



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SHIRLEI MARINA CAMARGO

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D
SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS,
ANTROPOMÉTRICOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA**

SHIRLEI MARINA CAMARGO

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D
SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS,
ANTROPOMÉTRICOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini
Barbosa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle Venturini

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

CAMARGO, SHIRLEI MARINA.

AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS, ANTROPOMÉTRICOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA / SHIRLEI MARINA CAMARGO. - Londrina, 2017.
63 f.

Orientador: DÉCIO SABBATINI BARBOSA.

Coorientador: DANIELLE VENTURINNI.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.
Inclui bibliografia.

1. VITAMINA D - Tese. 2. ESTRESSE OXIDATIVO - Tese. 3. SÍNDROME METABÓLICA - Tese. 4. INFLAMAÇÃO - Tese. I. BARBOSA, DÉCIO SABBATINI. II. VENTURINNI, DANIELLE . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

SHIRLEI MARINA CAMARGO

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS,
ANTROPOMÉTRICOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Clisia Mara Carreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra Francis Fregonesi Brinholi
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 22 de junho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me direcionar e fortalecer em todos os momentos, que em meios a “obstáculos” me mostrou a todo instante estar comigo, e que a realização desse projeto era possível. Por colocar no meu caminho o melhor professor que poderia ter, meu orientador Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa, que muito além de um admirável profissional é um admirável ser humano.

Ao Prof. Décio agradeço por cada ensinamento, cada minuto que se dispôs a me orientar, com tanta sabedoria, paciência e amor pelo que faz. Me faltam palavras de agradecimento.

À Prof. Danielle Venturini, minha co-orientadora, que sempre se colocou à disposição para me ajudar, mesmo em momentos difíceis, a qual tenho imensa admiração.

As amigas Luciana Higachi e Carine Coneglian, alunas do laboratório de pós graduação da Uel, que sempre se dispuseram a me ajudar.

À Prof. Nilcéia Godoy Mendes, por ter me incentivado iniciar o mestrado. Ao meu atual trabalho (Colégio Londrinense / Unifil), representados aqui pelo reitor Dr. Eleazar Ferreira e a professora Lucievelyn Marrone que autorizaram o uso CEPS-Unifil, o qual facilitou muito a realização desse trabalho.

Aos amigos e à minha família, que de alguma forma estiveram presentes, em especial a Patrícia Camargo minha irmã que sempre me incentivou com suas palavras de carinho. Ao Elio Soares Jr, que me apoia desde o primeiro momento.

Aos pacientes dessa pesquisa, os quais reconheço que foram essenciais.

Aos alunos de farmácia e nutrição da UniFil que colaboraram com a coleta de dados, e aos alunos da Uel que colaboraram com a análise dos exames laboratoriais.

A todos os professores do Centro de Ciências da Saúde - UEL que tive o prazer de extrair um pouco do conhecimento, que foram fundamentais.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a execução desse trabalho.

*“Daqui a cinco anos estaremos bem próximos
de sermos as mesmas pessoas que somos
hoje, exceto por duas coisas, os livros que
lemos e as pessoas nas quais nos
aproximamos”
(Charles Jones)*

CAMARGO, Shirlei Marina. **Avaliação da suplementação de vitamina D sobre parâmetros metabólicos, inflamatórios, antropométricos e biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica.** 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Mesmo ocorrendo avanços na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos e dos fatores de risco que predispõem ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SM), muitos aspectos importantes ainda não foram esclarecidos. Dados convincentes relacionam a hipovitaminose D com uma maior prevalência de SM, sendo esta hipovitaminose cada vez mais diagnosticada laboratorialmente e presente em todos os estágios da vida, mesmo em países com climas tropicais. Assim, cada vez mais se dá importância na quantificação dos níveis de vitamina D e se propõe que esta análise possa ser uma nova aliada na avaliação de risco para várias doenças crônicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de vitamina D sobre os parâmetros metabólicos, inflamatórios, antropométricos e biomarcadores de estresse oxidativo (EO) em indivíduos com SM. Realizou-se um ensaio clínico não controlado. Participaram 41 indivíduos com síndrome metabólica, em sobrepeso ou obesidade, com idade média de 50 anos e foram analisados inicialmente níveis da 25 hidróxi – vitamina D, dados antropométricos, metabólicos, de estresse oxidativo e inflamatórios. Esses indivíduos fizeram uso de vitamina D₃ durante 90 dias e após este período, as mesmas análises e medidas foram feitas. Na análise estatística foram realizados o teste de Shapiro-Wilk e de Levene para verificação da distribuição normal e homogeneidade dos dados. Constatada a normalidade na distribuição destes, utilizou-se o teste t pareado de Student; caso contrário utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon. Por fim, análises multivariadas foram empregadas para verificação de associações entre variáveis dependentes e independentes. Os melhores resultados obtidos nesse trabalho foram as reduções da pressão arterial sistólica e diastólica, dos níveis do PTH, colesterol total, colesterol LDL, colesterol não HDL, índice de risco aterogênico Castelli I e aumento da atividade da Paraoxonase 1 (PON 1) e ácido úrico. Nossos dados confirmam que a manutenção de concentrações plasmáticas adequadas de vitamina D pode contribuir na prevenção de doenças cardiovasculares em pacientes com SM, porém *per se* não é capaz de tratar essa doença.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Inflamação. Síndrome metabólica. Vitamina D.

CAMARGO, Shirlei Marina. **Evaluation of vitamin D supplementation on metabolic, inflammatory, anthropometric parameters and oxidative stress biomarkers in patients with metabolic syndrome**, 2017. 63 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Even though there were advances in the understanding of the pathophysiological mechanisms and risk factors that predispose to the development of metabolic syndrome (MS), many important aspects are still unclear. Convincing data relate vitamin D deficiency to a higher prevalence of. The aim of this study was to evaluate the vitamin D action in clinical and laboratorial indicators in individuals with MS. The hypovitaminosis D is being increasingly laboratory diagnosed and present in all stages of life, even in countries with tropical climates. Thus, it is increasingly important to quantify levels of vitamin D and it is proposed that this analysis may be a new ally in the assessment of risk for various chronic diseases. The objective of this study was to evaluate the effect of vitamin D supplementation on the metabolic, inflammatory, anthropometric and oxidative stress (EO) biomarkers parameters in individuals with MS. It has been performed an uncontrolled clinical trial with 41 subjects overweight or obesity metabolic syndrome, with an average age of 50 years old, it has been analyzed initially the levels of 25 - hydroxy - vitamin D, anthropometric, metabolic, oxidative stress and inflammatory data. These individuals took vitamin D₃ for 90 days and after this period, the same analysis and measurements were carried out. In the statistical analysis, the Shapiro-Wilk and Levene tests were performed to verify the normal distribution and homogeneity of the data, later for the normal distribution found, the paired Student's t-test was used; Wilcoxon non-parametric test was used. Finally, multivariate analyzes were used to verify associations between dependent and independent variables. The best results obtained in this study were reductions in systolic and diastolic blood pressure, Parathyroid hormone levels, total cholesterol, LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, Castelli I atherogenic risk index and increased activity of Paraoxonase 1 (PON 1) and uric acid. Our data confirm that the maintenance of adequate plasma concentrations of vitamin D may contribute to the prevention of cardiovascular diseases in patients with MS, but per se it is not able to treat this disease.

Keywords: Inflammation. Metabolic syndrome. Oxidative stress. Vitamin D.

LISTA DE ABREVIÇÃO

| | |
|------------|---|
| AOPP | Produtos avançados de oxidação proteica |
| %GC | Porcentagem de Gordura Corporal |
| ATP III | Adult Treatment Panel III |
| AU | Ácido úrico |
| CT | Colesterol Total |
| DM | <i>Diabetes mellitus</i> |
| DCV | Doença cardiovascular |
| EO | Estresse oxidativo |
| G6PD | Glicose-6-fosfato-desidrogenase |
| GGT | Gama glutamil transferase |
| HDL-c | Lipoproteína de alta densidade |
| HMG-CoA | 3-Hidroxi-3- Metilglutaril |
| HOMA – IR | Homeostatic model assessment – insulin resistance |
| IDF | International Diabetes Federation |
| IMC | Índice de massa corporal |
| LDL-c | Lipoproteína de baixa densidade |
| NADPH | Enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato |
| NCEP | Nacional Cholesterol Education Program |
| NHANES III | Terceiro estudo nacional de saúde e nutrição |
| NO | Óxido nítrico |
| NOx | Metabólitos do óxido nítrico (NOx) |
| OMS | Organização Mundial Da Saúde |
| PANEL III | Terceiro Programa Tratamento Adulto |
| PCR | Proteína C-reativa |
| PON1 | Paraoxonase 1 |
| PTH | Paratormônio |
| RNS | Espécie reativa de nitrogênio |
| ROS | Espécie reativa de oxigênio |
| SM | Síndrome metabólica |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SRAA | Sistema-Renina-Angiotensina-Aldosterona |

TG

Triglicerídeos

VDR

Receptor da vitamina D

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 | SINDROME METABÓLICA E VITAMINA D | 10 |
| 1.2 | VITAMINA D, DEFINIÇÃO E SÍNTESE | 13 |
| 1.3 | VITAMINA D E SUA INTERAÇÃO COM A SÍNDROME METABÓLICA E SEUS COMPONENTES | 15 |
| 1.3.1 | Vitamina D e obesidade | 16 |
| 1.3.2 | Vitamina D e hipertensão | 17 |
| 1.3.3 | Vitamina D e metabolismo glicídico | 17 |
| 1.3.4 | Vitamina D, metabolismo lipídico e biossíntese do colesterol | 18 |
| 1.4 | VITAMINA D E RISCO CARDIOVASCULAR | 19 |
| 1.5 | RELAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA, ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E VITAMINA D | 20 |
| 2 | OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 | GERAL | 23 |
| 2.2 | ESPECÍFICOS | 23 |
| 3 | METODOLOGIA | 24 |
| 3.1 | DETERMINAÇÕES ANTROPOMÉTRICAS E VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL | 25 |
| 3.2 | ANÁLISES LABORATORIAIS | 25 |
| 3.2.1 | Coleta e Preparo das Amostras | 25 |
| 3.2.2 | Marcadores inflamatórios, vitamina D e parâmetros bioquímicos | 25 |
| 3.2.3 | Determinação de metabólitos de óxido nítrico (NOx) | 26 |
| 3.2.4 | Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) | 26 |
| 3.2.5 | Determinação da atividade da paraoxonase1 (PON 1) | 27 |
| 3.3 | ANÁLISES ESTATÍSTICA | 27 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5 | CONCLUSÃO | 48 |
| | REFERÊNCIAS..... | 49 |
| | APÊNDICE | 61 |
| | Termo de consentimento livre e esclarecido | 62 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME METABÓLICA E VITAMINA D

A síndrome metabólica (SM) refere-se a um conjunto de distúrbios que aumentam o risco para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM) e doenças cardiovasculares. Dentre os critérios para se caracterizar um indivíduo com SM, pode-se citar a obesidade abdominal, hiperglicemia, hipertensão, hipertrigliceridemia e níveis diminuídos de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) (1).

Desde o início, quando Reaven em 1988 (2) tornou público o conceito de “Síndrome X”, até a atualidade, organizações internacionais e grupos de especialistas preocupam-se em estabelecer parâmetros e limiares que possam ser úteis no diagnóstico da SM. Dentre essas definições, destacam-se a proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que, em 1998, apresentou uma visão mais glicocêntrica, o *Adult Treatment Panel III* (ATPIII) proposto pelo *National Cholesterol Education Program* (NCEP), de 2001, revisado em 2004, que enfatiza os fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular e a definição proposta pela *International Diabetes Federation* (IDF), de 2005, que apresenta a obesidade como foco principal da definição de SM (3).

No Brasil, o NCEP-ATPIII é a definição recomendada pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, tendo-se em vista a simplicidade e a aplicabilidade dessa definição para a prática clínica (4), conforme tabela 1.

TABELA 1. Definição de Síndrome Metabólica segundo *Adult Treatment Panel III* (ATP III)

| Parâmetro | Número de alterações ≥ 3 de: |
|----------------|--|
| Glicose | ≥ 100 mg/dL ou em tratamento para hiperglicemia |
| HDL-colesterol | Homens: < 40 mg/dL ou em tratamento para HDL baixo Mulheres: < 50 mg/dL ou em tratamento para HDL baixo |
| Triglicérides | ≥ 150 mg/dL ou em tratamento para triglicérides elevados |
| Obesidade | Cintura ≥ 102 cm para homens ou ≥ 88 cm para mulheres |
| Hipertensão | $\geq 130 \times 85$ mmHg ou em tratamento medicamentoso para HAS |

Desde o princípio até as mais recentes definições, propostas pela OMS, pelo Grupo Europeu para o Estudo de Resistência à Insulina, pelo NCEP e pela IDF, destacam-se os papéis da resistência à insulina e da obesidade central como componentes-chave da SM (5).

