



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARILZA CELINA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE VITAMINA D SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM
SÍNDROME METABÓLICA**

Londrina
2018

MARILZA CELINA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE VITAMINA D SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO E NITROSATIVO EM PACIENTES COM
SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Danielle Venturini

Co-orientador: Prof. Dr. Decio Sabbatini Barbosa

Londrina
2018

MARILZA CELINA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE VITAMINA D SOBRE PARÂMETROS
METABÓLICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM
PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Regina Eches Perugini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^ª. Dr^ª. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de outubro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dra. Danielle Venturini por todos os ensinamentos;

À todos os docentes do programa, pelos conhecimentos adquiridos;

Aos colegas de pesquisa que participaram do projeto;

Aos colegas do Laboratório de Pós Graduação, em especial à Carine Coneglian pela colaboração na realização das técnicas laboratoriais;

Aos pacientes que, voluntariamente, participaram neste projeto de pesquisa, pela confiança em nossa equipe de pesquisadores e entendimento da importância da realização deste estudo;

À minha mãe Lourdes, pelo apoio e incentivo;

À minha filha Heloísa, que esteve presente em meu ventre desde o início das disciplinas; e em meio a tantos acontecimentos, me deu forças para continuar.

Da Silva, Marilza Celina. Influência dos níveis de vitamina D sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com síndrome metabólica. Dissertação de mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Introdução: A síndrome metabólica (SM) é um conjunto de fatores de risco cardiometabólicos, incluindo obesidade, hiperglicemia, hipertriglicerídios, dislipidemia e hipertensão. O estresse oxidativo poderia ser um evento que antecederia a fisiopatologia das doenças crônicas associadas a SM ou uma consequência desta desordem. Sabe-se que a deficiência de vitamina D está associada com o aumento do risco cardiovascular, à diminuição da tolerância à glicose, diminuição da insulina e da sensibilidade a insulina, e conseqüentemente, ao desenvolvimento de SM e Diabetes mellitus tipo 2. O mecanismo pelo qual a vitamina D está associada ao aumento da prevalência da SM ainda não está completamente elucidado.

Objetivo: Neste estudo avaliamos parâmetros metabólicos e o estado redox de pacientes com síndrome metabólica com e sem hipovitaminose D.

Metodologia: Neste estudo foram incluídos 88 mulheres adultas com SM atendidas no Ambulatório de Clínica Médica e Cardiologia do Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram coletados dados como idade, pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), circunferência abdominal (CA), circunferência de quadril (CC) e índice de massa corpórea (IMC). Foram realizadas dosagens séricas de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), triglicerídeos (TG), ácido úrico, vitamina D, glicose, insulina. O *Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance* (HOMA-IR) foi calculado e a resistência à insulina (RI) foi considerada quando HOMA $\geq 2,5$. Entre os marcadores do estresse oxidativo, foram determinados a capacidade antioxidante total do plasma por meio do *total-trapping antioxidante parameter* (TRAP), lipoperóxidos (CL-LOOH), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), metabólitos do óxido nítrico (NOx), grupo sulfidril (SH) e a atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1). Os indivíduos foram categorizados de acordo com níveis de vitamina D, em que níveis de vitamina D $< 30\text{ng/mL}$ indicava hipovitaminose (MetSHD) e níveis $\geq 30\text{ ng/mL}$ caracterizava quantidade suficiente de vitamina D (MetSD).

Resultados: O grupo MetSHD apresentou níveis elevados de TG ($p=0,04$), glicose ($p=0,03$) e resistência à insulina determinado pelo HOMA-IR ($p=0,04$) quando comparados ao grupo MetSD. No grupo MetSHD foi encontrado maior nível de oxidação de proteínas identificados pela AOPP ($p=0,03$) e maiores níveis de metabólitos do NO ($p=0,04$) quando comparados ao grupo MetSD. MetSHD apresentou uma tendência a níveis maiores de atividade da PON quando comparados ao grupo MetSD ($p=0,06$). MetSHD apresentou correlação negativa entre grupo SH e TC ($p<0,05$), e HDL ($p<0,05$); correlação negativa entre TRAP/ ácido úrico e BMI ($p<0,05$), AC ($p<0,05$), insulina ($p<0,05$). MetSHD apresentou correlação negativa entre AOPP e HDL ($p<0,05$); e correlação positiva entre TG ($p<0,05$), insulina ($p<0,001$) e HOMA-IR ($p<0,001$); e também apresentaram correlação positiva entre NOx e HOMA-IR ($p=0,05$).

Conclusão: Sugerimos que a hipovitaminose D em mulheres com SM pode ser considerada um fator de risco adicional nessa síndrome, haja vista sua relação com um pior quadro metabólico e oxidativo na população sul brasileira.

Palavras-chave: Síndrome metabólica, vitamina D, estresse oxidativo.

Da Silva, Marilza Celina. Influence of vitamin D in metabolic and oxidative and nitrosative stress in patients with metabolic syndrome. Master Degree Dissertation in Clinical and Laboratorial Physiopathology. Londrina State University, 2018.

ABSTRACT

Introduction: Metabolic syndrome (MetS) is a set of cardiometabolic risk factors, including obesity, hyperglycemia, hypertriglycerides, dyslipidemia and hypertension. Oxidative stress seems to play an important role in the development of MS and several components of this syndrome, such as hypertriglyceridemia and inflammation, induce the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Studies have suggested that oxidative stress could be an event that precede the pathology of chronic diseases associated with MS or a consequence of this disorder. ROS and RNS have been implicated in the factors that trigger MS such as obesity, hypertension, endothelial dysfunction and the pathophysiology of MS. In addition, increased oxidative stress associated with decreased antioxidant defenses can lead to metabolic disorders and changes in cellular signaling. Recent studies have shown that vitamin D deficiency is associated with increased cardiovascular risk, decreased glucose tolerance, decreased insulin turnover and insulin sensitivity, and consequently the development of diabetes type 2, and with dyslipidemia. The mechanism by which vitamin D is associated with increased prevalence of MS has not yet been fully elucidated.

Objective: We evaluated the lipid profile and oxidative/nitrosative status in patients with MetS with and without hypovitaminosis D, and to correlate oxidative and nitrosative biomarkers with metabolic in MetS patients with hypovitaminosis D.

Methodology: This study included 88 adult women with MetS were included. Clinical data as age, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), abdominal circumference (AC), waist circumference (WC), and body mass index (BMI) was obtained. Total cholesterol (TG), low density lipoprotein (LDL-cholesterol), high density lipoprotein (HDL-cholesterol), triglycerides (TG), vitamin D, uric acid, insulin, glucose was determined. The insulin resistance (IR) was calculated using the Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance (HOMA-IR), and $\text{HOMA-IR} \geq 2.5$ was considered IR. The oxidative stress biomarkers evaluated was antioxidant defense using total-trapping antioxidant parameter (TRAP) technique, plasma lipoperoxides (CL-LOOH), advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide metabolites (NOx), sulphhydryl groups (SH), and PON activity. Participants were categorized as hypovitaminosis D when vitamin D levels were $< 30\text{ng/mL}$ (MetSHD) and sufficient when vitamin D levels presented $\geq 30\text{ ng/mL}$ (MetSD).

Results: MetSHD presented elevated levels of TG ($p=0.04$), glucose ($p=0.03$), and IR determined by HOMA-IR in women with MetSHD ($p=0.04$) compared with those women with MetSD. It was found MetSHD presented statistically elevated protein oxidation demonstrated by AOPP ($p=0.03$) and elevated levels of NO metabolites ($p=0.04$) compared with those with MetSD. MetSHD presented a tendency to higher levels of PON activity ($p=0.06$). MetSHD presented negative correlation between SH groups and TC ($p<0.05$), and HDL-cholesterol ($p<0.05$); and presented a negative correlation between TRAP/ uric acid and BMI ($p<0.05$), AC ($p<0.05$), insulin ($p<0.05$). MetSHD presented a positive correlation between AOPP and HDL-cholesterol ($p<0.05$), TG ($p<0.05$), insulin

($p < 0.001$), and HOMA-IR ($p < 0.001$); and presented a positive correlation between NOx and HOMA-IR ($p = 0.04$).

Conclusion: Our study suggests that hypovitaminosis D in women with MetS may be considered an additional risk factor in this syndrome, given its relationship with a poorer metabolic and oxidative profile in this Brazilian population.

Keywords: metabolic syndrome, D vitamin, oxidative stress,

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica (<i>Advanced oxidatin protein products</i>)
ATP III	Terceiro painel de tratamento para adultos (<i>Adult Treatment Panel III</i>)
AU	Ácido úrico
CAM	Moléculas de adesão celular
CAT	Catalase
CT	Colesterol total
CL-LOOH	Quimioluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido
CMIA	Imunoensaio de quimioluminescência de micropartícula (<i>Chemiluminescence microparticle immunoassay</i>)
CuZnSOD	Superóxido dismutase Cobre-Zinco dependente
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>Desoxiribunucleic acid</i>)
DTNB	Ácido 2,2 ditiobisnitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (<i>Endotelial nitric oxide synthase</i>)
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos 23
GGT	Gama-glutamil transferase
G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
HOO [•]	Hidroperóxidos
HU	Hospital Universitário
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa dissulfato
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Hidroperóxido de hidrogênio
HOMA-IR	Modelo homeostático para acessar a resistência à insulina (<i>Homeostasis</i>)

Model Assessment Insulin Resistance)

IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LOO•	Radical alquila
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MDA	Malondialdeído
MnSOD	Superóxido dismutase magnésio dependente
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCEP	Programa Nacional de Educação em Colesterol (<i>National Cholesterol Education Program</i>)
NFkB	Fator de transcrição fator nuclear kappa B
NHANES	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NO•	Dióxido de nitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase (<i>Nitric oxide sintase</i>)
NO _x	Metabólitos do óxido nítrico (<i>Nitric oxide metabolites</i>)
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
N ₃ O ₄	Tetróxido de trinitrogênio
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ •	Superóxido
O ₂ ⁻¹	Oxigênio singlete
OH•	Radical hidroxila
PAI	Pró-oxidante-antioxidante <i>index</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase

PON	Paraoxonase
PTH	Paratormônio
QL	Quimioluminescência
RI	Resistencia a insulina
SH	Grupo tiol das proteínas
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
EC-SOD	Superóxido dismutase extracelular (<i>Extracelular superoxide dismutase</i>)
Tri	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis factor alfa</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	Receptor <i>toll like</i> (<i>Toll like receptor</i>)
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TRAP	Parâmetro antioxidante relacionado à captura total de radicais (<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VDERs	Elementos de resposta da vitamina D
VDR	Receptor de vitamina D (<i>Vitamin D Receptor</i>)
25(OH)D3	25 hidroxí coledalciferol
1,25(OH)2D3	1,25 dihidroxí coledalciferol

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Síndrome Metabólica	1
1.2. Síndrome Metabólica e Estresse Oxidativo e Nitrosativo.....	2
1.3. Síndrome Metabólica e Sistema Antioxidante	7
1.4. Síndrome Metabólica e Vitamina D.....	11
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Comitê de Ética	18
3.2. População e Amostra.....	18
3.3. Dados Demográficos, Epidemiológicos, Antropométricos e Clínicos.....	18
3.4. Coleta de Sangue	19
3.5. Biomarcadores do Estresse Oxidativo e Nitrosativo.....	19
3.6. Dosagem de Vitamina D	21
3.8. Biomarcadores Metabólicos	22
3.7. Análise Estatística	22
4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	23
5. CONCLUSÃO	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
7. REFERENCIAS	47
8. ANEXOS E APÊNDICES	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Moléculas pró-oxidantes, antioxidantes e enzimas envolvidas no estresse oxidativo e nitrosativo.....	07
FIGURA 2 – Síntese da vitamina D.....	12
FIGURA 3 - Metabolismo da Vitamina D.....	13

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica (SM) é um conjunto de fatores de risco cardiometabólicos, incluindo obesidade, adiposidade visceral; hiperglicemia, hipertriglicerídios, dislipidemia e hipertensão (JOHNSON e WEINSTOCK, 2006; ECKEL et al., 2010).

Nos últimos 20 anos, o número de pessoas diagnosticadas com SM em todo o mundo tem aumentado significativamente. Associada à epidemia global de obesidade e diabetes, a síndrome metabólica, devido ao aumento alarmante de sua incidência, pode ser considerada uma epidemia (REAVEN, 1988). A prevalência da SM varia de acordo com a idade e com o sexo, destacando-se que o envelhecimento do grupo feminino é marcado pelo aumento de 20% na prevalência da SM. Na idade entre 40-59 anos, os homens apresentam 40% e mulheres 34% de prevalência. Já na faixa etária ≥ 60 anos, homens apresentam 41% e mulheres apresentam 56% de prevalência. Diante do exposto, a SM tornou-se problema de saúde pública (FERREIRA et al., 2011).

Com o passar do tempo ocorreu 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 (WASSINK, OLIJHOEK e VISSEREN, 2007; FERREIRA et al., 2011). Tendo-se em vista os inúmeros riscos associados a essa síndrome, Reaven e colaboradores (2006) desenvolveram um estudo 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.

O diagnóstico de SM é realizado de acordo com a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2005), que adota *Adult Treatment Panel III* (ATPIII) proposto pelo *National Cholesterol Education Program* (NCEP) revisado em 2004 (GRUNDY et al., 2004), tendo em vista a simplicidade e a aplicabilidade dessa definição para a prática clínica (UNGER et al., 2010).

Para SM, são necessários a combinação de, pelo menos, três dos seguintes critérios:

- Circunferência abdominal ≥ 102 cm em homens e ≥ 88 cm em mulheres;
- Triglicerídeos ≥ 150 mg/dL ou uso de medicamentos para controle dos níveis de triglicerídeos;
- Colesterol HDL ≤ 40 mg/dL em homens e ≤ 50 mg/dL em mulheres, ou uso de medicamentos hipolipemiantes;
- Pressão arterial sistólica ≥ 130 mmHg e pressão arterial diastólica ≥ 85 mmHg e/ou uso de anti-hipertensivos;
- Glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL ou uso de hipoglicemiantes orais.

Apesar de a resistência à insulina (RI) não ser utilizada como critério diagnóstico para SM, é uma condição comum, o que explica manifestações clínicas da SM (DESROCHES e LAMARCHE, 2007). Um estudo mostrou que os níveis elevados de insulina e a RI estão presentes em pacientes com SM realizado em 37 mulheres e 18 homens da Turquia quando comparados a controles saudáveis (KORKMAZ et al., 2013).

A SM também tem sido associada ao estresse oxidativo, inflamação subclínica, condições pró-trombóticas e distúrbios fibrinolíticos. No entanto, estes parâmetros também não são usados como critério diagnóstico (LTEIF e MATHER, 2004).

1.2. Síndrome Metabólica e Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Os radicais livres são moléculas orgânicas ou inorgânicas que possuem átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, ávidos por elétrons e quimicamente muito reativos, podendo levar a oxidação de outras moléculas. Como no metabolismo celular são formados outros produtos reativos que não se encontram na forma de radicais livres, estes são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (PINHO et al., 2010).

As EROs são formadas fisiologicamente como parte do metabolismo celular. Para suprir a necessidade energética celular, o processo metabólico de fosforilação oxidativa mitocondrial leva à geração de moléculas de ATP, associada ao acontecimento de reações de oxidação e redução na cadeia de transporte de elétrons na membrana interna da mitocôndria, levando a redução de oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O). Estima-se de 95% do O_2 consumido resulte na formação de H_2O . E o restante não é completamente reduzido, levando a formação de EROs (HIBERTSON et al., 2011).

As ERNs também são formadas em processos fisiológicos ou em resposta a estímulos inflamatórios, incluindo os lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interferon gama (IFN- γ), que estimulam a produção de óxido nítrico (NO) por induzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase isoforma induzível (iNOS). O NO é produzido a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS) (MAARSINGH et al., 2009; TELES et al., 2015).

O estresse oxidativo e nitrosativo ocorre quando há desequilíbrio entre moléculas oxidantes e a capacidade antioxidante como aumento de EROs e ERNs, diminuição da capacidade antioxidante ou ambas as condições (ROBERTS e SINDHU, 2009). As principais EROs e ERNs produzidas são radical hidroxila (OH \bullet), o ânion superóxido (O $_2^{\bullet-}$), hidroperóxido (HO $_2\bullet$), óxido nítrico (NO \bullet) e o dióxido de nitrogênio (NO $_2\bullet$) (TELES et al., 2015) (Figura 1).

A peroxidação lipídica é provavelmente um evento citotóxico primário que origina uma sequência de lesões celulares. A peroxidação de lipídeos de membrana acarreta em mudanças na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, bem como a produção de peróxidos lipídicos. Estas alterações de membrana modificam a permeabilidade seletiva, o fluxo de íons e outras substâncias, resultando na perda da seletividade para entrada ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do ácido desoxirribonucleico (DNA), oxidação de LDL e comprometimento de componentes da matriz intracelular e extracelular. A peroxidação de lipídeos na parede do endotélio vascular contribui para a aterosclerose, risco de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (PILLON et al., 2012; TELES et al., 2015).

A ação da enzima nicotinamida adenina fosfato dinucleotídeo (NADH) oxidase, uma enzima presente nos tecidos renais e cardiovasculares, catalisa a transferência de um elétron para o oxigênio (O $_2$), produzindo o O $_2^{\bullet-}$. Aumento na sua expressão está associado a aumento nos níveis de EROs e, conseqüentemente, do estresse oxidativo (DEVARAJ, GOYAL e JIALAL, 2008; YOUN et al., 2014).

