isolated vitamin D supplementation improves the metabolic syndrome risk profile in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial

PF Poloni, L Cangussu, FN Bueloni-Dias, CL Orsatti, EB Schmitt, J Nahas-Neto, EAP Nahas*

Priscila Ferreira Poloni, priscilaferr2@yahoo.com.br – *Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University – UNESP*

Luciana Mendes Cangussu, lucianacangussu@gmail.com – *Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University – UNESP*

Flavia Neves Bueloni-Dias, flaviabueloni@hotmail.com - *Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University – UNESP*

Claudio Lera Orsatti, claudiorsatti@gmail.com – *Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University – UNESP*

Eneida Boteon Schmitt, eneidaboteon@gmail.com - *Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University – UNESP*

Jorge Nahas-Neto, netonahas@uol.com.br - *Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University – UNESP*

Eliana Aguiar Petri Nahas, epetri@fmb.unesp.br –*Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University – UNESP*

Short title: Vitamin D supplementation on metabolic syndrome risk profile

Author responsible for correspondence: *Eliana Aguiar Petri Nahas, MD, PhD

Abstract

Objective: To evaluate the effect of isolated vitamin D (Vd) supplementation on the metabolic syndrome (MetS) risk profile in postmenopausal women.

Design: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial

Setting: University Hospital in Southeastern Brazil.

Population: A total of 160 postmenopausal women (amenorrhea \geq 12 months, aged 50-65 years), randomized into two groups: Vd group, vitamin D₃ supplementation 1,000IU/day orally (n=80) or placebo group (n=80).

Methods: The intervention time was 9 months, with assessments at baseline and endpoint. Clinical and anthropometric data were collected. Lean body mass and body fat were estimated by DXA. The plasma concentration of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] was measured by HPLC. Biochemical parameters, including total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, glucose, and insulin were measured.

Main Outcome Measures: Vitamin D supplementation on diagnostic criteria for MetS.

Results: After 9 months, there was a significant increase in the plasma 25(OH)D levels for Vd group (+45.4%, $p < .001$), and a decrease (-18.5%, $p = 0.049$) in the placebo group. In the Vd group, a significant reduction was observed in triglycerides (-12.2%, $p = 0.001$), insulin (-13.7%, $p = 0.008$) and HOMA-IR (-17.9%, $p = 0.007$). In the placebo group, there was an increase in glucose (+6.2%, $p = 0.009$). No significant differences were observed in anthropometric characteristics between groups and between time points ($p > 0.05$). Analysis of the risk adjusted for age, time since menopause, and BMI showed that women supplemented with Vd had a lower risk of MetS (OR 0.42; 95% CI 0.21-0.83), hypertriglyceridemia (OR 0.43; 95% CI 0.22-0.85) and impaired glucose (OR 0.23; 95% CI 0.10-0.52) compared to the placebo group ($p < 0.05$).

Conclusions: In postmenopausal women, isolated supplementation with 1,000IU of vitamin D3 for 9 months was associated with a reduction in the MetS risk profile. Women undergoing vitamin D supplementation had a lower risk of MetS, hypertriglyceridemia and dysglycemia than women in the placebo group.

Keywords Vitamin D; Supplementation; Postmenopausal women; Metabolic syndrome.

Introduction

Vitamin D, a fat-soluble vitamin, plays an important and recognized role in parathyroid regulation, calcium/phosphorus homeostasis and bone mineralization.¹ The identification of vitamin D receptor (VDR) in almost all human cells has proved the association of vitamin D deficiency with various non-communicable chronic diseases such as obesity, hypertension, diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease (CVD).^{2,3} In the cardiovascular system, VDRs were found in the vascular smooth muscle, endothelium and cardiomyocytes. Thus, evidence suggests that vitamin D deficiency is a potential risk factor for CVD,^{4,5} the main cause of death in postmenopausal women.

Vitamin D deficiency and the increase in the prevalence of obesity are considered important public health issues.⁶ Obesity is a proinflammatory state that contributes to insulin resistance; a condition suggested being the causal factor of dyslipidemia and glucose intolerance.³ Vitamin D deficiency can affect the normal metabolic functioning of adipose tissue, having a significant impact on maintaining metabolic health.³ Metabolic syndrome (MetS) is defined by a set of metabolic risk factors that include abdominal obesity, dyslipidemia, arterial hypertension, and dysglycemia.⁷ This syndrome affects approximately 50% of the female population above the age of 50 and is associated with a three-fold increase in morbidity and mortality risk due to CVD.⁷⁻⁹ MetS is associated with a metabolic disorder called insulin resistance, in which the normal action of insulin is compromised.⁹ In a meta-analysis of 28 studies, elevated serum levels of 25(OH)D were associated with a 55% reduction in diabetes incidence, a 51% lower risk of MetS, and a 33% lower risk of CVD.¹⁰ Measurement of 25(OH)D is suitable to evaluate and to monitor vitamin D nutritional status in the human organism since serum levels are the main indicator of body reserves.¹¹

Vitamin D deficiency plays key role in the pathophysiology of risk factors of MetS which affect cardiovascular system, increase insulin resistance and obesity, and stimulate renin–angiotensin–aldosterone system that cause hypertension.^{10,12} In a recent review study, the authors concluded that observational and prospective studies, involving the general population of both genders, have indicated that MetS is associated with vitamin D insufficiency.¹² However available data from intervention studies were not consistent to draw final conclusions on the effect of vitamin D supplementation on risk factors of MetS. Since there is sufficient biologic plausibility to explain the role of vitamin D in the prevention and treatment of MetS, more studies are required to be carried out to establish the relationship.¹² Moreover, there are few data in postmenopausal women. Some observational studies have demonstrated an inverse relationship between vitamin D and MetS in postmenopausal women.¹³⁻¹⁵ On the other hand, to our knowledge there are limited intervention studies with vitamin D supplementation and MetS in health postmenopausal women. Based on these data, the aim of this study was evaluate the effect of isolated vitamin D supplementation on the MetS risk profile in postmenopausal women.

Methods

Study design and sample selection

This study was a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. The population studied consisted of patients seen at the Climacteric and Menopause Outpatient Clinic of the Botucatu Medical School—UNESP, from August, 2015 to December, 2016. Women aged 50 to 65 years who have not had a menstrual period for

at least 12 months were included. Exclusion criteria were: coronary artery disease current or previous, cerebrovascular arterial disease, abdominal aortic stenosis or aneurysm, insulin dependent diabetes, renal failure (creatinine >1.4 mg/dL), liver disorders, cancer, abusive alcohol consumption, grade III obesity, and use of previous vitamin D or hormone therapy. Informed consent was obtained from all the participants and the study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School, Sao Paulo State University. The study was registered at and approved by the Brazilian Clinical Trials Registry (ReBEC) under registration number RBR-4MHS32. This trial was in accordance with the CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) 2010 statement.¹⁶

Randomization and supplementation protocol

After initial screening, all participants were given a number (1–160) according to their order of inclusion in the study. Central computer randomization was conducted using specific software (SAS 9.2 for Windows using Procedure Plan). The women were randomly assigned to two groups in a predetermined sequence: supplemented group consisting of patients receiving vitamin D3 supplementation (n=80) and placebo group consisting of patients receiving placebo (n=80). All participants started simultaneously in February/March 2016. The investigator and the patients were unaware of the group allocation and different numbers (blinding); only the pharmacist responsible for manipulation of the placebo knew to which group the patients belonged. Thus, 80 patients received five oral drops (each drop containing 200 IU, 20-ml flask) of 1,000 IU of vitamin D3 (cholecalciferol, DePura®, Sanofi-Aventis, Brazil). The remaining 80 patients received five oral drops of placebo with the same characteristics and flavor (1%

powdered lemon flavor, 0.2 % EDTA, liquid flavor qs, and liquid petrolatum qsp in 20 ml). The flasks were identical and were packed and coded by the pharmacist so that the participants could not identify the group. The participants were asked to return the flasks during each visit (every 3 months) to determine the amount of unused medication and compliance. The time of follow-up was 9 months and the patients were submitted to clinical evaluation at baseline and endpoint. The flow chart shows the recruitment and randomization of the participants (**Figure 1**).