A SM é vista por alguns pesquisadores como uma complicação da obesidade, enquanto outros afirmam que a resistência à insulina é o principal fator de risco subjacente. De qualquer maneira, esta condição possui importantes implicações para a saúde pública devido aos conhecidos riscos à saúde associados a ela. A evidência de que a SM é uma condição emergente em grande parte da população torna a identificação de fatores de risco uma prioridade importante (6).

Embora os indivíduos resistentes à insulina possam não ser clinicamente obesos, eles comumente terão uma distribuição anormal de gordura pelo corpo que é caracterizada pela predominância de gordura visceral. Descreve-se que essa obesidade corporal superior, responsável pela acumulação ectópica de lipídios nos músculos e no fígado, predispõe ao desenvolvimento de resistência à insulina e dislipidemia (7).

Estima-se que a SM acometa entre 20% a 25% da população adulta e essa prevalência vem aumentando, devido a obesidade e o estilo de vida sedentário, chegando a 42% em indivíduos com mais de 60 anos (8). A SM é responsável por aproximadamente 7% dos óbitos globais, independentemente da causa, e por 17% daqueles relacionados com Doenças Cardiovasculares (DCV). Ela aumenta em 34% e 16% o risco para DCV em homens e mulheres, respectivamente. Ao se tomar como base cada componente da SM, os mais mórbidos são a pressão arterial elevada (33%) e os níveis séricos diminuídos de HDL-c (25%) (9).

Associada à epidemia global de obesidade e diabetes, a SM, devido ao aumento alarmante de sua incidência, pode ser considerada uma epidemia (10). Observa-se que, atualmente, houve uma mudança preocupante no estilo de vida das pessoas tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, determinada pelo aumento do consumo calórico e pela diminuição da prática de atividade física (2). Desse modo, em vista os inúmeros riscos associados a essa síndrome, muitos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos, os fatores genéticos e ambientais predisponentes, bem como futuros alvos terapêuticos que possibilitem não somente o tratamento, mas a prevenção da SM (11).

No Brasil, somente há alguns anos, o interesse pela pesquisa em SM tornou-se evidente, haja vista o aumento da conscientização sobre a importância dessa epidemia mundial. Em consequência desse atraso na produção científica brasileira,

estudos de base populacional sobre SM são escassos e não há critério de obesidade central específico para a nossa população, as referências são internacionais. No entanto, diversos estudos têm sido propostos na tentativa de identificar e caracterizar melhores pontos de corte para a população brasileira (12).

Apesar dos avanços na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos e dos fatores de riscos que predisõem um indivíduo ao desenvolvimento de SM, alguns aspectos ainda não foram completamente esclarecidos, tais como os distúrbios hormonais. A variação de susceptibilidade à SM observada entre indivíduos com fatores de risco semelhantes, sugere a ocorrência de uma interação importante entre fatores genéticos e ambientais em sua patogenia. Atualmente, outros fatores têm sido descritos como coadjuvantes para a patogênese dessa síndrome. Pode-se destacar o estresse crônico, alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e no sistema nervoso autonômico; a alteração do ambiente redox intracelular, a atividade do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), a presença de micro RNAs e a deficiência de vitamina D (3,13).

O estresse crônico, principalmente através da desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, promove a acumulação de gordura visceral. Reciprocamente, a obesidade promove um estado inflamatório sistêmico de baixo grau, mediado por alterações na secreção de adipocinas, que cronicamente podem alterar o metabolismo normal do indivíduo, propiciando o início e manutenção deste estresse crônico. Esse círculo vicioso, provavelmente iniciado pela disfunção do tecido adiposo visceral, pode ser o mecanismo primário que conduz ao desenvolvimento da síndrome metabólica (14).

O SRAA, mais conhecido por seus papéis fundamentais na regulação da pressão arterial e do equilíbrio hídrico, também tem papel potencial em vários aspectos da SM. Pode servir como um elo causal entre a obesidade e várias comorbidades, sendo que há evidências de que o SRAA contribui para a regulação do peso corporal, atuando em diferentes tecidos (15).

Os micro RNAs são pequenos RNAs não codificantes (ou seja, agem inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvo) com cerca de 22 nucleotídeos, que atuam como reguladores da expressão gênica na maioria dos processos biológicos em plantas e animais. A alteração na expressão de RNAs tem sido associada à várias patologias, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes (16). Vários estudos têm destacado o significado de micro RNAs na manutenção da homeostase metabólica, e, portanto, a regulação destes micro RNAs podem servir como potenciais alvos terapêuticos em doenças metabólicas (17,18).

Por fim, existem dados convincentes que relacionam a hipovitaminose D com uma maior prevalência de SM em uma variedade de populações (19). Sabe-se que os receptores de vitamina D estão envolvidos na expressão de cerca de 3000 genes humanos e sua deficiência pode afetar potencialmente numerosos processos patológicos (2,20).

1.2 VITAMINA D, DEFINIÇÃO E SÍNTESE

A vitamina D é reconhecida como um hormônio esteróide fundamental para a homeostase do cálcio e o metabolismo ósseo. A principal fonte endógena de vitamina D nos seres humanos provém da irradiação de raios ultravioleta (UVB) na pele, os quais convertem o 7-deidrocolesterol em vitamina D₃ (coleciferol) (21). A partir da pele, a vitamina D₃ vai à circulação geral e sofre uma primeira hidroxilação no fígado, gerando a 25(OH)D (calcidiol), metabólito mais abundante e estável da vitamina D e considerado o melhor indicador do *status* dessa vitamina no corpo. Em seguida, o calcidiol circulante chega aos rins onde sofre nova hidroxilação e é convertido em 1,25(OH)₂ D (calcitriol), forma ativa do hormônio que age por meio de seu receptor nuclear em diversos tipos celulares (22) conforme figura 1.

O papel da vitamina D na regulação do metabolismo ósseo está bem estabelecido há décadas (23). A vitamina D e o paratormônio (PTH) são dois reguladores principais do metabolismo mineral. Eles desempenham papéis fundamentais na manutenção da homeostase de cálcio e fosfato, bem como o desenvolvimento e manutenção da saúde óssea. PTH e vitamina D formam um ciclo de *feedback* controlado, o PTH sendo um estimulador principal da síntese de vitamina D no rim, enquanto a vitamina D exerce *feedback* negativo sobre a secreção de PTH. A vitamina D estimula a absorção intestinal de cálcio, a mineralização óssea e regula a síntese e secreção do PTH. Ambos os hormônios atuam em sintonia sendo que estudos recentes demonstram os efeitos da PTH e da vitamina D sobre o sistema cardiovascular (24,25). O hiperparatiroidismo e a deficiência de vitamina D têm sido implicados em uma variedade de distúrbios cardiovasculares incluindo hipertensão, aterosclerose, calcificação vascular e insuficiência renal. Ambos os hormônios têm efeitos diretos sobre o endotélio, coração e outras estruturas vasculares. (25). O hiperparatiroidismo secundário também pode aumentar o risco de desenvolver componentes da síndrome metabólica, incluindo hipertensão (26,27), obesidade e diabetes (27,28).

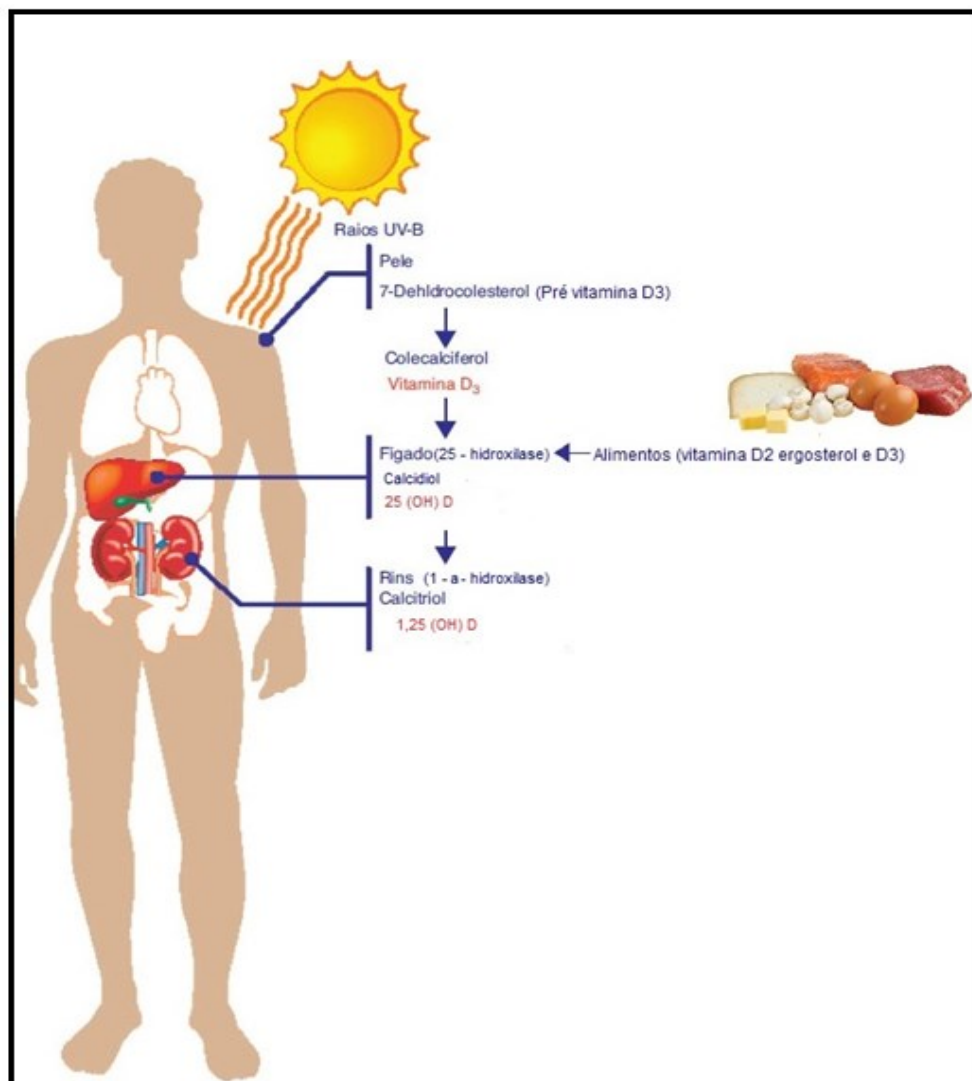


Figura 1. Síntese e metabolismo da vitamina D, processo metabólico sequencial, convertendo biologicamente a vitamina D inativa em sua forma ativa.

Adaptado Lichtenstein *et al.* 2013.

Além dos seus conhecidos efeitos no sistema musculo esquelético, a deficiência e/ou insuficiência de vitamina D (hipovitaminose D) tem sido associada a uma variedade de condições clínicas que incluem doenças autoimunes, como diabetes *mellitus* tipo 2 (22); doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e aterosclerose (29); neoplasias; obesidade (30); resistência à insulina e intolerância à glicose (21). As maiores causas de hipovitaminose D estão relacionadas a uma baixa exposição solar e a uma pobre ingestão alimentar, uma vez que sua ocorrência natural nos alimentos é pequena e a suplementação com essa vitamina não é feita rotineiramente em todos os países (31). A síntese de vitamina D é proporcional à área exposta à luz solar e depende não só de fatores ambientais como latitude, estação do

ano, hora do dia (31), mas também de uso de protetor solar e roupas que cobrem boa parte do corpo (32).

Nos seres humanos, em torno de 10% a 20% da vitamina D necessária à adequada função do organismo provém da dieta. As principais fontes dietéticas são a vitamina D3 (colecalfiferol), de origem animal, presente nos peixes ricos em ácidos graxos de ω -3 de água fria e profunda, como atum e salmão e a vitamina D2 (ergosterol), de origem vegetal, presente nos fungos comestíveis. Os restantes 80% a 90% são sintetizados endogenamente (33).

A hipovitaminose D é altamente prevalente e constitui um problema de saúde pública em todo mundo. Estudos mostram uma elevada prevalência dessa doença em várias regiões geográficas, incluindo o Brasil. Pode acometer mais de 90% dos indivíduos dependendo da população estudada (34,35).

Em um estudo realizado por Unger *et. al.* (2010), foi encontrado a prevalência de hipovitaminose D em 77% da população adulta em São Paulo. Nos Estados Unidos estudos mostram uma prevalência entre 20% a 70% de prevalência da hipovitaminose D na população (36,37).

A diretriz da *Endocrine Society* (Sociedade de Endocrinologia dos Estados Unidos) orienta a utilizar os seguintes critérios para interpretação do grau de suficiência em 25(OH)D (50): deficiência: < 20 ng/mL (70 nmol/L); insuficiência: 21 – 29ng/mL (52,5 – 72,5nmol/L); suficiência: 30 – 100 ng/mL (75 – 250 nmol/L) (38).