O estresse oxidativo parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento da SM e vários componentes desta síndrome, incluindo obesidade, hipertensão, aterosclerose, inflamação e diabetes mellitus tipo 2, os quais são processos capazes de induzir a produção de EROs e ERNs (HOPPS e CAIMI, 2013; OHMORI et al., 2005; ABDILLA et al., 2007; BULENT e ESRA, 2014; YOUN et al., 2014). O

estresse oxidativo poderia ser um evento que antecederia a patologia das doenças crônicas associadas à SM ou uma consequência desta desordem (ROBERTS e SINDHU, 2009).

A obesidade está associada ao aumento do estresse oxidativo e este pode desencadear o desenvolvimento da resistência à insulina (URAKAWA et al., 2003). Além disso, o aumento do estresse oxidativo associado com diminuição das defesas antioxidantes pode levar a transtornos metabólicos e alterações na sinalização celular (ROBERT e SINDHU, 2009).

A oxidação avançada de proteínas (AOPPs) é formada pela ação de oxidantes clorados, incluindo ácido hipoclorídico e cloraminas, resultantes da atividade das mieloperoxidases durante ação inflamatória de neutrófilos e monócitos. Os AOPP são definidos como produtos proteicos interligados contendo ditirosina, o que as tornam importantes biomarcadores da oxidação de proteínas e tornam possível estimar o grau de oxidação destas (CAKATAY et al., 2005; CAKATAY, RAYALI e UZUN, 2008; KORKMAZ et al., 2013). EROs e ERNs podem modificar proteínas direta ou indiretamente, geralmente de forma irreversível, e podem causar inibição da atividade de enzimas, aumento na suscetibilidade de agregação e proteólise (HOPPS e CAIMI, 2013).

Estudos têm relatado a AOPP como melhor parâmetro para determinação de estresse oxidativo em pacientes com SM, e também como marcador precoce do diabetes mellitus e SM (SABEKOVÁ et al., 2006; ZURAWSKA-PLAKSEJ et al., 2014; MARTIN-GALLÁN et al., 2003). A AOPP foi melhor correlacionada com parâmetros da SM do que outros marcadores do estresse oxidativo, e em especial com o metabolismo da glicose (ZURAWSKA-PLAKSEJ et al., 2014). Estudo mostrou que a oxidação de proteínas determinado pela AOPP e pelo pro-oxidante-antioxidante index (PAI), estão correlacionados com componentes da SM mais do que a peroxidação de lipídeos (VENTURINI, SIMÃO E DICHI, 2015).

Na SM, o estado pró-oxidante parece alterar a via de sinalização celular de insulina e levar a um efeito nocivo sobre o endotélio. Assim, tem-se observado que esta condição leva a RI e acelera o processo de aterogenicidade, sendo um fator desencadeador de diabetes mellitus tipo 2 (ROBERT e SINDHU, 2009; BULENT e ESRA, 2014).

A RI é considerada a base da SM e o estresse oxidativo exerce papel importante na sua etiologia e complicações. A insulina atua na manutenção dinâmica da homeostase da glicose, tanto na captação da glicose quanto na gliconeogênese. Além disso, outras ações da insulina estão relacionadas com doenças cardiovasculares, incluindo a produção

de NO e regulação das funções neurais, explicando a razão pela qual a RI está associada à hipertensão e neuropatia (TELES et al., 2015).

Deve-se destacar que a sinalização clássica da insulina pode acoplar outras vias de sinalização constituindo uma rede complexa de sinais e ações moleculares. Alterações nas inúmeras etapas de sinalização pode induzir a RI. São descritos na literatura, o aumento da fosforilação dos substratos dos receptores de insulina ativados, a degradação desses substratos, atividade aumentada de fosfatases e a ativação diminuída de moléculas da cascata de sinalização da insulina (ROBERT e SINDHU, 2009; FERREIRA et al., 2011).

O aumento de EROs e ERNs pode levar à ativação de serina-quinases, que fosforilam proteínas IRS, que são substrato do receptor de insulina, conduzindo a RI. É relatado que EROs e ERNs estimulam a sinalização pró-inflamatória por ativação de I κ B kinase beta (β) que fosforila resíduos de serina de substratos da cadeia de sinalização da insulina, levando a RI (GRAHAM e ADLER, 2014).

Sabe-se que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo resultam em acúmulo de metabólitos de ácidos graxos de cadeia longa e diacilglicerol, levando a maior ativação da proteína quinase C (PKC), fosforilação de substratos específicos resultando RI não somente nos músculos esqueléticos como também em tecidos adiposos, fígado e vasculatura (SCHENK e tal., 2008).

Dentre os radicais livres, o peroxinitrito parece causar danos diretos à estrutura molecular tanto de receptor de insulina quanto da própria molécula de insulina por meio de reações de nitração, o que compromete suas ações e leva a RI. A nitração da insulina também pode ocorrer devido à hiperglicemia, que induz a diminuição de tetraidrobiopterina (BH₄), importante na manutenção da integridade e função da proteína com resíduos de tirosina, como é a insulina, o que resulta em alterações e disfunção da molécula. A diminuição dos efeitos da insulina sob a via PI3K determina ainda alterações na vasodilatação do endotélio-dependente, estando também relacionado a alterações cardiovasculares (FERREIRA et al., 2011; POTENZA, ADDABBO E MONTAGNANI, 2009)

A regulação das condições morfológicas e fisiológicas do endotélio é de fundamental importância na manutenção do tônus e da homeostase intravascular, evitando o aumento da pressão arterial, outro aspecto determinante da SM. Para manter a homeostase, além do NO, o endotélio produz substâncias vasodilatadoras tais como prostaciclina e cininas, e também, substâncias vasoconstritoras como angiotensina II e

endotelina. Outros fatores importantes são a geração de plasminogênio tecidual, a liberação de substâncias anti-inflamatórias, de peptídeos natriuréticos (peptídeo atrial natriurético, peptídeo natriurético tipo B, C e D, a atividade normal da superóxido dismutase (SOD), evitando a instalação de uma situação de estresse oxidativo (CHAMPLAIN e tal., 2004).

Em situações de estresse oxidativo, a presença de radicais superóxido na vasculatura leva à reação com NO local, formando peroxinitrito (Figura 1). As moléculas de peroxinitrito provocam danos por atuarem diretamente no DNA celular, além de induzir o desacoplamento da eNOS. Nessas condições, a enzima NADP oxidase leva à produção de radicais superóxido, exacerbando o estresse oxidativo e o dano endotelial. Por outro lado, o dano endotelial criado ativa a enzima iNOS, aumentando a síntese de NO. Como resultado desse processo, uma resposta inflamatória será gerada, com o recrutamento de monócitos e linfócitos T para a parede dos vasos (CHAMPLAIN e tal., 2004).

A inflamação associada ao estresse oxidativo é fator determinante na etapa inicial da aterosclerose. As LDL plasmáticas são oxidadas ao chegar à região íntima arterial, em virtude desse estresse oxidativo instalado. Os macrófagos expressam receptores (*scavengers*) para lipoproteínas modificadas, englobando essas partículas de LDL oxidadas, formando células espumosas. A molécula de LDL oxidada, pode ainda causar disfunção no endotélio vascular, alterando seus mecanismos vasodilatadores e anticoagulantes. Como resultado desse processo, ocorre necrose de células espumosas, deposição de colesterol, fibrose e proliferação de fibras musculares lisas, com estreitamento dos vasos, contribuindo para aumento da resistência vascular periférica observado na hipertensão arterial (CHAMPLAIN e tal., 2004).

Robert e Sindhu (2009) mostraram que estilo de vida, dieta balanceada e exercícios apresentam um efeito positivo sobre o estresse oxidativo em pacientes com SM, e diminui as chances de desenvolver doenças crônicas associadas a SM e condições hiperoxidativas. Tomeleri et al. (2017) sugerem que um treinamento resistido durante 12 semanas pode levar a melhoras na composição corporal, pode reduzir os fatores de risco da SM e biomarcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR) e TNF- α , em mulheres brasileiras com média de idade de $70 \pm 5,7$ anos, sem intervenção na dieta.

1.3. Síndrome Metabólica e Sistema Antioxidante

A contínua exposição a várias moléculas oxidantes leva o organismo a desenvolver mecanismos de defesa contra essas espécies reativas. O sistema antioxidante é composto por sistema enzimático superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e sistema não enzimático (vitamina A, C, E e B), ácido fólico, glutatona, coenzima Q10, ácido α -lipóico-LA, carotenóides, flavonóides e oligoelementos como cobre, zinco, magnésio e selênio (Figura 1). Os antioxidantes geralmente agem em sinergismo com espécies reativas alvo, amenizando os efeitos do estresse oxidativo e atenuando a inflamação a nível molecular (GARCIA-BAILO et al., 2011; KOTANI e TANIGUSHI, 2011; GODALA et al., 2016).

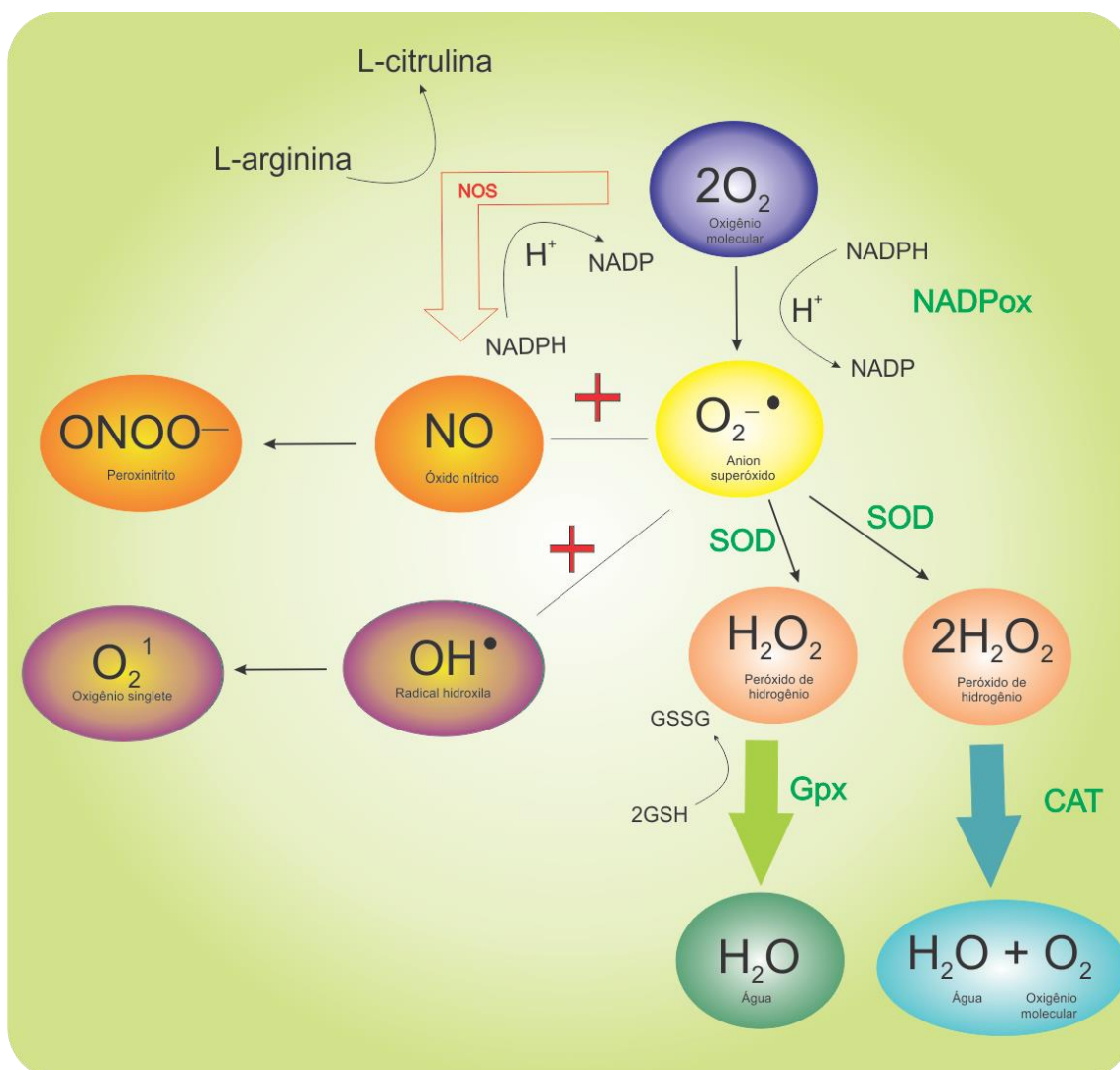


Figura 1. Moléculas pró-oxidantes, antioxidantes e enzimas envolvidas no estresse oxidativo e nitrosativo.

Fonte própria.

A função da SOD é catalisar a degradação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), molécula menos reativa. O H_2O_2 também possui efeito oxidante e difunde facilmente pelas membranas das células e citoplasma. Para reduzir este efeito oxidante e neutralizar a molécula, outras enzimas como CAT e GPx contribuem para a degradação do H_2O_2 produzindo água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2) (ZELKI, MARIANI e FOLZ, 2002) (Figura 1).

Esta enzima faz parte de uma família de enzimas que contem três isoenzimas no organismo de mamíferos, a SOD1 ou CuZn-SOD presente no citoplasma e núcleo das células; SOD2 ou Mn-SOD presente nas mitocôndrias e a SOD3 ou extracelular superoxide dismutase (EC-SOD) presente no ambiente extracelular (ZELKI, MARIANI e FOLZ, 2002). A SOD previne o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$, uma vez que este pode reagir com óxido nítrico (NO^{\cdot}) e formar peroxinitrito ($ONOO^-$), prevenindo o dano oxidativo celular. São a principal defesa antioxidante do organismo, e diversos estudos têm demonstrado a diminuição da atividade dessas enzimas em indivíduos com SM (ISOGAWA et al., 2009; CHEN et al., 2012; FEOLI et al., 2014).

A CAT, por sua vez, é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a água (H_2O) e oxigênio (O_2). Consiste em 4 subunidades de proteína e cada uma contém um íon ferro no grupo heme, que se submete a oxidação ao entrar em contato com molécula de H_2O_2 para produzir Fe^{+4} em uma estrutura chamada composto 1. Uma segunda molécula de H_2O_2 funciona como doador de elétron e resulta na destruição das duas moléculas de H_2O_2 e produz O_2 . CAT é a única enzima que metaboliza o H_2O_2 com alta afinidade e em altas concentrações (KOHEN e NYSKA, 2002), e é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (FEOLI et al., 2014).

A GPx é uma enzima tetramérica contendo selênio encontrada no citoplasma e na matriz mitocondrial. A GPx também é encontrada associada a membrana na sua forma insolúvel, atuando na neutralização de hidroperóxidos lipídicos. Diferentemente da CAT, a GPx age sobre o H_2O_2 até mesmo em concentrações pequenas de H_2O_2 . Para isso, GPx usa glutathiona na forma reduzida (GSH) como doadora de próton (H^+), que após reação se torna oxidada (GSSG) (Figura 1). Além de ser responsável pela diminuição de H_2O_2 , ela transforma lipoperóxidos e outros hidroperóxidos orgânicos em seus correspondentes compostos hidroxilados, que são menos reativos (ISOGAWA et al., 2009; CHEN et al., 2012; FEOLI et al., 2014).

De acordo com Chen et al. (2012), indivíduos com SM apresentam atividade diminuída de GPx, e essa diminuição foi associada ao aumento do estresse oxidativo e do estado pró-inflamatório. A diminuição da atividade da GPx também foi associada ao aumento do IMC e da circunferência abdominal.

Outras enzimas também colaboram com a capacidade antioxidante como, por exemplo, a glucose-6-fosfato desidrogenase que fornece redutores como NADPH necessários para a função celular e para regeneração de antioxidantes oxidados, regenerando a glutatona oxidada GSSG para a forma reduzida GSH, ao reduzir o NADH (KOHEN e NYSKA, 2002).

A paraoxonase (PON) é classificada como uma esterase cálcio dependente do grupo A, esterases que apresentam capacidade de hidrolisar compostos organofosforados, ao contrário das esterases do grupo B que são inativadas por organofosforados. Para sua atuação e estabilidade necessitam de cálcio (Ca^{+2}) e são amplamente distribuídas pelo corpo incluindo fígado, rins, intestino delgado e soro. A família de enzimas PON é constituída por 3 enzimas, PON1, PON2, PON3. A PON1 é uma enzima associada ao HDL e desempenha um papel importante na prevenção de complicações microvasculares do estresse oxidativo e várias substâncias químicas tóxicas. A PON previne a oxidação da HDL por hidrolisar peróxidos lipídicos e hidroperóxido, e também previne modificações oxidativas na LDL (RAJEKAR, MOGAREKAR e ADHE-EOJEKAR, 2016).

Em um estudo realizado na população indiana com SM, foram encontrados níveis diminuídos de PON quando comparados a indivíduos saudáveis (RAJEKAR, MOGAREKAR e ADHE-EOJEKAR, 2016). E em outro estudo a PON1 mostrou-se como um novo marcador da SM (RAJEKAR et al., 2016). Existe a hipótese de que o dano oxidativo a lipoproteínas, especialmente à HDL-colesterol, leva à redução da atividade da PON1 em situações em que o estresse oxidativo está presente, como ocorre em indivíduos com SM, devido a alterações glicêmicas e hiperinsulinemia. Assim, a atividade diminuída da PON1 parece ser consequência da disfunção ou modificação da HDL-colesterol, o qual é responsável pela redução na capacidade antioxidante (GARIN et al., 2005; EREN et al., 2014; ROJEKAR et al., 2016).

A vitamina C, ou ácido ascórbico é um antioxidante hidrofílico presente no plasma. A absorção de vitamina C ocorre no intestino delgado através do transportador de vitamina C dependente de sódio. Este transportador também está presente no túbulo

proximal renal, onde reabsorve ácido fólico (WANNAMETHEE et al.,2006; GARCIA-BAILO et al., 2011).