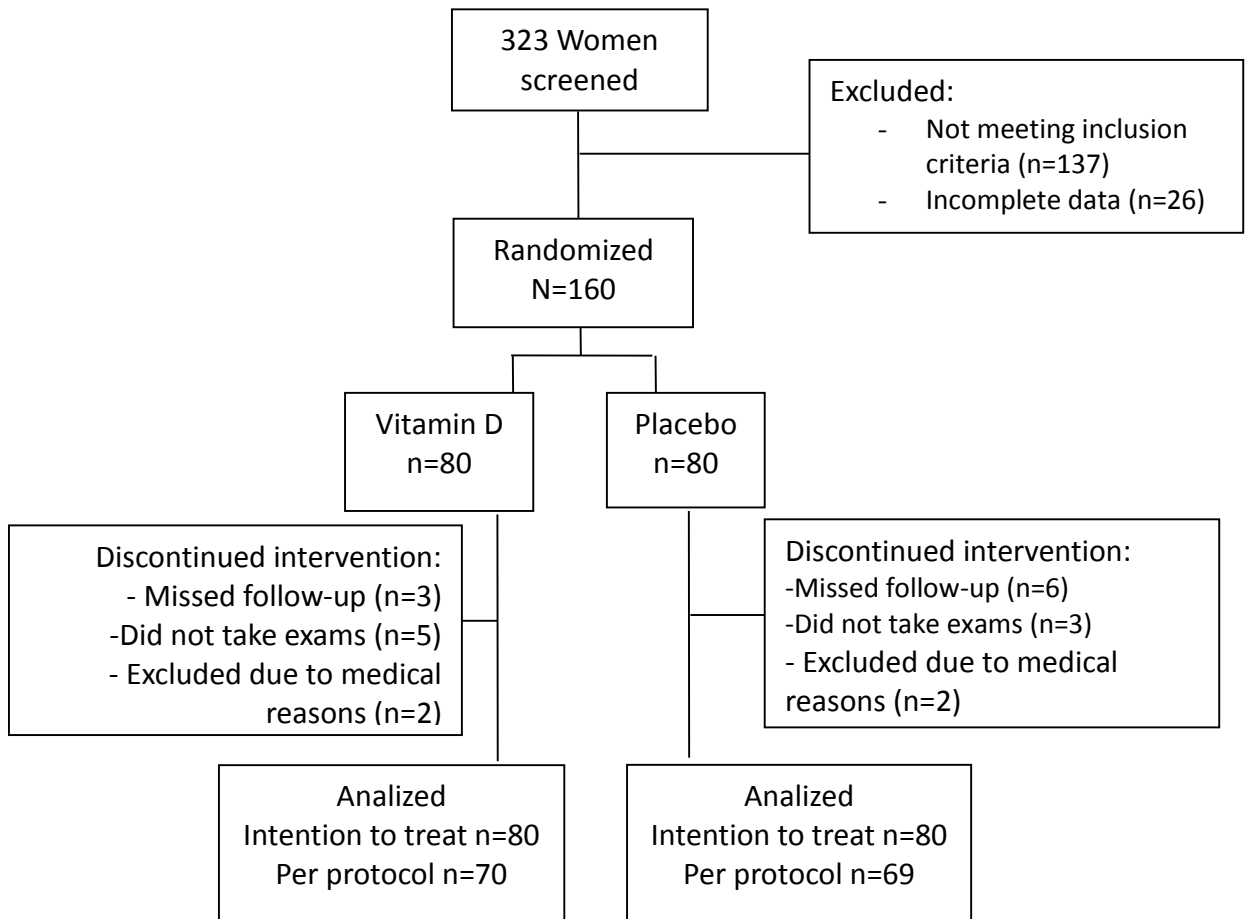


Figure 1- Flow chart of women included in the study.

Clinical and Anthropometric Measurements

All participants underwent individual interviews in which the following data were collected: age, time since menopause, current smoking, personal history of hypertension, diabetes and CVD, use of medications, blood pressure and physical activity. Smokers were defined as people who reported smoking regardless of the number of cigarettes smoked. Women who practiced aerobic physical exercise of moderate intensity for at least 30 min, five times a week, or resistance exercise three times a week were considered to be active. MetS was defined as the presence of three or more of the following diagnostic criteria proposed by the US National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III:¹⁶ waist circumference >88 cm; triglycerides ≥ 150 mg/dL; HDL <50 mg/dL; blood pressure $\geq 130/85$ mmHg or under therapy; fasting glucose ≥ 100 mg/dL or under therapy.

The anthropometric data included weight, height, body mass index (BMI=weight/height²) and waist circumference (WC). The World Health Organization criteria were used to classify BMI: normal, ≤ 24.9 kg/m²; overweight, 25–29.9 kg/m²; grade I obesity, 30–34.9 kg/m²; grade II obesity, 35–39.9 kg/m²; grade III obesity, 40 kg/m² or more. WC was measured at the midpoint between the lowest rib and the top of the iliac crest. The patients were advised to remain in the orthostatic position and the reading was performed at the moment of exhalation. This measurement was performed by a single evaluator. Any WC exceeding 88 cm was considered high.¹⁷

Lean body mass and body fat were estimated by total-body dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) at baseline and after 9 months using a Lunar Prodigy Primo densitometer (General Electric®, Madison, WI, USA). The results are reported as gram

per area or volume (g/cm²). The precision of the method is 1% for fat-free mass and 2% for fat mass.¹⁸ All tests were performed by the same examiner to minimize interobserver variation. Satisfactory reference values are ≥ 38.9 kg for total lean mass and < 37.3 % for total body fat in individuals older than 50 years. Fat mass and fat free mass were measured in the region extending from the shoulders to the distal phalanx of the feet.

Laboratory assessment

Serum levels of creatinine, triglycerides, total cholesterol, HDL, glucose and insulin were determined at baseline and after 9 months. Blood samples were collected from each participant after a 12-hour fast. Triglycerides, total cholesterol, HDL and glucose measurements were processed by an automated analyzer (*Technicon[®], RA-XT System; Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA*) and quantified by the colorimetric enzymatic method, using specific commercial reagents (*Sera-Pak[®], Bayer Corporation, Diagnostics Division, NY, USA*). LDL was calculated by subtracting total cholesterol from the sum of HDL and triglycerides and dividing the result by five. The values considered to be optimal were as follows: total cholesterol < 200 mg/dL, HDL > 50 mg/dL, LDL < 100 mg/dL, triglycerides < 150 mg/dL, and glucose < 100 mg/dL.¹⁶ Creatinine was measured by dry chemistry in an automated Vitrus 950 analyzer (Johnson-Johnson, Rochester, NY). Serum creatinine concentration values were considered within the normal range of 0.7 to 1.2 mg/dL. Insulin was measured by chemoluminescence with an automated Immulite 2000[®] immunoassay system (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). The normal range according to the method employed was 6.0 to 27.0 μ IU/mL. Insulin resistance was evaluated based on the statistical measurement of two plasma components (insulin and fasting glucose).