1.3 VITAMINA D E SUA INTERAÇÃO COM A SÍNDROME METABÓLICA E SEUS COMPONENTES

A hipovitaminose D está sendo cada vez mais diagnosticada laboratorialmente e está presente em todos os estágios da vida, mesmo em países com climas tropicais. A importância dos níveis de vitamina D como um novo fator de risco para várias doenças crônicas ganha cada vez mais interesse. Estudos avaliando a associação entre vitamina D e SM é uma área recente que vem despertando a curiosidade e atenção de vários pesquisadores (6,39).

Um estudo do Terceiro Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES III), onde foi verificada a associação entre vitamina D e SM, envolveu uma amostra representativa da população dos EUA (8421 homens e mulheres não grávidas que tinham 20 anos de idade ou mais). Para investigar a associação entre a concentração de vitamina D e SM, a população foi segregada com base nos níveis séricos de 25-(OH)-vitamina D. A associação entre as comorbidades que caracterizam a SM com os

níveis de vitamina D foi evidenciada por análise de regressão logística múltipla para controlar outros fatores potencialmente confundidores. Cerca de 1 em cada 5 indivíduos adultos apresentavam SM. A concentração média de 25-(OH)-vitamina D no sangue dos indivíduos com a síndrome foi de 67,1 nmol/L, significativamente menor do que em indivíduos sem a doença, com concentração média DE 75,9 nmol/L. O estudo também encontrou uma associação inversa significativa para os níveis séricos desta vitamina com alguns dos componentes individuais da SM, incluindo adiposidade abdominal, hipertrigliceridemia e hiperglicemia (40).

1.3.1 Vitamina D e obesidade

A adiposidade é um determinante importante nas concentrações séricas de vitamina D e pode, primariamente, estar relacionada aos baixos níveis séricos desse hormônio. A associação entre obesidade e baixas concentrações de vitamina D foi teorizada há mais de 30 anos e, neste período, acreditavam que era devido ao sequestro da vitamina D, um composto lipofílico, pelo tecido adiposo e muscular (41). Um estudo conduzido por Snidjer *et al.* (2005) evidenciou baixos níveis séricos de vitamina D e altos níveis séricos de PTH em pacientes obesos além de uma associação inversa entre gordura corporal e vitamina D sérica (42). Resultados similares foram observados por Arunabh *et al.* (2015) que encontraram uma associação inversa entre peso corporal e níveis séricos de vitamina D em 410 mulheres saudáveis IMC $23,9 \pm 2,9$ kg/m². Neste estudo, os níveis séricos de vitamina D diminuíram progressivamente com o aumento da gordura corporal mesmo após ajuste de idade, raça, estação e ingestão dietética de vitamina D (43). E de acordo com meta-análise recente, indivíduos obesos tem 35% a mais de risco em ter deficiência de vitamina D em todas as faixas etárias, quando comparado com indivíduos em eutrofia (44).

Na prevenção da obesidade utilizando a suplementação com vitamina D, Caanet *al.* (2007) realizaram a análise dos dados do estudo *Women's Health Initiative (WHI)* que englobou 36.282 mulheres na pós menopausa, com idade entre 50 e 79 anos. Os autores verificaram menor ganho de peso durante o uso de suplementação com 1.000 mg de cálcio e 400UI de colecalciferol, quando comparadas ao grupo controle (45).

1.3.2 Vitamina D e hipertensão

Foi demonstrado que a vitamina D inibe o SRAA, ajuda a proteger os vasos sanguíneos e contribui para a homeostase de cálcio. Estes mecanismos podem explicar, em parte, a relação inversa entre os níveis de vitamina D e pressão arterial observado em vários estudos. Estima-se que o déficit de vitamina D na população em geral é de 30-50%, o que representa um grande problema de saúde em muitos países (46).

A vitamina D regula a pressão arterial via SRAA e, em humanos, observa-se uma relação inversa entre níveis séricos de vitamina D e atividade da renina (47). Além disso, a vitamina D pode ter um efeito direto no sistema vascular, uma vez que as células endoteliais expressam o *vitamin D receptor* (VDR). Pfeifer *et. al.*, (2001) conduziram um estudo que avaliou a suplementação de vitamina D por oito semanas em mulheres com baixos níveis de vitamina D e encontraram, após suplementação, um aumento em 72% nos níveis desta vitamina e redução da pressão arterial sistólica (48). O estudo transversal (NHANES III) mostrou que os participantes com níveis de vitamina D >85,7nmol/L apresentaram valores mais baixos de pressão arterial quando comparados aos indivíduos com níveis de vitamina D <40,4nmol/L (49). Estudos de coorte prospectivos conduzidos pelo *Health Professionals' Followup* e pelo *The Nurses' Health Study* demonstraram um aumento no risco de hipertensão nos indivíduos com insuficiência de vitamina D (<37,5nmol/L) quando comparados aos que apresentaram níveis de vitamina D acima de 75nmol/L (50).

1.3.3 Vitamina D e metabolismo glicídico

A vitamina D parece afetar a secreção de insulina mediada pelos níveis plasmáticos de glicose por mecanismo direto e indireto. Os efeitos diretos são provavelmente mediados pela interação da vitamina D com seu receptor VDR presente nas células β pancreáticas (51). Os indiretos, por sua vez, estão associados com a regulação do influxo de cálcio para liberação da insulina já formada pelas células β pancreáticas (52). Um estudo mostrou uma associação inversa entre os níveis séricos de vitamina D com glicemia, insulina e HOMA-IR após ajuste do índice de massa corporal (IMC) (53). Em outro estudo prospectivo que avaliou a relação entre vitamina D e risco de hiperglicemia, os autores confirmaram uma associação inversa entre vitamina D e HOMA-IR, mesmo após ajuste de IMC, idade e sazonalidade (54). Entretanto, em pacientes com SM, os resultados são contraditórios. Em um estudo conduzido por Miñambres *et al.* (2012), os pacientes com deficiência de

vitamina D quando comparados aos pacientes com níveis normais de vitamina D apresentaram altos níveis de HOMA-IR, porém após análise de regressão logística, foi observada falta de associação entre essas variáveis (55).

1.3.4 Vitamina D, metabolismo lipídico e biossíntese do colesterol

A biossíntese endógena do colesterol inicia-se na união de duas moléculas de acetil-Coa. A enzima solúvel acetoacetil-CoA tiolase interconverte acetil-CoA e acetoacetil-CoA e a enzima HMG-CoA redutase, que em seguida, condensa-se a 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-CoA sintase para formar inibidores da HMG-CoA redutase, que catalisam a redução de HMG-CoA utilizando duas moléculas de NADPH em mevalonato. Mevalonato é metabolizado a farnesil-difosfato, depois em esqualeno, que é convertido em lanosterol. Lanosterol é então convertido em colesterol por uma série de oxidações, reduções e desmetilações (56), conforme figura 2.

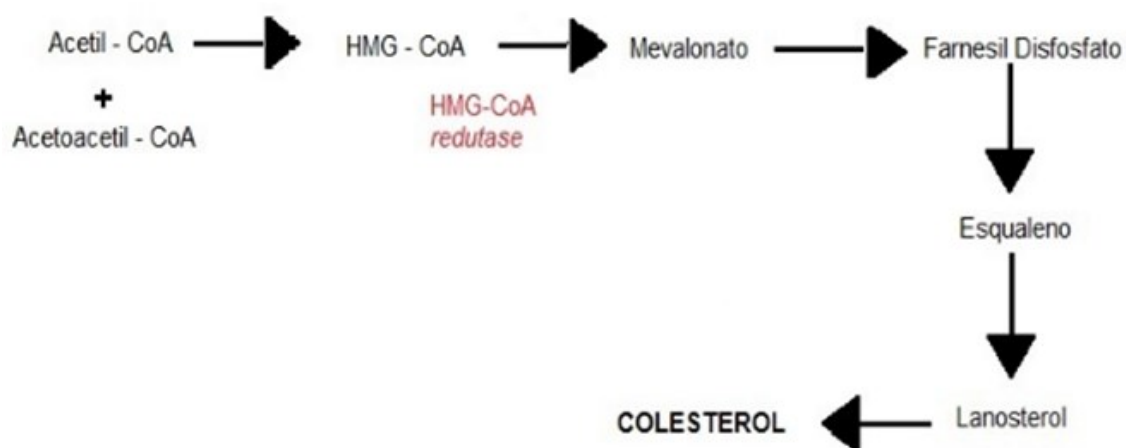


Figura 2 - Biossíntese do Colesterol, processo de conversão do acetil COA até se formar o colesterol. Adaptado de Linscum (2002).

Estudos relatam que a 25hidroxi- colecalciferol e a 1,25-(OH) colecalcitriol causam inibição da biossíntese do colesterol em dois locais diferentes. A inibição ocorre na desmetilação do lanosterol, e um segundo local de inibição ocorre na HMG-CoA redutase (57) .

Concentrações baixas de vitamina D têm sido observadas em alguns pacientes com DCV e em indivíduos dislipidêmicos. A hipovitaminose D tem sido associada com o aumento nas concentrações de colesterol total (CT), porém os resultados de estudos que avaliaram o impacto da suplementação de vitamina D no

perfil lipídico são controversos. Estudos da NHANES III (n = 15.088) revelaram que altos níveis de triglicerídeos (TG) foram significativamente associados com níveis de vitamina D ($p < 0,001$) (58). Entretanto, no estudo de NHANES 2003-2004, uma correlação positiva entre vitamina D e HDL-c ($p = 0,004$) foi encontrada, porém nenhuma correlação foi observada com os níveis de TG (59). Adicionalmente, em adultos jovens (n = 381) os níveis de vitamina D foram positivamente correlacionados com níveis de HDL-c ($p < 0,01$), enquanto que os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foram inversamente correlacionados com esta vitamina nos homens (n = 201) ($p = 0,007$) (60). Carbone *et al.* (2008), evidenciaram uma correlação positiva entre níveis de vitamina D com apoproteína AI ($p < 0,03$) e negativa relação com LDL-c/HDL-c ($p < 0,044$) em 51 indivíduos saudáveis (61). Estudo conduzido por Heikkinen *et al.* (1997) (62) não indicou melhora nos níveis de colesterol total, LDL-c e HDL-c após um ano de suplementação com vitamina D em mulheres pós-menopausa. Por outro lado, a suplementação com vitamina D e cálcio (200UI/dia e 600mg/dia, respectivamente) por 15 semanas resultou em redução pronunciada nos níveis de colesterol total, LDL-c e LDL-c/HDL-c em 63 mulheres com sobrepeso ou obesidade quando comparadas às que receberam placebo (63).

1.4 VITAMINA D E RISCO CARDIOVASCULAR

A doença DCV é a principal causa de mortalidade, com exceção do câncer. É a doença que tem maior impacto nos gastos com os sistemas de cuidados de saúde e na economia de vários países em todo o mundo, tendo previsão de mais de 23 milhões de indivíduos sofrendo com esta doença e suas consequências anualmente até 2030 (64, 65).

A literatura relata a deficiência de vitamina D como um fator de risco para DCV, e como um preditor biológico chave para taxas aumentadas desta doença (66). Existem alguns mecanismos plausíveis que explicam como a vitamina D pode estar ligada a DCV (67). Ela regula o SRAA (46, 67), suprime a proliferação do músculo liso das células vasculares (67), melhora a resistência à insulina (45, 67) melhora a vasodilatação dependente de células endoteliais, inibe atividade anticoagulante e hipertrofia de células miocárdicas e pode modular a atividade de macrófagos e a geração de citocinas (67).

Para avaliar o risco cardiovascular, diversos índices foram propostos e atualmente são muito utilizados. Podemos citar dentre eles os índices de Castelli I e II além das relações CT/TG e LDL/TG (68).

1.5 RELAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA, ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E VITAMINA D

Embora a produção desregulada de citocinas pró inflamatórias em pacientes obesos esteja fortemente associada à SM (69), estudos recentes mostraram que o EO também está relacionado criticamente na patogênese desta doença. Nos últimos anos, o papel potencial do EO na SM está evoluindo rapidamente. Embora seja aceito que o principal mecanismo patogênico da SM dependa da resistência à insulina, existe também a ligação entre esta doença, um estado de inflamação crônica em baixo nível e o EO. De fato, o EO desempenha um papel importante na patogênese das alterações vasculares por desencadeamento ou exacerbação dos processos bioquímicos que acompanham essa síndrome (70,71).

