UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Renata Vidonscky Luthold

**Vitamina D na modulação da microbiota intestinal:
associações com os perfis inflamatório e
cardiometabólico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Saúde Pública, Universidade de São Paulo
– USP, para obtenção de título de Mestre
em Ciências, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública
Orientadora: Prof^a Titular Sandra Roberta G. Ferreira Vivolo

São Paulo
2017

Vitamina D na modulação da microbiota intestinal: associações com os perfis inflamatório e cardiometabólico

Renata Vidonscky Luthold

Dissertação apresentada à Faculdade de
Saúde Pública, Universidade de São Paulo
– USP, para obtenção de título de Mestre
em Ciências, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública
Orientadora: Profª Titular Sandra Roberta G. Ferreira Vivolo

**São Paulo
2017**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Luthold, Renata V.

Vitamina D na modulação da microbiota intestinal: associação com os perfis inflamatório e cardiometabólico. Renata Vidonscky Luthold. São Paulo, 2017. p.89
Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública.

Título em inglês: Vitamin D in the modulation of gut microbiota: associations with inflammatory and cardiometabolic profiles.

1. Vitamina D

2. Microbiota intestinal

3. Inflamação

4. Risco cardiometabólico

5. Taxonomia

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª Sandra Roberta G. Ferreira Vivolo, por toda atenção, confiança e paciência. Agradeço por todo o aprendizado neste tempo trabalhando juntas e pela oportunidade de ingresso na vida acadêmica.

À minha mãe (*in memoriam*), por ser meu exemplo bondade e força, por ter me ensinado que com esperança e força de vontade conseguimos alcançar nossos sonhos.

Ao meu marido, Giovanni, que sempre me apoiou e acompanhou, pelos momentos de paciência e ensinamentos, por estar sempre ao meu lado.

Ao Prof. Gabriel R. Fernandes, responsável pelas análises de bioinformática da microbiota, pela dedicação, prontidão e, acima de tudo, grande competência e rigor nesta complexa abordagem metodológica.

À Profª Marise Lazaretti Castro, Lilian e Ilda pela colaboração nas dosagens da vitamina D no laboratório da UNIFESP e oportunidade de aprendizado.

Às colegas da pós-graduação, Luciana, Angélica, Isis, Bianca, Carol e Adriana por todos os ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos amigos e familiares pelo apoio e compreensão.

Aos participantes e pesquisadores do NutriHS que viabilizaram o desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários do Centro de Saúde Paula Souza por toda atenção e paciência.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação e do Departamento de Nutrição por todo auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RESUMO

LUTHOLD, R. V. **Vitamina D na modulação da microbiota intestinal: associações com perfil inflamatório e cardiometabólico** [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2017.

Introdução: Bactérias intestinais influenciam a resposta imune e conhecendo-se as ações imunomoduladoras da vitamina D passou-se a investigar sua relação com a microbiota. O *status* adequado desta vitamina está associado a uma composição mais saudável da microbiota, enquanto sua deficiência pode acarretar disbiose intestinal, endotoxemia, inflamação e resistência à insulina. O conhecimento de interações do *status* de vitamina D com a microbiota pode melhorar a compreensão da gênese de doenças crônicas mediadas pela inflamação. **Objetivo:** Examinou-se a associação da ingestão e concentração de vitamina D com a composição da microbiota fecal, marcadores inflamatórios e perfil bioquímico de participantes do *Nutritionists' Health Study*. **Métodos:** Nesta análise transversal, 150 adultos jovens foram estratificados em tercís de consumo e de concentração de 25(OH)D e comparados quanto ao perfil clínico e inflamatório. A associação de 25(OH)D com a microbiota (sequenciamento do 16S rRNA, região V4, Illumina® MiSeq) foi testada por regressão linear múltipla. **Resultados:** A ingestão de vitamina D se associou aos níveis séricos ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significantes de variáveis clínicas e inflamatórias entre os tercís de ingestão, exceto tendência de aumento do LPS com a redução da 25(OH)D (p -trend $< 0,05$). *Prevotella* foi mais abundante (log2FC 1,67; $p < 0,01$), e *Haemophilus* and *Veillonella* menos abundantes (log2FC -2,92 e -1,46; $p < 0,01$, respectivamente) no subgrupo com maior ingestão de vitamina D (referência) comparado aos outros grupos (primeiro e segundo tercís). PCR ($r = -0,170$; $p = 0,039$), selectina-E ($r = -0,220$; $p = 0,007$) e abundância de *Coprococcus* ($r = -0,215$; $p = 0,008$) e de *Bifidobacterium* ($r = -0,269$; $p = 0,001$) foram inversamente correlacionados com 25(OH)D. Após ajustes por idade, sexo, estação do ano e IMC, a 25(OH)D manteve associação inversa com *Coprococcus* ($\beta = -9,414$; $p = 0,045$) e *Bifidobacterium* ($\beta = -1,881$; $p = 0,051$), mas a significância desapareceu com a adição de marcadores inflamatórios aos modelos. **Conclusão:** Associações de ingestão e concentração de vitamina D com abundância de certos gêneros da microbiota sugerem que sua ação imunomoduladora poderia influenciar a composição bacteriana. Abundância relativamente maior de gram-negativos (*Haemophilus* e *Veillonella*) pode ter sido facilitada pela baixa ingestão e/ou concentração da vitamina. Menor proporção de bactérias benéficas (*Coprococcus* e *Bifidobacterium*) poderia estimular a resposta imune e inflamação. Concluimos que a participação da vitamina D na manutenção da homeostase imune deve ocorrer em parte pelas interações com a microbiota intestinal, embora o delineamento transversal impeça assegurar relações tipo causa-efeito.

Palavras-chave: vitamina D, microbiota intestinal, bactérias gram-negativas, inflamação

ABSTRACT

LUTHOLD, R. V. **Vitamina D na modulação da microbiota intestinal: associações com perfil inflamatório e cardiometabólico** [Dissertação de mestrado]. São Paulo: University of São Paulo, School of Public Health; 2017.

Introduction: Gut bacteria influence the immune response and due the immunomodulatory actions of vitamin D, it has been investigated its relationship with the microbiota. Adequate status of this vitamin is associated with adequate composition of the microbiota, while its deficiency can cause gut dysbiosis, endotoxemia, inflammation and insulin resistance. The knowledge of interactions of vitamin D status with the microbiota may improve the understanding of the genesis of inflammation-mediated chronic diseases. **Objective:** We examined the association of vitamin D intake and concentration with the composition of fecal microbiota, inflammatory markers and biochemical profile of participants from the Nutritionists' Health Study. **Methods:** In this cross-sectional analysis, 150 healthy young adults were stratified into tertiles of intake and concentrations of vitamin D and their clinical and inflammatory profiles were compared. The association between 25(OH)D and fecal microbiota (16S rRNA sequencing, V4 region, Illumina® MiSeq) was tested by multiple linear regression.) **Results:** Vitamin D intake was associated with its concentration ($p < 0.05$). There were no significant differences in clinical and inflammatory variables across tertiles of intake, except for a trend of LPS increases with reduction of 25(OH)D ($p\text{-trend} < 0.05$). *Prevotella* was more abundant ($\log_2\text{FC } 1.67$; $p < 0.01$), and *Haemophilus* and *Veillonella* less abundant ($\log_2\text{FC } -2.92$ e -1.46 ; $p < 0.01$, respectively) in subset with the highest vitamin D intake (reference) than that observed in the other subset (first plus second tertiles). CRP ($r = -0.170$, $p = 0.039$), E-selectin ($r = -0.220$, $p = 0.007$) and abundances of *Coprococcus* ($r = -0.215$, $p = 0.008$) and *Bifidobacterium* ($r = -0.269$, $p = 0.001$) were inversely correlated with 25(OH)D. After adjusting for age, sex, season and BMI, the 25(OH)D maintained inversely associated with *Coprococcus* ($\beta = -9.414$, $p = 0.045$) and *Bifidobacterium* ($\beta = -1.881$, $p = 0.051$), but significance disappeared following the addition of inflammatory markers in the regression models. **Conclusion:** Association of vitamin D intake and concentration with abundance of certain genera of microbiota suggests that its immunomodulatory action could influence the bacterial composition. Relatively higher abundance of gram-negative (*Haemophilus* and *Veillonella*) may have been facilitated by the low intake and/or concentration of the vitamin. Lower proportion of beneficial bacteria (*Coprococcus* and *Bifidobacterium*) could stimulate the immune response and inflammation. We conclude that the role of vitamin D in maintaining immune homeostasis should occur in part by interactions with the gut microbiota, although the cross-sectional design does not allow ensuring cause-effect relationships.

Key-words: vitamin D, gut microbiota, gram-negative bacteria, inflammation

SUMÁRIO

1 Introdução	7
1.1 Aspectos fisiológicos do metabolismo da vitamina D	7
1.2 Ações extra-ósseas da vitamina D	9
1.3 Relação da microbiota intestinal com a vitamina D	11
1.4 Deficiência de vitamina D, microbiota intestinal e doenças crônicas	13
1.5 Microbiota intestinal na fisiopatogênese de doenças cardiometabólicas	16
1.6 O NutriHS	19
1.7 Justificativa e hipótese	21
2 Objetivos	22
3 Material e métodos	23
3.1 Casuística	23
3.2 Protocolo	23
3.3 Variáveis de interesse	24
3.4 Procedimentos analíticos	25
3.5 Análise estatística	26
4 Resultados	28
5 Discussão	38
6 Conclusões.....	42
7 Referências	43
8 Anexo 1.....	57
9 Anexo 2.....	59
10 Anexo 3.....	61
11 Anexo 4.....	63
12 Anexo 5.....	86
13 Anexo 6.....	87
14 Anexo 7.....	88
15 Anexo 8.....	89

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tanto o papel da vitamina D como o da microbiota intestinal para a saúde humana tem recebido grande destaque na literatura. Os estudos da microbiota foram alavancados pela descoberta que o número de microorganismos supera em 10 vezes o número de células humanas e pelos avanços na identificação do microbioma, revelando a existência de 150 vezes mais genes bacterianos que nosso genoma (CANI & DELZENNE, 2007; QIN et al., 2010).

A exposição às bactérias intestinais representa importante estímulo para o desenvolvimento do sistema imune (LY et al., 2011). A composição da microbiota influencia a resposta imune ao longo da vida, protegendo o organismo contra uma série de doenças. Existem variações na composição bacteriana intestinal, influenciadas por fatores genéticos e ambientais (PENDERS et al., 2006; QIN et al., 2010).

Recentemente, despertou-se o interesse de investigar interações da microbiota intestinal com a vitamina D. As funções desta vitamina extrapolam a regulação do metabolismo do cálcio, destacando-se ações no sistema imune, ciclo celular e no risco cardiometabólico, evidenciadas pelas relações entre sua deficiência e a prevalência de doenças de natureza imunológica, câncer e cardiometabólicas (CANTORNA et al., 2004; CANTORNA, 2006; WANG et al., 2008; MICHOS & MELAMED, 2008; HEWISON, 2010).

As ações imunomoduladoras da vitamina D na barreira intestinal são relevantes, considerando a contínua exposição a agentes agressores (HEWISON, 2010). Ainda são raras as evidências de que esta vitamina possa atuar no estado inflamatório via modulação da microbiota intestinal (LY et al., 2011; CANTORNA et al., 2014). Reconhecendo a participação da microbiota na gênese de doenças crônicas, que têm a inflamação subclínica como mecanismo fisiopatológico, é de interesse aprofundar o conhecimento sobre as interrelações entre a vitamina D, microbiota intestinal e doenças crônicas. Até o momento, não há consenso sobre benefícios da suplementação com vitamina D em morbidades não-ósseas, nem evidência de redução de mortalidade (AUTIER & GANDINI, 2007; BJELAKOVIC et al., 2011; LICHTENSTEIN et al., 2013).