The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the following formula: insulin (mIU/mL) x glucose (mg/dL)/405. Insulin resistance was defined as HOMA-IR >2.71.

The plasma concentrations of 25(OH)D were measured at baseline and after 9 months for the evaluation of bioavailability and treatment compliance. The 25(OH)D concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an isocratic HPLC system equipped with a Rheodyne® manual injector (model 7725i), a 20- μ l loop, and a Waters UV-vis detector (model M-484). An RP 18 column (4.0mm \times 15 cm, 5- μ m particle size; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used. The detection limit was 2.5 ng/ml and the coefficient of variation was <7 %. Serum 25(OH)D levels were classified as normal (\geq 30 ng/mL), insufficiency (20–29 ng/mL) and deficiency (< 20 ng/mL).¹⁹

Statistical analysis

Sample size calculation was based on the study of Zittermann et al.,²⁰ which demonstrated a reduction in mean triglycerides levels after supplementation with vitamin D (basal 125 ± 59 mg/dL and final 104 ± 50 mg/dL). Assuming a 95% confidence interval, power of the test of 80%, a minimum of 119 women was estimated. Considering a 20% loss to follow-up, the sample size adopted was 80 women per group. Intention-to-treat analysis was used as the statistical. The Shapiro-Walk test was used to determine whether the variables showed a normal distribution and the Levene test to determine homogeneity. The mean and standard deviation were calculated for quantitative variables, and frequency and percentage for qualitative variables. The initial clinical, anthropometric and biochemical variables were compared between groups by

the Student's t test and Gamma distribution (asymmetric). The frequencies of categorical data were compared by the χ^2 test. To compare the anthropometric, and biochemical variables between time points (baseline and after 9 months) and between groups, a repeated measures design over time (analysis of variance, ANOVA) was used, followed by Tukey's multiple comparisons test adjusted for the group-time interaction. Multivariate analysis by binary logistic regression was performed considering a confidence interval (CI) of 95% and calculating the respective odds ratios (OR). The group of women using vitamin D was considered as the response compared to women of the placebo group to evaluate the possible association between the variables influencing the risk for MetS (dependent variables) and the intervention groups, adjusted for age, time since menopause, and BMI (confounding variables). A level of significance of 5% or the corresponding P value was adopted in all tests. The analyses were performed using the Statistical Analysis System 9.2 program (SAS).

Results

Of 323 invited patients, 160 were included in the study (**Figure 1**). For the participants who completed the study, adherence was 92% for the study medication (vitamin D3 or placebo). No differences in adherence were observed between the treatment groups. Of the 160 women analyzed, 21 discontinued the study before 9 months (Figure 1). Reported adverse events were few, mild, and equally distributed between the supplementation groups and the placebo group. In the vitamin D group, two participants, and in the placebo group, three participants discontinued the study due to gastrointestinal complaints and epigastric pain. No other adverse effects were reported.

The comparison of the baseline clinical, anthropometric, and laboratory characteristics between groups, vitamin D supplementation (n=80) and placebo (n=80), is shown in Table 1. The groups were homogenous in terms of all variables studied ($p>0.05$). The mean age of the patients included was 58.8 ± 6.6 years in the supplemented group and 59.3 ± 6.7 years in the placebo group, with time since menopause of 12.0 ± 8.8 and 12.3 ± 8.4 years, respectively. In both groups, the patients were classified on average as overweight (BMI 25 to 29.9 kg/m²) and as having central fat deposition (waist circumference >88 cm). The mean values of 25(OH)D indicated vitamin D insufficiency (< 20.0 ng/mL). And there was no difference in the occurrence of MetS between vitamin D group (28.7%) and placebo group (35%) ($p=0.063$) (**Table 1**).

Tables 2 and 3 showed the comparison of anthropometric and laboratory parameters between groups and time points. In the comparison of the anthropometric characteristics between groups and between time points no significant differences were observed in all analyzed parameters ($p>0.05$) (**Table 2**). At the final evaluation, after 9 months-treatment, there was a significant increase in the plasma 25(OH)D levels for the group supplemented with vitamin D, with a positive variation of 45.4% ($p<.001$). Moreover, for the placebo group, there was a decrease of 25(OH)D levels, with a negative variation of 18.5% ($p=0.049$), with a significant difference between the groups and between the final moment (**Table 3**). In the vitamin D group, a significant reduction was observed in triglycerides (-12.2%, $p=0.001$), with a significant difference between the groups after 9 months-treatment. There was also a significant decreased in the insulin (-13.7%, $p=0.008$) and HOMA-IR (17.9%, $p=0.007$), only in the group supplemented with vitamin D, however with no difference between the groups at the end of the intervention. On the other hand, in the placebo group there was an increase

in glucose (+6.2%, $p=0.009$), with a significant difference between the groups and between the final moment ($p<0.001$) (**Table 3**).

In the endpoint, according to the NCEP/ATP III which considers the presence of three or more criteria for diagnosis, 24% of the women supplemented with vitamin D and 40.0% of women of the placebo group were classified as having MetS. This difference in the prevalence of MetS between groups was significant ($p=0.012$) (**Table 4**). Analysis of the risk adjusted for age, time since menopause, and BMI showed that women supplemented with vitamin D had a lower risk of MetS (OR 0.42; 95% CI 0.21-0.83), hypertriglyceridemia (OR 0.43; 95% CI 0.22-0.85) and impaired glucose (OR 0.23; 95% CI 0.10-0.52) compared to the placebo group ($p<0.05$) (Table 4).

Table 1. Comparison of initial clinical, anthropometric and laboratory characteristics among postmenopausal women submitted to vitamin D supplementation (n=80) or placebo (n=80).

Parameters	Vitamin D	Placebo	P* value
Age (years)	58.8 (6.6)	59.3 (6.7)	0.654 ^a
Menopause age (years)	46.8 (6.2)	46.9 (5.6)	0.882 ^a
Menopause time (years)	12.0 (8.8)	12.3 (8.4)	0.804 ^b
SBP (mmHg)	134.3 (19.8)	136.5 (21.0)	0.499 ^a
DBP (mmHg)	81.5 (12.6)	81.0 (10.8)	0.794 ^a
BMI (kg/m ²)	29.4 (5.4)	29.9 (4.7)	0.505 ^a
Waist Circunference (cm)	94.0 (12.1)	94.1 (10.3)	0.994 ^a
25(OH)D (ng/mL)	15.0 (7.5)	16.9 (6.7)	0.086 ^a
Creatinine (mg/dL)	0.7 (0.2)	0.7 (0.1)	0.955 ^a
Glucose (mg/dL)	92.5 (10.6)	93.5 (10.9)	0.564 ^a
Insulin (μUI/mL)	11.7 (8.1)	10.1 (5.8)	0.085 ^b
HOMA-IR	2.7 (2.1)	2.4 (1.5)	0.125 ^b
Total Cholesterol (mg/dL)	211.3 (48.6)	210.0 (39.7)	0.855 ^a
HDL (mg/dL)	51.2 (12.2)	50.6 (12.3)	0.762 ^a
LDL (mg/dL)	128.9 (39.7)	129.7 (35.0)	0.885 ^a
Triglycerides (mg/dL)	155.5 (92.7)	165.3 (71.1)	0.399 ^b

Smoking n(%)	21 (26.2)	19 (23.8)	0.457 ^c
Physical exercise n(%)	25 (31.2)	21 (26.2)	0.428 ^c
Hypertension n(%)	44 (55.0)	49 (61.2)	0.423 ^c
Diabetes n(%)	12 (15.0)	16 (20.0)	0.405 ^c
Metabolic Syndrome, n(%)	23 (28.7)	28 (35.0)	0.063 ^c

Data are presented as Mean values (standard deviation) or number (%). SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistant*; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D.