O EO é conhecido por prejudicar a secreção de insulina pelas células β pancreáticas (72) e o transporte de glicose para o músculo (73) e tecido adiposo (74). O aumento do EO nas paredes vasculares está envolvido na patogênese da aterosclerose, hipertensão e esteatose hepática (69). EO, produzido localmente em cada um dos tecidos citados acima, induz danos às estruturas celulares, incluindo membranas, proteínas e DNA e, por estas razões, o EO parece estar envolvido na patogênese de cada doença levando à SM (75). Em primeiro lugar, o acúmulo de gordura visceral induz um aumento na peroxidação lipídica sistêmica e danos por excesso de ácidos graxos livres e citocinas como o TNF- α , que então desencadeiam agressões oxidativas em nível sistêmico (76). Em segundo lugar, os pacientes com SM apresentam as defesas antioxidantes em concentrações reduzidas. Com relação a hipertensão, o equilíbrio redox é um conhecido regulador fisiológico da pressão arterial, e estudos recentes observaram que o EO causa disfunção endotelial, levando ao aumento da pressão arterial e doença arterial coronariana. Em relação a dislipidemia, muitos estudos *in vitro* e *in vivo* relataram maior liberação de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS) e menor síntese de superóxido dismutase (SOD) em dislipidemias (69,74,75,76).

O desequilíbrio entre a produção de espécies químicas radicalares e a presença de substâncias com ação antioxidante (com predomínio do primeiro) em seres vivos é definido como EO (77). A ação prejudicial de radicais livres, quase sempre representados por ROS e/ou espécie reativa de nitrogênio (RNS), tem sido implicada na obesidade, hipertensão, disfunção endotelial e na fisiopatologia da SM (78,79). Um poderoso neutralizador de radicais livres é o ácido úrico (AU) que responde por 60% da capacidade de eliminação dos mesmos no plasma (80). É

considerado um dos antioxidantes mais poderosos no sangue de seres humanos e em pássaros (81). Alguns estudos demonstraram que existe benefício na administração intraperitoneal ou intravenosa de AU em modelos experimentais de várias doenças que envolvem aumento do EO, incluindo esclerose múltipla, alzheimer, acidentes vasculares e lesões da medula espinhal (82,83).

A inflamação tem um papel importante no desenvolvimento de doenças crônicas como câncer, artrite reumatoide, asma, doenças neurodegenerativas, diabetes e DCV. No entanto, se a inflamação causa estresse oxidativo (ou vice-versa) não é clara. As RNS podem induzir dano celular e iniciar a inflamação. Felizmente, a inflamação e o estresse oxidativo podem ser controlados com antioxidantes endógenos e exógenos. Nos indivíduos que têm SM, a inflamação e o estresse oxidativo encontram-se em níveis aumentados, enquanto as defesas antioxidantes apresentam-se diminuídas (84,85).

Alguns estudos têm relacionado o estresse oxidativo com a obesidade e com os níveis de glicose e hiperinsulinemia, contribuindo para o desenvolvimento da resistência periférica à ação da insulina em pacientes obesos (5, 86, 87). A obesidade está associada ao aumento do estresse oxidativo e este pode desencadear o desenvolvimento da resistência à insulina (5).

Menon et al. (87) demonstraram que existe uma relação direta entre os níveis de produto da peroxidação lipídica e glicose quando esta se encontra em níveis superiores a 7,0 mmol/L (126,2 mg/dL). Indivíduos adultos com SM apresentam menor concentração plasmática individual de vários antioxidantes e isto parece ser devido à menor ingestão destes compostos na dieta, assim, como também, pelo seu maior consumo devido ao estresse oxidativo (88). Um trabalho realizado com crianças obesas com SM verificou que o estado antioxidante (verificado pela metodologia do *status* antioxidante total -TAS), e os níveis plasmáticos de vitamina C e vitamina E são significativamente inferiores quando comparados àqueles encontrados em crianças obesas sem SM e crianças magras (89). A resistência à insulina avaliada pelo *Homeostatic model assessment – insulin resistance* (HOMA-IR), em pacientes hipercolesterolêmicos, aumenta o EO e influencia negativamente o sistema antioxidante total (evidenciado pela metodologia do Total Radical –*Trapping Antioxidant Parameter* -TRAP) (90).

Na presença da obesidade associada ao EO, adipocitocinas liberadas em grande quantidade ativam a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase resultando em aumento da síntese de ROS, como o radical superóxido. No endotélio, esse radical reage rapidamente com o óxido nítrico (NO) formando

peroxinitrito, uma espécie ainda mais reativa. Assim, a produção de ROS contribui para a disfunção endotelial pela diminuição da biodisponibilidade de NO. Entretanto, o estresse oxidativo não ocorre somente por meio desse mecanismo, já que indivíduos obesos apresentam um consumo aumentado de oxigênio em resposta ao aumento de carga mecânica e de metabolismo miocárdico. Uma das consequências negativas dessa característica é a produção de ROS derivados da respiração celular e da perda de elétrons ao longo da cadeia respiratória (91).

Os principais alvos do EO são o DNA, as proteínas, lipídeos e açúcares. Os produtos de oxidação proteica (AOPP) é considerado marcadores de oxidação e dano à proteínas em geral, podendo ser utilizados para estimar o dano oxidativo proteico (92, 93). A Gama Glutamil Transferase (GGT) pode refletir alterações metabólicas e também servir como um marcador de resistência à insulina. Estudos sugerem que a GGT, é uma medida fácil, universalmente padronizada e disponível, e pode representar um marcador precoce de inflamação subclínica e estresse oxidativo (94,95).

Em 1993, Wiseman demonstrou pela primeira vez que a vitamina D possui ação antioxidante, podendo prevenir a peroxidação lipídica dependente do ferro na membrana celular, e agindo de forma semelhante ao medicamento para o câncer Tamoxifeno, em função de um mimetismo molecular (96). Desde então, muitos mais estudos foram realizados, e os mecanismos da vitamina D tornaram-se cada vez mais claros (97).

Um estudo recente experimental demonstrou que a suplementação com vitamina D (500UI/kg) foi capaz de proteger ratos diabéticos contra o EO (avaliado pelos peróxidos totais e capacidade antioxidante total tanto no soro quanto no fígado) (98). A vitamina D, em determinadas situações, pode atuar tanto como antioxidante quanto como pró-oxidante (99). Agindo como antioxidante, pode reduzir o estresse oxidativo por vários mecanismos: prevenindo a peroxidação lipídica das membranas celulares, aumentando a atividade da GGT e da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e induzindo a síntese da glutathione peroxidase e da SOD. Por outro lado, sua capacidade pró-oxidante se dá pela redução nos níveis de glutathione redutase (100).

Em função do exposto acima e pela controvérsia em alguns estudos se a deficiência da vitamina D poderia realmente estar relacionada a alguns aspectos da SM e se a reposição desta vitamina reduziria o EO e a inflamação em pacientes com deficiência desta, é que propomos este trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de vitamina D sobre os parâmetros metabólicos, inflamatórios, antropométricos e biomarcadores de EO em indivíduos com SM.

2.2 ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis séricos de vitamina D em indivíduos com SM;
- Analisar os níveis séricos dos biomarcadores bioquímicos glicemia, colesterol total e frações, triacilgliceróis, ácido úrico e gama glutamil transferase;
- Quantificar os níveis de PCR;
- Verificar os níveis plasmáticos dos biomarcadores de EO PON, AOPP e NOx;
- Avaliar os parâmetros antropométricos e de pressão arterial;
- Verificar se a reposição de vitamina D é capaz de melhorar indicadores que caracterizam a síndrome metabólica e indicadores de risco cardiovascular.

3 METODOLOGIA

Este protocolo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina e aprovado de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos, sob o número do CAAE 41718014.9.0000.5231. Este ensaio clínico não controlado envolveu 41 indivíduos adultos (≥ 18 anos), com idade média de 50 anos, de ambos os sexos com características de SM (segundo os critérios da NCEP ATP III) atendidos na Clínica de Educação para a Saúde CEPS-Unifil entre os anos de 2012 a 2014. Os mesmos foram convidados para participarem da pesquisa no ano de 2015, por contato telefônico. Foram selecionados para este trabalho, indivíduos em sobrepeso ou obesidade, com padrão alimentar semelhante, que foram avaliados individualmente através do prontuário de atendimento, onde constava o recordatório alimentar e questionário de frequência alimentar. Sendo todos indivíduos caucasianos para tornar a amostragem homogênea em relação a maior ou menor síntese de vitamina D pela exposição da pele aos raios UVB e foram orientados a manter a exposição ao sol habitual, os mesmos faziam uso de medicamentos. Em nenhum momento deste estudo foi suspenso o uso rotineiro de medicamentos anti-hipertensivos, antidiabéticos, corticoides, anti-inflamatórios ou para tratamento de dislipidemias dos participantes. Foram excluídos indivíduos que tinham o hábito de ingerir suplementos alimentares a base de vitaminas ou propriedades antioxidantes, ou que faziam reposição de vitamina D, com doenças infectocontagiosas ou distúrbios hormonais que afetassem o metabolismo lipídico ou presença de insuficiência renal. Os 41 participantes receberam cápsulas, contendo 50.000 UI de vitamina D (colecalférol), e foram orientados a consumir 1 cápsula por semana, durante 12 semanas e manter o mesmo estilo de vida. As cápsulas de vitamina D₃, foram adquiridas em farmácia de manipulação e produzidas com a concentração pré-estabelecida para esse estudo. As coletas de sangue foram efetuadas antes e após 90 dias de suplementação com vitamina D. Todos os participantes foram informados dos procedimentos que foram submetidos e, após concordância, todos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice 1).

3.1 DETERMINAÇÕES ANTROPOMÉTRICAS E VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Todos os pacientes foram avaliados por equipe devidamente treinada fazendo as seguintes medições: peso (kg) através da balança marca Filizola, estatura (m) por estadiômetro fixo em parede e a partir destes dados foi calculado o IMC, definido como a relação entre o peso em quilogramas e a altura em metros elevada ao quadrado (kg/m^2) ($\text{peso}/\text{altura}^2$). A circunferência abdominal foi medida na localização anatômica da cicatriz umbilical (101), com fita métrica não elástica. E a aferição da pressão arterial foi realizada por esfigmomanômetro aneróide manual, conforme orientação da 6ª diretriz brasileira de hipertensão arterial (102). Todas as medidas e aferições foram realizadas no início do estudo e após 90 dias da suplementação.

A análise de gordura corpórea foi realizada pelo aparelho de bioimpedância maltron BF-900, seguindo as orientações do manual do fabricante. A avaliação antropométrica foi realizada no primeiro encontro e após 90 dias de suplementação.

3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.2.1 Coleta e Preparo das Amostras:

A coleta de sangue foi realizada em sala apropriada e as dosagens foram realizadas em laboratórios especializados no Hospital Universitário de Londrina. O sangue foi colhido em sistema a vácuo em tubos sem anticoagulante (para obtenção de soro) com gel separador e tubos contendo fluoreto de sódio para a determinação da glicemia. As amostras de sangue foram obtidas após 12 horas de jejum. O plasma e o soro que não foram utilizados para as análises no dia da coleta, foram separados e armazenados em freezer a -70°C (Indrel®) até a realização dos testes.

3.2.2 Marcadores inflamatórios, vitamina D e parâmetros bioquímicos:

A determinação dos níveis séricos de proteína C reativa (PCR) foi realizada por nefelometria (Dade-Behring). A dosagem da vitamina D foi realizada pela metodologia de quimiluminescência utilizando o equipamento Architect (ABBOTT).

As análises de CT, HDL-c, TG, AU, GGT e glicose, foram efetuadas em um auto analisador bioquímico (Dimension-Siemens®), utilizando-se kits Siemens. Para o cálculo dos valores de LDL -c foi utilizado a equação de Friedewald (1972)(103). O

calculado foi feito da seguinte forma: $\text{LDL-c mg/dL} = \text{Colesterol total} - (\text{TG}/5 + \text{HDL-c})$, não foi utilizando essa equação quando o TG estava acima de $> 400\text{mg/dL}$, já que está fórmula torna-se imprecisa na vigência de hipertrigliceridemia intensa.. A partir dos valores de CT, HDL-c e LDL-c foram calculados os índices de Castelli I ($\text{CT}/\text{HDL-c}$) e II ($\text{LDL-c}/\text{HDL-c}$). Os níveis de insulina de jejum e PTH foram determinados por enzima imuno ensaio em micropartículas (MEIA) no equipamento AxSYN (ABBOTT). O *Homeostatic Model Assessment-Insulin resistance* (HOMA-IR) é um método utilizado para quantificar a resistência à insulina (RI) (104,105). O índice HOMA-IR foi calculado da seguinte forma: $\text{HOMA-IR} = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum (mU/L)} / 22,5$.

3.2.3 Determinação de metabólitos de óxido nítrico (NOx):

A quantificação de subprodutos de óxido nítrico (NOx) foi medida através da determinação da concentração de nitritos no plasma. Para uma avaliação mais precisa, é necessário que os íons nitratos presentes sejam reduzidos a íons nitrito. Para esta transformação o meio de reação foi tratado com grânulos de cádmio. O NO é um gás muito instável que se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. (106). A quantificação de NOx é feita em leitora de microplacas Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, EUA), sendo as leituras feitas em 540 nm. A concentração de óxido nítrico é expressa em μM .