1.1 Aspectos fisiológicos do metabolismo da vitamina D

Vitamina D refere-se a um grupo de vitaminas lipossolúveis responsáveis pela absorção intestinal do cálcio e de outros micronutrientes (ferro, fósforo, magnésio, zinco), sendo a D3 (colecalciferol) e D2 (ergocalciferol) as mais importantes para o homem. Poucos alimentos contêm vitamina D; por ser lipossolúvel, sua absorção intestinal depende da

formação de micelas por meio da conjugação com os sais biliares. A dieta atende apenas 20% das necessidades corporais, tendo papel mais relevante para idosos e habitantes de regiões com menor exposição solar (LAWSON et al., 1979). As necessidades diárias individuais desta vitamina variam de 15 a 20 µg/dia (LICHTENSTEIN et al., 2013). Do ponto de vista populacional, o *Estimated Average Requirement* considera ingestão adequada aquela superior a 10 µg/dia (INSTITUTE OF MEDICINE, 2011).

A maior síntese da vitamina D ocorre na derme frente à radiação ultravioleta B, onde moléculas de 7-deidrocolesterol (pré-vitamina D) se transformam em vitamina D₃ por fotólise (HEWISON, 2012; HOLICK, 2009). Ao passar para corrente sanguínea, a vitamina circula ligada à proteína de transporte (DBP), sofrendo hidroxilações ao atingir certos órgãos (KIMBALL et al., 2008). No fígado, torna-se a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], que é inativa e estável, sendo sua determinação sanguínea a mais indicada para avaliar o *status* corporal (KIMBALL et al., 2008). Nos rins, a 25(OH)D é catalisada pela 1 α -hidroxilase (CYP27B1), convertendo-se em 1,25-di-hidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] (calcitriol), a sua forma ativa. O calcitriol atravessa a membrana celular e funciona de modo similar aos hormônios esteroides, através da ligação a receptor nuclear (VDR), exercendo papel regulador na transcrição de genes (HAUSSLER et al., 2008; HEWISON, 2012).

As funções da DBP vão além do transporte de vitamina D e seus metabólitos; participa na ativação de macrófagos e ligação a ácidos graxos. Polimorfismos desta proteína têm sido associadas a susceptibilidade a doenças como osteoporose, diabetes mellitus e esclerose múltipla (FU et al., 2009). Também a presença de VDR em vários tecidos denota sua relevância para o controle de múltiplos processos orgânicos.

No intestino delgado, a 1,25(OH)₂D estimula a absorção intestinal do cálcio, contribuindo de forma essencial para manutenção do esqueleto. Na sua ausência, apenas 10-15% do cálcio da dieta e cerca de 60% do fósforo seriam absorvidos. Este metabólito também está relacionado a diversas outras ações, tais como inibição da proliferação celular, angiogênese e da produção de renina e ao estímulo da produção de insulina e de catelicidina nos macrófagos (HOLICK et al., 2011). Embora a 1,25(OH)₂D seja a forma biologicamente ativa, seus níveis circulantes não refletem as reservas de vitamina, pois sua meia vida é de quatro a seis horas e as concentrações são cerca de mil vezes inferiores aos da 25(OH)D (HOLICK, 2009).

Concentrações séricas de 25(OH)D acima de 30 ng/mL são consideradas normais (HOLICK et al., 2011). Deficiência de vitamina D é definida segundo as sociedades americana e brasileira de endocrinologia como valores inferiores a 20 ng/mL, enquanto insuficiência entre 21 a 29 ng/mL (MAEDA et al., 2014). Entre os métodos mais acurados de dosagem estão a

cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massa, embora, na prática, os imunoenaios automatizados sejam os métodos mais comumente empregados (ALVES et al., 2013). Os últimos dosam concomitantemente a 25(OH)D2 e 25(OH)D3.

Embora a ação mais consagrada da vitamina D seja na regulação do metabolismo ósseo, a presença de VDR em diversos tecidos e da CYP27B1 em vários tipos celulares expressa sua importância para a homeostase sistêmica (DE CASTRO, 2011).

1.2 Ações extra-ósseas da vitamina D

Entre as ações extra-ósseas, cabe destacar seu papel imunomodulador, atuando sobre linfócitos, macrófagos e células dendríticas (VELDMAN et al., 2000; HEWISON, 2010; DI ROSA et al., 2011). Quando estas células são expostas *in vitro* a meio com diferentes concentrações da vitamina e lipopolissacarídeos (LPS) para promover inflamação, aquelas submetidas às menores concentrações produzem mais interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) em comparação às altas concentrações (ZHANG et al., 2012). Estas ações permitem entender a participação fisiopatológica da vitamina D em doenças de base imunológica como a doença de Chron (RAFTERY et al., 2015), doença inflamatória intestinal (CANTORNA et al., 2014), esclerose múltipla (CANTAREL, 2015), lúpus eritematoso sistêmico (BORBA et al., 2009), diabetes mellitus tipo 1 (TAKIISHI et al., 2010) e câncer (HOLICK, 2004).

A 1,25(OH)₂D é importante reguladora do crescimento celular (HOLICK, 2004) e acredita-se ter ações anticancerígenas, pois sua administração associa-se a efeitos anti-proliferativos, podendo ativar as vias de apoptose e inibir a angiogênese. Além disso, esta vitamina potencializa efeitos anticancerígenos de fármacos usados para este fim (DEEB et al., 2007). Recentemente, relatou-se relação inversa entre suas concentrações séricas e diversos tipos de câncer (VELDMAN et al., 2014; JEONG et al., 2015; PARK et al., 2015).

Evidências mostram que a vitamina D participa de dois aspectos importantes da função neuromuscular: a força muscular e o equilíbrio. Além de atuar nas células musculares esqueléticas via VDR também estimula um receptor de membrana que aumenta o transporte de cálcio, síntese proteica e a velocidade de contração muscular, resultando em melhora da capacidade de realizar movimentos rápidos protetores contra queda (PFEIFER et al., 2002; PEDROSA & CASTRO, 2005).

Diversas frentes apontam papel relevante da vitamina D no desenvolvimento de resistência à insulina e no sistema cardiovascular. Estudos descrevem correlação inversa entre suas concentrações e a prevalência de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (FORD et

al., 2005; ZIPITIS & AKOBENG, 2008; REIS et al., 2008; SCHUCH et al., 2009; WOLDEN-KIRK et al., 2011; SHANKAR et al., 2011; SALEHPOUR et al., 2012a KIM et al., 2014; GHANEI et al., 2015), embora a causalidade entre estas observações não esteja estabelecida. A falta de exposição solar não explica os baixos níveis séricos de vitamina D encontrados em obesos, sugerindo que deposição no tecido adiposo possa reduzir seus níveis na circulação (HARRIS & DAWSON-HUGHES, 2007). A presença de VDR nas células β e de proteínas ligadoras de cálcio dependente de vitamina D no tecido pancreático, assim como a expressão de 1α -hidroxilase, indicam possível mecanismo pelo qual a vitamina D poderia atuar no desenvolvimento do diabetes (CHIU et al., 2004; SCHUCH et al., 2009). Outros estudos verificaram que a deficiência da vitamina diminuía a sensibilidade à insulina e aumentava a produção de citocinas inflamatórias, associando-a a complicações macro e microvasculares (HERRMANN et al., 2015).

Em modelos animais, foi demonstrado que a suplementação de vitamina D pode aumentar o gasto energético e a sensibilidade a insulina (MARCOTORCHINO et al., 2014). Ratos suplementados com a vitamina tiveram menor ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica, possivelmente por *upregulation* de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e no metabolismo mitocondrial, que determinam gasto energético. Verificou-se, ainda, que a glicemia, insulinemia e HOMA-IR, elevados pela dieta hiperlipídica, diminuíram após suplementação com vitamina D. Porém, estudo prospectivo recente não comprovou que a suplementação com altas doses da vitamina fosse efetiva para prevenir diabetes em indivíduos de alto risco (JORDE et al., 2016). Achados de outros estudos de suplementação em mulheres sugeriram algum efeito no metabolismo de gorduras, tendo resultado em melhora significativa dos valores de HDL-c, apolipoproteína A-I e LDL-c (SALEHPOUR et al., 2012b; KIM et al., 2014).

Além de atuar indiretamente sobre o perfil de risco cardiovascular pelas ações no metabolismo, as próprias células do sistema circulatório (endoteliais e musculares lisas dos vasos sanguíneos, miócitos cardíacos e as células produtoras de renina) expressam a CYP27B1 e/ou o VDR. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ participa do controle da função cardíaca e da pressão arterial por meio da regulação do crescimento das células musculares e da contratilidade miocárdica (DE CASTRO, 2011; NORMAN & POWELL, 2014). Recentemente, verificou-se que níveis de vitamina D inadequados na infância também podem influenciar o risco de aterosclerose na vida adulta (JUONALA et al., 2015).

A importância do acompanhamento das concentrações de vitamina D tanto na infância como na gestação tem sido reforçada (HÖGLER, 2015). Relatou-se associação de *status* inadequado na gestação com maior risco de filhos com autismo (JIA et al., 2015), deformação no crânio (WEERNINK et al., 2015), menor massa óssea (JAVOID et al., 2006) e maior risco

de diabetes tipo 1 na infância (SØRENSEN et al., 2012). Por outro lado, concentrações adequadas de 25(OH)D na gravidez foram associadas a melhor desenvolvimento mental e psicomotor do recém-nascido (MORALES et al., 2012), enquanto na infância a suplementação protegeu contra a ocorrência de diabetes tipo 1 (ZIPITIS & AKOBENG, 2008).

1.3 Relação da microbiota intestinal com a vitamina D

As bactérias mais abundantes na microbiota intestinal pertencem aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, seguidos por *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Verrucomicrobia* e outros (ARUMUGAM et al., 2011; NEISH, 2009). Variações na composição bacteriana intestinal normal são determinadas por fatores genéticos e ambientais. Embora questionável se trato gastrointestinal seja estéril ao nascimento, sabe-se que a colonização bacteriana do intestino do neonato é fortemente influenciada pela microbiota materna vaginal e intestinal (RODRIGUEZ et al., 2015). Além do tipo de parto (normal ou cesariana), outros fatores como hábitos alimentares, doenças da infância e uso de fármacos (PENDERS et al., 2006; QIN et al., 2010; FALONY et al., 2016) influenciarão a composição da microbiota ao longo da vida e o risco para uma série de doenças (RODRIGUEZ et al., 2015).

Entre os fatores ambientais, a dieta e fármacos interferem de forma marcante no equilíbrio da microbiota com repercussões para o estado inflamatório (ARUMUGAM et al., 2011; CARICILLI et al., 2011; FALONY et al., 2016; PENDERS et al., 2006). A dieta tipicamente ocidental já foi associada à predominância de certas bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* e *Proteobacteria*, e à diminuição de *Bacteroidetes* (DE FILIPPO et al., 2010; GOMEZ et al., 2016; MASLOWSKI & MACKAY, 2011; MYLES, 2014), enquanto dietas ricas em carboidratos e fibras ao gênero *Prevotella* (GOMEZ et al., 2016; WU et al., 2011), mostrando que a ocidentalização pode acarretar perda de uma composição microbiana adequada. O uso de antibióticos tem sido associado a uma menor diversidade do microbioma (CANI et al., 2008), enquanto o de metformina à abundância do gênero *Akkermansia* (SHIN et al., 2012).

São recentes as investigações que exploram como uma condição de deficiência de vitamina D pode ser deletéria ao sistema imune, com reflexos na composição e/ou no papel da microbiota intestinal, predispondo a doenças de natureza imunológica ou às cardiometabólicas que tem a inflamação subclínica como base fisiopatológica (CANI et al., 2007; CANTORNA, 2010; LITONJUA & WEISS, 2007; LY et al., 2011; MORAES et al., 2014). Esta vitamina é essencial para o sistema imune inato, no qual atua melhorando a função das células dendríticas e linfócitos T regulatórios (células Treg), presentes em grande número na região intestinal. Observou-se que células mononucleares expostas à forma ativa da vitamina D melhoraram sua capacidade quimiotática e fagocítica, indispensável para atividade

antimicrobiana (BOUILLON et al., 2008). Assim, é evidente a importância do *status* da vitamina D para a homeostase intestinal, assim como seu papel na relação microbiota-hospedeiro. Apesar de consenso quanto à sua função moduladora nas defesas intestinais contra patógenos, há ainda controvérsias sobre uma relação causa-efeito na inflamação (LITONJUA & WEISS, 2007; CANTORNA, 2010; LY et al., 2011). Atividade anti-inflamatória desta vitamina já foi demonstrada (CANTORNA, 2006; HEWISON, 2010; TOPILSKI et al., 2004; ZHANG et al., 2012). Por outro lado, algumas evidências indicam que a baixa concentração de 25(OH)D poderia ser consequência da inflamação crônica e não causa (MANGIN et al., 2014).