*Significant difference if $P < 0.05$ (^a*t-Student test*, ^bGama distribution test or ^cChi-square test).

Table 2. Comparison of the anthropometric characteristics among postmenopausal women submitted to vitamin D supplementation (n=80) or placebo (n=80) at baseline and after nine months of intervention.

Indicator/Group	Baseline	9 months	Variation (%)	P * value
<i>SBP (mmHg)</i>				
Placebo	136.5 (21.0) ^a	139.0 (20.3) ^a	2.5 (1.8%)	0.850
Vitamin D	134.3 (19.8) ^a	130.6 (16.5) ^b	-3.7 (-2.8%)	0.233
<i>DBP (mmHg)</i>				
Placebo	81.0 (10.8) ^a	81.3 (10.1) ^a	0.3 (0.4%)	0.998
Vitamin D	81.5 (12.6) ^a	79.8 (11.1) ^a	-1.7 (-2.1%)	0.773
<i>BMI (kg/m²)</i>				
Placebo	29.9 (4.7) ^a	30.1 (4.6) ^a	0.2 (0.7%)	0.993
Vitamin D	29.4 (5.4) ^a	29.5 (5.4) ^a	0.1 (0.3%)	0.999
<i>Waist Circunference (cm)</i>				
Placebo	94.1 (10.3) ^a	94.5 (10.6) ^a	0.4 (0.4%)	0.991
Vitamin D	94.0 (12.1) ^a	92.9 (12.3) ^a	-1.1 (-1.2%)	0.928
<i>Body fat (%)</i>				
Placebo	43.5 (6.4) ^a	43.4 (6.6) ^a	-0.13 (-0.3%)	0.999
Vitamin D	42.6 (7.4) ^a	42.7 (7.8) ^a	0.07 (0.2%)	0.999
<i>Total lean mass (kg)</i>				
Placebo	39.5 (5.3) ^a	38.9 (4.8) ^a	-0.55 (-1.4%)	0.904
Vitamin D	38.4 (5.2) ^a	38.9 (5.4) ^a	0.53 (1.3%)	0.915

Data are presented as Mean values (standard deviation). SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index.

#Absolute variation: final values subtracted from baseline values.

* P -value shows the significant difference between moments ($P < 0.05$) and (a,b) show significant differences between groups and (a,a) without difference ($P > 0.05$) (ANOVA in repeated measures design followed by adjusted Tukey's test).

Table 3. Comparison of the biochemical characteristics among postmenopausal women submitted to vitamin D supplementation (n=80) or placebo (n=69) at baseline and after nine months of intervention.

Indicator/Group	Baseline	9 months	Variation (%)	P * value
<i>25(OH)D (ng/mL)</i>				
Placebo	16.9 (6.7) ^a	13.8 (5.9) ^a	-3.2 (-18.5%)	0.049
Vitamin D	15.0 (7.5) ^a	27.5 (10.4) ^b	12.5 (45.4%)	<0.001
<i>Total Cholesterol (mg/dL)</i>				
Placebo	210.0 (39.7) ^a	213.5 (40.6) ^a	3.5 (1.6%)	0.969
Vitamin D	211.3 (48.6) ^a	196.3 (42.3) ^a	-15.0 (-7.1%)	0.240
<i>HDL (mg/dL)</i>				
Placebo	50.6 (12.3) ^a	50.4 (13.8) ^a	-0.2 (-0.4%)	0.997
Vitamin D	51.2 (12.2) ^a	54.3 (13.0) ^b	3.1 (5.7%)	0.433
<i>LDL (mg/dL)</i>				
Placebo	129.7 (35.0) ^a	126.8 (43.3) ^a	-2.9 (-2.2%)	0.966
Vitamin D	128.9 (39.7) ^a	118.3 (33.6) ^a	-10.6 (-8.2%)	0.331
<i>Triglycerides (mg/dL)</i>				
Placebo	165.3 (71.1) ^a	167.9 (75.2) ^a	2.6 (1.5%)	0.732
Vitamin D	155.5 (92.7) ^a	136.5 (68.1) ^b	-19.0 (-12.2%)	0.001
<i>Glucose (mg/dL)</i>				
Placebo	93.5 (10.9) ^a	99.6 (15.6) ^a	6.1 (6.2%)	0.009
Vitamin D	92.5 (10.6) ^a	92.0 (8.5) ^b	0.5 (0.5%)	0.994
<i>Insulin (μUI/mL)</i>				
Placebo	10.1 (5.8) ^a	10.6 (6.7) ^a	0.6 (4.7%)	0.344
Vitamina D	11.7 (8.1) ^a	10.1 (7.6) ^a	-1.6 (-13.7%)	0.008
<i>HOMA-IR</i>				
Placebo	2.4 (1.5) ^a	2.7 (1.5) ^a	0.3 (11.1%)	0.054

Vitamin D	2.8 (2.1) ^a	2.3 (1.6) ^a	-0.5 (-17.9%)	0.007
-----------	------------------------	------------------------	---------------	--------------

Data are presented as Mean values (standard deviation).

HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistant*; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D.

#Absolute variation: final values subtracted from baseline values.

* *P* -value shows the significant difference between moments ($P < 0.05$) and (a,b) show significant differences between groups and (a,a) without difference ($P > 0.05$) (ANOVA in repeated measures design followed by adjusted Tukey's test).

Table 4. Association between the presence of metabolic syndrome and its clinical and laboratory components among postmenopausal women submitted to vitamin D supplementation or placebo after nine months of intervention.

Parameters	Vitamin D	Placebo	OR (95%)*	P value**
	n (%)	n (%)		
Metabolic Syndrome	20 (25.0)	32 (40.0)	0.42 (0.21-0.83)	0.012
WC (> 88cm)	49 (61.2)	60 (75.0)	0.53 (0.27-1.04)	0.062
Triglycerides (≥150mg/dl)	21 (26.2)	37 (46.2)	0.43 (0.22-0.85)	0.014
HDL (<50 mg/dl)	28 (35.0)	34 (42.5)	0.59 (0.30-1.17)	0.132
Glucose (≥100 mg/dl)	9 (11.3)	28 (35.0)	0.23 (0.10-0.52)	0.0003
BP (≥ 135/85 mmHg)	18 (22.5)	23 (28.7)	0.72 (0.35-1.46)	0.365

Values are expressed as n (%).

OR, odds ratio; WC, waist circumference; HDL, high density lipoprotein; BP, blood pressure.

* Odds Ratio (OR) adjusted for age, time of menopause, and body mass index.