A vitamina C desempenha importante papel no sistema imunológico e em processos oxidativos/imunológicos, removendo EROs e ERNs, prevenindo a glicação de proteínas, e protegendo contra a peroxidação de lipídeos. Os produtos oxidados de vitamina C, o radical ascorbil e ácido dehidroascorbico são facilmente regenerados pela glutathione, NADH ou NADPH. Além disso, o ácido ascórbico consegue reciclar a vitamina E e a glutathione oxidadas. Contudo, tem sido de grande interesse o uso de vitamina C como antioxidante e anti-inflamatório no diabetes mellitus tipo 2 (WANNAMETHEE et al.,2006; GARCIA-BAILO et al., 2011).

Adicionalmente, a vitamina E ocorre em 4 isoformas (α tocoferol, β tocoferol, γ tocoferol e δ tocoferol), e a diferença entre estas isoformas está na estrutura química que acarreta diferentes funções. O α -tocopherol é a forma predominante reconhecida no fígado pela proteína de transferência de α tocoferol, e é posteriormente incorporado a VLDL, enquanto, o γ tocoferol é metabolizado e não é retido. A suplementação de vitamina E é essencialmente de α tocoferol e γ tocoferol, sendo encontrado em vários vegetais, óleos, sementes e castanhas (GARCIA-BAILO et al., 2011).

A administração de vitamina E aumenta a proliferação de linfócitos devido ao aumento divisão celular. As ações anti-inflamatórias parecem estar relacionadas com inibição pós-transcricional da 5-lipoxigenase, enzima envolvida com a síntese de prostaglandinas. Além, disso, diminui fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB) e exerce potente efeito antioxidante lipofílico nas membranas celulares e também em lipoproteínas do plasma como LDL (GARCIA-BAILO et al., 2011). Estudos mostram que a ingestão de vitamina E bloqueia a peroxidação de lipídeos como LDL, previne o estresse oxidativo associado ao diabetes tipo 2 e anormalidades metabólicas como hiperglicemia, dislipidemia, e também suprime a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (DEVARAJ e JIALAL, 1999; HAN et al., 2004; THOMAS e STOCKER, 2000; GARCIA-BAILO et al., 2011).

Laboratorialmente pode-se avaliar a atividade enzimática bem como a dosagem de outros antioxidantes não enzimáticos. No entanto, há técnicas capazes de mensurar a capacidade antioxidante total em um sistema biológico. Um dos métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante total (*Total antioxidante capacity-TAC*) em fluidos biológicos é a capacidade antioxidante total (*total radical trapping potential-TRAP*), classificado com uma metodologia indireta. Esta técnica avalia a ação cumulativa de

todos os antioxidantes presentes no meio biológico (REPETTO et al., 1996; KOHEN e NYSKA, 2002). O ácido úrico também é um importante antioxidante, responsável por 60% da retirada de radicais livres no plasma humano, e assim pode influenciar os resultados do TRAP. Desta forma, ao corrigir os valores de TRAP com os valores de ácido úrico, estamos eliminando a influência deste fator nos resultados de TRAP (VENTURINI, SIMAO e DICHI, 2015).

1.4. Síndrome Metabólica e Vitamina D

A vitamina D desempenha papel fundamental na regulação da concentração de cálcio plasmático atuando na absorção intestinal e no metabolismo ósseo. Além disso, parece influenciar na regulação de glicose devido a efeitos sobre a secreção e ação da insulina, e está associada ao diabetes melittus tipo 2 (KHAN et al.,2012).

A vitamina D é sintetizada a partir do composto esteróide 7-deidrocolesterol presente na pele por exposição à luz solar ou, em menor quantidade, adquirida através da dieta ou suplementação (Figura 2). O esteróide 7-deidrocolesterol é convertido em pré-vitamina D3, seguido de isomerização final formando o colecalciferol (vitamina D3). O colecalciferol é transportado até o fígado ligado a uma α 1-globulina específica onde sofre hidroxilação no carbono 25 e produz a 25(OH)D3, um metabólito com atividade biológica limitada. A reação de hidroxilação ocorre principalmente no fígado, no entanto, outros tecidos como pele, intestino e rins têm sido descritos como catalisadores desta reação atividade (HARRIS et al., 2000; TNAGPRICHA et al., 2002; FERNANDEZ e VALDIVIELSO, 2006; LEE et al., 2008).

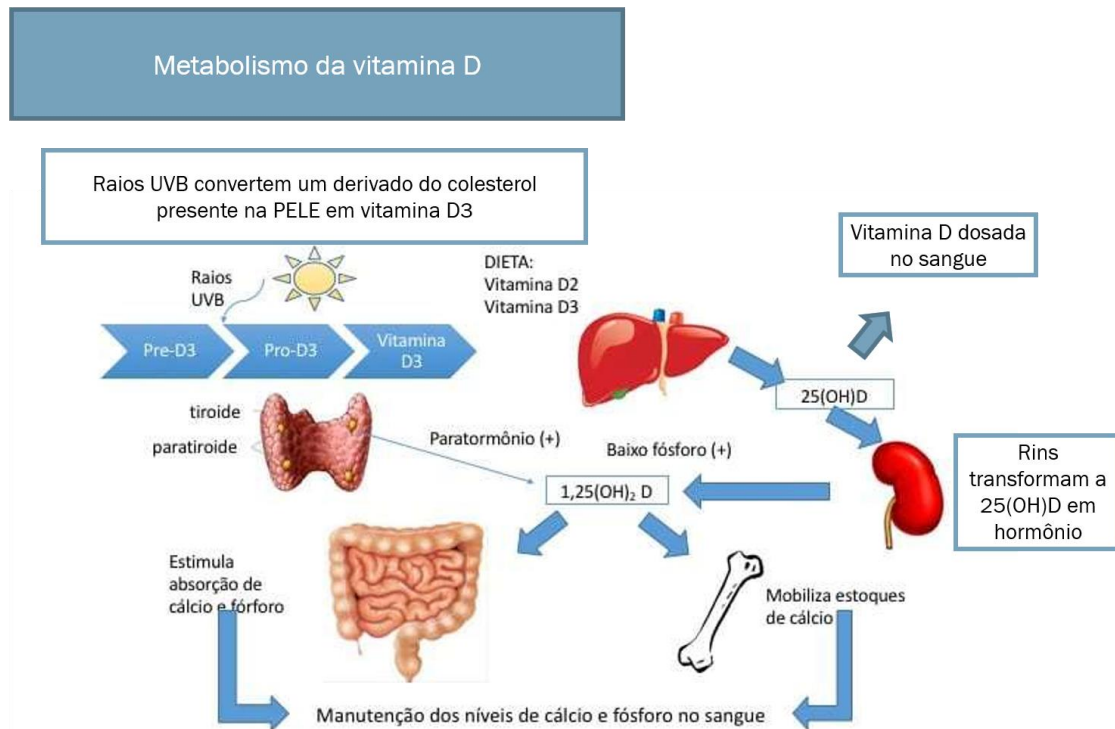


Figura 2. Síntese da vitamina D.

Fonte: MAEDA et al., 2014.

A $25(\text{OH})\text{D}_3$ é transportada até os rins e, sob ação da enzima $1,25(\text{OH})\text{D}-\alpha$ hidroxilase, sofre nova hidroxilação, desta vez no carbono número 1, formando o metabólito biologicamente ativo da vitamina, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A enzima $1,25(\text{OH})\text{D}-\alpha$ hidroxilase está localizada na membrana mitocondrial e é uma citocromo P-450 monoxigenase que necessita de oxigênio molecular e ferredoxina na forma reduzida para exercer sua atividade (HARRIS et al., 2000; TNAGPRICHA et al., 2002; FERNANDEZ e VALDIVIELSO, 2006; LEE et al., 2008). O metabolismo da vitamina D é regulado pela paratireoide ao produzir o paratormônio (PTH), o qual estimula os rins a realizar a ativação desta vitamina 25OHD em $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pela ação da enzima CYP450. Já os osteoclastos produzem o fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) que inibe a ativação da vitamina D pelos rins (Figura 3) (BICKLE, 2009).

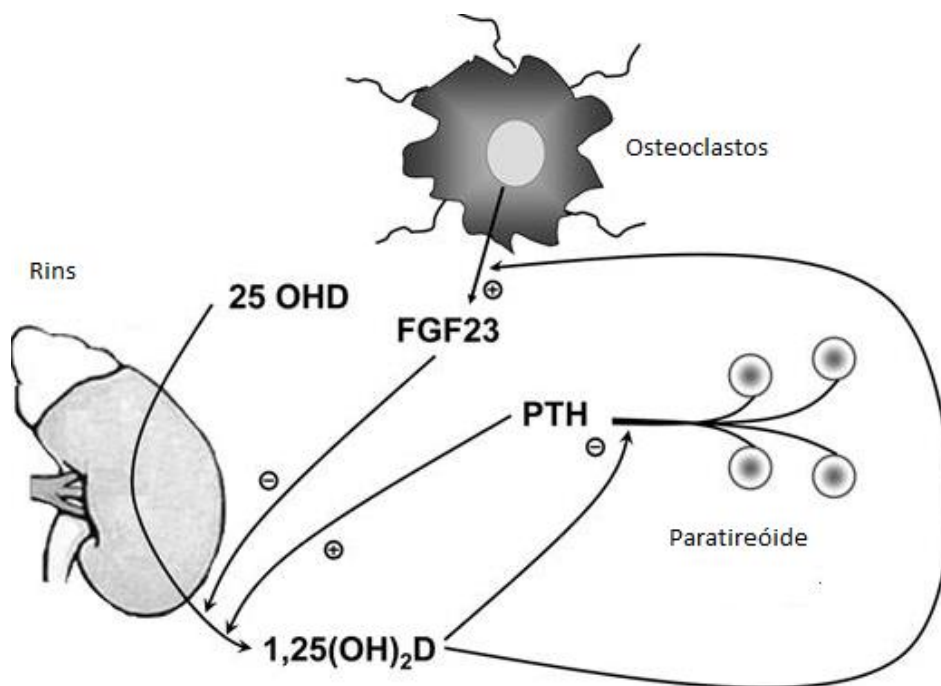


Figura 3. Metabolismo da Vitamina D.

Adaptado de BIKLE, 2009.

A maioria dos efeitos biológicos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é mediada por receptores específicos de alta afinidade, que age como um ligante ativador de fator de transcrição. Os principais mecanismos envolvidos no controle da transcrição do gene do receptor de vitamina D (*VDR*) incluem a ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, heterodimerização com receptor retinóide X (*RXR*), ligação do heterodímero a elementos de resposta da vitamina D (*VDERs*) e recrutamento de outras proteínas nucleares ao complexo inicial de transcrição. Assim, alterações genéticas no *VDR* podem desencadear defeitos importantes na ativação de genes, afetando o metabolismo do cálcio, proliferação celular e funções imunológicas (FERNANDEZ e VALDIVIELSO, 2006).

A vitamina D também exerce um papel na mediação da inflamação. A ligação da vitamina D ao seu receptor *VDR* leva a inibição da proliferação de linfócitos T, redução da produção de citocinas inflamatórias e inibição da maturação de células dendríticas. A ação da vitamina D sobre os linfócitos T suprime a sua diferenciação para o fenótipo Th1 e estimula a diferenciação para o fenótipo Th2. A vitamina D também inibe a proliferação de linfócitos B e, conseqüentemente, a produção de anticorpos (WHITE, 2008; DANIK e MANSON, 2012).

The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) verificou que 25 a 57% da população dos Estados Unidos apresentou níveis séricos diminuídos de vitamina D demonstrando uma significativa associação inversa entre concentrações séricas de vitamina D e SM (LOOKER et al., 2002). Estudos similares realizados em diferentes regiões dos Estados Unidos têm encontrado uma prevalência de deficiência de vitamina D que varia de 30 a 50% na população geral (LEE et al., 2008; HARRIS et al., 2000; TNAGPRICHA et al., 2002).

Sabe-se que existe uma relação entre diminuição nos níveis de vitamina D e obesidade. Níveis séricos de vitamina D diminuídos foram inversamente correlacionados com marcadores de obesidade, incluindo IMC e medida da circunferência abdominal (GOLDNER et al., 2008; FISH et al., 2010). A diminuição nos níveis séricos de vitamina D poderia ser devido ao grande sequestro pelo tecido adiposo, devido a sua lipossolubilidade neste tecido, reduzindo os níveis na circulação (WORTSMAN et al., 2000; BLUM et al., 2008). Assim, existe forte evidência de que os níveis de vitamina D estão alterados em indivíduos obesos e que trazem implicações para o desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades (DING et al., 2012).

O tecido adiposo é um órgão endócrino e secreta grande variedade de proteínas bioativas, e um importante número dessas adipocinas incluindo adiponectina (atividade anti-inflamatória), TNF- α e MCP-1, estão diretamente envolvidas na inflamação. Existem poucos estudos sobre o papel da vitamina D na modulação da produção de adipocinas (TRAYHURN e WOOD, 2004; TRAYHURN, BING e WOOD, 2006).

Adipócitos hipertrofiados em indivíduos obesos apresentam maior liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1), o que contribui para a inflamação tecidual. A inflamação do tecido adiposo é caracterizada pelo aumento de infiltrado de macrófagos e outras células imunológicas, desempenhando importante papel na disfunção deste tecido. A vitamina D também exerce essa imunomodulação no tecido adiposo (CINTI et al., 2005; FONTANA et al., 2007; SKURK et al., 2007; LOLMEDE et al., 2011). De acordo com Ding et al. (2012), a vitamina D parece desempenhar papel anti-inflamatório e parece amenizar a inflamação induzida por macrófagos nos tecidos adiposos.

A deficiência de vitamina D está associada com o aumento do risco cardiovascular e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, efeitos adversos sobre o endotélio e sobre a função da musculatura lisa que levam à hipertensão (DANIK e MANSON, 2012; BAKER et al., 2012). Deficiência de vitamina D está relacionada à

diminuição da tolerância à glicose, diminuição do *turn over* da insulina e da sensibilidade à insulina, e conseqüentemente, ao desenvolvimento de DMT2. Além disso, segundo Baker et al. (2012), a deficiência de vitamina D está associada a dislipidemia e SM.

O mecanismo pelo qual a vitamina D está associada ao aumento da prevalência da SM e da aterogenicidade ainda não está completamente elucidado. A vitamina D aumenta a expressão de receptores para insulina e baixos níveis de vitamina D estão associados com a disfunção das células β pancreáticas (CHIU, CHU e GO, 2004; PITTAS et al., 2007). Kayaniyil et al. (2010) demonstraram que a deficiência de vitamina D foi independentemente associada à resistência a insulina e disfunção das células β em pacientes com risco de diabetes. A correção da deficiência de vitamina D foi associada à melhora da SM, sugerindo que esta pode contribuir para alterações na sinalização da insulina (AL-DAGHRI et al., 2011). Além disso, a relação entre falta de vitamina D e dislipidemia pode ser devido a efeitos no metabolismo lipídico hepático. A vitamina D promove a absorção de cálcio no intestino, e o cálcio parece se ligar aos ácidos graxos formando compostos insolúveis que impedem a absorção de lipídeos. Assim, a vitamina D leva a um metabolismo anormal de lipídeos devido a alterações na biodisponibilidade de cálcio (VASKONEN et al., 2002; BAKER et al., 2012). Por outro lado, os ácidos graxos sequestram a vitamina D, sendo que a obesidade pode estar associada com a diminuição da biodisponibilidade da mesma (WORTSMAN et al., 2000; BAKER et al., 2012).

A hipovitaminose D é altamente prevalente e constitui um problema de saúde pública em todo o mundo. Estudos mostram uma elevada prevalência dessa condição em várias regiões geográficas, incluindo o Brasil, além disso, pode acometer mais de 90% dos indivíduos, dependendo da população estudada (MAEDA et al., 2014). Diversos são os mecanismos fisiopatológicos da hipovitaminose D nos componentes da SM. Em obesos, as alterações do sistema endócrino da vitamina D, caracterizada por elevados níveis de PTH e da forma ativa da vitamina D são responsáveis pelo *feedback* negativo para a síntese hepática de 25(OH) D₃. A deficiência desta pode dificultar a capacidade das células beta na conversão da pró-insulina em insulina. Estudos em ratos mostraram que a deficiência de vitamina D dificulta a liberação de insulina pelo pâncreas e reduz a tolerância da glicose, e que estas alterações são parcialmente revertidas após tratamento com 1,25(OH)2D₃ (CADE e NORMAN, 1987; BILLAUDEL et al., 1995).

Chiu e colaboradores (2004) observaram, em um estudo com 126 indivíduos saudáveis, que aqueles com hipovitaminose D (definida pelos níveis séricos de vitamina

D abaixo de 20ng/mL) apresentaram alto risco para SM quando comparados aos que não apresentavam hipovitaminose D. Neste estudo, os autores observaram que um aumento nos níveis séricos de vitamina D de 10 para 30ng/mL foi capaz de melhorar em 60% a sensibilidade à insulina (CHIU et al., 2004).

A vitamina D, em determinadas situações, pode atuar tanto como antioxidante quanto como pró-oxidante (KOREN et al., 2005). Agindo como antioxidante, pode reduzir o estresse oxidativo por vários mecanismos: 1) prevenindo as membranas celulares da peroxidação lipídica, 2) aumentando a atividade da gama-glutamil transferase (GGT) e da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e 3) induzindo a síntese da glutathiona peroxidase e da superóxido dismutase (SOD). Por outro lado, sua capacidade pró-oxidante se dá pela redução nos níveis de glutathiona redutase (HOECK e PALL, 2011).