Relatos da associação entre ingestão de vitamina D e composição de microbiota intestinal são recentes e estudos em modelos animais têm auxiliado nessa investigação. Camundongos *knockouts* para o VDR apresentam inflamação crônica no trato gastrointestinal; a ausência do VDR diminuiu o *homing* de linfócitos, resultando em inflamação mesmo diante de uma microbiota não-patogênica (CANTORNA, 2010). A microbiota fecal destes camundongos diferiu dos *wild-type*, sugerindo papel do VDR na regulação da composição e das funções da microbiota intestinal. Verificou-se que a ausência deste receptor e, portanto, da ação da vitamina D, determinava estado crônico de inflamação subclínica (YU et al., 2008) e que este efeito nos enterócitos ocorria pela via do NF κ B, que estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios (WU et al., 2010a). Estudo recente esclarece que, por um lado, a vitamina D regula a microbiota para manter a tolerância no trato gastrointestinal, e que, por outro, certas bactérias influenciam a expressão de VDR (FERGUSON et al., 2016). Recentemente, também foi relatado que outras vias importantes são afetadas em *knockouts* para o VDR, por exemplo, aquelas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos, infecções, câncer e outras doenças (JIN et al., 2015).

Metabólitos microbianos são detectáveis na urina, de modo que alterações no metaboloma urinário de animais suplementados com a vitamina têm permitido avaliar seu papel na regulação da microbiota (BORA et al., 2014). Estudo recente revelou alteração no metaboloma urinário de camundongos, indicando que a suplementação de vitamina D provocou mudanças benéficas na composição da microbiota intestinal de roedores, com menor proporção de *Proteobacteria* na composição microbiana, e manutenção da integridade da mucosa (CANTORNA et al., 2014). Coerentemente, verificou-se que camundongos deficientes desta vitamina eram ineficientes em atenuar os efeitos inflamatórios de LPS, endotoxina presente em bactérias gram-negativas (RYZ et al., 2015). Embora não seja claro o papel das diferentes bactérias que habitam o trato gastrointestinal, sabe-se que estas podem participar da fisiopatologia de doenças autoimunes e inflamatórias, apontando um caminho para o entendimento da relação da deficiência de uma substância imunomoduladora

– a vitamina D – com a composição da microbiota intestinal, e a resposta imune-inflamatória exacerbada (CANTAREL et al., 2015; CANTORNA et al., 2014).

Recentemente, documentou-se como o eixo microbiota intestinal – osso pode afetar o metabolismo ósseo (VILLA et al., 2016). Em camundongos submetidos a variações na ingestão de vitamina D na gestação e lactação, o *status* de vitamina D materno influenciou a saúde óssea da prole via microbiota intestinal, mediado por diminuição de LPS na microbiota de camundongos nascidos de mães com 25(OH)D adequada. Após o desmame, verificou-se que a prole alimentada com dieta de cafeteria, proveniente de mães com adequado *status* de vitamina D, tiveram menores níveis de LPS, além de maior volume ósseo.

Frente às constatações de que a combinação de baixas concentrações de vitamina D e certos padrões de microbiota poderia ser deletéria para a barreira intestinal, aprofundou-se na investigação sobre mecanismos pelos quais tal vitamina contribuiria para mantê-la saudável (FROICU & CANTORNA, 2007; KONG et al., 2008; ZHAO et al., 2012; ASSA et al., 2014). Estudos de pequeno porte sugeriram que baixa ingestão de vitamina D teria impacto na microbiota intestinal (MAI et al., 2009) e, de fato, a suplementação alterou favoravelmente composição da microbiota de indivíduos saudáveis, aumentando a diversidade e diminuindo a abundância relativa de *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas spp.* e *Escherichia/Shigella spp.*) (BASHIR et al., 2015). Dessa forma, levanta-se a expectativa de que a suplementação desta vitamina possa ser útil na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças em decorrência de efeitos benéficos sobre a microbiota intestinal (SZODORAY et al., 2008).

1.4 Deficiência de vitamina D, microbiota intestinal e doenças crônicas

Várias publicações têm chamado à atenção sobre a importância do *status* de vitamina D e da diversidade da microbiota intestinal desde o início da vida para a ocorrência de doenças crônicas, especialmente as abordadas a seguir (LITONJUA & DIANE, 2008; LY et al., 2011, WEISS, 2011; WEISS & LITONJUA, 2015).

➤ Doença inflamatória intestinal

Há evidências de que a colonização bacteriana comensal possa afetar a distribuição e expressão de VDR em células epiteliais intestinais, sugerindo uma interação dinâmica bactéria–receptor (WU et al., 2010a; JONES et al., 2013; LY et al., 2011). Estudo com camundongos *germ-free* comparados a *wild-type* revelou que os primeiros não absorvem nem metabolizam adequadamente vitamina D, sugerindo papel relevante da microbiota na regulação do *status* desta vitamina, o que poderia afetar a resposta imune e susceptibilidade a doenças inflamatórias intestinais (BORA et al., 2015).

Por outro lado, parece que as concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e o VDR regulariam a inflamação e a microbiota para garantir a homeostase no trato gastrointestinal (OOI et al., 2013; ASSA et al., 2014; CANTORNA et al., 2014; RAFTERY et al., 2015; CANTORNA, 2016). Achados em modelos animais *knockouts* para o VDR com doença inflamatória intestinal grave (CANTORNA et al., 2014) são coerentes com relatos em humanos portadores da doença e de deficiência de vitamina D (RAFTERY et al., 2015). Células T efetoras de animais *knockouts* apresentam alta produção de interferon γ (IFN- γ) e interleucinas no intestino, enquanto que nos *wild type* ocorre estímulo de células Treg e desativação de Th1 e Th17 com redução da inflamação intestinal (CANTORNA et al., 2014). Outros confirmaram que camundongos deficientes de vitamina D apresentavam resposta inflamatória intestinal exacerbada, o que acarretava perda de uma microbiota comensal, concluindo que ao atuar nestas células a vitamina atenuaria a inflamação e contribuiria para uma composição microbiana mais saudável (OOI et al., 2013; ASSA et al., 2014; CANTORNA et al., 2014; RYZ et al., 2015). O papel benéfico dessa vitamina na doença inflamatória intestinal poderia ser devido ainda à indução da expressão das proteínas de junção na mucosa, que fortalecem as *tight junctions* (KONG et al., 2008).

Vários estudos relatam benefícios de níveis elevados de vitamina D na prevenção e no tratamento da doença de Crohn (RAFTERY et al., 2015; CANTORNA, 2016) que parecem decorrer do estímulo dos genes de defensinas e do receptor *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2* (NOD2) (SOKOL et al., 2008), possivelmente reguladores da composição da microbiota intestinal (WEHKAMP et al., 2007). Defensinas são proteínas com capacidade anti-microbiana, enquanto o NOD2 desempenha papel importante na imunidade inata, sendo que sua função inadequada favorece infecções intestinais. Verificou-se que camundongos *knockouts* para o NOD2 apresentavam uma composição diferente da microbiota intestinal (REHMAN et al., 2011). Apesar de resultados animadores, ainda são necessários estudos para avaliar se deficiência de vitamina D poderia influenciar a composição da microbiota pela redução destes receptores.

Em suma, o conjunto de publicações revela que tanto a microbiota pode modular os efeitos da vitamina D sobre sistema imunológico no intestino, como o *status* de vitamina D pode afetar a composição bacteriana.

➤ **Esclerose múltipla**

A participação da microbiota na fisiopatologia da esclerose múltipla foi sugerida pelas observações de que estes pacientes se beneficiaram da suplementação de vitamina D, apresentando concomitantemente alteração da composição da microbiota intestinal (CANTAREL et al., 2015). Interpretou-se que o benefício seria decorrente do aumento de

Faecalibacterium e de *Coprococcus*, gêneros que já foram associados à redução do estado inflamatório em diversos estudos. Outros investigadores atribuíram à presença destes gêneros bacterianos a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), particularmente o butirato, conhecido por ser dotado de efeitos anti-inflamatórios (SEGAIN et al., 2000; SOKOL et al., 2008; PRYDE et al., 2002). Outro estudo envolvendo portadores de esclerose múltipla observou que o aumento dos níveis séricos de vitamina D associaram-se à maior proporção de *Ruminococcaceae*, também envolvido na produção de AGCC (TANKOU et al., 2015).

➤ **Câncer**

A ação da vitamina D no crescimento celular motivou investigações sobre seus efeitos anticancerígenos (HOLICK, 2004; FELDMAN et al., 2014). Foi relatada relação inversa entre suas concentrações séricas com diversos tipos de câncer (FELDMAN et al., 2014; JEONG et al., 2015; PARK et al., 2015), bem como com aumento da sobrevida em indivíduos com a doença (WEBB et al., 2015).

Uma vez que a microbiota influencia a função barreira intestinal e a resposta imune, sua deficiência compromete a homeostase intestinal. Dessa forma, uma permeabilidade intestinal aumentada a produtos tóxicos e endotoxinas como os LPS (CANTORNA et al., 2014; RYZ et al., 2015) poderia funcionar como estímulo à carcinogênese. De fato, a ativação de *toll-like receptors* (TLR) pelos LPS circulantes já foi associado a metástases, como no caso de carcinoma papilar da tiróide, câncer colorretal e de mama (ARTHUR et al., 2012; NAMBA et al., 2007; HSU et al., 2011). Além disso, há evidências de que LPS poderiam aumentar a invasão no câncer de pulmão (LIU et al., 2015).

➤ **Doenças cardiometabólicas**

Investigações sobre o envolvimento da microbiota intestinal entre os mecanismos pelos quais a deficiência de vitamina D se associa a doenças cardiometabólicas se justificaram pelo fato destas apresentarem inflamação subclínica como base fisiopatológica.

Demonstrou-se que a deficiência de 1,25(OH)₂D aumenta a produção de citocinas e a permeabilidade intestinal a endotoxinas, particularmente os LPS (KONG et al., 2008), que promovem inflamação crônica sistêmica (CARICILLI, 2011; MORAES et al., 2014). A ligação de LPS a TLR-4 em diferentes tecidos determina infiltração de macrófagos e produção de citocinas inflamatórias, dentre as quais destaca-se o TNF- α , que está diretamente relacionado à resistência à insulina por fosforilar em serina o substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), comprometendo a cascata de sinalização insulínica (PRADA et al., 2005).

No que se refere à obesidade e diabetes mellitus tipo 2, vários estudos têm sugerido a participação fisiopatogênica da microbiota intestinal (QIN et al., 2012; EVERARD et al., 2013; DERRIEN et al., 2016). Indivíduos com disglícemia e hipovitaminose D quando

suplementados com vitamina D tiveram redução na abundância relativa de *Roseburia*, *Blautia*, *Ruminococcus* e *Dorea* (CIUBOTARU et al., 2015). Considerando que os gêneros *Dorea* e *Blautia* já tinham sido associados a aumento da permeabilidade intestinal (LECLERCQ et al., 2014), os autores sugeriram que a hiperpermeabilidade intestinal e a inflamação indicavam a conexão entre a microbiota, vitamina D e metabolismo glicídico. A ideia é corroborada pelas demonstrações de que a suplementação da vitamina D preserva a barreira intestinal (KONG et al., 2008; MEEKER et al., 2016).