**Significantly different if $p < 0.05$ (Logistic regression).

Discussion

Main findings

In this study, isolated supplementation with 1,000 IU of vitamin D3 for 9 months was associated with a reduction in the MetS risk profile in postmenopausal women. Women undergoing vitamin D supplementation had a lower risk of MetS, hypertriglyceridemia and dysglycemia when compared to women in the placebo group, even after adjusting for different factors. The high prevalence of a poor vitamin D status has gained much public health interest because of its association with CVD conditions, including arterial hypertension, diabetes, and the MetS.²¹ A meta-analysis evaluating the association of vitamin D with MetS and diabetes included 17 prospective studies with 210,107 participants and 15,899 metabolic events. The mean time of follow-up was 10 years. The results showed an inverse association between 25(OH)D concentrations and the risk for diabetes, insulin resistance, and MetS. The authors concluded that interventions designed to maintain serum vitamin D levels within the adequate range might be useful to prevent metabolic diseases.²²

Strengths and limitations

The strengths of the present study include its prospective, double-blind, placebo-controlled design and sample metabolic biomarkers that were evaluated in healthy postmenopausal women. Consequently, our results may be more relevant to the population of postmenopausal women living in the community than studies focused on people who have specific diseases. The duration of the intervention and the dose administered were also sufficient to cause measurable increases in serum 25(OH)D

values. This study also showed high adherence rates (92% of the participants), with no differences between the intervention groups (vitamin D or placebo). And, the use of HPLC for the measurement of 25(OH)D, which is more sensitive in detecting VD in plasma. Moreover, the present study has some limitations. The first is related to the representativeness of the sample. Since a group of postmenopausal women attending a public health service were studied, it can be assumed that they are periodically seen by medical professionals and have constant access to general healthcare. The second, our results cannot be generalized to other racial/ethnic groups, or for postmenopausal women with other diseases or who are frail and institutionalized.

Interpretation

There are several possible physiopathological mechanisms that could explain the effect of vitamin D on the components of MetS. The most plausible explanation is that VD influences insulin secretion and sensitivity, which play a major role in MetS. Different biological factors support the association of vitamin D deficiency with insulin resistance and diabetes. In humans, polymorphisms in the VDR genes have been associated with variations in insulin secretion and sensitivity.²³ The pancreas possesses VDR in insulin-secreting pancreatic beta cells and 1 α -hydroxylase, and so has capacity to convert circulating 25(OH)D to 1,25 dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D], the active form of vitamin D and is responsible for physiologic functions.¹² Moreover, the VDR and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in adipocytes and skeletal muscle.^{24,25} Vitamin D may also affect indirectly insulin sensitivity in skeletal muscle and adipose tissue by regulating the levels of extracellular calcium, which is essential for insulin-mediated intracellular processes.²⁶

Results from our study suggest that in postmenopausal women, vitamin D supplementation may play a role in the reduction of the MetS risk profile. The women supplemented with vitamin D had a reduction in blood insulin levels (-13.7%) and HOMA-IR (-17.9%). On the other hand, in the placebo group there was an increase in blood glucose levels (+6.2%), with a significant difference between the groups. However studies in postmenopausal women are scarce to compare the results of this study. The few randomized controlled trials (RCT) that are published in this field were conducted in both genders, with patients suffering from type 2 diabetes, elderly and obese individuals, or patients using high therapeutic doses of vitamin D.²⁷ In a randomized, placebo-controlled trial supplementation with 4,000 IU of vitamin D3 per day for 12 weeks successfully improved vitamin D insufficiency, insulin secretion and sensitivity in 89 overweight or obese subjects with pre diabetes.²⁸ Improvement in serum insulin and HOMA-IR with reduction in insulin resistance was reported in 100 patients with type 2 diabetes supplemented with 50,000 IU of vitamin orally per week for the period of 8 weeks.²⁹ Recent study assessed whether vitamin D supplementation could be used to improve glucose metabolism, and components of MetS. Adults (n=22, aged 21 to 75 years) with type II diabetes, hypovitaminosis D and insulin resistance (HOMA-IR \geq 2) were randomly assigned to either supplementation with vitamin D 5,000 IU/day or placebo, for 12 weeks. A significant improvement was observed in the HOMA-IR with vitamin D supplementation compared to baseline. Changes in BMI, WC, diastolic BP and lipid profile (HDL, LDL, TG, and cholesterol) did not differ between the groups.³⁰

In the present study, after 9 months-treatment, there was a decrease in blood triglycerides levels (-12.2%, p=0.001), with a significant difference when compared to the placebo group. One possible mechanism underlying the inverse association between

serum lipids and vitamin D levels is likely to be related to a reduction in the intestinal absorption and synthesis of lipids, and to a decrease in lipolysis with increasing 25(OH)D concentrations.³¹ In recent cross-sectional study, Schmitt et al.¹⁵ evaluated the association between vitamin D deficiency and risk factors for MetS in 463 postmenopausal women. Women with low 25(OH)D levels had higher triglycerides, insulin and HOMA-IR levels. MetS was detected in 57.8% of women with hypovitaminosis D and in 39.8% of those with sufficient VD. A low 25(OH)D level (<30ng/mL) was significantly associated with MetS (OR 1.90), high triglycerides (OR 1.55) and low HDL (OR 1.60), compared to sufficient 25(OH)D levels.¹⁵ In a literature review, observational studies showed that subjects with high serum 25(OH)D levels had a more favorable lipid profile than those with deficiency. However, the intervention studies gave divergent results with some showing a positive and some a negative effect of VD supplementation³². Similar to our findings, Zittermann et al.,²⁰ evaluating 82 subjects (47.4 year, 62% women) in the vitamin D group (300 IU vitamin D3/day) and 83 subjects (48.8 year, 72% women) in the placebo group, observed a significant decrease in serum triglycerides (-13.5%) as compared with the placebo group (+3.0%).²⁰ Another randomized, controlled, double-blind study assessed the effect of high-dose vitamin D supplementation (50,000 IU weekly) on cardiometabolic risk factors in 80 subjects (41 years, 51% women) with MetS. After 4 months, serum 25(OH)D concentration was increased in intervention group, while it was decreased in placebo group. There was a significant decrease in triglycerides concentration. Other metabolic or anthropometric factors did not change significantly.³³

On the other hand, Wood et al.,³⁴ in placebo-controlled trial, evaluating 305 postmenopausal women (60-70 years), observed that daily supplementation with

vitamin D (400 or 1000 IU) had no effect on total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, insulin resistance, or inflammatory markers.³⁴ Randomized, placebo-controlled study evaluated the impact of VD on glucose homeostasis in 47 patients with type 2 diabetes mellitus (66 years, 53% women), assigned into two groups: oral daily supplementation with vitamin D at a dose of 1000 U/day for 12 months or matching placebo capsules. Glucose homeostasis parameters, leptin and adiponectin did not change in both groups.³⁵ A recent randomized placebo controlled trial evaluated 126 subjects (49 years, 46% women) with MetS and vitamin D deficiency, allocated to receive either a daily oral tablet contain 700 IU VD or placebo. There were significantly higher serum 25(OH)D in the treated group, but no significant effect was observed for the metabolic variables which included body mass index, blood pressure, blood glucose and lipids in both treatment and placebo groups. For authors, further studies are warranted in order to elucidate the cause-effect relation between vitamin D status, obesity and related metabolic disorders.³⁶ The discrepancies can be explained by different doses or type of vitamin D given, characteristics or number of subjects included, or duration of the studies.