Indivíduos com hipovitaminose D são mais propensos ao desenvolvimento de doenças metabólicas, dentre elas, a SM (WORTSMAN et al., 2000; BAKER et al., 2012). Apesar dos avanços na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos e dos fatores de riscos que predispõem um indivíduo ao desenvolvimento de SM, muitos aspectos importantes da fisiopatologia desta doença ainda não foram totalmente esclarecidos, dentre eles, o papel do estresse oxidativo e dos níveis séricos inadequados de vitamina D. Até o momento, não é de nosso conhecimento, nenhum estudo que tenha avaliado a influência da deficiência/insuficiência de vitamina D sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo na população sul brasileira. Assim, torna-se importante a realização de estudos para a compreensão da influência da vitamina D sobre a fisiopatologia da SM.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros metabólicos e o estado redox em pacientes com síndrome metabólica com e sem hipovitaminose D.

2.2. Objetivos Específicos

Em indivíduos com SM com e sem hipovitaminose D:

- Avaliar o perfil lipídico;
- Descrever o perfil glicêmico e calcular a resistência à insulina (HOMA-IR);
- Determinar a capacidade antioxidante (TRAP);
- Mensurar os biomarcadores de peroxidação lipídica (hidroperóxidos) e peroxidação protéica (AOPP);
- Determinar os metabólitos do NOx;
- Avaliar a atividade da PON;
- Correlacionar marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo com marcadores metabólicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob o número do CAAE n. 41718014.9.0000.5231 (ANEXO). Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente a obtenção dos dados e das amostras da pesquisa (ANEXO).

3.2. População e Amostra

Foi realizado um estudo transversal e a população foi constituída por 88 mulheres, adultas, com características de SM segundo os critérios da NCEP ATP III, atendidas no Ambulatório de Clínica Médica e Cardiologia do Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), maiores de 18 anos, com padrão alimentar semelhante, o qual foi avaliado individualmente através do prontuário médico.

Todas as participantes selecionadas eram caucasianas a fim de tornar o grupo mais homogêneo em relação a maior ou menor síntese de vitamina D pela exposição aos raios ultravioletas. Estas foram orientadas a manter sua rotina de exposição solar habitual. Em nenhum momento foi suspenso o uso de medicamentos anti-hipertensivos.

Foram excluídos do estudo as mulheres que faziam suplementação alimentar com vitaminas e antioxidantes, incluindo vitamina D, e que apresentavam doenças infectocontagiosas, distúrbios hormonais, doenças crônicas como diabetes descompensado, doenças cardiovasculares e em uso de medicamentos que interferem no metabolismo lipídico e/ou glicêmico.

3.3. Dados Demográficos, Epidemiológicos, Antropométricos e Clínicos

Os dados demográficos como idade, sexo, etnia, epidemiológicos e clínicos dos pacientes inseridos no estudo foram obtidos por membros da equipe de pesquisa. A etnia foi classificada de acordo com a autopercepção do indivíduo em Caucasiano e não Caucasiano (BRASIL, 2011).

As medidas antropométricas avaliadas foram peso corporal (Kg) e altura (m), para calcular o índice de massa corpórea (IMC) ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$). Foram realizadas medidas da circunferência abdominal (cm) e circunferência de quadril (cm) através de mensuração direta pela equipe de pesquisadores. A pressão arterial foi obtida após repouso de 20 minutos e através de duas aferições.

3.4. Coleta de Sangue

As amostras foram coletadas com o sistema de coleta a vácuo em tubos com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante e em tubos sem anticoagulante com gel separador, após 12 horas de jejum. Após a coleta, o material foi imediatamente centrifugado a 3000 r.p.m por 15 min. Plasma e soro foram aliquotados em tubos tipo *epENDORF* e armazenados em *freezer* -70°C (Indrel®) para posterior análise.

3.5. Biomarcadores do Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Os testes que avaliam os biomarcadores do estresse oxidativo e nitrosativo foram realizados em triplicata. O coeficiente de variação inter-ensaio e intra-ensaio foi menor do que 10%.

3.5.1. Capacidade antioxidante total do plasma (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter, TRAP)

A capacidade antioxidante total do plasma foi detectada por meio da técnica do TRAP, na qual, avalia-se a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no meio. Esta técnica quantifica antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis presentes no plasma, por meio de quimioluminescência (QL), como descrito por Repetto e colaboradores (1996). Baseia-se no princípio da adição de um azoiniciador ao plasma, substância capaz de gerar radicais livres, que por sua vez, são neutralizados pelos antioxidantes presentes no plasma, período no qual a oxidação é inibida e comparada ao do Trolox® (New Jersey, EUA) análogo hidrossolúvel da vitamina E, usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado a capacidade antioxidante total do plasma. Os valores de TRAP foram corrigidos pelos níveis de ácido úrico (AU) (VENTURINI et al, 2012) e os resultados foram expressos pela razão TRAP/AU. A determinação do AU foi realizada

em autoanalisador bioquímico Dimension[®] (Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA) segundo as recomendações do fabricante e os valores foram expressos em mg/dL.

3.5.2. *Determinação de lipoperóxidos lipídicos iniciados por t-butil (CL-LOOH)*

A avaliação da formação de lipoperóxidos no plasma pelo método de QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Gonzalez-Flecha e colaboradores (1991). A QL estimulada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH) foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no plasma. O teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E, com formação de lipoperóxidos, resultando em um aumento da emissão de fótons, realizado em contador β marca Beckman[®] modelo LS 6000, (Fullerton, Califórnia, EUA). As análises foram efetuadas em frascos de plástico para cintilação e protegidas da luz. Os resultados foram obtidos em contagem por minuto (c.p.m.)

3.5.3. *Determinação dos produtos avançados da oxidação proteica (AOPPs)*

AOPPs foram determinados em amostras de plasma usando o método descrito por Witko-Sarsat e colaboradores (1996). AOPPs resultam da oxidação de resíduos de aminoácidos como a tirosina, levando a formação de produtos de proteínas contendo ditirosina detectados por espectrofotometria. Os níveis de AOPPs foram expressos em micromol/litro ($\mu\text{mol/L}$) de equivalente de T cloramina.

3.5.4. *Determinação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)*

Os NOx foram determinados no plasma por espectrofotometria de acordo com a reação de Griess, com algumas modificações (GUEVARA et al., 1998; PANIS et al., 2011). Esta técnica utiliza o grânulo de cádmio para reduzir nitrato a nitrito, o qual é quantificado ao formar um complexo colorido com reagente de Griess. Os resultados foram expressos em μM .

3.5.5. *Determinação de proteínas carbonílicas*

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como biomarcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). O método utilizado para sua quantificação no plasma foi

espectrofotométrico, baseado na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila, formando a 2,4 dinitrofenilhidrazona (WITKO-SARSAT et al., 1996). Os resultados foram expressos em $\text{nmol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteínas totais.

3.5.6. Grupo sulfidril (SH)

Os grupamentos sulfidrilas foram realizados por colorimetria descrito segundo o método de Hu (1994), adaptado para microplaca por Taylan e Resmi (2010). O grupo sulfidril ocorre em compostos não proteicos (glutathiona e cisteína livre) e em compostos proteicos (albumina). A reação entre o grupo sulfidril e DTNB produz o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela com absorvância máxima a 412 nm. Foi utilizado amostras de soro para esta análise. Os resultados são expressos em $\mu\text{M/g}$ de proteína.

3.5.7. PON

A enzima PON foi determinada em ensaio triplo enzimático pela técnica de espectrofotometria segundo Richter, Jarvink e Furlong (2008), em soro. A atividade total da PON-1 é determinada pela formação de hidrólise do fenil-acetato (fenol). A taxa de hidrólise de fenil-acetato, foi determinada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA), no comprimento de onda de 270 nm, medidos durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras), com a temperatura mantida a 25°. A atividade foi expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar do fenil-acetato que equivale a 1,31 mMol/Lcm^{-1} .

3.6. Dosagem de Vitamina D

Níveis séricos de 25(OH)D foram determinados em amostras de soro pelo imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), utilizando-se o equipamento Architech® (Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) e os resultados foram expressos em ng/mL. Foram considerados insuficientes e/ou deficientes de vitamina D indivíduos que apresentaram níveis séricos de 25(OH)D < 30 ng/mL e suficientes de vitamina D quando os valores de 25(OH)D foram ≥ 30 ng/mL.

3.7. Biomarcadores Metabólicos

As dosagens séricas de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos e ácido úrico e a dosagem plasmática de glicose foram realizadas em um autoanalisador bioquímico Dimension[®] (Dade Behring, Deerfield, IL, USA).

A determinação dos níveis plasmáticos de insulina foi realizada por QL em imunoensaio com micropartículas como fase sólida, utilizando-se o equipamento ARCHITECT[®] (Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

O HOMA-IR foi utilizado para avaliação da RI (HAFFNER, MIETTINEN, STERN, 1997; HAFFNER, 2003) e calculado da seguinte forma: (insulina plasmática de jejum x glicose plasmática de jejum/ 22,5). A RI foi considerada quando HOMA \geq 2,5.

3.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no Programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, USA). Variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado, e as variáveis contínuas foram analisadas pelo Teste de Mann Whitney. O teste de correlação utilizado foi o de Correlação de Spearman. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos no artigo científico apresentado a seguir, que será submetido ao periódico *British Journal of Nutrition*, Qualis A2, fator de impacto: 4,25.

Artigo 1**Hipovitaminosis D is associated with the components of metabolic syndrome in Brazilian women**

Silva MC¹.; Martins RDB².; Goto FK².; Marinelli ACF².; Okino AM².; Matsumoto AK².; Arceni BS².; Barbosa DS².; Venturini D^{2*}.

¹Phisiopatology Postgraduation Program, Health Science Center, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

²Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

*Corresponding author: Danielle Venturini, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: +55-43-3371-2313. e-mail: danielle.venturini@bol.com.br

ABSTRACT

Low vitamin D status and oxidative/nitrosative stress have been recognized as risk factors for chronic diseases such as metabolic syndrome (MetS). The objective of this study was to evaluate the metabolic, and oxidative/nitrosative markers for association with hypovitaminosis D in women with MetS. The following were evaluated: metabolic biomarkers (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides, uric acid, plasma glucose, insulin), and oxidative/nitrosative stress biomarkers (hydroperoxides-CL-LOOH, carbonyl protein, nitric oxide metabolites-NO_x, sulfhydryl groups-SH of proteins, total radical-trapping antioxidant parameter-TRAP, total serum activity of PON1). Vitamin D was determined as 25 hydroxy (OH). The homeostasis model assessment (HOMA-IR) was calculated. The group of women with vitamin D <30 ng/mL (MetSHD) showed an increase in fasting glucose (p=0.03), TG (p=0.04), HOMA-IR (p=0.04), CT/HDL (p=0.04), LDL/HDL (p=0.03), non-HDL (p=0.04). Levels of vitamin D were lower in the group of women with MetSHD (p<0.0001). There were increased levels of AOPP (p=0.03) and NO_x (p=0.04) in the MetSHD group. In MetSHD, the SH group were negatively correlated with TC (r=-0.359, p<0.05) and LDL-C (r=-0.347, p<0.05), whereas AOPP was negatively correlated with HDL (r=-0.365, p<0.05) and positively correlated with fasting glucose (r=0.320, p<0.05), TG (r=0.655, p<0.0001), insulin levels (r=0.501, p<0.001) and HOMA-IR (r=0.541, p<0.001). NO_x was positively correlated with HOMA-IR (r=0.343, p<0.05), and TRAP/uric acid was negatively correlated with BMI, WC, and insulin levels (r=-0.33, -0.344, -0.366, p<0.05), respectively. In conclusion, the present study showed that hypovitaminosis D in Brazilian women with MetS is associated with metabolic, and oxidative/nitrosative biomarkers, which are important factors for cardiovascular risk.

Key-words: Hypovitaminosis D, oxidative stress, metabolic syndrome, nitrosative stress, metabolic markers.

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a complex disease characterized by a distinct process and cardiovascular risk factors that could culminate in cardiovascular disease and type 2 diabetes (D2 M)¹.

Vitamin D has a pleiotropic action and can affect multiple organs and metabolic processes, including the cardiovascular, renal and immune systems². Some studies showed that hypovitaminosis D is associated with several risk components of MetS, individually. Abdominal obesity, characteristic of individuals with MetS, is associated with lower levels of vitamin D^{1,3,4}. MetS affects approximately 50% of females and is associated with a threefold increase in morbidity and mortality due to cardiovascular disease^{5,6,7,8}. A transversal study showed that hypovitaminosis D is associated with cardiovascular disease independently of the degree obesity¹. Another study showed that individuals with low levels of vitamin D presented higher risks of cardiovascular diseases after 10-15 years of segment⁹.

An imbalance between reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) production and antioxidant substances is the main characteristic of oxidative stress^{10,11,12}. Oxidative stress occur when the energy supply begins to exceed the storage capacity of the adipocytes and, as result, hypertrophy occurs. This hypertrophy leads to a higher release of adipokines as proinflammatory cytokines, resulting in low-grade inflammation, which begins in the adipose tissue and eventually reaches the circulation system and other organs^{10,11,12}.

Additionally, paraoxonase (PON) is a family of Ca⁺⁺ dependent enzymes, namely, PON1, PON2 and PON3^{13,14}. Paraoxonase1 (PON1) is exclusively associated with HDLc and is a genetically polymorphic enzyme. It plays a vital role in the prevention of microvascular complications due to oxidative stress and against various toxic chemicals. HDL oxidation is stopped by PON1-mediated hydrolysis of lipid peroxides¹⁵.

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of insulin resistance by disrupting the release of adipokines by adipose tissue that can trigger inflammation. Thus, it seems that MetS is a factor associated with inflammation and oxidative stress. Low vitamin D status has been increasingly recognized as widespread in all life stages, even in sunny climates. The possible importance of vitamin D status as a novel risk factor for various chronic diseases has gained more interest. In addition, one area of recent study has been the investigation of the association between vitamin D status and MetS.

However, despite evidence of the association of the serum vitamin D and MetS in women, some studies have demonstrated contradictory results. Thus, more clinical studies are needed to confirm the association between vitamin D and women with MetS. Thus, the objective of the present study was to evaluate the oxidative and nitrosative markers, and the association with hypovitaminosis D in women with MetS.

Materials and Methods

Participants:

The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human patients were approved by the Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE 41718014.9.0000.5231). Written informed consent was obtained from all patients. This study included 88 Brazilian women with MetS from the ambulatory centre of the University Hospital of Londrina, Parana, Brazil. Patient motivation was related to the intake of a nonpharmacologic therapy that was practically without side effects. The exclusion criteria were CVDs (except hypertension); thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal, and oncologic diseases; or acute infection and utilization of lipid lowering drugs, oestrogen replacement therapy, drugs for hyperglycaemia; and antioxidant supplements. Patients who were taking antihypertensive drugs were not excluded and were allowed to continue taking their prescribed dosage. None of the participants followed a specific diet before the start of the study. The patients were instructed not to change their usual diets, alcohol intake, level of physical activity, or other lifestyle factors throughout the study. Anthropometric measurements, oxidative stress, and biochemical parameters were assessed. MetS was defined following the Adult Treatment Panel III criteria¹⁶. When three of the following five of the characteristics were verified, a diagnosis of MetS was given: 1. abdominal obesity: waist circumference >102 cm in men and >88 cm in women; 2. hypertriglyceridemia ≥ 150 mg/dL (1.695 mmol/L); 3. low levels of HDL-C: ≤ 40 mg/dL (1.036 mmol/L) in men and ≤ 50 mg/dL (1.295 mmol/L) in women; 4. high blood pressure: $\geq 130/85$ mm Hg; and 5. high fasting glucose: ≥ 100 mg/dL (5.5 mmol/L). The MetS patients were categorized as having vitamin D levels < 30 ng/mL and ≥ 30 ng/mL. All samples were centrifuged at 3000 g for 15 min, and plasma or serum aliquots were stored at -70 °C until assayed. Inter- and intra-assay coefficients of variance were $< 10\%$, as determined in human serum.

Anthropometric and Blood Pressure Measurements

Height and weight were measured in the morning with participants wearing light clothing, but no shoes. After 5 min of rest, each participant had his or her blood pressure measured on the left arm while in a sitting position. We considered the current use of antihypertensive medication as an indication of high blood pressure. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference was measured at the umbilical level with the participants standing after normal expiration and the hip girth was measured at the widest part of the hip and, the waist-to-hip ratio was calculated.

Metabolic markers

Peripheral blood samples were collected after fasting for 12 hours. The metabolic biomarkers were evaluated by serum levels of lipids (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides), uric acid and plasma glucose using Dade Behring™ reagents in a biochemical autoanalyser (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Plasma insulin levels were determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The homeostasis model assessment (HOMA-IR) was used as a surrogate measurement of insulin sensitivity¹⁷. The homeostasis model of assessment in insulin resistance (HOMA-IR) was used as a surrogate measure of insulin sensitivity using $\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin (mU/mL)} \times \text{fasting glucose (nmol/L)} / 22.5$ (HAFFNER, 2003). The 25 hydroxy (OH) were determined using a chemiluminescence assay (CMIA) (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), and the results were expressed as ng/mL.

Oxidative Stress Biomarkers

Peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant. All samples were immediately centrifuged at 3,000 rpm for 15 min, and plasma and serum aliquots were stored at freezer -80 °C until use. The samples were identified consecutively by number to guarantee confidentiality. Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) was evaluated as described previously¹⁸, and the results were expressed in counts per min (cpm). Carbonyl protein content was measured as an estimate of protein oxidative injury, as described elsewhere¹⁹. Nitric oxide metabolites (NO_x) were assessed by nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) concentration according to the Griess reaction supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium²⁰, and the results were expressed in μM.