Também há indícios do envolvimento da vitamina D na homeostase do sistema cardiovascular por intermédio da regulação microbiota e do estado inflamatório (BARENGOLTS, 2013; ADAMCZAK et al., 2014). Além de atuar no controle da produção de citocinas inflamatórias, esta vitamina tem efeito inibitório na proliferação de músculo liso vascular e no sistema renina-angiotensina (ZITTERMANN et al., 2005). Ainda, faz-se necessário aprofundar o conhecimento sobre o conjunto de mecanismos pelos quais essa vitamina modularia a microbiota intestinal, estado inflamatório e o perfil de risco para doenças crônicas.

Uma vez que a composição da microbiota intestinal influencia a exposição do organismo aos LPS, gerando inflamação e resistência à insulina, conclui-se que deva participar no desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares.

1.5 Microbiota intestinal na gênese de doenças cardiometabólicas

A composição da microbiota sofre a influência de fatores ambientais, em particular da alimentação que, por sua vez, é determinante da adiposidade corporal, principal fator de risco para doenças cardiometabólicas. A relevância de se compreender sua gênese baseia-se no fato de serem as principais doenças crônicas não-transmissíveis da atualidade. Em 2010, foram responsáveis por 64% dos óbitos e para 2050 projetam-se 15,4 milhões de mortes por estas causas (ABEGUNDE et al., 2007). Também no Brasil, as doenças cardiometabólicas aparecem entre as líderes de mortalidade (BRASIL, 2010).

Investigações recentes sobre os mecanismos pelos quais hábitos de vida não-saudáveis (alimentação inadequada, sedentarismo, fumo, baixa exposição solar) participam na gênese de doenças cardiometabólicas têm reforçado o envolvimento da microbiota intestinal. O padrão dietético atual do mundo ocidental, rico em gorduras saturadas e pobre em fibras, que eleva o risco cardiometabólico, associa-se a composições bacterianas que favorecem um estado pró-inflamatório e de resistência à insulina (QIN et al., 2012; EVERARD et al., 2013). Por outro lado, bons hábitos alimentares estão relacionados a uma composição mais saudável da microbiota, conferindo proteção cardiometabólica. Em modelo animal, a

abundância de *A. muciniphila* foi associada a dieta rica em fibras, determinando aumento na espessura da camada de muco e melhora da permeabilidade intestinal (EVERARD et al., 2013), efeitos desejáveis para reduzir a exposição a toxinas. Sua concentração no intestino tem sido inversamente associada a doenças como doença inflamatória intestinal e desordens metabólicas (DERRIEN et al., 2016). Resultados do nosso grupo sugerem que a *A. muciniphila* favorece o metabolismo da glicose, sendo sua abundância regulada pelo IFN- γ (GREER et al., 2016).

Entre os mecanismos mais estudados na relação da microbiota com fenótipos de risco cardiometabólico, destaca-se a endotoxemia metabólica decorrente da translocação dos LPS para a circulação sistêmica. A microbiota intestinal representa um grande reservatório desta endotoxina, especialmente em indivíduos que consomem dieta com alto teor de gorduras. LPS no intestino induzem inflamação a partir de sua ligação ao complexo CD14 e ao TLR4 de células imunes inatas, funcionando como gatilho para síntese de citocinas pró-inflamatórias (CANI et al., 2007; CANI & DELZENNE, 2007; CANI et al., 2008). Modelos animais mostraram que a dieta hiperlipídica relaciona-se à maior permeabilidade intestinal de LPS para circulação, desencadeando um estado pró-inflamatório sistêmico crônico (CANI et al., 2008). O tecido adiposo responde à endotoxemia metabólica via TLR4, aos quais também se ligam ácidos graxos saturados. A ativação do NF-KB resulta na produção de mediadores inflamatórios, que deterioram vias de sinalização insulínica e geram resistência à insulina predispondo às doenças cardiometabólicas.

O *fasting-induced adipocyte factor* (FIAF) é um inibidor da lipase de lipoproteína, produzido pelo intestino, fígado e tecido adiposo que, quando suprimido pela ação da microbiota intestinal determina absorção de ácidos graxos e acúmulo de triglicérides nos adipócitos (TILG et al., 2009). Animais deficientes de FIAF, quando alimentados com dieta hiperlipídica, ganham mais peso corporal que os *wild-type*, e apresentam maiores concentrações de leptina e insulina (BÄCKHED et al., 2007). Apesar das evidências de participação no controle da adiposidade corporal, não está claro se o efeito é mediado por bactérias intestinais.

Relatou-se que a composição da microbiota varia entre indivíduos com ou sem obesidade ou diabetes mellitus tipo 2 (DIBAISE et al., 2008; LEY et al., 2006; CANI & DELZENNE, 2007). Em indivíduos obesos com resistência à insulina descreveu-se um predomínio do filo *Firmicutes* sobre o *Bacteroidetes* (LEY et al., 2006; GOODMAN et al., 2011; SANTACRUZ & DALMAU, 2009), perfil este associado à endotoxemia metabólica (CANI & DELZENNE, 2007; CANI et al., 2008). Apesar de estudos relacionarem a microbiota ao estado nutricional, é necessário aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela associação (MORAES et al., 2014).

Certas bactérias são capazes de degradar os carboidratos complexos tendo como produtos os AGCC. Estes fornecem energia, alteram o pH intestinal e podem influenciar a composição da microbiota. É possível, embora controverso, que tais ácidos graxos funcionem como substrato para lipogênese hepática favorecendo a deposição de gordura (CARICILLI et al., 2013; VELLOSO et al., 2015; MORRISON & PRESTON, 2016). Em particular, demonstrou-se que o butirato era capaz de induzir a expressão de genes que codificam para proteínas de junção (occludina e claudina) na mucosa intestinal, necessárias para integridade da barreira intestinal. Além disso, o butirato exerce localmente ação anti-inflamatória por inibição do fator de transcrição NF- κ B (MORRISON & PRESTON, 2016).

AGCC, ao se ligarem a receptores de ácidos graxos livres (FFAR), expressos em células enteroendócrinas L, também estimulam a produção de *glucagon-like-peptide* (GLP) e peptídeo YY (PYY). Este último, além de ações locais na motilidade intestinal que propiciam maior absorção de nutrientes, atua a nível hipotalâmico inibindo neurônios orexígenos e promovendo saciedade (KASUBUCHI et al., 2015). O GLP-1, por sua vez, promove a secreção de insulina e colabora para saciedade regulando o esvaziamento gástrico. FFAR2 é expresso em células imunes, influenciando a resposta inflamatória. A modulação do sistema imune pelos AGCC pode ser um dos mecanismos pelos quais dietas ricas em fibras alimentares trariam benefícios em doenças cardiometabólicas (KASUBUCHI et al., 2015). Tal sugestão é coerente com achados em camundongos ob/ob alimentados com prebióticos (fibras alimentares promotoras do crescimento de bactérias benéficas), nos quais o GLP aumentou a expressão de proteínas de junção celular e reduziu as concentrações séricas de LPS e de marcadores inflamatórios (CANI et al., 2009a), e com achados preliminares em seres humanos (CANI et al., 2009b).

Outro mecanismo influenciado pela microbiota envolve a enzima *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), que regula o metabolismo lipídico e glicídico em tecidos como o hepático e musculatura esquelética. Quando a AMPK é inibida, ativa processos que predispõem ao ganho de peso. As evidências vêm de estudo com camundongos *germ-free* que, mesmo submetidos a uma dieta hipercalórica, mantiveram peso e apresentaram maior oxidação muscular de ácidos graxos e melhor sensibilidade à insulina, efeitos estes atribuídos à ativação da AMPK (BÄCKHED et al., 2007). Ao contrário, animais com a microbiota presente suprimiram a oxidação de ácidos graxos, aumentaram de peso e apresentaram resistência à insulina. Tal ativação da AMPK poderia decorrer de AGCC, especialmente o butirato, por aumentar a expressão do co-ativador do *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) (KASUBUCHI et al., 2015), reconhecido por desempenhar papel na regulação do metabolismo glicídico e lipídico.

Por outro lado, há modelos experimentais indicando que certos AGCC poderiam ser deletérios, predispondo à obesidade e à síndrome metabólica. Animais submetidos à dieta hiperlipídica elevaram o acetato circulante, que estimulou a síntese de grelina e ativou o sistema parassimpático, responsável pelo estímulo das células β para produção insulínica (PERRY et al., 2016). A combinação de elevação das concentrações de grelina e de insulina resultou em aumento do apetite e da ingestão alimentar, tendo como consequências a obesidade e distúrbios metabólicos.

Proteínas após clivagens também podem ser utilizadas pelas bactérias principalmente no cólon distal, onde há disponibilidade limitada de carboidratos. Deste processo resultam aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) e, posteriormente, produtos finais tais como os compostos fenólicos, típicos da sua degradação. Bactérias que reconhecidamente metabolizam aminoácidos no intestino pertencem à classe *Clostridia* (NEIS et al., 2015). Apesar de diversos estudos relatarem associações entre altas concentrações de BCAAs e melhora de certos parâmetros metabólicos, os achados são ainda controversos sobre o metabolismo da glicose (NEIS et al., 2015; YOON, 2016). É possível que concentrações constantemente elevadas destes aminoácidos possam ativar o mTORC1, resultando em resistência à insulina.

Os ácidos biliares também apresentam efeito direto sobre a microbiota intestinal, favorecendo a proliferação de certas comunidades bacterianas, e indiretos atuando como integradores endócrinos, ativando receptores que protegem contra depósitos de gordura no fígado e músculo (NIE et al., 2015; CERDÁ et al., 2016). Ácidos biliares secundários são capazes de se ligar a receptor acoplado à proteína G presente nas células enteroendócrinas. A ativação deste receptor regula o metabolismo energético em tecido muscular e adiposo marrom (CERDÁ et al., 2016), podendo, portanto, alterar a adiposidade corporal. Dessa forma, além destas células enteroendócrinas responderem à exposição de certos nutrientes na luz intestinal, estas também são estimuladas por ácidos biliares, atuando na manutenção da homeostase metabólica (THOMAS et al., 2009).

Apesar das evidências da participação da microbiota intestinal na fisiopatogênese de doenças cardiometabólicas, ainda são grandes as lacunas neste conhecimento. Considerando que as doenças cardiometabólicas estão entre as principais causas de morte na atualidade, são relevantes a identificação e o combate de seus fatores de risco. Estudos de coorte, que permitam observar prospectivamente a relação entre o consumo alimentar, o perfil da microbiota fecal e biomarcadores, têm potencial para elucidar questões fisiopatológicas e propor estratégias de prevenção.

1.6 O NutriHS

O *Nutritionist Health Study* – NutriHS é uma coorte de estudantes de nutrição e nutricionistas iniciada em 2014, que busca avaliar periodicamente seus hábitos de vida e outros possíveis fatores de risco (<http://www.fsp.usp.br/nutrihs>).

Experiências estrangeiras de coortes de profissionais da saúde têm contribuído para identificação de determinantes de problemas de saúde pública e à proposição de meios para controle. Pesquisadores escolheram esta amostra em função do nível educacional, possibilitando responder com precisão questionários técnicos e motivação para participar de estudo de longa duração. O *Nurses' Health Study* – NHS (<http://www.channing.harvard.edu/nhs/>) aprofundou o conhecimento do papel de hábitos de vida e medicamentos na saúde de mulheres enfermeiras americanas (COLDITZ & HANKINSON, 2005). As investigações iniciais baseavam-se em questionários validados, com foco em câncer e no efeito dos contraceptivos orais, sendo acrescentados outros desfechos e coletas laboratoriais ao longo do tempo (NHS 2 e 3). Na mesma linha, o *Health Professionals Follow-Up Study* – HPFS (<http://www.hsph.harvard.edu/hpfs/>) tem buscado investigar aspectos da saúde do homem (Wilson et al., 2011). No nosso meio, iniciativas semelhantes são escassas.

Dessa forma, nosso Grupo iniciou a primeira fase do estudo de estudantes e egressos de cursos de nutrição da FSP-USP e de instituições parceiras cujos objetivos atuais são:

- ✓ Analisar os hábitos de vida (alimentação, atividade física, tabagismo) o perfil antropométrico e a composição corporal ao longo do curso;
- ✓ Avaliar o perfil de fatores de risco cardiovascular tradicionais e novos marcadores e sua associação com a composição corporal;
- ✓ Analisar a composição da microbiota intestinal e sua associação com hábitos alimentares e com novos marcadores de risco cardiometabólico;
- ✓ Analisar a associação de dados informados sobre a gestação e primeira infância com fatores de risco cardiovascular tradicionais e marcadores de risco cardiometabólico, com ênfase na microbiota intestinal.