3.2.4 Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)

Concentrações plasmáticas de AOPP foram determinados utilizando método semiautomatizado descrito por Witko-Sarsatetal (1996). Os resultados de oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, conduzem à formação de produtos de proteína de reticulação contendo di-tirosine, que podem ser detectados por espectrofotometria. As concentrações de AOPP foram expressas em micromoles por litro ($\mu\text{mol/L}$) de equivalentes de cloramina (107).

3.2.5 Determinação da atividade da paraoxonase1 (PON 1)

A atividade total PON1 foi determinada pela taxa de hidrólise do fenilacetato (fenol), baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvinke, Furlong (2008) (108). A taxa de hidrólise de fenilacetato foi determinada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de ondas de 270 nm, medidos durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a 25°C. A atividade foi expressa em U/MI com base no coeficiente de extinção molar do fenilacetato que equivale a 1,31 mmol/Lcm.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Inicialmente uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância para cada variável estudada pelo teste de Levene. Para os dados com distribuição normal, utilizou-se o teste t pareado de Student sendo que estes foram apresentados na forma de média e desvio-padrão. Caso contrário foi empregado o teste não paramétrico de Wilcoxon, onde foram apresentadas as medianas e valores mínimos e máximos. Por fim, análises multivariadas foram empregadas para verificação de associações entre variáveis dependentes e independentes onde todas estas foram avaliadas pelo método de passo único (*enter*) Foi considerado significativo sempre que $p < 0,05$. Todos os cálculos (com exceção da análise multivariada) foram feitos no software Graph Pad In Stat version 3.00 for Windows, San Diego Califórnia. As análises multivariadas foram feitas utilizando-se o software MedCalc versão 11.3.3.0 (USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

The evaluation of vitamin D supplementation on the metabolic inflammatory indicators, as well as of oxidative stress in individuals with metabolic syndrome.

AUTHORS: Shirlei Marina Camargo¹, Andressa K. Matsumoto¹, Danielle Venturini², Décio Sabbatini Barbosa^{1,2}.

¹Graduation Program in Health Sciences of State University of Londrina, Paraná, Brazil

² Department of Clinical Analysis and Toxicological, State University of Londrina, Paraná, Brazil

INSTITUTION:

Londrina State University

Health Sciences Department

Rod. Celso Garcia Cid, Km 380, PR445, 86057-970, P.O Box 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR DATA:

Shirlei Marina Camargo - Londrina University Hospital - Department of Health Sciences, Rua Roberto Koch, 60, Vila Operária

Londrina -PR - Brazil - CEP 86038-350 /Phone: 55-43 - 3371-2378 / E-mail:

shirleicamargo@hotmail.com

SHORT TITLE: Vitamin D supplementation assessment in patients with metabolic syndrome.

Summary

Background & objectives: Even though there were advances in the understanding of the pathophysiological mechanisms and risk factors that predispose to the development of metabolic syndrome (MS), many important aspects are still unclear. Convincing data relate vitamin D deficiency to a higher prevalence of MS. The aim of this study was to evaluate the vitamin D action in clinical and laboratorial indicators in individuals with MS. The hypovitaminosis D is being increasingly laboratory diagnosed and present in all stages of life, even in countries with tropical climates. Thus, it is increasingly important to quantify levels of vitamin D and it is proposed that this analysis may be a new ally in the assessment of risk for various chronic diseases. The objective of this study was to verify if vitamin D supplementation in individuals with deficiency of this vitamin associated with MS can improve aspects that characterize this syndrome, and in some inflammatory markers and oxidative stress.

Methods: It has been performed an uncontrolled clinical trial with 41 subjects overweight or obesity metabolic syndrome, with an average age of 50 years old, it has been analyzed initially the levels of 25 - hydroxy - vitamin D, anthropometric, metabolic, oxidative stress and inflammatory data. These individuals took vitamin D for 90 days and after this period, the same analyzes and measurements were made. In the statistical analysis, the Shapiro-Wilk and Levene tests were performed to verify the normal distribution and homogeneity of the data. When the normal distribution was found, the paired Student's t-test was used; Wilcoxon non-parametric test was used. Finally, multivariate analyzes were used to verify associations between dependent and independent variables.

Results: The best results obtained in this study were reductions in systolic and diastolic blood pressure, Parathyroid hormone levels, total cholesterol, LDL cholesterol,

non-HDL cholesterol, Castelli I atherogenic risk index and increased activity of Paraoxonase 1 (PON 1) and acid uric

Conclusion: Our data confirm that the maintenance of adequate plasma concentrations of vitamin D may contribute to the prevention of cardiovascular diseases in patients with MS, but per se is not able to treat this disease.

Keywords: Oxidative stress; Inflammation; Metabolic syndrome; Vitamin D.

1. Introduction

Metabolic Syndrome (MS) refers to a group of disorders that increase the risk to developing type 2 *diabetes mellitus* (DM) and cardiovascular diseases. Among the criteria for characterizing an individual with MS, it may be mentioned abdominal obesity, hyperglycemia, hypertension, hypertriglyceridemia, and decreased levels of HDL-c (1). In Brazil, the Nacional Cholesterol Education (NCEP) - Adult Treatment Panel (ATPIII) is the recommended setting for MS by the I Brazilian Guidelines for Diagnosis and Treatment of MS (2). It is estimated that MS affects between 20% and 25% of the adult population and this prevalence is increasing due to obesity and sedentary lifestyle, reaching 42% in individuals over 60 years old (3). It is known that in individuals with MS, inflammation and oxidative stress are at increased heights, while antioxidant defenses are diminished (4, 5).

Despite advances in the understanding of the pathophysiological mechanisms and risk factors that predispose an individual to the development of MS, many important aspects have not been clarified, such as hormonal disorders (6,7). There are convincing data that relate vitamin D deficiency to a higher prevalence of MS in a variety of populations (8).

Hypovitaminosis D is being increasingly laboratory diagnosed and is present at all stages of life, even in countries with tropical climates. The importance of vitamin D

levels as a new risk factor for various chronic diseases is gaining increasing interest. Studies evaluating the association between vitamin D and MS are a recent area that has aroused the curiosity and attention of several researchers (9). Studies relate vitamin D to blood pressure regulation via RAAS and, in humans, an inverse relationship between serum vitamin D levels and renin activity is observed (10). In addition, vitamin D may have a direct effect on the vascular system, since endothelial cells express vitamin D receptor (VDR). Low concentrations of vitamin D have been observed in some patients with cardiovascular diseases and in dyslipidemic individuals (11,12).

The aim of this study was to verify whether vitamin D supplementation in patients with insufficiency or deficiency of this vitamin associated with MS may improve some aspects that characterize this syndrome, and in some inflammatory markers and oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1 Study design and participants

This protocol was submitted to the Ethics Committee on Human Being Research of Londrina State University and it was approved in accordance with the standards of the National Health Council Resolution 466/12 on research involving human beings. This uncontrolled clinical trial involved 41 adult (≥ 18 years) individuals, middle age of 50 years, of both sexes with characteristics of MS (according to NCEP ATP III criteria), attended at the CEPS-Unifil Health Education Clinic Between the years of 2012 to 2014. They were invited to participate in the research in the year 2015, by telephone contact. Were selected for this study, individuals in overweight or obesity, with similar food pattern, who were evaluated individually through the attendance record, which included the food recall and food frequency questionnaire. Which were

evaluated individually through the service chart, which included the questionnaire on food consumption and food frequency. Being all Caucasian individuals to make homogeneous sampling in relation to greater or lesser synthesis of vitamin D by exposure of the skin to UVB rays and were oriented to maintain the usual sun exposure, they used medicines.

At no point in this study was the routine use of antihypertensive drugs, antidiabetics, corticosteroids, anti-inflammatories or treatment of dyslipidemia of the participants suspended. Those who have been in the habit of ingesting dietary supplements based on vitamins or antioxidant properties, or that make vitamin D replacement, were excluded; With infectious diseases or hormonal disorders that affect the lipid metabolism or presence of renal failure. The 41 participants received capsules containing 50.000 IU of vitamin D (cholecalciferol), and was instructed to consume 1 capsule per week for 12 weeks and maintain the same lifestyle. As vitamin D capsules, they were purchased from a handling pharmacy and produced at a pre-established concentration for this study. Blood samples were taken before and after 90 days of vitamin D supplementation. All participants were informed of the procedure they underwent and, after agreement, all of them signed a free informed consent form.

2.2 Anthropometric Determinations and Blood Pressure Verification

All patients were evaluated by a properly trained team, taking the following measurements: weight (kg) using the Filizola brand, stature (m) per fixed stadiometer on the wall and from these data the BMI was calculated, defined as the ratio between weight In kilograms and the height in meters raised to the square (kg / m^2) ($\text{weight} / \text{height}^2$). Abdominal circumference was measured at the anatomical location of the umbilical scar (13), with non-elastic tape measure. And the blood pressure was measured by manual aneroid sphygmomanometer, according to the orientation of the

7th Brazilian hypertension guideline (14). All measurements and measurements were taken at baseline (T0) and after 90 days (T90) of supplementation.

The analysis of body fat was performed by the maltron BF-900 bioimpedance device, following the instructions in the manufacturer's manual. The anthropometric evaluation performed at the first meeting and after 90 days of supplementation.

2.3 Laboratory tests

Samples Collection and Preparation:

Blood samples were collected in an appropriate room and the measurements were performed in specialized laboratories at Londrina University Hospital. Blood samples were collected into vacuum system in tubes without anticoagulant (to obtain serum), separating gel and tubes containing sodium fluoride for the determination of blood sugar levels (glycemia). Blood samples were obtained after a 12-hour fasting. The plasma and the serum were not used for the analyses on the collection day, they were separated and stored in a freezer at - 70 ° C (Indrel ®) to perform the tests.

Inflammatory markers, vitamin D and biochemical parameters:

The determination of C - reactive protein serum levels (CRP) was obtained through nephelometry (Dade-Behring); and the vitamin D serum level determination, through chemiluminescence using the Architect device (Abbott). The analysis of total cholesterol (TC), High density lipoprotein (HDL-c), triglycerides (TG), uric acid (UA), gamma glutamyltransferase (GGT) and glucose were obtained in a biochemical auto analyzer (Siemens-Dimension ®) using Siemens kits. For the calculation of LDL-c values the Friedewald equation (1972) (103) was used. The calculated was done as follows: $LDL-c \text{ mg / dL} = \text{Total cholesterol} - (TG / 5 + HDL-c)$, Was not using this equation when the triglycerides is above > 400mg / dL, since this formula becomes imprecise in the presence of hypertriglyceridemia. From TC, HDL-c and LDL-c values,

the Castelli I (TC / HDL-c) and II (LDL-c / HDL-c) index were calculated. Fasting insulin levels and parathyroid hormone (PTH) levels were determined by enzyme immunoassay in microparticles (MEIA) in the AxSYN (Abbott) equipment. The *Homeostatic-Model Assessment Insulin Resistance* (HOMA-IR) is a method used to quantify insulin resistance (IR) (16,17). The HOMA-IR index was calculated as follows:

$$\text{HOMA-IR} = \text{fasting glucose (mmol / L)} \times \text{fasting insulin (mU / L)} / 22.5.$$

Nitric oxide metabolites determination (NOx):

Quantification of nitric oxide byproducts (NOx) was measured by determining the concentration of nitrite in plasma. For a more accurate assessment, it is necessary that the nitrate ions are reduced to nitrite ions. For such transformation, the reaction medium was treated with cadmium beads. Nitric oxide is a very unstable gas, which degrades into nitrates and nitrites byproducts. The method is based on the reduction of nitrate to nitrite, mediated by oxido-reduction reactions occurring between the nitrate present in the sample and cadmium-copper reagent system with subsequent diazotization and colorimetric detection of the azo compound formed by the addition of the Griess reagent (18). Quantification of NOx is performed in microplate reader ASYS Expert Plus[®] Biochrom (Holliston, MA, USA), and readings made at 540 nm. The concentration of nitric oxide is expressed in $\mu\text{mol/L}$.

Determination of advanced oxidation protein products (AOPP)

AOPP plasma concentrations were determined using a semi-automated method described by Witko-Sarsat et al (1996). Amino acid residues oxidation results, such as tyrosine, lead to crosslinking protein products containing di-tyrosine, which can be detected spectrophotometrically. The AOPP concentrations are expressed in micromoles per liter $\mu\text{mol / L}$ of chloramine equivalents (19).

Determination of paraoxonase1 activity (PON 1)

The total PON1 activity was determined by the rate of hydrolysis of the phenylacetate (phenol), based on the methodology described by Richter, Jarvinke, Furlong (2008) (108). The rate of phenylacetate hydrolysis was determined on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) at wavelengths of 270 nm, measured over 4 minutes (16 readings with a 15-second Readings) with the temperature maintained at 25 ° C. Activity was expressed as U / MI based on the molar extinction coefficient of the phenylacetate equivalent to 1.31 mmol / Lcm.