In our study, no change in blood pressure and in anthropometric measures was observed between VD group and placebo group. Our result was in line with previous clinical trials.^{30,33,34,36,37} However, in some other clinical trials, improvement of anthropometric measures and blood pressure resulted. It seems that there needs to be a long time to observe the treatment effect of vitamin D supplementation on anthropometric measures. The inconsistent results could be due to the length of the studies and types of supplementations. A meta-analysis of four RCTs found a reduction of 2.44 mmHg in SBP in vitamin D-treated subjects without any significant decrease in

DBP.³⁸ Pfeifer et al. reported a decrease of 9% in SBP in severely vitamin D-deficient women with calcium and vitamin D supplementation.³⁹ Some physiologic mechanisms for the effects of vitamin D were explained, such as the regulation of the renin-angiotensin system, and calcium absorption together with parathyroid hormone.^{39,40} Well-designed clinical trials are needed to show whether or not there is a causal role of vitamin D supplementation on decreasing blood pressure.

Conclusion

The isolated and daily supplementation of 1,000 UI of vitamin D₃ for 9 months in postmenopausal women was associated with a reduction in the metabolic syndrome risk profile. The hypothesis that the vitamin D supplementation may lead to a reduction of metabolic biomarkers proposes a potential role of vitamin D in the prevention and treatment of metabolic syndrome.

References

- 1 Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–281
- 2 Vacek JL, Vanga SR, Good M, Lai SM, Lakkireddy D, Howard PA. Vitamin D deficiency and supplementation and relation to cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2012; 109:359-363.
- 3 Strange RC, Shipman KE, Ramachandran S. Metabolic syndrome: A review of the role of vitamin D in mediating susceptibility and outcome. *World J Diabetes* 2015;6:896-911.
- 4 Motiwala SR, Wang TJ. Vitamin D and cardiovascular risk. *Cur Hypertension Reps* 2012;14:209-218.

- 5** Kienreich K, Tomaschitz A, Verheyen N, Pieber T, Gaksch M, Grüber MR, Pilz S. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients* 2013;5:3005-3021.
- 6** Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr* 2012;108:1915-23
- 7** Gurka MJ, Vishnu A, Santen RJ, DeBoer MD, Progression of metabolic syndrome severity during the menopausal transition. *J Am Heart Assoc* 2016;5:e003609.
- 8** Nahas EAP, Padoani NP, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Tardivo AP, Dias R. Metabolic syndrome and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. *Climacteric* 2009;12:431-438.
- 9** Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56: 1113–1132.
- 10** 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;65:225-236.
- 11** Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009;19:73–8.
- 12** Prasad P, Kochhar A. Interplay of vitamin D and metabolic syndrome: A review. *Diabetes Metab Syndr* 2016;10:105-12.
- 13** Song HR, Park CH. Low serum vitamin D level is associated with high risk of metabolic syndrome in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 2013;36:791-796.
- 14** Chon SJ, Yun BH, Jung YS, Cho SH, Choi YS, Kim SY, et al. Association between vitamin D status and risk of metabolic syndrome among Korean postmenopausal women. *PLoS one* 2014;9:e89721.

- 15** Schmitt EB, Nahas-Neto J, Bueloni-Dias F, Poloni PF, Orsatti CL, Petri Nahas EA. Vitamin D deficiency is associated with metabolic syndrome in postmenopausal women. *Maturitas* 2018;107:97-102.
- 16** Expert Panel on Detection, 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;285:2486-2497.
- 17** Blumel JE, Legorreta D, Chedraui P, Ayala F, Bencosme A, Danckers L, et al. Optimal waist circumference cutoff value for defining the metabolic syndrome in postmenopausal Latin American women. *Menopause* 2012;19:433-437.
- 18** Kiebzak GM, Leamy LJ, Pierson LM, Nord RH, Zhang ZY. Measurement precision of body composition variables using the lunar DPX-L densitometer. *J Clin Densitom* 2000;3:35-41
- 19** 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. *Am J Clin Nutr* 2006;84:18-28.
- 20** Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, Götting C, Kuhn J, Kleesiek K, et al. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1321-7.
- 21** Thomas GN, Hartaigh B, Bosch JA, Pilz S, Loerbroks A, Kleber ME, et al. Vitamin D levels predict all-cause and cardiovascular disease mortality in subjects with the metabolic syndrome: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study. *Diabetes Care* 2012;35:1158-64.

- 22** Khan H, Kunutsor S, Franco OH, Chowdhury R. Vitamin D, type 2 diabetes and her metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc* 2013;72:89-97.
- 23** Lips P, Eekhoff M, van Schoor N, Oosterwerff M, Jongh R, Krul-Poel Y, et al. Vitamin D and type 2 diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;173:280-285.
- 24** Cangussu LM, Nahas-Neto J, Orsatti CL, Bueloni-Dias FN, Nahas EA. Effect of vitamin D supplementation alone on muscle function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Osteoporos Int* 2015;26:2413-21.
- 25** Abbas MA. Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;165:369–381.
- 26** Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017-2029.
- 27** Seibert E, Lehmann U, Riedel A, Ulrich C, Hirche F, Brandsch C, et al. Vitamin D3 supplementation does not modify cardiovascular risk profile of adults with inadequate vitamin D status. *Eur J Nutr* 2017;56:621-634.
- 28** Harris SS, Pittas GA, Palermo JN. A randomized, placebo-controlled trial of vitamin D supplementation to improve glycaemia in overweight and obese African Americans. *Diabetes Obes Metab* 2012;14:789–94.
- 29** Talaei A, Mohamadi M, Adgi Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2013;5:8–12.
- 30** Al-Sofiani ME, Jammah A, Racz M, Khawaja RA, Hasanato R, et al. Effect of Vitamin D Supplementation on Glucose Control and Inflammatory Response i

n Type II Diabetes: A Double Blind, Randomized Clinical Trial. *Int J Endocrinol Metab* 2015;13:e22604.

31 Jorde R, Grimnes G. Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog Lipid Res* 2011;50:303–312

32 Challoumas D. Vitamin D supplementation and lipid profile: What does the best available evidence show? *Atherosclerosis* 2014;235:130-139.

33 Salekzamani S, Mehralizadeh H, Ghezel A, Salekzamani Y, Jafarabadi MA, Babil AS, et al. Effect of high-dose vitamin D supplementation on cardiometabolic risk factors in subjects with metabolic syndrome: a randomized controlled double-blind clinical trial. *J Endocrinol Invest* 2016;39:1303-1313.

34 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:3557–3568

35 Breslavsky A, Frand J, Matas Z, Boaz M, Barnea Z, Shargorodsky M. Effect of high doses of vitamin D on arterial properties, adiponectin, leptin and glucose homeostasis in type 2 diabetic patients. *Clin Nutr* 2013;32:970-5.

36 Yin X, Yan L, Lu Y, Jiang Q, Pu Y, Sun Q. Correction of hypovitaminosis D does not improve the metabolic syndrome risk profile in a Chinese population: a randomized controlled trial for 1 year. *Asia Pac J Clin Nutr* 2016;25:71-7.

37 Wamberg L, Kampmann U, Stødkilde-Jørgensen H, Rejnmark L, Pedersen S, Richelsen B. Effects of vitamin D supplementation on body fat accumulation, inflammation, and metabolic risk factors in obese adults with low vitamin D levels results from a randomized trial. *Eur J Intern Med* 2013;24:644–649.

38 Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D3 and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1633–1637.

39 Witham MD, Nadir MA, Struthers AD. Effect of vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 2009;27:1948–1954.