The sulfhydryl group of proteins was evaluated in the plasma by a spectrophotometric assay based on 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), as reported previously²¹, and the results were expressed in μM . Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported previously²³. This method detects hydrosoluble and/or lyposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analogue Trolox, and TRAP values were expressed in the equivalent of μM Trolox, and the results were expressed as TRAP/AU. Total serum activity of PON1 was determined by the method described by Richter, Jarvik, and Furlong²². The rate of hydrolysis of phenyl acetate was determined in a microplate reader EnSpire, Perkin Elmer® (Waltham, MA, USA) at 270 nm, and the temperature was maintained at 25 °C. Measures were recorded for 4 min each 15 s. The activity was expressed in U/mL on the phenyl acetate molar extinction coefficient of $1.31 \text{ mMol/L cm}^{-1}$.

Statistical analysis

The data were evaluated by the statistical analysis program GraphPad Statmate 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Continuous variables were evaluated using the Mann-Whitney test, and data were expressed as the median and interquartile range (25%-75%). Correlations were evaluated by Spearman's rank correlation. All the results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Clinical, anthropometric, and metabolic parameters in women with MetSHD and MetSD are shown in Table 1. The mean age of MetSHD and MetSD group were 50.61 ± 7.65 years and 53.7 ± 4.35 years, respectively. According to BMI, the MetSHD and MetSD group showed $33.5 (25.3-61.0) \text{ Kg/m}^2$ and $30.6 (24.0-39.0) \text{ Kg/m}^2$, respectively. MetSHD presented AC and WC as $95.0 (81.0-140.0) \text{ cm}$ and $103.5 (89.0-170.0) \text{ cm}$, respectively, while MetSD presented $95.0 (67.0-115.0) \text{ cm}$ and $96.2 (90.0-127.0) \text{ cm}$, respectively. No differences were found with respect to age, WC, BMI, AC, and WC ($p > 0.05$) in both groups. Women with vitamin D $< 30 \text{ ng/mL}$ (MetSHD) group showed a statistically significant increase in fasting glucose ($p = 0.03$), TG ($p = 0.04$), HOMA-IR, CT/HDL ($p = 0.03$), LDL/HDL ($p = 0.04$), non-HDL ($p = 0.04$) when compared with vitamin D $\geq 30 \text{ ng/mL}$ (MetSD). As expected, levels of vitamin D were lower in the group of women

with MetS and vitamin D < 30 ng/mL compared with the group with vitamin D \geq 30 ng/mL, but the groups presented significant differences ($p < 0.0001$).

According to Table 2, with respect to oxidative stress, there was a significant increase in the AOPP ($p = 0.03$) and NOx ($p = 0.04$) levels in the MetSHD group when compared to MetSD. No difference was found in the SH group, hydroperoxides (CL-LOOH), TRAP/uric acid, and AOPP/TRAP ($p > 0.05$). Additionally, there was a tendency to higher levels of PON in the MetSHD group ($p = 0.06$).

Table 3 shows a Spearman correlation rank between clinical, metabolic, and oxidative stress parameters in women with MetS and D hypovitaminosis. The SH group was negatively correlated with TC ($r = -0.359$, $p < 0.05$) and LDL-C ($r = -0.347$, $p < 0.05$), whereas AOPP was negatively correlated with HDL ($r = -0.365$, $p < 0.05$) and positively correlated with fasting glucose ($r = 0.320$, $p < 0.05$), TG ($r = 0.655$, $p < 0.0001$) insulin levels ($r = 0.501$, $p < 0.001$) and HOMA-IR ($r = 0.541$, $p < 0.001$). NOx was positively correlated with HOMA-IR ($r = 0.343$, $p < 0.05$), and TRAP/uric acid was negatively correlated with BMI, WC, and insulin levels ($r = -0.33$, -0.344 , -0.366 , $p < 0.05$), respectively.

Discussion

The main finding of this study was that women with MetSHD presented higher levels of fasting glucose, HOMA-IR, triglycerides, and biomarkers of oxidative stress than did women without hypovitaminosis D. In addition, it seems that hypovitaminosis D is a determinant factor for cardiovascular risk and oxidative stress, once all women presenting MetS were assessed.

Our results are in agreement with previous research's involving hypovitaminosis D and disturbances in metabolism and oxidative stress markers, which showed that serum vitamin D levels seem to be inversely correlated with measures of obesity, BMI, fat mass and waist circumference. It suggests that lower levels of vitamin D in obese subjects could be due greater sequestration by adipose tissue, reducing available circulation^{4,27-34}.

There is an inverse correlation between serum 25(OH)D levels and cardiovascular disease, MetS and their complications such as glucose intolerance, obesity, hypertension, insulin resistance, ischaemic heart disease, and stroke^{35,36}. Schmitt et al.³⁷ showed that women with vitamin D deficiency had a higher risk of developing MetS, hypertriglyceridemia and low HDL levels than did women with adequate levels of

vitamin D. Women with hypovitaminosis D also presented higher levels of total cholesterol, triglycerides, insulin and HOMA-IR than those with adequate vitamin D.

In this study, women with MetSHD presented higher levels of fasting glucose and HOMA-IR, and these results agree with previous studies^{37,38}. The most plausible explanation is that vitamin D influences insulin secretion and sensitivity, which plays a major role in MetS.

The vitamin D receptor is expressed in insulin-secreting pancreatic beta cells and in peripheral target tissues such as skeletal muscles and adipose tissue. Vitamin D can compromise the capacity of beta cells to convert pro-insulin into insulin^{41,42}. Vitamin D indirectly affects insulin sensitivity in skeletal muscles and adipose tissue by regulating the levels of extracellular calcium, which is essential for insulin-mediated intracellular processes⁴¹.

A study showed that vitamin D stimulated the expression of insulin receptors, and low vitamin D levels were associated with beta-cell dysfunction. Vitamin D deficiency was independently associated with insulin resistance and beta-cell function in patients at risk for diabetes⁴³⁻⁴⁶. Individuals with lower levels of vitamin D presented a higher incidence of type 2 diabetes due to insulin secretion and sensibility. *In vitro*, studies showed that 1,25(OH)-vitamin could stimulate insulin secretion directly by enhancing calcium levels due to adequate vitamin D levels^{44,47}.

Vitamin D also has an immunomodulation effect than can protect against type 1 diabetes⁴⁸. In addition, a study supported a direct correlation between vitamin D and insulin resistance⁴⁴. The relationship between D hypovitaminosis and hypertension is clear, and the mechanism of this association is due to the interaction of vitamin D with the renin-angiotensin-aldosterone system, the immune inflammation in MetS and the effects of vitamin D in the vascular endothelium and smooth muscle⁴⁹.

Diabetes is not only about the body's inability to handle glucose properly but is also an inflammatory disease. Because vitamin D has anti-inflammatory effects, it is not surprising that it has beneficial effects on improving islet cell functions and insulin release, and on decreasing insulin resistance^{38,50-55}.

Our results showed that women with MetSHD presented higher triglycerides levels. The relationship between vitamin D deficiency and dyslipidaemia may be due, in part, to vitamin D's effects on hepatic lipid metabolism. Vitamin D promotes intestinal calcium absorption, and calcium may bind to fatty acids to form insoluble complexes that inhibit lipid absorption. Thus, vitamin D deficiency may lead to abnormal processing of lipids

due to calcium availability⁵⁶. Linear regression analysis demonstrated a significant inverse association between vitamin D and LDL, and TG. In addition, vitamin D was independently associated with greater odds of hyperlipidaemia⁴³. Schmitt et al.³⁷ found that women with vitamin D deficiency had a higher risk of hypertriglyceridemia and low HDL. Other review also showed that subjects with high serum levels of vitamin D had a more favourable lipid profile than those with vitamin D deficiency⁵⁷. A longitudinal study demonstrated that an increase in serum 25(OH)D levels was associated with a significant reduction of triglycerides levels and that the mechanism underlying the inverse association is a reduction in the intestinal absorption and synthesis of lipid, as well as a decrease in lipolysis with increasing vitamin D concentrations^{34,58}.

Gene expression related with inflammatory cytokines⁵⁹. The inflammatory process seems to be responsible for oxidative stress generation and may induce. On the other hand, vitamin D has a potent immunoregulatory action, such as inhibiting the production of interleukin-6, interleukin-8, interferon- γ by peripheral blood mononuclear cells in autoimmune diseases⁶⁰. Reported results support the concept that increased oxidative stress may play an important role in MetS^{62,63}.

In our study, women with MetS and hypovitaminoses D presented higher levels of AOPP. In addition, a significantly and positive correlation between AOPP and triglycerides, fasting glucose, insulin and HOMA-IR values was found. We also showed a negative correlation between AOPP and HDL. These results agree with previous studies. Korkmaz et al.²⁷, showed that AOPP values are higher in MetS patient's group when compared with a control group and found a positive correlation between AOPP levels and glucose, triglycerides, insulin levels, and HOMA-IR values. Cakatay⁶⁴ reported that patients with type 2 diabetes exhibit elevated protein oxidation, indicated by elevated plasma protein carbonyl and AOPP levels, this may be correlated with glycaemia and glycaemic control. Another study presented a multiple regression analysis and revealed that AOPP levels are the most important independent determinants of the MetS. This finding confirms that high AOPP levels are indicative of an increase in oxidative stress and can cause direct oxidative damage in proteins in MetS patients^{64,65,66}. In our group of study demonstrated a positive correlation between AOPPs and waist circumference ($p < 0.01$), fasting glucose ($p < 0.05$), homeostasis model assessment insulin resistance ($p < 0.001$), triacylglycerol ($p < 0.0001$), and uric acid ($p < 0.001$), whereas there was an inverse correlation with high-density lipoprotein cholesterol ($p < 0.001$)⁶⁶.

MetSHD group presented higher levels NO_x compared with those with MetSD. In addition, NO_x metabolites were positively associated with HOMA-IR in women with MetS and lower levels of vitamin D. The role of insulin resistance at the level of the endothelial cell in vascular pathophysiology is unclear. Several studies in humans and gene-modified mice have demonstrated a close association between insulin resistance and nitric oxide bioactivity⁶⁷. Endothelial dysfunction and vascular insulin resistance usually coexist, and chronic inflammation engenders both. Growing evidence from both clinical and animal studies has suggested that endothelial dysfunction and vascular insulin resistance coexist in obesity and diabetes and that they may play a causative role in the development of metabolic insulin resistance^{68,69,70,71,72}. Choi et al.⁷³, concluded that uric acid induced endothelial dysfunction by contributing to vascular insulin resistance in terms of insulin-induced NO production, potentially leading to the development of hypertension. Montagnani et al.⁷³ dissected the pathway by which insulin stimulates the NO release from endothelial tissue *in vitro*. In addition, Kuboki et al.⁷⁴ demonstrated that insulin regulates the eNOS transcription in the endothelium.

The MetSHD group showed a negative correlation between SH groups and TC and HDL. Several oxidative modifications of proteins may be introduced by ROS-RNS. The thiol (-SH) group of cysteine residues is a particularly sensitive target of oxidant species, forming sulfenic acid, mixed disulfide, S-glutathiolated derivatives, as well as sulfonic and sulfonic acid⁷⁵. Cysteine-bound thiol may also be nitrosylated through the addition of a NO group. Such S-nitrosylation is a reversible modification playing essential roles in modulating the function of a great number of cellular proteins^{76,77}. Tyrosine residues may be affected by peroxynitrite-mediated nitration, that is, the addition of an NO₂ group to the phenolic ring of tyrosine⁷⁸. Oxidized proteins may be subject to accelerated degradation and loss of function, with potentially significant cytotoxic consequences⁷⁸.

Oxidized proteins may be subject to accelerated degradation and loss of function, with potentially significant cytotoxic consequences⁷⁹. A study showed suggest AOPP as the most appropriate parameter for determination of oxidative stress by the action of the chloraminated oxidants, mainly by the action of chloramines, produced by myeloperoxidase un activated neutrophils. They also determined that group with more MetS components (with 5 components) presented higher AOPP an lower TRAP when compared with another group of MetS with less components (4 components)⁸⁰. Taken

together, MetSHD group presented higher AOPP levels when compared with MetSD group, which are in agreement with previous results.

Studies have found decreases in individual antioxidants, such carotenoids, vitamin C, and vitamin E, as well as TRAP in MetS subjects^{81,82}. A study showed lower TRAP concentration compared with control group⁸². Although no difference was found between TRAP concentrations in MetSHD and MetSD groups, MetSHD group showed a negative correlation between TRAP/ uric acid and BMI, AC, and insulin.

Our research group showed that hypertriglycerolemia, hyperglycemia, hypertension, and lower HDL-cholesterol values are important factors in increasing oxidative stress, which leads to increase production of superoxide anion via the nicotinamide adenosine phosphate oxidase pathway. This anion reacts rapidly with NO to form peroxynitrite, thus inactivating NO and leading to endothelial dysfunction. Thus, the individuals with MetSHD of our study showed a similar metabolic profile of the previous cited study, and also increased levels oxidative markers such AOPP, NOx, and a tendency to increased antioxidant defense evaluated by PON activity⁸².

Conclusions

In conclusion, the present study showed that hypovitaminoses D in Brazilian women with MetS is associated with elevated levels of fasting glucose, HOMA-IR, triglycerides, and biomarkers of oxidative stress compared with women with MetSD. These are important factors for cardiovascular risk. Other studies should be conducted for a better understanding of these correlations.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Authorship

The authors' responsibilities were as follows: M.C.S. and A.M.O. collected the data, designed the study, interpreted the results, and wrote the manuscript. D.V. performed the statistical analysis. R.D.B.M., F.K.G., A.C.F.M., A.K.M., and B.S.A. performed the

oxidative stress parameters. D.V. and D.S.B. developed the hypothesis tested in the study, designed the study, interpreted the results, and wrote the manuscript.

References

1Miñambres I, Sánchez-Herández J, Sánchez-Quesada JL, et al., (2012). The association of hypovitaminosis D with the metabolic syndrome is independently of the degree of obesity. *ISRN Endocrinol.*, 691803.

2Ding C, Gao D, Wilding J, et al. (2012). Vitamin D signaling in adipose tissue. *Br J Nutr.* **108**, 1915-23.

3Maki KC, Fulgoni VL, Keast DR, et al. (2012). Vitamin D intake and status are associated with lower prevalence of metabolic syndrome in U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Surveys 2003–2006, *Metab. Syndr. Relat. Dis.* **10**, 363–372.

4Cheng S, Massaro JN.; Fox, C.S, et al. (2010). Adiposity, cardiometabolic risk, an vitamin D status: The Framingham Heart Study. *Diabetes*, **59**, 242-8.

5Mottillo S, Filion KB, Genest J, et al. (2010). The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **56**, 1113–1132.

6Nahas EAP, Padoani NP, Nahas-Neto J, et al., (2009). Metabolic syndrome and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. *Climacteric* **12**, 431–438.

7Gurka, M.J.; Vishnu, A.; Santen, R.J, et al. (2016). Progression of metabolic syndrome severity during the menopausal transition, *J. Am. Heart Assoc.* **5**, e003609

8Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. (2008). Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*, **117**, 503-11.

9Khan H, Hunutsor S, Franco OH (2013). Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic diseases: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc*, **72**, 89-97.

10Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, et al. (2007). Relationship between adipocytes size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 1023-1033.

11Klötting N, Blüher M. (2014). Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* **15**, 277-87.

11Klötting N, Blüher M. (2014). Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* **15**, 277-87.

12Cotillard A, Poitou C, Torcivia A, et al. (2014). Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab.* **99**, E1466-70.

- 13Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, et al. (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*. **33**, 498–507.
- 14Mackness B, Durrington PN, Mackness MI, (1998). Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, **31**, 329–36.
- 15Rosenblat M, Karry R, Aviram M, (2006). Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis*, **187**, 74–81.
- 16Grundey SM, Cleeman JJ, Daniels SR et al. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**, 2735–52.
- 17Haffner SM. (20013). Insulin resistance, inflammation and the prediabetic state. *Am J Cardiol* **92**, 18J–26J.
- 18Gonzalez-Flecha BG, Llesuy S, Boveris A (1991). Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* **10**, 93-100.
- 19Reznick Az, Paccker L, (1994). Oxidative damage to protein: spectrophometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. **233**, 357-363.
- 20Panis C, Mazzuco T, Costa CZF, et al. (2011). Trypanosoma cruzi: Effects of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol* **127**, 58-65.
- 21Hu ML. (1994). Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN and Simon MI. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 380-382.
- 22Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE, (2008). Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates *Circ. Cardiovasc. Genet* **1**, 147-152)
- 23Repetto M, Reides C, Carretero MLG, et al. (1996). Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta*, **255**, 107-117.
- 24Gorter PM, Olijhoek JK, Van Der Graaf Y, et al. (2004). Prevalence of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* **173**, 363–369.
- 25Trevisan M, Liu J, Bahsas Fb, et al. (1998). Syndrome X and mortality: a population-based study. Risk Factor and Life Expectancy Research Group. *Am J Epidemiol* **148**, 958–966.

26Ford ES, Giles WH, Dietz WH (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Med Assoc* **287**, 356–359.

27Korkmaz GG, Altinoglu E, et al. (2013). The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metab*, **62**, 828-835.

28Wortsman, J, Matsuoka, Ly, Chen, Tc, et al. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* **72**, 690–693.

29Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, et al. (2004) The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 1196–1199

30Snijder MB, Van Dam RM, Visser M, et al. (2005) Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 4119–4123.

31Botella-Carretero, JI, Alvarez-Blasco F, Villafruela JJ, et al. (2007). Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr* **26**, 573–580.

32Ford ES, Ajani Ua, Mcguire LC, et al. (2005) Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* **28**, 1228–1230.

33Konradsen S, Ag H, Lindberg F, et al. (2008) Serum 1,25-dihydroxy vitamin D is inversely associated with body mass index. *Eur J Nutr* **47**, 87–91.