2.4 Statistical analysis

An exploratory analysis was initially conducted to assess the normal distribution of data in the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance for each variable studied by the Levene's test. For data with normal distribution, we used the paired t test of Student and these were presented as mean and standard deviation. Otherwise, the nonparametric Wilcoxon test was used, where the medians, minimum and maximum values were presented. Finally, multivariate analyses were used to verify the correlations between dependent and independent variables by method enter, where all variables are put in one single step. It was considered significant whenever $p < 0.05$. All calculations (exception to multiple regression) were made in Graph Pad In Stat version 3:00 software for Windows, San Diego, California. Multiple regression was made by MedCalc Software v. 11.3.3.0.

3. Results

There was no significant difference in patients with MS in the weight, BMI, waist circumference and percentage of body fat (% BF), after 90 days of intervention with vitamin D. However, it can be observed that there was a significant decrease in systolic blood pressure and diastolic pressure as shown in table 1.

There was no significant difference in blood glucose levels, insulin and HOMA-IR calculation in patients who used vitamin D during the 90 days of weekly intervention and follow-up in this study (Table 2).

In the individuals' lipid profile treated with vitamin D, it was observed that after 90 days, there was significant decrease in total cholesterol, LDL cholesterol and non-HDL-c. However, the treatment was not able to improve HDL-c and triglycerides (Table 3). In the Castelli I index, there was a significant decrease in values, but the same did not happen in the Castelli II index (Table 3).

Table 1 – Demographic, Anthropometric data and blood pressure

| | T0 mean (± S.E.) or median (min-max) | T90 (± S.E.) or median (min-max) | p value |
|--|---|---|----------------|
| Age | 50.34 ± 8.69 | | |
| Sex | 26 W/15 M | | |
| Weight (kg) | 97.21 ± 3.63 | 97.13 ± 3.64 | 0.8176 |
| Waist circumference (cm) | 111.80 ± 2,60 | 113.10 ± 2.40 | 0.0900 |
| BMI (weight/height²) | 35.60 ± 1.11 | 35.61 ± 1.10 | 0.9437 |
| % Body Fat | 37.77 ± 1.58 | 37.42 ± 1,50 | 0.6572 |
| Systolic Pressure (mmHg) | 130 (110-190) | 130 (124-135) | 0.0340 |
| Diastolic Pressure (mmHg) | 90 (75-120) | 90 (70-100) | 0.0120 |

S.E. - standard error; BMI - Body mass index. W; Women; M; Men. T0-Basal; T90-After 90 days. Age, weight, waist circumference, BMI and % body fat in mean (±S.E.) by paired test t ; blood pressure in median (min-max) by Wilcoxon.

Table 2 - Blood glucose, Insulin and HOMA-IR

| | T0 median (min-max) | T90 median (min-max) | p value |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|
| Glycemia (mg/dL) | 114 (84 – 338) | 114 (85 – 308) | 0.2530 |
| Insulin (µU/mL) | 13.300 (5.300 – 20.400) | 12.400 (6.000 – 68.600) | 0.5818 |
| Homa – IR | 4.227 (1.305 – 93.373) | 3.825 (1.403 – 52.559) | 0.7071 |

S.E. - standard error; HOMA - IR - Homeostatic model assessment. T0–Basal; T90-After 90 days .Glycemia, insulin and Homa-IR in median (min-max) by Wilcoxon.

Table 3 - Lipid Profile and Cardiovascular Biomarkers

| | T0 mean (± S.E.) or median (min-max) | T90 (±S.E.) or median (min-max) | p value |
|---|---|--|----------------|
| Total Cholesterol (mg/dL) | 213.83 ± 7,08 | 202.22 ± 6,75 | 0.020 |
| LDL – c (mg/dL) | 133.81 ± 6.52 | 126.58 ± 6.28 | 0.0362 |
| HDL- c (mg/dL) | 41 (24-80) | 41 (24-82) | 0.8046 |
| Triglycerides (mg/dL) | 153 (47 – 515) | 148 (57 – 454) | 0.8036 |
| Non-HDL cholesterol (mg/dL) | 170.51 ± 7.19 | 158.59 ± 6.58 | 0.0178 |
| Castelli I (col. Total/ HDL) | 5.255 ± 0.28 | 4.873 ±0.23 | 0.0211 |
| Castelli II (LDL/ HDL) | 3.027 ± 0.20 | 3.005± 0.18 | 0.9822 |
| Total cholesterol/ triglycerides (mg/dL) | 1.341 (0.4796 – 4.468) | 1.253 (0.3991 – 3.912) | 0.1485 |
| LDL-c / triglycerides (mg / dL) | 0.8852 (0.2453 - 3.311) | 0.7515 (0.1803 - 2.835) | 0.0912 |

S.E. - standard error; LDL - Low density lipoprotein; HDL High density lipoprotein. T0–Basal; T90-After 90 days. Total Cholesterol, LDL-c, Non-HDL cholesterol, Castelli I and Castelli II in mean (±S.E.) by paired test t ; HDL-c, Triglycerides, Total cholesterol/ triglycerides and LDL-c / triglycerides in median (min-max) by Wilcoxon.

Individuals who used vitamin D after 90 days had a significant change in the levels referred to above and decreased PTH. There was an increase in the levels of uric acid. It is observed that there was no significant change in inflammatory markers, CRP and GGT after 90 days of vitamin D use (Table 4).

In oxidative stress markers, there was a significant increase in PON1 activity after 90 days of vitamin D use, but there was no difference in the levels of AOPP and NOx (Table 5).

TABLE 4 - Inflammatory Biomarkers, Vitamin D and PTH

| | T0 mean (\pm S.E.) /or median (min-max) | T90 (\pm S.E.) /or median (min-max) | p value |
|--------------------------|---|---|----------|
| Vitamin D (ng/mL) | 19.19 \pm 0.8334 | 43.44 \pm 2.067 | < 0.0001 |
| PTH (pg/mL) | 55.82 \pm 4,026 | 48.63 \pm 3,299 | 0.0060 |
| Uric Acid (mg/dL) | 4.70 (2.70 – 8.80) | 5.00 (2.50 – 9.40) | 0.0002 |
| CRP-C (mg/L) | 4.20 (0.60 – 35.50) | 4.40(1.30-22.40) | 0.4200 |
| GGT (U/L) | 42.00 (20.00 - 165.00) | 43.00 (24.00 - 106.00) | 0.3309 |

S.E. - standard error; PTH - Parathormone; CRP - C reactive protein; GGT - gamma glutamyl transferase. T0–Basal; T90-After 90 days. Vitamin D and PTH in mean (\pm S.E.) by paired test t ; Uric Acid, CRP – C and GGT in median (min-max) by Wilcoxon.

TABLE 5 - Biomarkers of Oxidative Stress

| | T0 mean (\pm S.E.) /or median (min-max) | T90 (\pm S.E.) /or median (min-max) | p value |
|-------------------------------------|---|---|----------|
| PON 1 (U/mL) | 366.06 (133.87 - 744.77) | 479.76 (320.71 - 646.46) | < 0.0001 |
| AOPP (μmol/L) | 88.93 (39.94 - 292.36) | 83.14 (34.06 - 178.72) | 0.2382 |
| NOx (μmol/L) | 6.99 (3.06 – 17.02) | 6.87 (2.52 – 15.40) | 0.8835 |

S.E. - standard error; PON 1 - Paraoxonase 1; AOPP - advanced oxidation protein products; NOx - Nitric oxide by products. T0–Basal; T90-After 90 days. PON 1, AOPP and NOx in median (min-max) by Wilcoxon.

Multivariate analysis

In multivariate analyses, considering total cholesterol levels as the dependent variable and HDL-c, triglycerides and LDL-c / TG ratio as independent ones, we find a coefficient of determination $R^2 = 64.75$ $p < 0,0001$. Regarding the activity of PON (dependent variable), we obtained a $R^2 = 33.30$, where the independent variables that contributed most were TG, the LDL / TG ratio, HDL-c and uric acid. Finally, taking into account the Castelli I index as the dependent variable, to obtain $R^2 = 67.03$ $p < 0.0001$, we see the association with the independent variables and the non-HDL cholesterol, TG and PON activity.

4. Discussion

The best results obtained in this study were reductions in systolic and diastolic blood pressure, PTH levels, TC, LDL-c, non-HDL cholesterol, Castelli I atherogenic risk index and increased activity of Paraoxonase 1 (PON 1) and levels of Uric acid.

It was found in this study that vitamin D did not interfere in anthropometric indicators (weight, BMI, waist circumference and percentage of body fat). However, it has been observed that hypovitaminosis D is directly related to hypertension. The favorable effects of oral vitamin D supplementation on blood pressure has also been reported by Forman et al., 2013, which evaluated healthy blacks, a population with a high prevalence of hypovitaminosis D, in this study, 283 subjects with a mean age of 51 years, almost half in antihypertensive use were randomly double blinded to receive oral vitamin D3 treatment at different doses (1,000, 2,000 or 4,000 IU per day) or placebo for 3 months. In the analysis after 3 months, the authors found small but significant changes in systolic pressure (21). In a study with *knockout mice*, Ly et al. (2004) (22) showed that the lack of the vitamin D receptor (VDR) increased the production of renin and angiotensin II, leading to hypertension, cardiac hypertrophy and increased water intake. Based on these results, it was concluded that the vitamin D is a

potent suppressor of the endocrine system in the renin biosynthesis (23). We found in our study that vitamin D did not significantly alter blood glucose levels and the resistance to insulin action, calculated by the HOMA-IR index. Some studies have shown that vitamin D may improve insulin resistance and impaired glucose tolerance in pre-diabetic (24,25,26). However, studies that have examined the effect of vitamin D on insulin resistance and glycemic control in patients with type 2 diabetes already established, had negative results (24,27).

Vitamin D did not significantly alter the levels of TG and HDL-c, yet we have obtained positive results with regard to reduction of LDL, TC, non-HDL-c and in the marker of cardiovascular diseases, index of Castelli I.

Vitamin D and cholesterol related studies reported that 1,25-dihydroxycholecalciferol and 25-dihydroxycholecalciferol cause cholesterol biosynthetic pathway inhibition at two different locations: at the demethylation of lanosterol and a second location inhibition occurs in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG CoA reductase) (28). The results show that vitamin D3 hydroxy analogues decreased cholesterol biosynthesis by inhibiting HMG-CoA reductase activity and lanosterol-14 α -demethylase. Thus, the inhibitory effect of vitamin D3 hydroxy analogues is specifically exerted on the sterol biosynthesis, suggesting that it is necessary hydroxylation of vitamin D3 for inhibiting the demethylation of lanosterol (28).

Regarding the cardiovascular risk indexes, it is probable that the Castelli I index was more sensitive than the others (such as Castelli II index, ratio of total cholesterol / triglycerides and LDL-c / triglycerides) showing improvement when using vitamin D in relation to the reduction in future cardiovascular events (29).

The increase in levels of vitamin D proves that the subjects adhered to the treatment and that this was effective, since there was also a reduction in plasma PTH levels. A study suggests that increased PTH may contribute to the development of the

metabolic syndrome (30,31). Hyperparathyroidism and vitamin D deficiency have been implicated in a variety of cardiovascular disorders including hypertension, atherosclerosis, vascular calcification, and renal failure. Both hormones have direct effects on the endothelium, heart and other vascular structures. (23,33). Secondary hyperparathyroidism may also increase the risk of developing components of the metabolic syndrome, including hypertension (30, 33), obesity, and diabetes (30,34).

We know that increased uric acid in individuals with a predisposition to the development of gout is harmful, but we must not forget that this molecule has an antioxidant property, which at the level of oxidative stress is interesting, thus demonstrating a positive effect of vitamin D supplementation. (35,36,37).

Higher uric acid serum concentration was found in a cross-sectional study, where we found a positive association between levels of vitamin D and this nitrogenous compound (38). In our work, we also found this. In our study, we obtained no change in inflammatory markers, Gamma GT and C-reactive protein (CRP). Nevertheless, the study of Sharifi *et al.* (2014) found a reduction in CRP levels with the administration of 50,000 IU of vitamin D for four months in patients with non - alcoholic liver disease (39). Witham *et al.* (2013) found no reduction in CRP levels after 8 weeks of supplementation with a single dose of 100,000 IU vitamin D3 in women in South Asia (40). Krivošíková *et al.* (2015) concluded that vitamin D anti-inflammatory action in the general population remain uncertain (41). The literature is inconclusive on the effect of vitamin D supplementation on inflammation. Experimental protocols were used to homogenize laboratory test sample, nonetheless results remain contradictory (42).