40 Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* 2007;282:29821–29830

5. Conclusão

Em mulheres na pós-menopausa, a suplementação isolada de 1.000 UI de vitamina D3 por 9 meses associou-se a menor risco cardiometabólico. As mulheres submetidas à suplementação de vitamina D apresentaram menor risco de síndrome metabólica, hipertrigliceridemia e hiperglicemia que as mulheres no grupo placebo.

6. Referências

1. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil: tábua completa de mortalidade - 2016. 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.
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;115(11):1481-501.
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;72(2):132-8.
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;285(19):2486-97.
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. *Arch Intern Med* 2001;161(14):1717-23.
7. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among US Adults. *Diabetes Care* 2004;27(10):2444-9.

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;364(9438):937-52.
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;366(9497):1640-9.
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;117(7):905-14.
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;9:206.
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. *J Strength Conditioning Res* 2012;26(8):2130-9.
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;35(9):1835-44.
14. Nahas EA, Andrade AM, Jorge MC, Orsatti CL, Dias FB, Nahas-Neto J. Different tools for estimating cardiovascular risk in Brazilian postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2013;29(10):921-5.

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 Chaperon* 2014;19(4):559-68.
16. Drewnowski A. Nutrition transition and global dietary trends. *Nutrition* 2000;16(7-8):486-7.
17. De Caterina R, Zampolli A, Del Turco S, Madonna R, Massaro M. Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. *Am J Clin Nutrition* 2006;83(2):421S-6S.
18. Pines A. Lifestyle and diet in postmenopausal women. *Climacteric* 2009;12 Suppl 1:62-5.
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 J* 2010;9:64.
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;117(13):1658-67.
21. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, American Heart A, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109(3):433-8.
22. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365(9468):1415-28

23. Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, Mora S. The metabolic syndrome in women. *Cardiol Res* 2006;14(6):286-91.
24. Nahas EA, Nahas-Neto J, Orsatti CL, Sobreira ML, Tardivo AP, Witkin SS. Evaluation of clinical and inflammatory markers of subclinical carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Menopause* 2014; 21(9):982-9.
25. NCEP - 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;285(19):2486-97.
26. Millen BE, Pencina MJ, Kimokoti RW, Zhu L, Meigs JB, Ordovas JM, et al. Nutritional risk and the metabolic syndrome in women: opportunities for preventive intervention from the Framingham Nutrition Study. *Am J Clin Nutr* 2006;84(2):434-41.
27. Olufadi R, Byrne CD. Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *J Clin Pathol* 2008;61(6):697-706.
28. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Med* 1998;15(7):539-53.
29. Saely CH, Koch L, Schmid F, Marte T, Aczel S, Langer P, et al. Adult Treatment Panel III 2001 but not International Diabetes Federation 2005 criteria of the metabolic syndrome predict clinical cardiovascular events in subjects who underwent coronary angiography. *Diabetes Care* 2006;29(4):901-7.
30. Reaven GM. The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chemistry* 2005;51(6):931-8.

31. Nahas EAP, Padoani NP, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Tardivo AP, Dias R. Metabolic syndrome and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. *Climacteric* 2009;12(5):431-8.
32. Sell H, Eckel J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13(4):366-70.
33. Stefanska A, Bergmann K, Sypniewska G. Metabolic Syndrome and Menopause: Pathophysiology, Clinical and Diagnostic Significance. *Adv Clin Chem* 2015;72:1-75.
34. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111(11):1448-54.
35. Berg G, Mesch V, Boero L, Sayegh F, Prada M, Royer M, et al. Lipid and lipoprotein profile in menopausal transition. Effects of hormones, age and fat distribution. *Hormone Metab Research* 2004;36(4):215-20.
36. Vannice GK. n-3s from fish and the risk of metabolic syndrome. *J Am Diet Ass* 2010;110(7):1014-7.
37. Gurka MJ, Vishnu A, Santen RJ, DeBoer MD. Progression of Metabolic Syndrome Severity During the Menopausal Transition. *J Am Heart Assoc* 2016;5:e003609.
38. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011;364(3):248-54.
39. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
40. Heaney RP, Recker RR, Grote J, et. al. Vitamin D3 is more potent than vitamin D2 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;96(3):447-52.

41. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, et al. Estimates of optimal vitamin D status. *OsteoporosInt* 2005;16:713–716.
42. Holick MF. The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clin Chem* 2010;56(5):729-31.
43. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1911-30.
44. 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 Intern* 2010;21(7):1151-4.
45. 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* 2010;182(12):E610-8.
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;370(9588):657-66.
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. *Br J Nutr* 2014;111(1):23-45.
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. *J Intern Med* 2006;260(3):245-54.
49. Russo LA, Gregorio LH, Lacativa PG, Marinheiro LP. [Concentration of 25-hydroxyvitamin D in postmenopausal women with low bone mineral density]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53(9):1079-87.

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? *Clin Nutr* 2010;29(6):784-8.
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;13(1):14.
52. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1678S-88S.
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. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(4):1146-52.
54. Mason RS. Vitamin D: a hormone for all seasons. *Climacteric* 2011;14(2):197-203.
55. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, et. al. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006;84:18–28.
56. Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*. 2007 Jul 19;357(3):266-81.
57. 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.
58. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(3):1196-9.

59. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72(3):690-3.
60. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117(4):503-11.
61. Forouhi 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;57(10):2619-25
62. Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr* 2012;108(11):1915-23.
63. Forman JP, Curhan GC, Taylor EN. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension among young women. *Hypertension* 2008;52(5):828-32.
64. Vacek JL, Vanga SR, Good M, Lai SM, Lakkireddy D, Howard PA. Vitamin D deficiency and supplementation and relation to cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2012;109(3):359-63.
65. Strange RC, Shipman KE, Ramachandran S. Metabolic syndrome: A review of the role of vitamin D in mediating susceptibility and outcome. *World J Diabetes* 2015;6(7):896-911.
66. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):157-61.
67. 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. *Nutr J* 2008;7:4.

68. 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. *J Diabetes Metab Dis* 2012;11(1):16.
69. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine* 2008;33(1):90-4.
70. 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;65(3):225-36.
71. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 820-5.
72. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2004; 27: 2813-18.
73. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 2005; 28: 1228-1230.
74. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinol* 2006;147(12):5542-8.
75. Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabol Clin Exper* 2002;51(3):356-9.
76. Zhao G, Ford ES, Li C. Associations of serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone with surrogate markers of insulin resistance among U.S. adults without physician-diagnosed diabetes: NHANES, 2003-2006. *Diabetes Care* 2010;33(2):344-7.

77. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Inter J Clin Prac* 2003;57(4):258-61.
78. von Hurst PR, Stonehouse W, Coad J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient - a randomised, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 2010;103(4):549-55.
79. Tai K, Need AG, Horowitz M, Chapman IM. Glucose tolerance and vitamin D: effects of treating vitamin D deficiency. *Nutrition* 2008;24(10):950-6.
80. Witham MD, Dove FJ, Dryburgh M, Sugden JA, Morris AD, Struthers AD. The effect of different doses of vitamin D(3) on markers of vascular health in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetol* 2010;53(10):2112-9.
81. 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;59(1):242-8.
82. Bhandari SK, Pashayan S, Liu IL, Rasgon SA, Kujubu DA, Tom TY, et al. 25-hydroxyvitamin D levels and hypertension rates. *J Clin Hypertension* 2011;13(3):170-7.
83. Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, et al. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Ann Intern Med* 2010;152(5):307-14.
84. Wang C. Role of vitamin d in cardiometabolic diseases. *J Diabetes Res* 2013;2013:243934.
85. De Pergola G, Nitti A, Bartolomeo N, Gesuita A, Giagulli VA, Triggiani V, et al. Possible role of hyperinsulinemia and insulin resistance in lower vitamin D levels in overweight and obese patients. *Bio Med Res Inter* 2013;2013:921348.