A obtenção de dados auto-referidos ocorreu por preenchimento eletrônico que permitiu procedimentos padronizados e análises ágeis. Particularmente quanto ao consumo alimentar, o Grupo parte de pressuposto de que a qualidade da informação coletada deva ser elevada por envolver estudantes de nutrição, e ainda que a evolução dos conhecimentos no curso deveria impactar favoravelmente em biomarcadores, indicativos de alimentação saudável.

O fato da FSP-USP abrigar um Curso de Graduação em Nutrição representou condição propícia para o desenvolvimento do NutriHS. Considerando-se a duração de cinco anos do curso, a contínua admissão de novos graduandos, a viabilidade de resgatar dados de egressos, bem como de seguir os recém-graduados, abriu a oportunidade ímpar de iniciar uma coorte de nutricionistas da FSP-USP. Pelos contatos com pesquisadores de outros centros universitários que oferecem graduação em nutrição, a amostra inicial do NutriHS pôde ser substancialmente incrementada. A obtenção de biomarcadores na linha de base tem proporcionado investigação de fatores de risco ou proteção para doenças cardiometabólicas, bem como de outros marcadores pouco explorados.

O NutriHS poderá se tornar um estudo-referência no país para pesquisas relacionadas ao impacto na saúde de hábitos de vida, particularmente referentes à alimentação e nutrição, que estão entre as maiores preocupações de órgãos internacionais de saúde.

1.7 Justificativa e hipótese

Apesar da vitamina D ser alvo importante de pesquisas, o conhecimento a respeito da sua ampla gama de funções ainda apresenta lacunas importantes, especialmente quanto às suas interações com o sistema imune e doenças metabólicas e cardiovasculares. Existem evidências de que o *status* de vitamina D do hospedeiro interfere no efeito da microbiota intestinal sobre o sistema imune. Sua deficiência acarreta disbiose intestinal; é possível que o *status* adequado desta vitamina associe-se a uma composição saudável da microbiota, reduzindo a endotoxemia, inflamação e resistência à insulina. O quanto padrões de dieta influenciariam no equilíbrio “vitamina D – microbiota – inflamação” foi pouco explorado.

Respostas a estas dúvidas são desejáveis considerando o papel tanto da vitamina D como da microbiota intestinal na gênese de DCNTs como as cardiometabólicas, que estão entre as principais causas de óbito na atualidade. A primeira fase do NutriHS oferece oportunidade ímpar de obter dados para investigar tais associações.

Este estudo teve como hipótese principal a existência de associação entre as concentrações circulantes de 25(OH)D com a composição da microbiota fecal e com o perfil de risco cardiometabólico. Com base na sua propriedade imunomoduladora, especulamos que a vitamina D regularia a inflamação, contribuindo para manutenção de composição bacteriana mais saudável. A homeostase da microbiota, por sua vez, minimizaria a inflamação sistêmica, reduzindo o risco de doenças a ela associadas.

2 OBJETIVOS

Em adultos jovens participantes do NutriHS, foram testadas associações do consumo de vitamina D e da sua concentração sérica com:

- o perfil de microbiota fecal,
- marcadores de inflamação e de resistência à insulina,
- perfil de risco cardiometabólico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

No NutriHS estão sendo incluídos, até dezembro de 2016, estudantes e egressos de cursos de Nutrição da FSP-USP e de instituições parceiras, os quais, após assinarem eletronicamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 1). O único critério de exclusão para participação no NutriHS é a presença de gestação. Os meios de obtenção de amostras, análises e divulgação dos resultados seguem as normas do Conselho Nacional de Saúde, no que se refere à Ética em Pesquisa com Seres Humanos e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da FSP-USP (Anexo 2).

Para o presente estudo, foi constituída uma amostra de conveniência dos 150 primeiros participantes inscritos que apresentaram dados completos sobre as variáveis de interesse para este estudo, com idade entre 18 e 40 anos. Os critérios de exclusão foram: uso de antibióticos, probióticos, prébióticos ou metformina nos últimos seis meses e episódios de diarreia nas duas semanas que antecederam a entrega da amostra de fezes.

3.2 Protocolo

Os dados do NutriHS foram coletados em etapas, sendo a primeira delas a divulgação e o contato inicial com os potenciais participantes do estudo, de maneira presencial e via web (*e-mail* e *Facebook*). Os objetivos foram esclarecidos e os interessados foram orientados a acessar a página do estudo que está vinculada ao *site* da FSP-USP. Neste, o participante cadastra senha de acesso que o conduz ao *link* do TCLE. Após clicar assegurando a concordância com todos os termos, passa-se ao preenchimento *on-line* dos questionários (Anexo 3). Este *software*, denominado de e-NutriHS, permite contínuo armazenamento de dados, inclusive aqueles oriundos do questionário de frequência alimentar (QFA). Ao término do preenchimento dos questionários, os participantes são direcionados à página de agendamento da visita presencial, na qual é realizada a avaliação clínica e coleta de material biológico.

A interface do e-NutriHS dos pesquisadores permite a conferência *on-line* dos dados coletados eletronicamente com o intuito de identificar respostas incompletas e/ou inconsistentes, são checadas e alteradas durante a visita presencial. Um *e-mail* contendo orientações sobre a coleta presencial é enviado ao participante previamente.

A etapa presencial ocorre no Centro de Saúde da FSP-USP, onde os participantes são submetidos a aferições da pressão arterial, avaliação antropométrica e coleta de sangue após jejum de 12 horas e de fezes. As amostras de sangue foram colhidas no inverno para 30

participantes, 54 na primavera, 37 no outono e para 30 no verão. Parte das análises laboratoriais foram realizadas de imediato, localmente, e alíquotas destes materiais foram estocadas a -80°C para análises posteriores.

3.3 Variáveis de interesse

- ***Antropometria e pressão arterial***

O peso foi obtido em balança digital (precisão de 100 g) e a estatura em estadiômetro de parede (precisão de 0,1 cm), utilizados para a determinação do índice de massa corporal (IMC). A circunferência da cintura foi obtida com o indivíduo ereto, usando fita métrica, flexível e inelástica, com precisão de 0,1 cm, localizando-se o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca.

A pressão arterial (PA) foi aferida por aparelho automático (Omron model HEM-712C, Omron Health Care Inc, USA). Três medidas de pressão arterial foram realizadas com adequação do manguito à circunferência braquial, após cinco minutos de repouso na posição sentada, havendo intervalo de dois minutos entre elas. Os valores finais de pressão sistólica e diastólica foram aqueles resultantes da média aritmética das duas últimas medidas. Pressão arterial (PA) média foi calculada usando a fórmula: $PA \text{ diastólica} + 1/3 (PA \text{ sistólica} - PA \text{ diastólica})$ (GUYTON & HALL, 2006).

- ***Avaliação de hábitos de vida: alimentação e atividade física***

A avaliação dos hábitos alimentares foi realizada por meio de QFA previamente validado (Grupo de pesquisa de avaliação do consumo alimentar - <http://www.gac-usp.com.br/materiais-de-apoio.php>). Este QFA contempla o hábito alimentar dos indivíduos no período de um ano, identificando a porção individual usual de 102 itens alimentares. Os dados foram processados diretamente no e-NutriHS, com cálculo imediato do equivalente a um dia alimentar e fornecimento de dados de macro e micronutrientes por alimento e total diário, de acordo com os dados de composição nutricional do USDA *National Nutrient Database for Standard Reference* (<http://ndb.nal.usda.gov/>). O software de análise da dieta foi desenvolvido especificamente para o NutriHS. O montante de cada alimento, referido pelo participante, foi transformado em equivalente em gramas por dia. Para cálculo da ingestão de vitamina D derivada de leite e derivados, empregou-se o leite não-fortificado e considerou-se o iogurte natural, sem frutas. A suplementação relatada pelos participantes foi adicionada ao cálculo. O relatório da dieta pode ser emitido em quantidade diária de energia, macronutrientes (em valores absolutos ou relativos à energia total), micronutrientes e/ou grupo de alimentos.

A atividade física foi avaliada pelo Questionário Internacional de Atividade Física, versão curta, disponibilizada *on-line* previamente validado (CRAIG et al., 2003; MATSUDO et al., 2001). Para fins deste estudo, utilizou-se a atividade física total, expressa em minutos por semana.

3.4 Procedimentos analíticos

O perfil lipídico (colesterol total, HDL-c e triglicérides) foi analisado por métodos colorimétricos e enzimáticos e o LDL-c foi calculado pela equação de Friedwald. A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase e a insulina por ensaio imunofluorimétrico, baseado em anticorpo monoclonal (MONOBIND Inc., Lake Forest, CA, USA). A resistência à insulina foi estimada pelo índice HOMA-IR (MATTHEWS et al., 1985).

A proteína C reativa foi determinada por ensaio imunoenzimático quimioluminescente e as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 pelo sistema Multiplex® que emprega ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), LPS por ELISA (MyBioSource, San Diego, CA).

A concentração de 25(OH)D total foi determinada por eletroquimioluminescência (Elecsys 2012, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). O limite de detecção do ensaio de 25(OH)D foi 3,0 ng/mL; coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 3,3% e 9,9%, respectivamente. As categorias de *status* de vitamina D (suficiência, insuficiência ou deficiência) foram definidas de acordo com a *Endocrine Society* e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (HOLICK et al., 2011; MAEDA et al, 2014).

A extração e quantificação do DNA das bactérias fecais foram feitas através do Maxwell® 16 DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A composição taxonômica das comunidades bacterianas foi obtida por sequenciamento de amplicons da subunidade 16S do gene rRNA (16S rRNA), região V4, no equipamento Illumina® MiSeq, gerando pares de sequências de 250 bases cada. As construções das bibliotecas de sequenciamento do DNA foram realizadas segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) e seguiram os passos descritos por Caporaso et al. (2012), utilizando os iniciadores 515F e 806R. Em média, foram produzidas cerca de 200 mil sequências por amostra. As sequências produzidas passaram por um filtro de qualidade para remoção de bases nas extremidades com valores de Phred menores do que 5. Os demais nucleotídeos foram filtrados por uma janela deslizante de 4 bases, em que a média da qualidade das bases deveria ter um valor de Phred maior que 15. Tal filtro de qualidade foi executado utilizando a ferramenta Trimmomatic (BOLGER et al., 2014). Os pares de sequências já filtrados foram juntados de modo que formassem um fragmento único

representando cada amplicon sequenciado. Para tal, foi utilizado a ferramenta FLASH (MAGOČ & SALZBERG, 2011), exigindo sobreposição mínima de 30 bases entre os fragmentos direto e reverso. Cada um dos fragmentos foi agrupado a uma sequência do banco de dados GreenGenes 13.5, utilizando o script *pick_otu* e uma identidade de 97%. A sequência representativa de cada agrupamento foi classificada taxonomicamente utilizando a referência do mesmo banco GreenGenes. Todas as etapas de agrupamento e classificação foram realizadas utilizando scripts do pacote Qiime v1.8 usando a base de dados GreenGenes.

Os procedimentos de bioinformática foram realizados numa parceria com a Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Belo Horizonte, MG (Prof. Gabriel R. Fernandes). As tabelas com a quantificação das OTUs foram utilizadas nas demais etapas.

3.5 Análise estatística

Inicialmente foi verificada a distribuição das variáveis usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis foram expressas como média e desvio-padrão, mediana e intervalo interquartil ou porcentagem. Quando a distribuição não era normal, as variáveis sofreram transformação logarítmica, função inversa ou quadrada antes das análises (especificadas em cada tabela), com retorno à escala original nas tabelas.