34Jorde R, Grimnes G, (2011). Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog. Lipid Res.* **50**, 303–312.

35Ford ES, Zhao G, Tsai J, (2011). Associations between concentrations of vitamin D and concentrations of insulin, glucose, and HbA1c among adolescents in the United States, *Diab. Care* **34**, 646–648.

36Majumdar V, Nagaraja, D, Christopher R, (2011). Vitamin D status and metabolic syndrome in Asian Indians. *Int. J. Obes. (Lond.)* **35**, 1131–1134.

37Schmitt EB, Nahas-Neto J, Bueloni-Dias F, et al. (2018). Vitamin D deficiency is associated with metabolic syndrome in postmenopausal women. *Maturitas*, **107**, 97-102.

38. Wimalawansa, S.J. (2018). Associations of vitamin D with insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **175**, 177-189

39Ju SY, Jeong HS, Kim H, (2014). Blood vitamin D status and metabolic syndrome in the general adult population: a dose-response meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1053–1063.

40Vitezova A, Zillikens AC, Van Herpt TW, *et al.* (2015). Vitamin D status and metabolic syndrome in the elderly: the Rotterdam Study. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, 327–335.

41Oh JY, Barrett-Connor E, (2002). Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: The Rancho Bernardo Study, *Metabol. Clin. Exp.* **51**, 356–359.

42Bland R, Markovic D, Hills CE, *et al.* (2004). Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90, 121–125.

43Baker F, Mehta NN, Baker DG, *et al.* (2012). Vitamin D, Metabolic Dyslipidemia, and Metabolic Syndrome in Rheumatoid Arthritis. *Am J Med*, **125**, 1036e9-1-36e15.

44Pittas AG, Lau J, Hu FB, (2007). The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 2017–29.

45Chiu KC, Chu A, GO VL, *et al.* (2004). Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* **79**(5):820-825.

46Kayaniyil S, Vieth R, Retnakaran R, *et al.* (2010). Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes Care* **33**, 1379-1381.

47Mathieu C, Gisemans C, Giulietti A, *et al.* (2005). Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*, **48**, 1247-57.

48Hyppönen, E, (2010). Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes evidence for an association? *Diabetes Obes Metab*, **33**,1379-81.

49Wang, L.; Song, Y.; Manson, J.E.; *et al.* (2012). Circulating 25-hydroxy-vitamin d and risk cardiovascular disease: A meta-analysis of prospectives studies. *Circ Cardiovasc Disease*, **5**, 819-829.

50Moyad MA, (2003). The potential benefits of dietary and/or supplemental calcium and vitamin D. *Urol. Oncol.* **21**, 384–391.

51Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes, *Trends Immunol.* **25**, 4–7.

52Sung CC, Liao MT, Lu KC, *et al.* (2012). Role of vitamin D in insulin resistance, *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 634195.

53Pilz S, Kienreich K, Rutters F, *et al.* (2013). Role of vitamin D in the development of insulin resistance and type 2 diabetes, *Curr. Diab. Rep.* **13**, 261–270.

54Krishnan AV, Feldman D, (2011). Mechanisms of the anti-cancer and antiinflammatory actions of vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51**, 311–336.

55Chagas CE, Borges MC, Martini LA *et al.* (2012). Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients* **4** (1) 52–67.

56Vaskonen T, Mervaala E, Sumuvuori V, *et al.* (2002). Effects of calcium and plant sterols on serum lipids in obese Zucker rats on a low-fat diet. *Br J Nutr.* **87**, 239-245.

57Challoumas, D. (2014). Vitamin D supplementation and lipid profile: what does the best available evidence show? *Atherosclerosis*, **235**, 130–139.

58Jorde R, Sneve M Emaus N, *et al.* (2010). Cross-sectional and longitudinal relation between serum 25-hydroxyvitamin D and body mass index: the Tromso study. *Eur J Nutr* **49**, 401–407.

59Ridker PM, Buring JE, Cook NR *et al.*, (2003). C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events. An 8-year follow-up of 14 719 initially healthy american women. *Circulation* **107**, 391–7.

60Inoue M, Matsui T, Nishibu A, *et al.* (1998). Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ on inflammatory responses in psoriasis. *Eur J Dermatol* **8**, 16–20

61Ceriello A, Motz E. (2004) Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24** (5), 816–823.

62Roberts CK, Sindhu, S. (2009) Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences* **84**, 705–712

63Cakatay U. (2005). Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* **31**:551–7

64Meaney E, Vela A, Samaniego V, *et al.* (2008). Metformin, arterial function, intima-media thickness and nitrooxidation in metabolic syndrome: the Mefisto study. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **35**, 895–903.

65Sebeková K, Boor P, Valachovicová M, *et al.* (2006). Association of metabolic syndrome risk factors with selected markers of oxidative status and microinflammation in healthy omnivores and vegetarians. *Mol Nutr Food Res* **50**: 858–68.

66Venturini D, Simão ANC, Dichi I, (2015). Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation. *Nutrition research* **35**, 759 – 765.

67Kearney MT, Duncan ER, Kahn M, *et al.* (2008). Insulin resistance and endothelial cell dysfunction: studies in mammalian models. *Exp Physiol.* **93**, 58-63.

68Jonk AM, Houben AJ, De Jongh RT, *et al.* (2007). Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology*, **22**, 252–260.

69Kim F, Pham M, Maloney E, et al. (2008). Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1982–1988.

70Caballero AE, Bousquet-Santos K, Robles-Osorio L, et al. (2008). Overweight Latino children and adolescents have marked endothelial dysfunction and subclinical vascular inflammation in association with excess body fat and insulin resistance. *Diabetes Care*, **31**:576–582. doi: 10.2337/dc07-1540.

71Muris DM, Houben AJ, Schram MT, et al. (2013). Microvascular dysfunction: an emerging pathway in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 29–38.

72.Choi, Y.J.; Yoon, Y.; Hien, T.T.; et al. (2014) Uric acid induces endothelial dysfunction by vascular insulin resistance associated with the impairment of nitric oxide synthesis. *FASEB J.* 28(7):3197-204

73Montagnani M, Ravichandran Lv, Chen H, et al. (2002). Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol* **16**, 1931–1942.

74Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* **101**, 676–681.

75Shao D, Oka S, Brady CD, et al. (2012). Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 550–558.

76Murray CI, Van Eyk J.E. (2012). Chasing cysteine oxidative modifications: proteomic tools for characterizing cysteine redox status. *Circulation. Cardiovasc. Genet.* **5**, o1–o10.

77Haldar, SM, Stamler JS, (2013). S-nitrosylation: integrator of cardiovascular performance and oxygen delivery. *J. Clin. Invest.* **123**, 101–110.

78Castro L, Demicheli V, Tortora, V, et al. (2011). Mitochondrial protein tyrosine nitration. *Free Radic. Res.* **45**, 37–52.

79Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., et al. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* **9**, 169–176.

80Venturini, D.; Rampazzo, C.H.; De Souza, S.A.F.; Barbosa, D.S. Increased oxidative stress according to number of risk factors in metabolic syndrome patients. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 7(1)A134, 2015.

81Piwowar A.; Knapik-Kordecka, M.; Warmas, M. (2007) AOPP and its relation with selected markers of oxidative/ antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.*, 77(2):188-92.

82Venturini, D.; Simão, A.N.C.; Sripes, N.; Bahls, L.D.; Nelo, A.S.; Belinetti, F.M.; Lozovoy, M.A.B.; Dichi, I. (2012). Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity*, 20(12).

Table 1. Clinical, anthropometric and metabolic parameters in women with metabolic syndrome with or without D hypovitaminosis.

	MetSHD (n=63)	MetSD (n=25)	p value
Age (years)	50.61 ± 7.65	53.7 ± 4.35	0.85
BMI (Kg/m ²)	33.5 (25.3-61.0)	30.6 (24.0-39.0)	0.06
WC (cm)	95.0 (81.0-140.0)	95.0 (67.0-115.0)	0.93
AC (cm)	103.5 (89.0-170.0)	96.2 (90.0-127.0)	0.51
SBP (mmHg)	130 (110-190)	125 (110-145)	0.61
DBP (mmHg)	85 (78-120)	85 (70-100)	0.94
Fasting glucose (mg/dL)	113 (84-389)	99 (91-150)	0.03
Insulin (mU/mL)	13.9 (3.4-35.6)	10.6 (4.8-28.8)	0.07
HOMA-IR	3.49 (1.4-25.3)	2.6 (1.1-7.9)	0.04
TC (mg/dL)	200.0 (130.0-301.0)	181.0 (138.0-298.0)	0.07
HDL (mg/dL)	42.0 (23.0-80.0)	49.0 (28.0-73.0)	0.31
LDL (mg/dL)	130.0 (57.0-229.0)	107.9 (76.2-228)	0.21
TG (mg/dL)	130.0 (47.0-298.0)	108.0 (54.0-296.0)	0.04
Uric acid (mg/dL)	4.4 (2.7-8.1)	4.6 (3.0-6.9)	0.42
CT/ HDL	4.7 (2.2-8.6)	3.5 (2.4-8.5)	0.03
LDL/HDL	2.8 (1.0-5.8)	2.1 (1.2-6.5)	0.04
Non-HDL (mg/dL)	153.5 (73.0-254.0)	129.5 (93.0-263.0)	0.04
CT/TG	1.4 (0.6-4.4)	1.6 (0.7-3.0)	0.14
LDL/TG	0.8 (0.2-3.3)	1.0 (0.4-2.0)	0.12
Vitamin D (ng/mL)	20.2 (8.1-29.5)	32.5 (30.0-45.8)	< 0.0001

MetSHD: metabolic syndrome with hypovitaminosis D (Vitamin D < 30 ng/mL); MetSD: metabolic syndrome with sufficient vitamin D (D Vitamin ≥ 30 ng/mL); BMI: Body mass index, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure; WC: waist circumference, AC: abdominal circumference, TC: Total cholesterol, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, TG: Triglycerides, HOMA-IR: Insulin Resistance Homeostasis Model Assesment.

The results were expressed as median, interquartile range (25%-75%). Differences were assessed by Mann Whitney test (p<0.05).

Table 2. Oxidative stress parameters in women with metabolic syndrome with or without D hypovitaminosis.

	MetSHD (n=63)	MetSD (n=25)	p value
SH (uM/mg of protein)	304.3 (192.9-488.5)	413.0 (199.0-471.5)	0.38
AOPP (uMol/ L of chloramine-T-equivalent)	84.9 (39.9-206.2)	67.5 (39.2-241.75)	0.03
NOx (uM)	7.02 (3.7-16.7)	5.0 (3.1-20.5)	0.04
CL-LOOH (cpm)	930265 (103887-3363230)	1142567 (409383-4730787)	0.12
TRAP/Uric acid	220.4 (121.4-406.8)	221.1 (145.7-332.7)	0.84
AOPP/TRAP	0.34 (0.1-1.3)	0.3 (0.2-1.3)	0.72
PON (mMol/Lcm-1)	428.1 (133.8-744.7)	289.3 (160.6-583.2)	0.06

MetSHD: metabolic syndrome with hypovitaminosis D (Vitamin D < 30 ng/mL); MetSD: metabolic syndrome with sufficient vitamin D (D Vitamin ≥ 30 ng/mL); SH: sulphhydryl group; AOPP: Advanced oxidation products protein, NOx: nitric oxide products; CL-LOOH: terc-butyl hydroperoxide-9-initiated chemiluminescence, TRAP: total radical trapping antioxidant parameter, PON: paraoxonase, The results were expressed as median, interquartile range (25% -75%). Differences were assessed by Mann Whitney test (p<0.05).

Table 3. Correlation between anthropometric and metabolic with oxidative stress parameters in women with hypovitaminosis D.

	SH (uM/mg of protein)	AOPP (uMol/ L of chloramine- T- equivalent)	NOx (uM)	PON (mMol/Lcm-L)	CL- LOOH (cpm)	TRAP/Uric acid
BMI (Kg/m ²)	0.04	0.11	0.21	-0.168	0.09	-0.33*
AC (cm)	0.02	0.21	0.15	-0.146	0.18	-0.344*
SBP (mmHg)	-0.186	0.163	0.27	-0.315	0.133	0.119
DBP (mmHg)	-0.03	0.144	0.04	-0.139	-0.02	-0.129
Fasting glucose (mg/dL)	-0.09	0.32	0.315	0.04	0.09	0.09
TC (mg/dL)	-0.359*	0.218	0.06	0.203	0.146	0.24
HDL (mg/dL)	-0.07	-0.365*	-0.282	0.13	-0.06	-0.002
LDL (mg/dL)	-0.347*	0.122	0.11	0.122	0.101	0.263
TG (mg/dL)	0.103	0.655^{**}	0.009	-0.013	0.006	-0.203
Insulin (mU/mL)	0.07	0.501**	0.217	0.228	-0.026	-0.366*
HOMA-IR	-0.016	0.541**	0.343*	0.213	0.04	-0.099
D vitamin (ng/mL)	0.023	0.009	-0.04	0.019	-0.09	-0.124

SH: sulphhydryl group; AOPP: Advanced oxidation products protein, NOx: nitric oxide products; CL-LOOH: terc-butyl hydroperoxide-9-initiated chemiluminescence, TRAP: total radical trapping antioxidant parameter, PON: paraoxonase; BMI: Body mass index, AC: abdominal circumference, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, TC: Total cholesterol, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, TG: Triglycerides, HOMA-IR: Insulin Resistance Homeostasis Model Assessment. Spearman Correlation, *p<0.05; **p<0.001; ^{***}p<0.0001.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho obteve as seguintes conclusões:

- O grupo MetSHD apresentou elevados níveis de TC e TG quando comparados a mulheres com SM sem hipovitaminose D (grupo MetSD);
- O grupo MetSHD apresentou elevados níveis glicose quando comparados ao grupo MetSD e maior resistência à insulina determinado pelo HOMA-IR;
- Não foram encontradas diferenças na capacidade antioxidante determinada pelo TRAP entre os grupos;
- O grupo MetSHD apresentou níveis estatisticamente elevados oxidação de proteínas identificados pela AOPP quando comparados ao grupo MetSD;
- O grupo MetSHD apresentou maiores níveis de NO quando comparado ao grupo MetSD;
- O grupo MetSHD apresentou correlação negativa entre grupo SH e TC, e HDL; e também apresentaram correlação negativa entre TRAP/ ácido úrico e BMI, AC, insulina.
- O grupo MetSHD apresentou uma tendência a elevação na sua atividade quando comparado ao grupo MetSD;
- O grupo MetSHD apresentou correlação positiva entre AOPP e HDL, TG, insulina e HOMA-IR; e apresentaram correlação positiva entre NOx e HOMA-IR;

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo foi capaz de evidenciar que em um grupo de mulheres brasileiras com SM, as que apresentavam níveis baixos de vitamina D apresentam risco cardiovascular superior às com níveis adequados de vitamina D, sendo, portanto, um parâmetro de risco adicional nessa doença.

Novos estudos de intervenção de vitamina D deverão ser conduzidos na tentativa de normalizar os níveis dessa vitamina e minimizar o risco nessa população.

7. REFERENCIAS

ABDILLA, N.; TORMO, M.C.; FABIA, M.J.; CHAVES, F.J.; SAEZ, G.; REDON, J. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Human Hypert*, 21:68-75, 2007.

AL-DAGHRI, N.M.; ALKHARFY, K.M.; AL-SALEH, Y.; et al. Modest reversal of metabolic syndrome manifestations with vitamin D status correction: a 12-months prospective study. *Metabolism*, 2011.

BAKER, J.F.; MEHTA, N.N.; BAKER, D.G.; TOEDTER, G.; SHULTS, J.; VON FELDT, J.M.; LEONARD, M.B. Vitamin D, metabolic dyslipidemia, and metabolic syndrome in Rheumatoid Arthritis. *The American Journal of Medicine*, 125:10, 1036e10-15, 2012.

BILLAUEDEL, B.J.; BOURLON, P.M.; SUTTER, B.C.; et al. Regulatory effects of 1,25-dihydroxivitamin D3 on insulin release and calcium handling via the phospholipid pathway in islets from vitamin D-deficient rat. *Journal of Endocrinology Investigation*, 18, 673-682, 1995.

BIKLE, d. Nonclassic actions of vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.94, n.1, p.26-34, 2009.

BLUM, M.; DOLNIKOWSKI, G.; SEYOUM, E.; et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*, 33, 90-94, 2008.

BRASIL. IBGE. *Brazilian Institute of Geography and Statistics. (2011) Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe*. Available in: http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed in July 16, 2013.

BULENT, D.; ESRA, D.; GONUL, A.; et al. The association between the epicardial adipose tissue thickness and oxidative stress parameters in isolated metabolic syndrome patients: a multimarker approach. *International Journal of Endocrinology*, 2014:9540-45, 2014

CADE, C.; NORMAN, A.W. Rapid normalization/ stimulation by 1,25-dihydroxivitamin D3 of insulin secretion and glucose tolerance in the vitamin D deficiency rat. *Endocrinology*, 120, 1490-1497, 1987.

CAKATAY U. (2005). Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* 31:551-7

CAKATAY, U.; KAYALI, R.; UZUN, H. Relation of plasma protein oxidation parameters and paraoxonase activity in the ageing population. *Clin Exp Med*, 84:705-712, 2009.

CHAMPLAIM, J., WU, R., GIROUARD, H., KARACHI, H., MIDAOURI, A.E., LAPLANTE, M.A., et al. Oxidativo stress in hipertensivos. *Clín Exp Hypertens.*, 26(7&8),593-601, 2004).

CHEN, S.J.; YEN, C.H.; HUANG, Y.C.; LEE, B.J.; HSIA, S.; LIN, P.T. Relationship between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome. *PLoS One*, 7(9)e45693. 2012.