Considering the non-statistical significance in relation to AOPP and NOx after supplementation, it is likely that these biomarkers were not sensitive enough to discriminate any changes in protein oxidation level, especially albumin, and either in the metabolism of nitric oxide. This may have occurred because of the small number of patients evaluated in this study.

The PON1 is a HDL structure bound enzyme and classically associated as a protective factor against cardiovascular diseases because it acts by inhibiting, for example, LDL oxidation (43,44,45). The increased activity of this enzyme observed in this study may indicate a possible protective role of vitamin D in cardiovascular events.

In a recent study, 30 men with acute myocardial stroke were evaluated and it has been found that vitamin D deficiency was accompanied by the decrease of the PON1 levels. Thus, the decrease in the levels of amine 25 OH Vitamin D3 may occur as part of oxidation and / or inflammatory response (46).

In multivariate analyses, the decrease in total cholesterol levels is strongly and significantly associated to the levels of HDL-c, TG and LDL / TG ratio. The decrease in cholesterol levels is mainly linked to LDL which explains this strong association. Although to a lesser extent, the increase in the activity of PON1 showed a significant association with the independent variables: TG, LDL / TG, HDL-c and uric acid. Again, decrease in cholesterol level of LDL as well as the increase in the concentration of UA showed important. It is possible to speculate that the decrease in cholesterol levels linked to these lipoproteins have spared PON1 antioxidant action given that this has, among other functions, prevent oxidation of lipids linked to these particles. It is also likely that the increase in UA levels (which has antioxidant action), has been an important factor in the preservation of the PON1 activity. Finally, the improvement in the Castelli I Index is strongly and significantly associated with the decrease in non – HDL- c levels and TG and significantly with the increase in the PON1 activity.

In conclusion, data from this study confirm that supplementation of vitamin D in individuals with MS may, over the years, prevent cardiovascular diseases due to improved blood pressure levels, lipid profile as well as a marker of atherogenic index (Castelli I). The increase in PON 1 activity may also contribute to this benefit by possibly minimizing oxidative stress, together with increased uric acid, thus counteracting the health of MS patients, but *per se* is not able to treat this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authorship Statement

Conflict of interests and sources of funding

No

References

1. Kayaniyl S, Vieth R, Harris SB, Retnakaran R Hnight JA. Association of 25 (OH) D and PTH with Metabolic Syndrome and Its Traditional and Nontraditional Components. *J. Clin. Endocrinol Metab*, January 2011;9 (1):168-75.
2. Kassi And Pervanidou P Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine* 2011;9:48-61.
3. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute. *Circulation* 2009;120(16):1640-45.
4. Kanagasabai T, Ardern CI. Contribution of Inflammation, Oxidative Stress, and Antioxidants to the Relationship between Sleep Duration and Cardiometabolic Health. *Sleep* 2015; 38(12):1905-12.
5. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009;3:73–80.
6. Brandão AP, I Brazilian Guidelines for Diagnosis and Treatment of Metabolic Syndrome. *Brazilian Archives of Cardiology* 2005;84.
7. Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E. The metabolic syndrome – from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metabolic Clin North Am.* 2008;37(3):559-79.

8. Oyedele T, Adeyemi OM. High prevalence of vitamin D deficiency in HIV-infected adults: what are the future research questions? *Curr. HIV / AIDS Rep* 2012;9 (1):1-4.
9. Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J. Nutr.* 2005; 135: 2739S–2748S.
10. Resnick LM, Muller FB, Laragh JH. Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Ann Intern Med.* 1986;105:649-54.
11. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2001; 86:1633-37.
12. Gannage-Yared MH, Chedid R, Khalife S, Azzi E, Zoghbi F, Halaby G. Vitamin D in relation to metabolic risk factors, insulin sensitivity and adiponectin in a young Middle-Eastern population. *Eur. J. Endocrinol* 2009;57:298-305.
13. Hasselmann MH, et al. Association between abdominal circumference and hypertension in women: Pro-Health Study. *Cad. Public Health* 2008;24(5):1187-91.
14. Brazilian Society of Cardiology. 7th Brazilian Arterial Hypertension Directive. *Rev Bras Cardiologia* 2016;107(3)(Supl. 3):1-103.
15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
16. Haffner SM. Insulin resistance, inflammation and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 2003;92:18-26J.
17. Mattheus D, Hosjer J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.

18. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiéc et al: Determination of nitrito/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Clin. Chim Acta 1998; 274:177-88.
19. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int. 1996;49(5):1304-13.
20. Richter RJ, Jarvink GP, Furlong C.E. Determination of Paraoxonase 1 status Without the Use of Use of Toxic Organophosphate Substrates. Circulation-cardiovascular Genetics 2008;1:147-52.
21. Forman JP, Scott JB, Ng K, *et al.* Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks. Hypertension 2013;61(4):779-85.
22. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, W Xiang, Zheng W, Kong J. Vitamin D: A negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. J Steroid Biochem Mol Biol 2004; 89-90 (5):387-92.
23. Mandarino NR, Monteiro FCJ, Lages JS, JVL Salgado, Salgado NF. Is Vitamin D Deficiency New Risk Factor for Cardiovascular Disease? The Open Cardiovascular. Medicine Journal 2015;9,40-9.
24. Reaven GM. The metabolic syndrome: is this diagnosis Necessary? Am J Clin. Nutr 2006; 83: 1237-47.
25. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, L Pilote, Poirier P, S Rinfret, Schiffrin EL, Eisenberg MJ. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: The Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of the American College of Cardiology 2010; 56 (14): 1113-32.
26. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. J. Clin. Endocrinol Metab. 2003; 88: 4673-76.
27. Wassink AMJ, Olijhoek JK, Visseren FLJ. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. Eur J Clin Invest 2007; 37 (1): 8-17.

28. Gupta AK, Sexton RC, Rudney H. Effect of vitamin D3 derivatives on cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. *J Lipid Res* 1989;. 30379-86.
29. Millán J, Pintó X, et al. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular Health and Risk Management* 2009;5:757–65.
30. Reis JP, Von Mühlen D, Kritz-Silverstein D, Wingard DL, Barrett-Connor E. Vitamin D, Parathyroid Hormone Levels, and the Prevalence of Metabolic Syndrome in Community-Dwelling Older Adults . *DIABETES CARE* JUN 2007;30(6): 1549-55.
31. Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM: Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005;28:2926–32.
32. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol* 2016 Mar 15;6(2):561-601.
33. Jorde R, Svartberg J, Sundsfjord J: Serum parathyroid hormone as a predictor of increase in systolic blood pressure in men. *J Hypertens* 2005; 23:1639–44.
34. Snijder MB, van Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, Seidell JC, Lips P: Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4119–23.
35. Fabbrini E, Serafini M, Baric IC, Hazen SL, Klein S. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes* 2014;63:976–81.
36. S, Mughal MR, Chan SL, Arumugam TV, Baharani A, Tang SC, et al A synthetic uric acid analog accelerates cutaneous wound healing in mice. *PLoS One*. 2010;6:5.
37. Reginato AM, Mount DB, Yang I, Choi Nat HK. The genetics of hyperuricaemia and gout. *Rev Rheumatol* 2012 October;8(10):610–21.

38. Thakkinstian A, Anothaisintawee T, et al. Potential causal associations between vitamin D and uric acid: Bidirectional mediation analysis. *Scientific Reports* 2015; 5: 1452-8.
39. Sharifi, N., Amani, R., Hajiani, E., Cheraghian, B. Does vitamin D Improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine* 2014;47:70-80.
40. Witham MD, Dove FJ, Dryburgh M, Sugden JA. The effect of different doses of vitamin D3 on markers of vascular health in Patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Struthers Received, Diabetologia* 2010;53:2112-19.
41. Krivošíková Z, Šebeková MGK. Vitamin D Levels Decline with Rising Number of Cardiometabolic Risk Factors in Healthy Adults: Association with adipokines, Inflammation, Oxidative Stress and Advanced Glycation Markers 2015;1-17.
42. Cavalcante IGM, Silva AS, Costa MJC, Persuhn DC, Issa CTMI, Freire TLL, Gonçalves MCR. Effect of vitamin D3 supplementation and influence of Bsm1 polymorphism of the VDR gene profile of the inflammatory and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency Vitamin D3 mega dose angiograms inflammatory markers. *Experimental Gerontology* 2015;66:10-16.
43. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152-4.
44. Yavuz DG, Yuksel M, Deyneli O, Ozen Y, Aydin HS. Akalin Association of serum paraoxonase activity with insulin sensitivity and oxidative stress in hyperthyroid and nodular goitre TSH-suppressed patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 61:515-21.
45. Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, Toprak AD, et al. Effect of Vitamin D Deficiency and Replacement on Endothelial Function in Asymptomatic. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(10),4023-30.
46. Ellidag HY, Yilmaz A, Aydin O, et al. Acute Phase Response: Implication in ST-segment Elevation Myocardial Infarction. *The Open Biochemistry Journal*, 2014;8:4.

5 CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos resultados obtidos neste trabalho, observamos que a manutenção dos níveis séricos adequados de vitamina D pode contribuir na saúde de indivíduos com SM. Quando suplementada nestes pacientes que apresentam deficiência ou insuficiência desta vitamina, mostrou-se eficaz na redução de pelo menos um dos componentes que caracterizam a SM (pressão arterial sistólica e diastólica). Porém, a vitamina D não é capaz de tratar *per si* esta doença. Em níveis séricos adequados está possivelmente relacionada na prevenção de doenças cardiovasculares por reduzir as concentrações de colesterol total e LDL, colesterol não HDL além de melhorar um índice de risco cardiovascular (Castelli I). Esta prevenção às doenças cardiovasculares pode estar potencializada em função do incremento na atividade da enzima PON 1, e aumento do ácido úrico, com reconhecidas ação antioxidante. Entretanto, são necessários mais estudos para se estabelecer de forma mais conclusiva qual a importância na manutenção dos níveis de vitamina D no tratamento de indivíduos com SM.

REFERÊNCIAS

1. Kayaniyl S, Vieth R, Harris SB, Retnakaran R, Hnigh JA. Association of 25(OH)D and PTH with Metabolic Syndrome and Its Traditional and Nontraditional Components. *J.Clin. Endocrinol Metab.*, January 2011,96(1):168–75.
2. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37:1595-607.
3. Brandão AP, I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2005, 84.
4. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine.* 2011;9:48-61.
5. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 2003;88: 4673-76.
6. Thakkinstian A, Anothaisintawee T, Chailurkit L, Ratanachaiwong W, Sritara P, Ongphiphadhanakul B. Potential causal associations between vitamin D and uric acid: Bidirectional mediation analysis. *Scientific Reports* 2015;5:14528.
7. Barbosa PJBB, Lessa I, Filho NA, Magalhães LBNC, Araújo J. Critério de Obesidade Central em População Brasileira: Impacto sobre a Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2006;87:407-14.
8. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute. *Circulation* 2009;120 (16):1640-5.
9. Reaven GM. The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round? *Journal of Internal Medicine.* 2010;269:127-36
10. Wassink AMJ, Olijhoek JK, Visseren FLJ. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 2007;37(1):8-17.

11. Reaven GM. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *Am J Clin. Nutr* 2006;83:1237-47.
12. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 56(14):1113-1132.
13. Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E. The metabolic syndrome – from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metabolic Clin North Am.* 2008;37(3):559-79.
14. Paredes S, Ribeiro L. Cortisol: the villain in Metabolic Syndrome? *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2014; 60(1):84-92.
15. Kloet AD, Krause EC, Woods SC. The Renin Angiotensin System and the Metabolic Syndrome. Published in final edited form as: *PhysiolBehav* 2010; 100(5): 525–534.
16. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18:997–1006.
17. Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2011; 96:E846 –E850.
18. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107:810–17.
19. Oyedele T, Adeyemi OM. High prevalence of vitamin D deficiency in HIV-infected adults: what are the future research questions? *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2012;9(1):1-4.

20. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, Handunnetthi L, Handel AE, Disanto G, Orton SM, Watson CT, Morahan JM, Giovannoni G, Ponting CP, Ebers GC, Knight JC. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome Res* 2010;10:1352–60.
21. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2010; 95 (2) :471-8.
22. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2009;94(1):26-34.
23. Reis JP, von Mühlen D, Michos ED, et al. Serum vitamin D, parathyroid hormone levels and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 207(2): 585-90.
22. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araújo LMQ, Vieira JGJ, Maeda SS, et al. Prevalência da deficiência, insuficiência de vitamina D e hiperparatireoidismo secundário em idosos institucionalizados e moradores na comunidade da cidade de São Paulo, Brasil. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.* 2010;51(3):437-42.
25. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol* 2016 Mar 15;6(2):561-601
26. Jorde R, Svartberg J, Sundsfjord J. Serum parathyroid hormone as a predictor of increase in systolic blood pressure in men. *J Hypertens* 2005; 23:1639–44.
27. Reis JP, M'Uhlen DV, Silverstein DK, et al. Vitamin D, Parathyroid Hormone Levels, and the Prevalence of Metabolic Syndrome in Community-Dwelling Older Adults. . *Diabetes Care* 2007 Jun;30(6):1549-55.
28. Snijder MB, Van Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, Seidell JC, Lips P. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4119–23.