O consumo de vitamina D e a concentração de 25(OH)D foram estratificados em tercís. ANOVA (ou teste de Kruskal-Wallis quando indicado) foi usada para comparar variáveis entre os tercís com posterior emprego da análise de Bonferroni para localizar as diferenças. Comparações de médias entre 2 categorias foram comparadas por teste t de Student para amostras independentes. Coeficiente de Pearson ou Spearman foi usado para testar as correlações entre o consumo de vitamina D (ajustada para 1.000 kcal) ou concentração de 25(OH)D e outras variáveis.

O pacote DESeq2 (LOVE et al., 2014) foi utilizado para a identificação de diferença na abundância dos grupos taxonômicos entre diferentes grupos. Esse pacote está disponível para o ambiente R através do repositório Bioconductor. O DESeq2 utiliza a tabela de quantificação dos táxons por amostra e os associa a metadados qualitativos dessas amostras. Através de testes assumindo uma distribuição binomial negativa dos dados, o pacote entrega uma análise de abundância diferencial dos táxons em diferentes condições experimentais. A variação da abundância e a confiabilidade estatística é conferida por um teste FDR de Benjamini e Hochberg. Utilizando-se o DESeq2 obteve-se o *log2 fold change* (Log2FC) que

representa a diferença de certa OTU contra o nível de referência. Se a diferença de frequência entre os grupos é igual a zero indica que não há diferença entre as médias dos grupos.

Para análise da diversidade microbiana, foi realizada a “beta diversidade” que representa quais indivíduos têm estrutura mais parecida como um todo. Na representação gráfica de Jensen-Shannon em *principal coordinates analysis* (PCoA), os pontos identificam os indivíduos da amostra, que, quando próximos uns aos outros, significa que apresentam estruturas semelhantes.

Apenas aquelas OTUs cujas frequências relativas foram maiores que 0,1% e estiveram presentes nas amostras de fezes de 80% dos participantes foram consideradas nas análises de correlação. Os dados de OTU no nível de gênero estão sendo apresentados e expressos em abundância relativa à totalidade deles. Coeficiente de Spearman foi usado para testar correlações entre as concentrações de 25(OH)D e a abundância de gêneros bacterianos.

Regressão linear múltipla foi empregada para avaliar associação independentes das concentrações de 25(OH)D (variável resposta) com as demais variáveis. Os modelos tiveram a finalidade de investigar especialmente a associação entre o status da vitamina D com a microbiota intestinal, ajustadas para variáveis de confundimento (idade, sexo, estação do ano e IMC). A concentração de vitamina D no modelo foi ajustada para a primavera, estação que apresentou significativamente menores níveis séricos de 25(OH)D em relação as demais. Foram posteriormente acrescentadas ao modelo, uma a uma, as variáveis inflamatórias com valor de “p” menor que 0,20 na análise univariada. Tais variáveis foram interpretadas como explicativas da associação (via fisiopatogênica). O valor de p significativo foi fixado em 5%.

A análise estatística foi realizada com o auxílio por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*®, versão 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA) e o R foi usado para as análises de microbiota.

Uma versão mais sintética deste capítulo bem como dos demais pode ser encontrada no Anexo 4 que contém o manuscrito aceito para publicação na ***Metabolism, Clinical and Experimental*** (Ref. METABOLISM-D-16-00854R1, title: Gut microbiota interactions with the immunomodulatory role of vitamin D in normal individuals. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.007>)

4 RESULTADOS

A amostra foi composta por 90,7% de mulheres, com idade média de $24,9 \pm 5,8$ anos e IMC médio de $23,6 \pm 4,7$ kg/m². Cerca de 28,5% dos participantes tinham sobrepeso ou obesidade; todos negaram hipertensão ou diabetes mellitus. Quatro participantes apresentaram glicose venosa de 100, 101, 105 e 106 mg/dL, mas posteriores medidas de glicose capilar em jejum comprovaram tolerância normal à glicose.

Quanto à ingestão de vitamina D (média de $6,98 \pm 3,73$ µg/dia), 81,0% dos indivíduos consumiam abaixo do recomendado. As principais fontes de ingestão de vitamina D foram leite e derivados e ovo. Sem suplementação, o maior consumo foi 20,3 µg/dia. Doze participantes referiram suplementação vitamínica (dez usavam 5 µg/dia e os outros dois 30 µg/dia de vitamina D).

A média da concentração de 25(OH)D foi de $23,9 \pm 9,7$ ng/mL; 24,0% participantes estavam suficientes de vitamina D (≥ 30 ng/mL), 39,3% insuficientes (≥ 20 a 30 ng/mL) e 36,7% deficientes (< 20 ng/mL). Os valores foram significativamente menores quando o sangue foi coletado durante a primavera em comparação com as outras estações do ano ($20,3 \pm 8,0$ versus $25,8 \pm 10,0$ ng/mL, $p = 0,01$). Quando a concentração de 25(OH)D foi comparada entre as categorias de IMC ($\geq$ ou < 25 kg/m²), os valores médios não diferiram entre si.

Na Tabela 1 estão representados os dados demográficos e clínicos de acordo com os tercís de ingestão de vitamina D. Os participantes do terceiro tercíl eram significativamente mais velhos do que os outros. Valores das medidas antropométricas, pressão arterial, e dados bioquímicos não diferiram entre os tercís de ingestão. A concentrações média de 25(OH)D aumentou do primeiro para terceiro tercíl ($21,5 \pm 9,0$ versus $23,5 \pm 10,0$ versus $26,5 \pm 9,6$ ng/mL, respectivamente, $p = 0,013$). A concentração de LPS foi maior, com significância limítrofe, no segundo tercíl de ingestão de vitamina D comparado aos demais. Não foram observadas diferenças nas concentrações médias de marcadores inflamatórios entre os tercís.

Tabela 1. Número (porcentagem entre parênteses) e médias ($\pm$ desvio padrão) ou medianas (intervalo interquartil) dos dados demográficos e clínicos de acordo com os tercís de ingestão de vitamina D, em μg por dia.

	Tercil 1 1,66 – 4,95	Tercil 2 4,97 – 7,18	Tercil 3 7,56 – 39,87	p-valor
Mulheres	48 (96)	45 (90)	43 (86)	0,224
Caucasoides	32 (64)	37 (74)	31 (62)	0,395
Renda < 5 salários mínimos	31 (62)	30 (60)	28 (56)	0,824
Idade (anos)	21 (20-26)	22 (21-27)	25 (22-30) ^c	0,004
Atividade física (min/semana)	425 (145-885)	360 (123-667)	460 (176-1005)	0,585
IMC (kg/m^2) ^Ω	23,2 $\pm$ 4,2	22,8 $\pm$ 4,2	24,2 $\pm$ 4,0	0,116
Circunferência da cintura (cm) [€]	76,5 $\pm$ 12,6	76,0 $\pm$ 10,2	79,4 $\pm$ 9,9	0,084
PA média (mmHg) ^{&}	84,3 $\pm$ 9,8	84,0 $\pm$ 9,2	82,5 $\pm$ 14,9	0,990
Glicemia (mg/dL)	82,1 $\pm$ 10,6	82,0 $\pm$ 7,3	81,1 $\pm$ 9,2	0,828
Insulina ($\mu\text{UI}/\text{mL}$)	8,8 (6,6-12,6)	9,0 (7,2-13,3)	8,9 (6,1-12,9)	0,569
HOMA-IR	1,8 (1,3-2,6)	1,9 (1,4-2,6)	1,7 (1,1-2,4)	0,536
Colesterol não-HDL (mg/dL)	121,8 $\pm$ 31,7	117,4 $\pm$ 32,6	111,4 $\pm$ 29,8	0,269
25(OH)D (ng/mL) ^{&}	21,5 $\pm$ 9,0	23,5 $\pm$ 10,0	26,5 $\pm$ 9,6 [#]	0,013
Lipopolissacarídeos (pg/mL) ^{&}	9,8 $\pm$ 4,6	11,9 $\pm$ 7,8	9,7 $\pm$ 4,1	0,055
Proteína C reativa (mg/L)	3,0 (2,2-3,9)	2,7 (2,0- 3,4)	2,7 (2,1-3,6)	0,280
Interleucina-6 (pg/mL)	9,0 (6,7-11,7)	9,3 (6,7-12,5)	9,7 (7,6-11,5)	0,715
Interleucina-10 (pg/mL)	4,1 (2,7-5,7)	4,4 (2,7-6,9)	3,7 (2,2-6,3)	0,571
TNF- α (pg/mL)	42,0 (34,1-60,1)	45,7 (36,4-56,5)	46,5 (37,2-58,0)	0,597
Selectina-E (pg/mL)	17,8 (11,5-24,4)	17,6 (12,6-23,3)	19,4 (13,0-24,8)	0,877
Interferon- γ (pg/mL)	0,3 (0,2-0,6)	0,3 (0,2-0,7)	0,3 (0,2-0,4)	0,517

IMC, índice de massa corporal PA, pressão arterial TNF- α , tumor necrosis factor-alpha
ANOVA seguido por teste de Bonferroni *post hoc* ou teste de Kruskal-Wallis ou teste de qui-quadrado de Pearson para frequências

[&] Transformação logarítmica para análise

^Ω Função inversa para análise

[€] Elevado ao quadrado para análise

[#] p < 0,05 *versus* tercil 1

^c p < 0,05 *versus* tercil 2

A ingestão de vitamina D bruta ($r = 0,212$; $r = 0,010$) e ajustada por 1.000 kcal correlacionaram-se com sua concentração sérica ($r = 0,220$; $p = 0,008$; Figura 1).

Figura 1. Correlação entre ingestão de vitamina D bruta (painel A) e ajustada por 1000 kcal (painel B) e concentrações de 25(OH)D na totalidade da amostra estudada. Transformação logarítmica para análise por coeficiente de Pearson.

Estratificando as variáveis em categorias de 25(OH)D, não foram observadas diferenças entre os tercís, embora houvesse diminuição nas médias de PCR, IFN- γ , e de HOMA-IR foram com significância limítrofe. Além disso, foi observada tendência significativa na diminuição dos valores médios de LPS à medida que os tercís de 25(OH)D aumentavam (Tabela 2).

Tabela 2. Número (porcentagem entre parênteses) e médias ($\pm$ desvio padrão) ou medianas (intervalo interquartil) de dados demográficos e clínicos de acordo com tercís de concentrações de 25(OH)D, em ng por mililitro.

	Tercil 1 4,21 – 18,93	Tercil 2 18,93 – 26,48	Tercil 3 26,48 – 61,30	p-valor
Mulheres	44 (88)	43 (86)	49 (98)	0,087
Caucasoides	31 (62)	34 (68)	35 (70)	0,677
Renda < 5 salários mínimos	30 (60)	32 (64)	27 (54)	0,592
Idade (anos)	22,0 (20,0-29,6)	24,0 (21,0-30,3)	23,0 (21-26,0)	0,240
Atividade física (min/semana)	505 (157-990)	360 (127-685)	375 (163-732)	0,468
IMC (kg/m ²) ^Ω	23,4 $\pm$ 4,3	23,9 $\pm$ 4,2	22,8 $\pm$ 3,8	0,387
Circunferência da cintura (cm) [€]	78,4 $\pm$ 13,1	78,8 $\pm$ 10,8	74,6 $\pm$ 8,3	0,162
PA média (mmHg) ^{&}	85,2 $\pm$ 9,6	81,7 $\pm$ 14,4	83,8 $\pm$ 10,1	0,626
Glicemia (mg/dL)	82,5 $\pm$ 8,4	82,2 $\pm$ 9,9	80,6 $\pm$ 9,1	0,531
Insulina (μ UI/mL)	9,6 (7,8-13,2)	8,8 (6,1- 3,5)	8,4 (5,7-11,2)	0,124
HOMA-IR	1,9 (1,63-2,7)	1,9 (1,2-2,7)	1,6 (1,1-2,1)	0,080
Colesterol não-HDL (mg/dL)	118,9 $\pm$ 36,4	109,9 $\pm$ 28,7	122,7 $\pm$ 27,9	0,107
Lipopolissacarídeos (pg/mL) ^{&}	11,4 $\pm$ 7,7	10,3 $\pm$ 3,7	9,7 $\pm$ 5,1	0,092 [¥]
Proteína C reativa (mg/L)	3,0 (2,6-4,1)	2,7 (1,9-3,6)	2,6 (2,1-3,4)	0,066
Interleucina-6 (pg/mL)	9,3 (6,9-12,9)	9,7 (7,1-12,2)	8,6 (6,7-10,4)	0,126
Interleucina-10 (pg/mL)	3,8 (2,6-6,5)	4,5 (2,8-6,3)	3,8 (1,9-5,5)	0,305
TNF- α (pg/mL)	46,6 (36,8-57,5)	42,5 (35,8-61,3)	44,3 (35,8-52,9)	0,707
Selectina-E (pg/mL)	19,1 (13,5-24,9)	17,3 (11,6-25,0)	16,4 (12,1-23,8)	0,394
Interferon- γ (pg/mL)	0,31 (0,2-0,7)	0,32 (0,2-0,7)	0,26 (0,2-0,4)	0,080

IMC, índice de massa corporal PA, pressão arterial TNF- α , tumor necrosis factor-alpha
ANOVA seguido por teste de Bonferroni *post hoc* ou teste de Kruskal-Wallis ou teste de qui-quadrado de Pearson para frequências

[&] Transformação logarítmica para análise

^Ω Função inversa para análise

[€] Elevado ao quadrado para análise

[¥] p de tendência = 0,038

As concentrações de 25(OH)D apresentaram correlações inversas com a PCR ($r = -0,170$; $p = 0,039$ e selectina-E ($r = -0,220$; $p = 0,007$), conforme mostrado na Figura 2, mas não com o INF- γ .