CHIU, K.C.; CHU, A.; GO, V.L.; SAAD, M.F. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr*, 79(5):820-825, 2004.

CINTI, S.; MITCHEL, G.; BARBATELLI, G.; et al., Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue: key players of obese mice and humans, *J Lipid Res*, 46, 2347-2355.

DANIK, J.S.; MANSON, J.E. Vitamin D and Cardiovascular disease. *Current treatment Options in Cardiovascular medicine*, 14:414-424, 2012.

DESROCHES, S.; LAMARCHE, B. The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32(1):23-32, 2007.

DEVARAJ, S.; GOYAL, R.; JIALAL, I. Inflammation, oxidative stress, and the metabolic syndrome. *US Endocrinology*, 32-7, 2008.

DEVARAJ S, JIALAL I. α -Tocopherol decreases interleukin-1 β release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*,19:1125–1133, 1999.

DING, C.; GAO, D.; WILDING, J.; THAYHURN, P.; BING, C. Vitamin D signaling in adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 108, 1915-1923, 2012.

ECKEL, R.H., ALBERTI, K.G.M.M., GRUNDY, S.M., ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. *Lancet.*, 375:181–183, 1999.

EREN E, ABUHANDAN M, SOLMAZ A, TAŞKIN A. Serum paraoxonase/arylesterase activity and oxidative stress status in children with metabolic syndrome. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2014;6:163-168.

FEOLI, A.M.; MACAGNAN, F.E.; PIOVESAN, C.H.; BODANESE, L.C.; SIQUEIRA, I.R. Xanthine oxidase activity is associated with risk factors for cardiovascular disease and inflammatory and oxidative status markers in metabolic syndrome: effects of a single exercise session. *Oxid Med Cell Longev*, 5870-83, 2014.

FÉRNANDEZ-BERGÉS, D.; CONSUEGRA-SÁNCHEZ, L.; CABRERA DE LEÓN, A.; VILA, J.; FÉLIX-REDONDO, F.J.; SEGURA-FRAGOSO, A.; LAPETRA, J.; GUEMBE, M.J. VEJA, T.; DÍAZ, O.; MARRUGAT, J. Metabolic and inflammatory profiles of biomarkers in obesity, metabolic syndrome, and diabetes in a Mediterranean population. *DARIOS Inflammatory study. Red Esp Cardiol (Engl Ed)*, 67(8):624-31, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; CORREA, C.R.; FREIRE, C.M.M.; MOREIRA, P.L.; BERCHIERI-RONCHI, C.B.B.; REIS, R.A.S.; NOGUEIRA, CR.N. Síndrome

metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. *Rev Bras Clin Med. São Paulo*, 9(1):54-61, 2011.

FONTANA, L.; EAGON, J.C.; TRUJILLO, M.E.; et al. Visceral adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*, 56, 1010-1033, 2007.

GARCIA-BAILO, B.; EL-SOHEMY, A.; HADDAD, P.S., ARORA, P.; BENZAIED, F.; KARMALI, M.; BADAWI, A. Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics: Targets & Therapy*, 5 7–19, 2011.

GARIN MC, KALIX B, MORABIA A, JAMES RW. Small, dense lipoprotein particles and reduced paraoxonase-1 in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, 90:2264-2269, 2005.

GODALA, M.; MATEREK-KUŚMIERKIEWICZ, I.; MOCZULSKI, D.; SZATKO, F.; GASZYŃSKA, E.; TOKARSKI, S.; KOWALSKI, J. Should antioxidant vitamin supplementation be applied in patients with metabolic syndrome? A case-control study. *Menopause Rev.*, 15(1): 32-38, 2016.

GONZALEZ-FLECHA, B.G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 10: 93-100, 1991.

GOLDNER, W.S.; STONER, J.A.; THOMPSON, J.; et al. Prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency in morbidly obese patients: a comparison with non-obese controls. *Obes Surg*, 18, 145-150, 2008.

GRAHAM, E.J., ADVERTIU, F.R. Long-term modelos of oxidativo stress and mitochondrial damage in insulin resistance progression. *J Theor Biol*, 340(7):238-50, 2014

GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; MERZ, C.N.; et al., Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Journal of American College of Cardiology*, 44(3):720-32, 2004.

GUEVARA I, IWANEJKO J, DEMBINSKA-KIÉC et al: Determination of nitrito/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*, 274:177-188, 1998.

HAFFNER SM. Insulin resistance, inflammation and the prediabetic state. *Am J Cardiol.*, 92:18-26J, 2003.

HAFFNER, S.M.; MIETTINEN, H.; STERN, M.P. The homeostasis model in San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*, v.20, p. 1087-1092, 1997.

HAN SN, ADOLFSSON O, LEE CK, PROLLA TA, ORDOVAS J, MEYDANI SN. Vitamin E and gene expression in immune cells. *Ann N Y Acad Sci.*, 1031:96–101, 2004.

HARRIS SS, SOTERIADES E, COOLIDGE JA, MUDGAL S, DAWSON-HUGHES B. Vitamin D insufficiency and hyperparathyroidism in a low income, multiracial, elderly population. *J Clin Endocrinol Metab.*, 85:4125-4130, 2000.

HOECK AD, PALL ML. Will vitamin D supplementation ameliorate diseases characterized by chronic inflammation and fatigue? *Medical Hypotheses*, 76:208–213, 2011.

HOPPS, E.; CAIMI, G. Protein oxidation in metabolic syndrome. *Clin Invest Med*, Feb 1;36(1):E1-8, 2013.

HU, ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI (eds) *Methods in Enzymology*. California: Academic Press. p. 380-82, 1994.

HYBERTSON BM, GAO B, BOSE SK, MCCORD JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med*.32(6):234-46, 2011.

ISOGAWA, A.; YAMAKADO. M.; YANO, M.; SHIBA, T. Serum superoxide dismutase activity correlates with the components of metabolic syndrome or carotid artery intima-media thickness. *Diabetes Res Clin Pract*, 86(3):213-8, 2009.

JOHNSON, L.W.; WEINSTOCK, R.S. The metabolic syndrome: concepts and controversy. *Mayo Clinic Proc*, 81 (12):1615-20, 2006.

KAYANIYIL, S.; VIETH, R.; RETNAKARAN, R.; et al. Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 33(6)1379-1381, 2010.

KHAN, H.; KUNUTSOR, S.; FRANCO, O.H.; CHOWDHURY, R. Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcome: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1-9, 2012.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, vol 30, no 6, pp 620–650, 2002.

KOREN R, RAVID A. Vitamin D and the cellular response to oxidative stress. In: Feldman D, editor. *Vitamin D*, Amsterdam: Elsevier Academic Press, Inc; 2005. p. 761-770.

KORKMAZ, G.G.; ALTINOGLU, E.; CIVELEK, S.; SOZER, V.; EERDENE, F.; TABAK, O.; UZUN, H. The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in metabolic syndrome. *Metabolism*, 829-35, 2013.

KOTANI, K.; TANIGUCHI, N. The association between reactive oxidative metabolites and metabolic syndrome in asymptomatic Japanese men. *J Clin Med Res*, 3(5)247-51, 2010.

LEE JH, O'KEEFE JH, BELL D, HENSRUD DD, HOLICK MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? J Am Coll Cardiol 2008;52:1949-1956.

LOLMEDE, K.; DUFFAUT, C.; ZACAROFF-GIRARD, A.; et al. Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. Diabetes Metabolism, 37, 283-290, 2011.

LOOKER AC, DAWSON-HUGHES B, CALVO MS, GÜNTER EW, SAHYOUN NR. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal suppopulations from NHANES III. Bone 2002;30:771-777.

LTEIF, A.; MATHER, K. Insulin resistance, metabolic syndrome and vascular disease: update on mechanism linkages. Can J Cardiol, 20(Suppl B):66B-76B, 2004.

MAARSINGH H, ZAAGSMA J, MEURS H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. Br J Pharmacol. 2009;158(3):652-64.

MAEDA, S.S.; BORBA, V.Z.C.; CAMARGO, M.B.R.; SILVA, D.M.W.; BORGES, J.L.C.; BANDEIRA, F.; LAZARETTI-CASTRO, M. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. Arq Bras Endocrinol Metab., 58/5, 2014.

MARTIN-GALLÁN, P.; CARRASCOSA, A.; GUSSINIYÉ, M.; SOMINGUEZ, C.; Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. Free Radic Biol Med, 34, 1563-74, 2003.

MOHIT ROJEKAR, MUKUND MOGAREKAR, ARATI ADHE-ROJEKAR. Study of Oxidative Stress Marker Serum Paraoxonase in Metabolic Syndrome. Turk J Endocrinol Metab., ;20:83-87, 2016.

NOUROOZ-ZADEH J, TAJADDINI-SARMADI J, WOLFF S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. Analyt Biochem, v.220, p.403-409, 1994.

OHMORI K, EBIHARA S, KURIYAMA S, et al. The relationship between body mass index and plasma lipid peroxidation biomarker in an older, healthy Asian community. Ann Epidemiol,15:80-84, 2005.

PANIS, C.; MAZZUCO, T.; COSTA, C.Z.F. et al. *Trypanosoma cruzi*: Effects of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. Experimental Parasitology, 127: 58-65, 2011.

PINHO RA, ARAÚJO MC, GHISI GLM, BENETTI M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. Arq Bras Cardiol. 94(4):549-55, 2010.

PILLON NJ, CROZE ML, VELLA RE, SOULÈRE L, LAGARDE M, SOULAGE CO. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxy-2-nonenal (4- HNE) induces insulin

resistance in skeletal muscle through Both Carbonyl and Oxidative Stress. *Endocrinology*, 153(5):2099 -111, 2012.

PITTA, A.G.; LAU, J.; HU, F.B.; DAESON-HUGHES, B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 92(6):2017-2029, 2007.

POTENZA, M.A., ADDABBO, F., MONTAGNANI, M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(3):E568-77, 2009

RAJEKAR, M.; MOGAREKAR, M.; ADHE-EOJEKAR, A. Study of oxidative stress marker sérum paraoxonase in metabolic syndrome. *Turk J Endocrinol Metab*, 20:83-87, 2016.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 7:1595-1607, 1988.

REAVEN, G.M. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *American Journal of Clinical Nutrition*, 83:1237-47, 2006.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M.L.G. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta*, 255: 107-117, 1996.

REZNICK, A.Z.; PACCKER, L. Oxidative damage to protein: spectrophometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymology*, 233: 357-363, 1994.

RICHTER RJ, JARVIK GP, FURLONG CE, (2008). Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates *Circ. Cardiovasc. Genet* **1**, 147-152)

ROBERTS, C.K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Science*, 84(21-22):705-12, 2009.

SABEKOVÁ, K.; BOOR, P.; VLAKOVIKOVÁ, M.; PARRÁK, V.; BABINSKÁ, H.; et al. Association of metabolic syndrome risk factors with selected markers of oxidative status and microinflammation in healthy omnivores and vegetarians. *Mol Nutr Food Res*, 50, 858-68, 2006.

SCHENK, S.; SABERI, M., OLEFSKI, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clín Invest.*, 118(9):2992-3002, 2008.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 56, 1023-1033, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. I Diretriz Brasileiro de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 84 Supl I:1-28, 2005.

TAYLAN, E.; RESMI, H. The Analytical Performance of a Microplate Method for Total Sulphydryl Measurement in Biological Samples. *Turk. J. Biochem.* 35 (3), 275-278, 2010.

TELES, Y.C.F.; MONTEIRO, R.P.; OLIVEIRA, M.S.; RIBEIRO-FILHO, J. o PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA SINDROME METABÓLICA. *J. Health Sci Inst*, 33(1)89-93, 2015.

THOMAS SR, STOCKER R. Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.*, 28(12):1795–1805, 2000.

TNAGPRICHA V, PEARCE EN, CHEN TC, HOLICK MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med.*;112:659-662, 2002.

TOMELERI, C.M.; SOUZA, MARIANA F. ; BURINI, R. C. ; CAVAGLIERI, R. C. ; RIBEIRO, ALEX S. ; ANTUNES, M. ; NUNES, J. P. A. ; VENTURINI, DANIELLE ; BARBOSA, D.S. ; SARDINHA, LUÍS B ; CYRINO, E. S. . Resistance training reduces metabolic syndrome and inflammatory markers in older women: a randomized controlled trial. *Journal of Diabetes* , v. efirst, p. 1-28, 2018.

TRAYHURN, P.; BING, C.; WOOD, I.S. Adipose tissue and adipokines – energy regulation from the human perspective. *J Nutr*, 136, 1935S-1939S, 2006.

TRAYHURN, P; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and rhe pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, 92, 347-355, 2004.

UNGER, R.H.; CLARK, G.O.; SCHERER, P.E.; ORCI, L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801:209-214, 2010.

URAKAWA H, KATSUKI A, SUMIDA Y, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88:4673-4676, 2003.

VALDIVIELSO, J.M.; FERNANDEZ, E. Vitamin D polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta*, 371, 1-12, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30: 1323-1338, 2007.

VASKONEN, T.; MERVAALA, E.; SUMUVUORI, V.; et al. Effects of calcium and plant sterols on serum lipids in obese Zucker rats on a low-fat diet. *Br J Nutr*, 87:239-245, 2009.

VENTURINI, D.; SIMÃO, ANC; DICHI, I. Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation. *Nutrition Research*, 759-765, 2015.

VENTURINI, D., SIMÃO, A.N.; SCRIPES, N.A.; BAHLS, L.D.; MELO, P.A.; BELINETTI, F.M.; LOZOVY, M.A.; DICHI, I. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 20(12):2361-6, 2012.

YOUN, J.Y.; SIU, K.L.; LOB, H.E.; ITANI, H.; HARRISON, D.G.; CAI, H. role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome. *Diabetes*, 63(7)2344-55, 2014.

WASSINK AMJ, OLIJHOEK JK, VISSEREN FLJ. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest.*, 37(1):8-17, 2007.

WANNAMETHEE SG, LOWE GD, RUMLEY A, BRUCKDORFER KR, WHINCUP PH. Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes, and markers of inflammation and hemostasis. *Am J Clin Nutr.*, 83(3):567–574, 2006.

WHITE, J.H. Vitamin D signaling, infectious disease and regulation of innate immunity. *Infect Immun*, 76(9):3837-43, 2008.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLERE-BLANDIN, C. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49: 1304–1313, 1996.

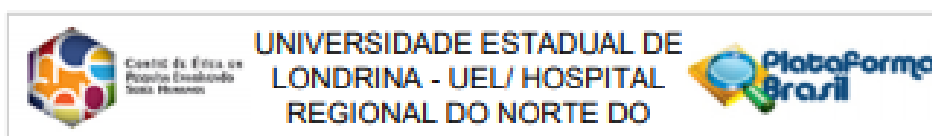
WORTSMAN, J.; MATSUOKA, L.Y.; CHEN, T.C.; et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *American Journal Clin Nutrition*, 72, 1196-1199, 2000.

ZELKI, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 33(3):337-49, 2002.

ZURAWSKA-PLAKSEJ, E.; GRZEBYK, E.; MARCINIAK, D.; SZYMÁNKA-CHABOBSKA, A.; PIWOWAR, A. Oxidatively modified forms of albumin in patients with risk factors of metabolic syndrome. *J endocrinol Invest*, 2014.

8. ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A: Parecer do Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Danielle Venturini

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 41718014.9.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto sensu

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.058.882

Data da Relatoria: 11/05/2015

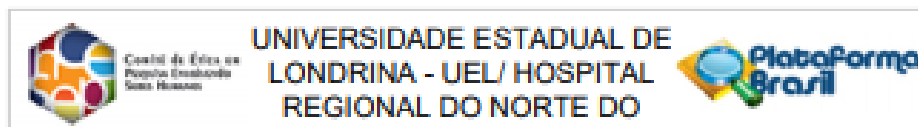
Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como proposta a avaliar o efeito da suplementação de vitamina D em pacientes com síndrome metabólica, no que diz respeito aos parâmetros antropométricos, inflamatórios, metabólicos e níveis de estresse oxidativo, para tanto, serão recrutados cerca de 100 indivíduos adultos (>18 anos), de ambos os sexos com síndrome metabólica, sendo 50 obesos e 50 com sobrepeso, atendidos no Ambulatório de Clínica Médica e de Cardiologia do Hospital Universitário de Londrina e 100 indivíduos para o grupo controle que serão recrutados entre os funcionários vinculados a UEL com IMC normal (18-24,9kg/m²). Este estudo terá dois momentos.

primeiramente, far-se-á uma avaliação da prevalência de hipovitaminose D na população estudada e, a partir dessa análise, os pacientes que apresentarem deficiência ou insuficiência de vitamina D serão alocados em quatro grupos de aproximadamente vinte e cinco indivíduos. Dos 50 pacientes obesos com SM, 25 receberão cápsulas contendo

50.000 U de vitamina D (uma por semana) e 25 receberão cápsulas de placebo por noventa dias. Os indivíduos com sobrepeso serão subdivididos em dois grupos, 25 receberão cápsulas contendo 50.000 U de vitamina D e 25 receberão cápsulas de placebo por noventa dias. Os indivíduos do grupo controle não receberão suplementação.

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 86.057-970
UF: PR **Município:** LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep208@uel.br



Continuação do Protocolo: 1.058.882

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos: 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.

- 1) Identificar a prevalência de insuficiência e/ou deficiência de vitamina D nos pacientes com SM;
- 2) Verificar se a reposição de vitamina D é capaz de melhorar os componentes da síndrome metabólica (SM) e o desequilíbrio redox nestes pacientes;
- 3) Determinar os níveis de homocisteína, leptina e adiponectina nos indivíduos com SM antes e após a administração de vitamina D.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora a suplementação com vitamina D para pacientes com níveis séricos insuficientes se faz necessária e não oferece riscos à saúde do indivíduo, haja vista que a suplementação será administrada apenas aos pacientes que apresentarem deficiência ou insuficiência dessa vitamina e não será administrada no grupo controle. A coleta de material biológico será realizada por equipe treinada e qualificada, em sala própria para a realização da mesma, minimizando os riscos.