86. Schottker B, Herder C, Rothenbacher D, Perna L, Muller H, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and incident diabetes mellitus type 2: a competing risk analysis in a large population-based cohort of older adults. *Eur J Epidemiol* 2013;28(3):267-75.
87. Ford ES, Zhao G, Li C, Pearson WS. Serum concentrations of vitamin D and parathyroid hormone and prevalent metabolic syndrome among adults in the United States. *J Diabetes* 2009;1(4):296-303.
88. Maki KC, Fulgoni VL, 3rd, Keast DR, Rains TM, Park KM, Rubin MR. Vitamin D intake and status are associated with lower prevalence of metabolic syndrome in U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Surveys 2003-2006. *Metabolic Syndrome Relat Dis* 2012;10(5):363-72.
89. Hypponen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes* 2008;57(2):298-305.
90. Gagnon C, Lu ZX, Magliano DJ, Dunstan DW, Shaw JE, Zimmet PZ, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D is associated with increased risk of the development of the metabolic syndrome at five years: results from a national, population-based prospective study (The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study: AusDiab). *J Clin Endocrinol Metabolism* 2012;97(6):1953-61.
91. Barchetta I, De Bernardinis M, Capoccia D, Baroni MG, Fontana M, Fraioli A, et al. Hypovitaminosis D is independently associated with metabolic syndrome in obese patients. *PloS one* 2013;8(7):e68689.
92. Khan H, Kunutsor S, Franco OH, Chowdhury R. Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc* 2013;72(1):89-97.

93. Kayaniyil S, Harris SB, Retnakaran R, Vieth R, Knight JA, Gerstein HC, et al. Prospective association of 25(OH)D with metabolic syndrome. *Clin Endocrinol* 2014;80(4):502-7.
94. Chacko SA, Song Y, Manson JE, Van Horn L, Eaton C, Martin LW, McTiernan A, Curb JD, Wylie-Rosett J, Phillips LS, Plodkowski RA, Liu S. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in relation to cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):209–17.
95. Song HR, Park CH. Low serum vitamin D level is associated with high risk of metabolic syndrome in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 2013;36(10):791-6.
96. Chon SJ, Yun BH, Jung YS, Cho SH, Choi YS, Kim SY, et al. Association between vitamin D status and risk of metabolic syndrome among Korean postmenopausal women. *PLoS one* 2014;9(2):e89721.
97. Andreozzi P, Verrusio W, Viscogliosi G, Summa ML, Gueli N, Cacciafesta M, Albanese CV. Relationship between vitamin D and body fat distribution evaluated by DXA in postmenopausal women. *Nutrition* 2016;32(6):687–92.
98. Motiwala SR, Wang TJ. Vitamin D and cardiovascular risk. *Curr Hypertension Reports* 2012;14(3):209-18.
99. 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. *Arch Intern Med* 2008;168(12):1340-9.
100. Katsiki N, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Vitamin D deficiency, statin-related myopathy and other links with vascular risk. *Curr Med Res Opin* 2011;27(9):1691-2.

101. 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. *J Res Med Sciences* 2012;17(11):1052-5.
102. Kienreich K, Tomaschitz A, Verheyen N, Pieber T, Gaksch M, Grubler MR, et al. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients* 2013;5(8):3005-21.
103. Wang C. Role of vitamin d in cardiometabolic diseases. *J Diabetes Res* 2013;2013:243934.
104. Elamin MB, Abu Elnour NO, Elamin KB, Fatourehchi MM, Alkatib AA, Almandoz JP, et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1931-42.
105. 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. *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 2012;32(11):2794-802.
106. Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, Götting C, Kuhn J, Kleesiek K, et al. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1321-7.
107. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Ann Inter Med* 2010;152(11):726-32.
108. CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/physical/pdf/PAFact_Sheet_OlderAdults.pdf

109. Blumel JE, Legorreta D, Chedraui P, Ayala F, Bencosme A, Danckers L, et al. Optimal waist circumference cutoff value for defining the metabolic syndrome in postmenopausal Latin American women. *Menopause* 2012;19:433-437.
110. Kiebzak GM, Leamy LJ, Pierson LM, et. al. Measurement precision of body composition variabels using the lunar DPX-L densitometer. *J Clin Densitom* 2000;3:35-41.
111. Rech, CR; Lima, LRA; Cordeiro, BA, et. al. Validade de equações antropométricas para a estimativa da gordura corporal em idosos do sul do Brasil. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum* 2010;12(1):1-7
112. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chemistry* 1972;18(6):499-502.
113. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixture population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;72(2):219-20.

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 imune-inflamatórios e cardiometabólicos em mulheres na pós-menopausa” que será realizado sob a responsabilidade das Dras. Priscila Ferreira Poloni e Flávia Bueloni-Dias. Este estudo deseja conhecer se o uso da vitamina D tem benefício para o coração. A sua participação será de responder a questionário, com duração de 10 minutos, e passar por avaliação clínica com medida da pressão arterial, peso, altura e cintura. No dia da consulta serão colhidos 20 ml de sangue para dosagens de alguns exames. Neste estudo as participantes serão divididas em dois grupos, realizado por meio de sorteio onde apenas um grupo de mulheres receberá a vitamina D na forma de 5 gotas ao dia e outro usará apenas um líquido semelhante sem efeito algum, conhecido como placebo, na forma de 5 gotas ao dia. Você deverá retornar as consultas agendadas a cada três meses, durante um ano para seguimento. Ao final desse período você será submetida à nova avaliação clínica e a nova coleta de 20 ml de sangue para dosagens dos exames.

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, ____/____/_____.

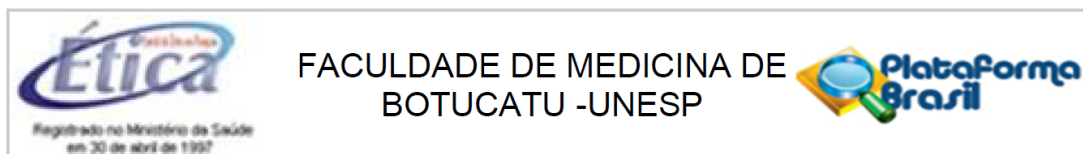
Assinatura da Participante

Assinatura do Pesquisador

Priscila Ferreira Poloni- e-mail: priscilaferr2@yahoo.com.br Fone:38801377

Flávia Bueloni Dias – email: flaviabueloni@hotmail.com Fone 38801402

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

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
Título e Resumo			
	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	_____
Introdução			
Fundamentação e objetivos	2a	Fundamentação científica e explicação do raciocínio	_____
	2b	Objetivos específicos ou hipóteses	_____
Métodos			
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	_____
Randomização:			
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	_____
Resultados			
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	_____
Números analisados	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)	_____
Discussão			
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	_____
Interpretação	22	Interpretação consistente dos resultados, balanço dos benefícios e danos, considerando outras evidências relevantes	_____
Outras informações			
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.