Figura 2. Correlações entre as concentrações de 25(OH)D e proteína C reativa (painel A) e selectina-E (painel B). Análise por coeficiente de Spearman.

A microbiota fecal dos indivíduos foi principalmente composta pelos filos *Firmicutes* (49,9%), *Bacteroidetes* (29,4%), *Verrucomicrobia* (9,3%), *Proteobacteria* (5,9%) e *Actinobacteria* (2,6%), como mostrado na Figura 3. Os 15 gêneros mais abundantes de um total de 280 gêneros identificados estão mostrados na Figura 4.

Figura 3. Abundância relativa dos principais filos na microbiota fecal da amostra total.

Figura 4. *Box-plot* das abundâncias relativas dos principais gêneros presentes na microbiota fecal. No eixo dos X estão representados os 15 gêneros mais comuns; a primeira letra maiúscula representa a família e, na sequência sublinhado, está o nome do gênero.

Diferenças significativas ($p < 0,005$) entre as abundâncias de gêneros presentes na microbiota fecal dos indivíduos do terceiro tercil de ingestão de vitamina D (Figura 5 - painel A) e de concentrações de 25(OH)D (Figura 5 - painel B) em relação àqueles do primeiro e segundo tercis estão ilustradas na Figura 5 e anexo 6 (Heatmap representativo da abundância relativa de gêneros bacterianos dos participantes agrupados segundo tercis de 25(OH)D).

Figura 5. *Log2 fold change* (em média de *reads*) de gêneros selecionados da microbiota fecal da amostra estudada, usando DESeq2. Terceiros tercís foram comparados com a soma do primeiro com o segundo. Alguns gêneros foram diferentes ao nível de $p < 0,005$. O círculo vermelho indica que gênero pertence ao filo *Firmicutes*, círculo azul a *Bacteroidetes* e círculo amarelo a *Proteobacteria*.

Painel A: Proporção de média de *reads* do terceiro tercís (referência) em comparação com os outros tercís de ingestão de vitamina D. **Painel B:** Proporção de média de *reads* do terceiro tercís (referência) em comparação com outros tercís de concentração de 25(OH)D.

Prevotella foi mais abundante (log2FC 1,67; $p < 0,01$), enquanto *Haemophilus* e *Veillonella* foram menos abundantes (log2FC -2,92; $p < 0,001$ e -1,46, $p < 0,01$, respectivamente) no grupo com a maior ingestão de vitamina D do que nos outros grupos (primeiro e segundo tercís). Em relação à concentração de 25(OH)D, *Megasphaera* foi mais abundante (logFC 3,11; $p < 0,001$), enquanto *Haemophilus* e *Veillonella* menos abundantes (log2FC -3,53 e -2,78; $p < 0,001$, respectivamente) no grupo com maiores níveis circulantes.

Quanto à diversidade microbiana, a análise de beta diversidade não revelou nenhum padrão relacionado às concentrações de vitamina D (Anexo 5).

Coeficientes de correlação selecionados estão mostrados na Tabela 3. Variáveis inflamatórias foram correlacionadas entre si e com o IMC. Além disso, PCR e selectina-E foram inversamente correlacionadas à concentração de 25(OH)D. As abundâncias de *Coprococcus* ($r = -0,215$, $p = 0,008$) e *Bifidobacterium* ($r = -0,269$, $p = 0,001$) também foram inversamente correlacionadas com a 25(OH)D. As correlações de *Faecalibacterium*,

Akkermansia, *Prevotella*, *Haemophilus* e *Veillonella* com 25(OH)D não atingiram significância estatística.

Com base nesta análise de correlações, foram testadas associações independentes entre concentrações de 25(OH)D com alguns gêneros, ajustando-se para variáveis de controle (idade, sexo, IMC e estação do ano) e explicativas (PCR, selectina-E e IFN- γ). Modelos distintos foram construídos para cada gênero (*Faecalibacterium*, *Coprococcus* e *Bifidobacterium*). Apesar da correlação não significativa de *Akkermansia* e *Faecalibacterium* com a vitamina D, estes gêneros foram incluídos no primeiro modelo, confirmando a ausência de associações significativas.

A associação independente da primavera com os valores de 25(OH)D manteve-se em todos os modelos. Quando gêneros bacterianos foram adicionados (modelos #2), associações inversas com *Coprococcus* ($p = 0,045$) e *Bifidobacterium* ($p = 0,051$) foram detectadas, embora com uma significância limítrofe para o último. Incluindo marcadores inflamatórios nestes modelos, apenas a PCR e selectina-E mostraram-se inversamente associadas à vitamina. No modelo 3 (ajustado para PCR), a associação de *Coprococcus* (modelo 3A, $p = 0,056$) foi enfraquecida, mas não a do gênero *Bifidobacterium* (modelo 3B, $p = 0,035$). No modelo 4 (ajustado para selectina-E), a associação de *Coprococcus* com 25(OH)D manteve-se significativa (modelo 4A, $p = 0,034$), mas não a de *Bifidobacterium* (modelo 4B; $p = 0,073$). Apesar de não haver associação de IFN- γ com a vitamina, sua adição aos modelos, confirmou que *Bifidobacterium* (modelo 5B, $p = 0,037$), mas não *Coprococcus* (modelo 5A, $p = 0,079$), associou-se independentemente à variável dependente.

Tabela 3: Coeficientes de correlação selecionados entre variáveis clínicas e abundâncias dos gêneros mais comuns na microbiota fecal.

	25(OH)D	IMC	PA média	Glicose	Insulina	CRP	LPS	IL-6	IL-10	TNF- α	Selectina-E	IFN- γ	Coproc	Bifidobac	Faecali	Akkerm
25(OH)D	1	-0,046	-0,047	-0,030	-0,126	-0,170*	-0,098	-0,122	-0,095	-0,065	-0,220**	-0,148 [#]	-0,215**	-0,269**	-0,143 [#]	0,093
IMC	-0,046	1	-0,263**	0,221**	-0,103	-0,133	-0,002	0,339**	0,232**	0,195*	0,231**	0,115	-0,056	0,120	-0,092	-0,048
PA média	-0,047	-0,263**	1	0,277**	0,164*	-0,204*	-0,135	0,110	0,040	-0,052	0,017	-0,007	0,016	0,158 [#]	0,117	-0,063
Glicose	-0,030	0,221**	0,277**	1	0,062	0,005	0,016	0,181*	0,028	0,120	0,178*	0,046	-0,049	0,026	0,030	-0,130
Insulina	-0,126	-0,103	0,164*	0,062	1	0,071	0,048	0,046	0,052	-0,080	-0,170*	-0,103	-0,052	0,082	0,057	-0,028
PCR	-0,170*	-0,133	-0,204*	0,005	0,071	1	0,078	-0,088	0,039	0,021	-0,173*	-0,042	0,107	-0,126	-0,013	-0,012
LPS	-0,098	-0,002	-0,135	0,016	0,048	0,078	1	-0,044	0,075	0,083	0,109	0,049	0,032	0,062	-0,136 [#]	0,046
IL-6	-0,122	0,339**	0,110	0,181*	0,046	-0,088	-0,044	1	0,500**	0,610**	0,306**	0,553**	-0,111	-0,034	0,134	-0,206*
IL-10	-0,095	0,232**	0,040	0,028	0,052	0,039	0,075	0,500**	1	0,420**	0,023	0,348**	-0,010	0,068	0,047	-0,203*
TNF- α	-0,065	0,195*	-0,052	0,120	-0,080	0,021	0,083	0,610**	0,420**	1	0,110	-0,602**	-0,101	-0,059	0,126	-0,110
Selectina-E	-0,220**	0,231**	0,017	0,178*	-0,170*	-0,173*	0,109	0,306**	0,023	0,110	1	-0,143 [#]	-0,008	0,100	0,024	-0,018
IFN- γ	-0,148 [#]	0,115	-0,007	0,046	-0,103	-0,042	0,049	0,553**	0,348**	-0,602**	-0,143 [#]	1	-0,010	0,005	0,120	-0,118
Coproc	0,215**	-0,056	0,016	-0,049	-0,052	0,107	0,032	-0,111	-0,010	-0,101	-0,008	-0,010	-	-	-	-
Bifidobac	-0,269**	0,120	0,158 [#]	0,026	0,082	-0,126	0,062	-0,034	0,068	-0,059	0,100	0,005	-	-	-	-
Faecali	-0,143 [#]	-0,092	0,117	0,030	0,057	-0,013	-0,136 [#]	0,134	0,047	0,126	0,024	0,120	-	-	-	-
Akkerm	0,093	-0,048	-0,063	-0,130	-0,028	-0,012	0,046	-0,206*	-0,203*	-0,110	-0,018	-0,118	-	-	-	-

IMC, índice de massa corporal PA, pressão arterial PCR, proteína C-reativa LPS, lipopolissacarídeos IL, interleucina
 TNF- α , fator de necrose tumoral alpha IFN- γ , interferon gamma Coproc, *Coprococcus* Bifidobac, *Bifidobacterium* Faecali, *Faecalibacterium* Akkerm, *Akkermansia*
 Coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman * p < 0,05 ** p < 0,01 [#] p < 0,10

Tabela 4. Coeficientes (erros padrão entre parênteses) de variados modelos de regressão linear para associações de concentrações 25(OH)D transformadas para log, com abundâncias de gêneros selecionados, ajustados para diversas variáveis. "A" refere-se ao gênero *Coprococcus* e "B" ao gênero *Bifidobacterium*.