Os Benefícios esperados são: produzir informações consistentes sobre o estado nutricional da vitamina D nos pacientes com Síndrome Metabólica e assim propor medidas para a elaboração de estratégias epidemiológicas e clínicas mais efetivas para prevenção/tratamento de tais desfechos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Levando em consideração a problemática descrita, este estudo tem relevância para a área específica e poderá contribuir significativamente para a identificação da hipovitaminose D, bem como sua correção por o uso da suplementação dessa vitamina na população estudada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

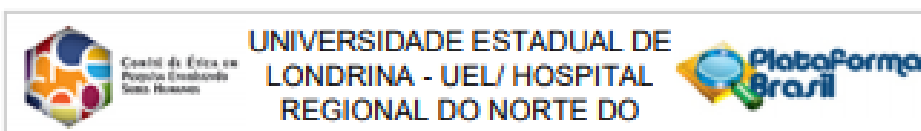
Em relação aos termos de apresentação obrigatória, a folha de rosto foi assinada pelo vice coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. A autorização do HU está anexada e devidamente assinada. O orçamento financeiro foi apresentado e o financiamento foi elaborado mediante verba de projetos aprovados anteriormente. O TCLE está redigido na forma de convite e foi incluído os possíveis riscos aos participantes da pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3	CEP: 86.037-870
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR	Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5435	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.658.882

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

LONDRINA, 12 de Maio de 2015

Assinado por:
Paula Mariza Zede Alliprandini
(Coordenador)

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 86.057-970
UF: PR **Município:** LONDRINA
Telefone: (43)3371-5452 **E-mail:** cep258@uel.br

ANEXO B: Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**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, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371-2490, email cep268@uel.br. 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: _____

ANEXO C: Normas da Revista *British Journal of nutrition*

DETAILED MANUSCRIPT PREPARATION INSTRUCTIONS

Language

Papers submitted for publication must be written in English and should be as concise as possible. We recommend that authors for whom English is not their first language have their manuscript checked by someone whose first language is English before submission, to ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. Please see the Author Language Services section below for more information.

Spelling should generally be that of the *Concise Oxford Dictionary* (1995), 9th ed. Oxford: Clarendon Press. Authors are advised to consult a current issue in order to make themselves familiar with BJN as to typographical and other conventions, layout of tables etc. Sufficient information should be given to permit repetition of the published work by any competent reader of BJN.

Published examples of BJN article types can be found below:

- [Research Article](#)
- [Review Article](#)
- [Horizons Article](#)
- [Letter to the Editor](#)

Authorship

The Journal conforms to the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\)](#) definition of authorship, as described by P.C. Calder ([Br J Nutr \(2009\) 101, 775](#)). Authorship credit should be based on:

1. Substantial contributions to conception and design, data acquisition, analysis and/or interpretation;
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
3. Final approval of the version to be published.

The contribution of individuals who were involved in the study but do not meet these criteria should be described in the Acknowledgments section.

Ethical standards

The required standards for reporting studies involving humans and experimental animals are detailed in an Editorial by G.C. Burdge ([Br J Nutr \(2014\) 112](#)).

EXPERIMENTS INVOLVING HUMAN SUBJECTS

The notice of contributors is drawn to the guidelines in the World Medical Association (2000) Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, with notes of clarification of 2002 and 2004 (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>), the *Guidelines on the Practice of Ethics Committees Involved in Medical Research Involving Human Subjects* (3rd ed., 1996; London: The Royal College of Physicians) and the Guidelines for the ethical conduct of medical research involving children, revised in 2000 by the Royal College of Paediatrics and Child Health: Ethics Advisory Committee (*Arch Dis Child* (2000) **82**, 177–182). Articles reporting randomised trials must conform to the standards set by the [Consolidated Standards of Reporting Trials \(CONSORT\) consortium](#). A completed CONSORT Checklist ([Consolidated Standards of Reporting Trials \(CONSORT\) consortium](#)) must accompany manuscripts reporting randomised controlled trials.

Submissions that do not include this information will not be considered for review until a completed CONSORT Checklist has been submitted and approved.

Required disclosures: A paper describing any experimental work on human subjects must include the following statement in the Experimental Methods section: "This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects/patients were approved by the [insert name of the ethics committee; a specific ethics number MUST be inserted]. Written [or Verbal] informed consent was obtained from all subjects/patients. [Where verbal consent was obtained this must be followed by a statement such as: Verbal consent was witnessed and formally recorded]." For clinical trials, the trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry should be included.

PLEASE NOTE: As a condition for publication, all randomised controlled trials that involve human subjects submitted to BJN for review must be registered in a public trials registry. A clinical trial is defined by the ICMJE (in accordance with the definition of the World Health Organisation) as any research project that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Registration information must be provided at the time of submission, including the trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry.

EXPERIMENTS INVOLVING THE USE OF OTHER VERTEBRATE ANIMALS

Papers that report studies involving vertebrate animals must conform to the 'ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research' detailed in Kilkenny et al. (*J Pharmacol Pharmacother* (2010) **1**, 94-99) and summarised at www.nc3rs.org.uk. Authors MUST ensure that their manuscript conforms to the checklist that is available from the nc3Rs website (the completed check list should be uploaded as a separate document during submission of the manuscript). The attention of authors is drawn particularly to the ARRIVE guidelines point 3b ('Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology', point 9c ('Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment') and point 17a ('Give details of all important adverse events in each experimental group'). The Editors will not accept papers reporting work carried out involving procedures that cause or are considered likely to cause distress or suffering which would confound the outcomes of the experiments, or experiments that have not been reviewed and approved by an animal experimentation ethics committee or regulatory organisation.

Required disclosures: Where a paper reports studies involving vertebrate animals, authors must state in the Experimental Methods section the institutional and national guidelines for the care and use of animals that were followed and that all experimental procedures involving animals were approved by the [insert name of the ethics committee or other approving body; wherever possible authors should also insert a specific ethics/approval number].

Manuscript Format

The requirements of BJN are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the ICMJE.

Typescripts should be prepared with 1.5 line spacing and wide margins (2 cm), the preferred font being Times New Roman size 12. At the ends of lines, words should not be hyphenated unless hyphens are to be printed. **Line numbering and page numbering are required.**

MANUSCRIPTS SHOULD BE ORGANISED AS FOLLOWS:

COVER LETTER

Papers should be accompanied by a cover letter including a brief summary of the work and a short explanation of the novelty of the study and how it advances nutritional science. The text for the cover letter should be entered in the appropriate box as part of the online submission process.

TITLE PAGE

The title page should include:

1. The title of the article;
2. Authors' names;
3. Name and address of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed for each author;
4. Name, mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author responsible for correspondence about the manuscript;
5. A shortened version of the title, not exceeding 45 characters (including letters and spaces) in length;
6. At least four keywords or phrases (each containing up to three words).

Authors' names should be given without titles or degrees and one forename may be given in full. Identify each author's institution by a superscript number (e.g. A.B. Smith¹) and list the institutions underneath and after the final author.

ABSTRACT

Each paper must open with an unstructured abstract of **not more than 250 words**. The abstract should be a single paragraph of continuous text without subheadings outlining the aims of the work, the experimental approach taken, the principal results (including effect size and the results of statistical analysis) and the conclusions and their relevance to nutritional science.

INTRODUCTION

It is not necessary to introduce a paper with a full account of the relevant literature, but the introduction should indicate briefly the nature of the question asked and the reasons for asking it. It should be **no longer than two manuscript pages**.

EXPERIMENTAL METHODS

The methods section must include a subsection that describes the methods used for statistical analysis (see the section on statistical analysis in the [Appendix](#)) and the sample size must be justified by the results of appropriate calculations and related to the study outcomes.

Justification of sample size: All manuscripts that report primary research must contain a statistical justification of sample size that is stated explicitly in the Statistics sub-section of the Methods. Manuscripts that do not contain this information will be returned to the authors for correction before peer review. The amended versions will be treated as new submissions. The information required must include, but not be restricted to, the following:-

- Hypothesised effect size with appropriate justification.
- A statement regarding statistical power (typically 80%) and the two-sided significance level (typically 0.04).
- An explanation of how the statistical power was calculated.
- If sample size is determined by the feasibility of recruitment minimally detectable effect sizes should be provided instead of power analysis.

The only exceptions are:-

- Meta-analyses.
- Exploratory or secondary analysis of observational studies based on large sample sizes

For studies involving humans subjects or experimental animals, the Methods section must include a subsection that reports the appropriate ethical approvals for the study (see Ethical Standards above).

All analytical procedures must be accompanied by a statement of within and between assay precision.

Diets: The nutrient composition of diets used in studies published in BJN must be described in detail, preferably in a table(s). Experimentally relevant differences in composition between diets are essential. For instance, studies of fat nutrition should always include fatty acid compositions of all diets.

PCR analysis: Where experiments involve measurement of mRNA including microarray analysis, for analysis of individual genes, mRNA should be measured by quantitative RTPCR. A statement about the quality and integrity of the RNA must be provided together with the results of electrophoretic analysis of the purity of the PCR products. Unless published elsewhere, full details of the oligonucleotide primers and of the PCR protocol must be stated either in the text or in Supplementary Material. The stability of reference genes used for normalisation of PCR data must be reported for the experimental conditions described. Where possible, analysis of mRNA levels should be accompanied by assessment of either protein levels or activities.

Microarray analysis: Studies involving microarray analysis of mRNA must conform to the "[Minimum Information about a Microarray Experiment](#)" (MIAME) guidelines including deposition of the raw data in an appropriate repository (the Access Code must be stated in the Methods). All microarray experiments must be accompanied by appropriate validation by quantitative RTPCR.

RESULTS

These should be given as concisely as possible, using figures or tables as appropriate. Data must not be duplicated in tables and figures.

DISCUSSION

While it is generally desirable that the presentation of the results and the discussion of their significance should be presented separately, there may be occasions when combining these sections may be beneficial. Authors may also find that additional or alternative sections such as 'conclusions' may be useful. The discussion should be **no longer than five manuscript pages**.

ACKNOWLEDGMENTS

Here you may acknowledge individuals or organizations that provided advice and/or support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

FINANCIAL SUPPORT

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors

should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)".

This disclosure is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis; all such support must be disclosed here and if no such support was received this must be stated. Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

In addition to the source of financial support, please state whether the funder contributed to the study design, conduct of the study, analysis of samples or data, interpretation of findings or the preparation of the manuscript. If the funder made no such contribution, please provide the following statement: "[Funder's name] had no role in the design, analysis or writing of this article."

CONFLICT OF INTEREST

Please provide details of all known financial, professional and personal relationships with the potential to bias the work. Where no known conflicts of interest exist, please include the following statement: "None."

For more information on what constitutes a conflict of interest, please see the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) guidelines](#).

AUTHORSHIP

Please provide a very brief description of the contribution of each author to the research. Their roles in formulating the research question(s), designing the study, carrying it out, analysing the data and writing the article should be made plain.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text using superscript Arabic numerals in parentheses, e.g. 'The conceptual difficulty of this approach has recently been highlighted^(1,2)'. If a reference is cited more than once, the same number should be used each time. References cited only in tables and figure legends should be numbered in sequence from the last number used in the text and in the order of mention of the individual tables and figures in the text.

Names and initials of authors of unpublished work should be given in the text as 'unpublished results' and not included in the References. References that have been published online only but not yet in an issue should include the online publication date and the Digital Object Identifier (doi) reference, as per the example below.

At the end of the paper, on a page(s) separate from the text, references should be listed in numerical order using the Vancouver system. When an article has more than three authors only the names of the first three authors should be given followed by '*et al.*' The issue number should be omitted if there is continuous pagination throughout a volume. Titles of journals should appear in their abbreviated form using the [NCBI LinkOut page](#). References to books and monographs should include the town of publication and the number of the edition to which reference is made. References to material available on websites should follow a similar style, with the full URL included at the end of the reference, as well as the date of the version cited and the date of access.

Examples of correct forms of references are given below.

Journal articles

1. Rebello SA, Koh H, Chen C *et al.* (2014) Amount, type, and sources of carbohydrates in relation to ischemic heart disease mortality in a Chinese population: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* **100**, 53-64.
2. Villar J, Ismail LC, Victora CG *et al.* (2014) International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* **384**, 857-868.
3. Alonso VR & Guarner F (2013) Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr* **109**, Suppl. 2, S21-S26.
4. Bauserman M, Lokangaka A, Gado J *et al.* A cluster-randomized trial determining the efficacy of caterpillar cereal as a locally available and sustainable complementary food to prevent stunting and anaemia. *Public Health Nutr*. Published online: 29 January 2015. doi: 10.1017/S1368980014003334.

Books and monographs

1. Bradbury J (2002) Dietary intervention in edentulous patients. PhD Thesis, University of Newcastle.
2. Ailhaud G & Hauner H (2004) Development of white adipose tissue. In *Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology*, 2nd ed., pp. 481-514 [GA Bray and C Bouchard, editors]. New York: Marcel Dekker.
3. Bruinsma J (editor) (2003) *World Agriculture towards 2015/2030: An FAO Perspective*. London: Earthscan Publications.
4. World Health Organization (2003) *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series no. 916. Geneva: WHO.
5. Keiding L (1997) *Astma, Allergi og Anden Overfølsomhed i Danmark – Og Udviklingen 1987-1991 (Asthma, Allergy and Other Hypersensitivities in Denmark, 1987-1991)*. Copenhagen, Denmark: Dansk Institut for Klinisk Epidemiologi.

Sources from the internet

1. Nationmaster (2005) HIV AIDS – Adult prevalence rate. http://www.nationmaster.com/graph-T/hea_hiv_aid_ad... (accessed June 2013).

FIGURES

Figures should be supplied as separate electronic files. Figure legends should be grouped in a section at the end of the manuscript text. Each figure should be clearly marked with its number and separate panels within figures should be clearly marked (a), (b), (c) etc. so that they are easily identifiable when the article and figure files are merged for review. Each figure, with its legend, should be comprehensible without reference to the text and should include definitions of abbreviations. The nature of the information displayed in the figures (e.g. mean (SEM)) and the statistical test used must be stated.

We recommend that only TIFF, EPS or PDF formats are used for electronic artwork. Other non-preferred but usable formats are JPG, PPT and GIF files and images created in Microsoft Word. Note that these non-preferred formats are generally NOT suitable for conversion to print reproduction. For further information about how to prepare your figures, including sizing and resolution requirements, please see our [artwork guide](#).

In curves presenting experimental results the determined points should be clearly shown, the symbols used being, in order of preference, ○, ●, △, ▲, □, ■, ×, +. Curves and symbols should not extend beyond the experimental points. Scale-marks on the axes should be on the inner side of each axis and should extend beyond the last experimental point. Ensure that lines and symbols used in graphs and shading used in histograms are large enough to be easily identified

when the figure size is reduced to fit the printed page. Statistically significant effects should be indicated with symbols or letters.

Colour figures will be published online free of charge, and there is a fee of £350 per figure for colour figures in the printed version. If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect colour charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Images submitted with a manuscript should be minimally processed; some image processing is acceptable (and may be unavoidable), but the final image must accurately represent the original data. Grouping or cropping of images must be identified in the legend and indicated by clear demarcation. Please refer to the [Office of Research Integrity guidelines](#) on image processing in scientific publication. Authors should provide sufficient detail of image-gathering procedures and process manipulation in the Methods sections to enable the accuracy of image presentation to be assessed. Authors should retain their original data, as Editors may request them for comparison during manuscript review.

TABLES

Tables should be placed in the main manuscript file at the end of the document, not within the main text. Please **do not** supply tables as images (e.g. in TIFF or JPG format). Be sure that each table is cited in the text. Tables should carry headings describing their content and should be comprehensible without reference to the text.

The dimensions of the values, e.g. mg/kg, should be given at the top of each column. Separate columns should be used for measures of variance (SD, SE etc.), the \pm sign should not be used. The number of decimal places used should be standardized; for whole numbers 1.0, 2.0 etc. should be used. Shortened forms of the words weight (wt) height (ht) and experiment (Expt) may be used to save space in tables, but only Expt (when referring to a specified experiment, e.g. Expt 1) is acceptable in the heading.

Footnotes are given in the following order: (1) abbreviations, (2) superscript letters, (3) symbols. Abbreviations are given in the format: RS, resistant starch. Abbreviations in tables must be defined in footnotes in the order that they appear in the table (reading from left to right across the table, then down each column). Symbols for footnotes should be used in the sequence: *†‡§||¶, then ** etc. (omit * or †, or both, from the sequence if they are used to indicate levels of significance).

For indicating statistical significance, superscript letters or symbols may be used. Superscript letters are useful where comparisons are within a row or column and the level of significance is uniform, e.g. ^{a,b,c}Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$). Symbols are useful for indicating significant differences between rows or columns, especially where different levels of significance are found, e.g. 'Mean values were significantly different from those of the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ '. The symbols used for P values in the tables must be consistent.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Additional data (e.g. data sets, large tables) relevant to the paper can be submitted for publication online only, where they are made available via a link from the paper. The paper should stand alone without these data. Supplementary Material must be cited in a relevant place in the text of the paper.

Although Supplementary Material is peer reviewed, it is not checked, copyedited or typeset after acceptance and it is loaded onto the journal's website exactly as supplied. You should check your Supplementary Material carefully to ensure that it adheres to journal styles. Corrections cannot be made to the Supplementary Material after acceptance of the manuscript. Please bear this in mind when deciding what content to include as Supplementary Material