29. Choi AI, Lo JC, Mulligan K, Schnell A, Kalapus SC, Li Y, et al. Association of vitamin D insufficiency with carotid intima-media thickness in HIV-infected persons. *Clin. Infect Dis.* 2011;52(7):941-4.
30. Greene-Finestone LS, Berger C, de Groh M, Hanley DA, Hidiroglou N, Sarafin K, et al. 25-Hydroxyvitamin D in Canadian adults: biological, environmental, and behavioral correlates. *Osteoporos Int.* 2011;22(5):1389-99.
31. Gannagé-Yared M, Chemali R, Yaacoub N, Halaby G. Hypovitaminosis D in a sunny country: relation to lifestyle and bone markers. *J Bone Miner Res.* 2000;15(9):1856-62.
32. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, Mac Laughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1987;64(6):1165-8.
33. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev.* 2008; 66: 82-94.
34. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int.* 2009;20(11):1807-20.
35. Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR, et. al. Recomendação da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia para diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014; 58/5:411-33.
36. Greene-Finestone LS, Berger C, de Groh M, Hanley DA, Hidiroglou N, Sarafin K, et al. 25-Hydroxyvitamin D in Canadian adults: biological, environmental, and behavioral correlates. *Osteoporos Int.* 2011;22(5):1389-99.
37. 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.
38. Castro LCG. The vitamin D endocrine system. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011; 55-8.

39. Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J. Nutr.* 2005; 135: 2739S–2748S.
40. 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.
41. Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J. Clin. Invest.* 1971;50:679–687.
42. Snijder MB, van Dam RM, Visser M, et al. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2005;90:4119–4123.
43. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D level in healthy women. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2003;88:157–161.
44. Slusher AL, McAllister MJ, Huang CJ. A therapeutic role for vitamin D on obesity-associated inflammation and weight-loss intervention. *Inflamm. Res.* 2015; 64:565–575.
45. Caan B, Neuhauser M, Aragaki A, Lewis CB, Jackson R, Leboff MS. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of postmenopausal weight gain. *Arch Intern Med.* 2007;167(9):893–902.
46. Tamez H., Kalim S., Thadhani R.I. Does vitamin D modulate blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22:204–9.
47. Resnick LM, Muller FB, Laragh JH. Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Ann Intern Med.* 1986;105:649–654.
48. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2001; 86:1633–1637.

49. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *AM J. Hypertens* 2007;20:713-9.
50. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incidence hypertension. *Hypertension* 2007;49:1063-9.
51. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV, Chan SL, Squires PE, et al. Expression of 25-hydroxyvitaminD3-1 alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:121-5
52. Milner RD, Hales CN. The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studies in vitro. *Diabetologia* 1967;3:47-9.
53. Liu E, Meigs JB, Pittas AG, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with markers of the insulin resistant phenotype in nondiabetic adults. *J. Nutr.* 2009;139(2):329-334.
54. 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):2619-2625.
55. Miñambres I, Sánchez-Hernández J, Sánchez-Quesada JL, Rodríguez J, Leiva A, Pérez A. The association of hypovitaminosis D with the metabolic syndrome is independent of the degree of obesity. *ISRN Endocrinology* 2012.
56. Liscum L. Cholesterol biosynthesis. Elsevier Science 2002; 617:409-31.
57. Gupta AK, Sexton RC, Rudney H. Effect of vitamin D3 derivatives on cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. *J. Lipid Res.* 1989;30:379-386.

58. Martins D, Wolf M, Pan D, Zadshir A, Tareen N, Thadhani R, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007;167:1159-65.
59. Reis JP, Von Muhlen D, Miller ER. Relation of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels with metabolic syndrome among US adults. *Eur J Endocrinol* 2008;159:41-8.
60. Gannage-Yared MH, Chedid R, Khalife S, Azzi E, Zoghbi F, Halaby G. Vitamin D in relation to metabolic risk factors, insulin sensitivity and adiponectin in a young Middle-Eastern population. *Eur. J. Endocrinol* 2009;57:298-305.
61. Carbone LD, Rosenberg EW, Tolley EA, Holick MF, Hughes TA, Watsky MA, et al. 25-hydroxyvitamin D, cholesterol, and ultraviolet irradiation. *Metabolism* 2008;57:741-8.
62. Heikkinen AM, Tuppurainen MT, Niskanen L, Komulainen M, Penttila I, Saarikoski S. Long-term vitamin D3 supplementation may have adverse effects on serum lipids during postmenopausal hormone replacement therapy. *Eur. J. Endocrinol* 1997;137:495-502.
63. Major GC, Alarie F, Dore J, Phouttama S, Tremblay A. Supplementation with calcium + vitamin D enhances the beneficial effect of weight loss on plasma lipid and lipoprotein concentrations. *Am J Clin. Nutr.* 2007;85:54-9.
64. Liu M, Li X, Sun R, Zeng Y, Chen S, Zhang P. Vitamin D nutritional status and the risk for cardiovascular disease (Review). *Experimental and therapeutic medicine* 2016; 11: 1189-93.
65. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3: 442.
66. Emad AS, Dujaili AI, Munir N, Iniesta RR. Effect of vitamin D supplementation on cardiovascular disease risk factors and exercise performance in healthy participants: a randomized placebo-controlled preliminary study. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2016; 7(4):153– 165.

67. Aguirre MP, Gutierrez ED, Flores M, Salazar E, Salmeron J. High vitamin D consumption is inversely associated with cardiovascular disease risk in an urban Mexican population. *Journal.pone* 2016 Nov; (28): 1-13.
68. Bhardwaj S, Bhattacharjee J, Bhatnagar MK, Tyagi S. Atherogenic index of plasma, Castelli risk and atherogenic coefficient – new parameters in assessing cardiovascular risk. *Int J Pharm Bio Sci* 2013; 3: 359–64.
69. Grundy SM. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2005;109, 433–438.
70. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani F. Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging and Disease* 2015;(2):6.
71. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381– 478.
72. Matsuoka T. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J. Clin. Investig.* 1997; 99:144–50.
73. Maddux, BA. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of α -lipoic acid. *Diabetes* 2001;50:404–10.
74. Rudich A. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 1998;47:1562–69.
75. Hopps E, Noto D, Caimi G, Aversa MR. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2010;20:72–7.
76. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: A unifying hypothesis. *J. Nutr. Biochem.* 2008;19:491–504.

77. Baser H1, Can U, Baser S, Hidayetoglu BT, Aslan U, Buyuktorun I, Yerlikaya FH. Serum total oxidant/anti-oxidant status, ischemia-modified albumin and oxidized-low density lipoprotein levels in patients with vitamin D deficiency, *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59 (4):318-24.
78. Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, Chaves FJ, Saez G, Redon J. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Human Hypert* 2007;21:68-75.
79. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-16.
80. Fabbrini E, Serafini M, Baric IC, Hazen SL, Klein S. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes* 2014; 63:976–81.
81. Mughal MR, Chan SL, Arumugam TV, Baharani A, Tang SC, et al. A synthetic uric acid analog accelerates cutaneous wound healing in mice. *PLoS One.* 2010;6:5.
82. Scott GS, Cuzzocrea S, Genovese T, Koprowski H, Hooper DC. Uric acid protects against secondary damage after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102: 3483–8.
83. Nery RA, Kahlow BS, Skare TL, et al. Uric acid and tissue repair. *Arq Bras Cir Dig* 2015;28(4):290-2.
- 84 – Kanagasabai T, Ardern CI. Contribution of Inflammation, Oxidative Stress, and Antioxidants to the Relationship between Sleep Duration and Cardiometabolic Health. *Sleep* 2015; 38(12):1905-12.
85. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009;3:73–80.
86. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-23.

87. Menon V, Ram M, Dorn J, et al. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabetic Med* 2004;21:1346-52.
88. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care* 2003;26:575-81.
89. Molnár D, Decsil T, Koletzko B. Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome. *Intern J. Obesity* 2004;28:1197-202.
90. Shin M-J, Park E, Lee JH, Chunga N. Relationship between insulin resistance and lipid peroxidation and antioxidant vitamins in hypercholesterolemic patients. *Ann. Nutr. Met.* 2006;50:115-20.
91. Gutiérrez-Salméan G, Ceballos-Reyes G, Ramírez-Sánchez I. Obesity and metabolic syndrome: Future therapeutics based on novel molecular pathways. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 2012;24(4):204-11.
92. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:43.
93. Dib LA, Ferriani RA, Navarro PAAS, et al. Marcadores séricos de estresse oxidativo e resultados dos procedimentos de reprodução assistida em pacientes inférteis com síndrome dos ovários policísticos e controles. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2010 Mar;32(3):24-9.
94. Mukesh GG, Anusha NC. Serum GGT activity and hsCRP level in patients with type 2 diabetes mellitus with good and poor glycemic control: An evidence linking oxidative stress, inflammation and glycemic control. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2013;12:56.
95. Gambino R, Durazzo M, Guidi S, Tiozzo E, et al. Associations between γ -glutamyl transferase, metabolic abnormalities and inflammation in healthy subjects from a population-based cohort: A possible implication for oxidative stress. *World J Gastroenterol* 2005;11(45):7109-17.

96. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett.* 1993;326:285-8.
97. Chun-Yen Ke, Fwu-Lin Yang, Wen-Tien Wu, Chen-Han Chung, Ru-Ping Lee, Wan-Ting Yang, , Kuang-Wen Liao, Yi-Maun. Research Paper Vitamin D3 Reduces Tissue Damage and Oxidative Stress Caused by Exhaustive Exercise. *International Journal of Medical Sciences.* 2016;13(2):147-53.
98. Salum E, Kals J, Kampus P, Salum T, Zilmer K, Aunapuu M, Arend A, Eha J, Zilmer M. Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract* 2013.
99. Koren R, Ravid A. Vitamin D and the cellular response to oxidative stress. In: Feldman D, editor. *Vitamin D*, Amsterdam: Elsevier Academic Press 2005. p. 761-70.
100. Hoeck AD, Pall ML. Will vitamin D supplementation ameliorate diseases characterized by chronic inflammation and fatigue? *Medical Hypotheses* 2011;76:208–13.
101. Hasselmann MH, et al. Associação entre circunferência abdominal e hipertensão arterial em mulheres: Estudo Pró-Saúde. *Cad. Saúde Pública* 2008;24(5)1187-91.
102. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 6ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Rev Arquivo Bras de Cardiologia* 2010; 95(1 supl.1): 1-51.
103. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
104. Haffner SM. Insulin resistance, inflammation and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 2003;92:18-26J.

105. Mattheus D, Hosjer J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
106. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiéc et al: Determination of nitrito/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim Acta* 1998; 274:177-188.
107. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.
108. Richter RJ, Jarvink GP, Furlong C.E. Determination of Paraoxonase 1 status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. *Circulation-cardiovascular Genetics* 2008;1:147-152.

APÊNDICE

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa:

AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NOS MARCADORES ANTROPOMÉTRICOS, METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(la) a participar da pesquisa intitulada “Avaliação da suplementação de vitamina D nos marcadores antropométricos, metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica”, realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar o efeito da administração de vitamina D no perfil lipídico, no estresse oxidativo, nos marcadores inflamatórios e na disfunção endotelial de pacientes com síndrome metabólica. A sua participação é muito importante e ela se dará pela doação de 45 mL de sangue por punção venosa (15mL de sangue com EDTA, 25mL de soro e 5mL de sangue com fluoreto) em duas etapas, no momento basal e após 90 dias de intervenção, sendo que todos os materiais usados serão descartáveis. Você será aleatoriamente alocado em um dos dois grupos: Grupo vitamina D (GD) receberá uma cápsula de 50.000 UI de vitamina D/semana, durante 12 semanas. Grupo placebo (GP) receberá uma cápsula de placebo por semana durante 12 semanas. Você não saberá qual cápsula estará tomando durante o estudo. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esperamos que essa pesquisa produza informações consistentes sobre o estado nutricional da vitamina D nos pacientes com SM e possa fornecer dados para futuras políticas de intervenção além de propor medidas para a elaboração de estratégias epidemiológicas e clínicas mais efetivas para prevenção/tratamento de tais desfechos.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação nesta. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar, professora Dr^a Danielle Venturini (43) 3371-2313, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, localizado no LABESC - Laboratório Escola, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380 (PR 445) Campus Universitário, E-mail cep268@uel.br ou pelo telefone (43) 3371-54-55.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2014.

Prof^a Dr^a Danielle Venturini

(RG: 5783027-1)

_____ (**nome por extenso do sujeito de pesquisa**), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____