	Idade	Sexo	IMC	Estação (primavera)	<i>Coprococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Proteína C-reativa	Selectina-E ^{&}	Interferon-γ ^{&}	R ²
Modelo 1	0,002 (0,006)	-0,15 (0,117)	-0,005 (0,007)	-0,207** (0,071)	-	-	-	-	-	0,082
Modelo 2-A	0,002 (0,006)	-0,106 (0,118)	-0,006 (0,007)	-0,210** (0,071)	-10,151* (5,024)	-	-	-	-	0,107
Modelo 2-B	0,002 (0,006)	-0,151 (0,118)	-0,005 (0,008)	-0,209** (0,072)	-	-1,794# (0,910)	-	-	-	0,082
Modelo 3-A	0,004 (0,006)	-0,111 (0,115)	-0,010 (0,007)	-0,208** (0,069)	-9,414# (4,887)	-	-0,074* (0,030)	-	-	0,140
Modelo 3-B	0,001 (0,006)	-0,158 (0,112)	-0,003 (0,008)	-0,203** (0,069)	-	-1,881* (0,882)	-0,080** (0,030)	-	-	0,145
Modelo 4-A	0,002 (0,006)	-0,094 (0,116)	2e-4 (0,008)	-0,209** (0,070)	-10,565* (4,936)	-	-	-0,169** (0,064)	-	0,147
Modelo 4-B	0,001 (0,006)	-0,145 (0,115)	0,007 (0,008)	-0,204** (0,070)	-	-1,625 (0,899)	-	-0,157* (0,065)	-	0,140
Modelo 5-A	0,002 (0,006)	-0,107 (0,118)	-0,005 (0,007)	-0,210** (0,071)	-9,082# (5,106)	-	-	-	-0,039 (0,030)	0,116
Modelo 5-B	0,002 (0,006)	-0,161 (0,116)	0,002 (0,008)	-0,200** (0,071)	-	-1,924* (0,914)	-	-	-0,016 (0,011)	0,116

*p < 0,05

**p < 0,01

#p < 0,06

&Variáveis transformadas para log para as análises

Modelo 1: ajustado para sexo, idade, índice de massa corporal e estação do ano

Modelo 2: Modelo 1 com gênero bacteriano

Modelo 3: Modelo 2 com proteína C reativa

Modelo 4: Modelo 2 com selectina-E

Modelo 5: Modelo 2 com interferon-γ

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, tanto a ingestão como os níveis circulantes de vitamina D foram associados com a abundância de determinados gêneros comensais da microbiota intestinal de participantes NutriHS. Os achados de proporções distintas de gêneros de acordo com o *status* da vitamina D levantam a hipótese de que o efeito modulador dessa vitamina em células imunes intestinais poderia influenciar a composição bacteriana. Uma resposta imune reduzida numa condição de deficiência de vitamina D poderia aumentar a vantagem competitiva de *Haemophilus* e *Veillonella*, que foram relativamente mais abundantes no grupo de indivíduos com baixa ingestão comparado com o de maior ingestão e concentração de vitamina D. Essas bactérias gram-negativas poderiam explicar os maiores níveis de LPS detectados nesse subgrupo. Por outro lado, abundância relativamente pequena de bactérias com efeito benéfico – tais como os gêneros *Bifidobacterium* e *Coprococcus* – poderia ativar a resposta imune intestinal e induzir inflamação local, exigindo vias anti-inflamatórias compensatórias dependentes da 25(OH)D. Foi encontrada associação inversa entre marcadores inflamatórios e 25(OH)D. Os resultados reforçam o papel da vitamina D na manutenção da homeostase do sistema imune, e, especula-se que isto ocorra, em parte, devido à interação com a microbiota intestinal, embora o delineamento do estudo impeça o estabelecimento de relações de causa-efeito.

Uma peculiaridade do nosso estudo foi a inclusão de uma amostra saudável de jovens adultos que têm conhecimento e habilidades no campo da nutrição. Verificaram-se valores médios crescentes de 25(OH)D ao longo de tercis de consumo, assim como uma correlação direta entre estas variáveis. Não há consenso na literatura sobre esta relação e a maioria dos estudos não mostrou correlação significativa (VIETH, 1999; NESBY-O'DELL et al., 2002; HOLLIS, 2005; HYPPONEN & POWER, 2007; WANG et al., 2008; SALEHPOUR et al., 2012b). É possível que o presente estudo tenha sido capaz de encontrá-la devido à alta confiabilidade dos dados dietéticos colhidos na amostra atual de alunos de graduação e graduados em nutrição (FOLCHETTI et al., 2016).

O perfil clínico dos três subgrupos de participantes estratificados de acordo com a concentração de 25(OH)D não diferiram, embora um perfil cardiometabólico pior pudesse ser esperado em indivíduos com insuficiência ou deficiência de vitamina D. Em geral, os relatos de associações inversas de vitamina D com a obesidade e metabólicas distúrbios ocorreram em indivíduos mais velhos (FORMAN et al., 2007; SHANKAR et al., 2011; SALEHPOUR et al., 2012a; KIM et al., 2014). Assim, as características demográficas da amostra poderiam explicar a falta de associações entre 25(OH)D e estas variáveis. Os valores de LPS mais elevados observados no subgrupo com concentrações mais baixas de 25(OH)D, poderiam

sugerir uma condição de risco para endotoxemia metabólica. Foi descrito anteriormente que camundongos deficientes de vitamina D, expostos a um agente bacteriano patogênico, exibiram maior translocação de endotoxinas e produção de citocinas inflamatórias (RYZ et al. 2015). Como um ambiente pró-inflamatório sistêmico é considerado base fisiopatológica para doenças cardiometabólicas, o conjunto destes achados nos parece coerente com estudos nos quais a concentração de vitamina D foi associada a manifestações da síndrome metabólica (FORMAN et al., 2007; SHANKAR et al., 2011; SALEHPOUR et al., 2012a; KIM et al., 2014). No entanto, um estudo prospectivo recente não apoia um efeito protetor da suplementação da vitamina D contra anormalidades metabólicas (JORDE et al., 2016).

Correlações inversas significativas entre as concentrações de 25(OH)D e de selectina-E e PCR foram observadas, sugerindo que mesmo entre indivíduos saudáveis, o *status* desta vitamina D mantém uma condição anti-inflamatória. Nessa linha, vários estudos têm relatado que a 25(OH)D desempenha papel importante no sistema imune, associando altas concentrações, bem como o maior consumo da vitamina, com menor inflamação crônica subclínica (MORA et al., 2008; HEWISON, 2012; BELLIA et al., 2013). Em animais e humanos, há evidências de que a vitamina D module a resposta imune reduzindo a inflamação (LY et al., 2011; HEWISON, 2012; CANTORNA et al., 2014), o que está de acordo com nossos resultados de correlação inversa entre 25(OH)D e os referidos marcadores inflamatórios.

A análise metagenômica confirmou que os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram os mais abundantes, e que *Bacteroides* foi o gênero mais comum, em concordância com outros relatos (ARUMUGAM et al., 2011). Um achado interessante foi a abundância relativamente elevada de *Akkermansia* na amostra. Além disso, foi detectada correlação inversa entre este gênero e marcadores inflamatórios e do metabolismo da glicose. Tal correlação está de acordo com estudos anteriores mostrando que a *Akkermansia muciniphila* associa-se com efeitos benéficos no perfil metabólico e inflamatório (DERRIEN et al., 2011; QIN et al., 2012; EVERARD et al., 2013). Em modelos animais, foram demonstrados benefícios da *A. muciniphila* na permeabilidade intestinal, na espessura da camada de muco e em alterações metabólicas da obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (EVERARD et al., 2013). Uma vez que a amostra foi composta por indivíduos jovens, com adiposidade corporal adequada e perfil metabólico saudável, uma alta proporção deste gênero não foi um achado inesperado.

As análises do DeSeq2 forneceram informações relevantes sobre a relação de alguns gêneros no grupo referência em comparação com outros (primeiro mais segundo tercis). Verificamos que *Prevotella* foi mais proeminente no grupo com maior ingestão de vitamina D. Em populações que consomem uma dieta rica em carboidratos e fibras já havia sido relatada maior abundância de *Prevotella* (WU et al., 2011). O consumo de fibras nos participantes dos NutriHS foi bastante adequado ($29,5 \pm 17,8$ g/dia, dados não mostrados), o que poderia estar

contribuindo para a alta abundância relativa deste gênero. O gênero *Haemophilus* já foi associado com doença inflamatória intestinal e com concentrações de LPS, e *Veillonella* com valores elevados de citocinas inflamatórias (SAID et al., 2013; VAN DEN BOGERT et al., 2014). Estas bactérias gram-negativas com LPS na superfície foram menos dominantes nos grupos com a maior ingestão e níveis circulantes de 25(OH)D. Além disso, a menor concentração de LPS foi encontrada entre aqueles com a maior concentração da vitamina. É possível que os participantes com pior *status* de vitamina D e reduzida capacidade de responder a *Haemophilus* e *Veillonella* possam permitir a translocação de LPS pela barreira intestinal e provocar inflamação sistêmica. Esta hipótese é apoiada por estudos em modelos animais, nos quais a suplementação de vitamina D aumentou a expressão de genes de defensinas e NOD2, intensificando a resposta imunológica contra patógenos intestinais (SOKOL et al., 2008). Também foi demonstrado que a 1,25(OH)₂D₃ induziu a expressão de proteínas de junção e reforçou o complexo *tight junction*, melhorando a barreira intestinal (KONG et al., 2008). Estudos adicionais sobre estes mecanismos são necessários para testar hipóteses aqui levantadas e desvendar possíveis capacidades imunomoduladoras destes gêneros.

Considerando a amostra total, os gêneros *Coprococcus* e *Bifidobacterium* mantiveram correlação inversa com a concentração de 25(OH)D após os ajustes. Ambos os gêneros têm sido relacionados com IMC adequado, homeostase glicêmica, produção de butirato e ações anti-inflamatórias (COLLADO et al., 2008; FURET et al., 2010; WU et al., 2010b). É possível que a exposição a alta abundância destas bactérias poderia atenuar a resposta imune. Associação direta de *Coprococcus* com vitamina D foi relatada quando essa vitamina foi suplementada para o tratamento de doenças de natureza imune (CANTAREL et al., 2015), mas não em indivíduos saudáveis. Nos participantes normais de nosso estudo, o resultado de uma associação inversa entre 25(OH)D e a abundância de *Coprococcus* pode ser reflexo da homeostase imunológica intestinal e de um estado inflamatório sistêmico estável. Até onde conhecemos, nenhum estudo mostrou uma associação de *Bifidobacterium* com *status* de vitamina D. Em nossas análises de regressão linear, a atenuação ou abolição da associação destes gêneros com a adição dos três diferentes marcadores inflamatórios sugere que a inflamação pode mediar parcialmente a relação entre concentração de vitamina D e microbiota. Isto está de acordo com evidências de sua ação anti-inflamatória (ZHANG et al., 2012) e os relatos de um estado pró-inflamatório quando a vitamina D está ausente (CANTORNA, 2010). Camundongos *knockouts* para VDR apresentaram inflamação crônica no trato gastrointestinal, mesmo diante de uma microbiota não patogênica. Apesar das controvérsias sobre a relação causa-efeito (MANGIN et al., 2014), há consenso de que esta vitamina é importante mediador das defesas intestinais contra patógenos (ASSA et al., 2014).

O presente estudo tem limitações, principalmente decorrentes ao seu delineamento transversal que o torna especulativo em alguns aspectos. Apesar disso, é importante levantar hipóteses a serem testadas em novos estudos sobre uma questão emergente na literatura. O tamanho da amostra não foi pequeno, de modo que o estudo pôde avaliar uma ampla gama de variáveis relacionadas ao perfil de risco cardiometabólico. A amostra de estudantes e profissionais da área da nutrição deve ter fornecido dados alimentares confiáveis, mas, por outro lado, pode ter implicado em limitação relacionada à homogeneidade dos hábitos alimentares. Tal condição impede a generalização dos presentes achados à população geral. Investigação de indivíduos mais velhos, sob níveis de risco mais elevados, e com hábitos alimentares heterogêneos é necessária para confirmar os nossos resultados. Considerando o aumento da prevalência de deficiência de vitamina D nas populações atuais, o nosso estudo representa caminho inovador para melhorar a compreensão deste cenário.

6 CONCLUSÕES

Em adultos jovens participantes do NutriHS, este estudo mostra haver associações do *status* de vitamina D com gêneros bacterianos da microbiota fecal, bem como com marcadores de inflamação sistêmica de baixo grau, mas não com resistência à insulina. Ainda, apoia a ideia de que ações moduladoras da vitamina D no sistema imune intestinal poderia influenciar a composição bacteriana comensal e vice-versa. Uma maior abundância relativa dos gêneros gram-negativos, tais como *Haemophilus* e *Veillonella*, pode ter sido facilitada pela baixa ingestão e/ou baixa concentração de vitamina D. A proporção relativamente menor de bactérias benéficas, tais como *Coprococcus* e *Bifidobacterium*, poderia desencadear uma resposta imune e inflamação, exigindo ações anti-inflamatórias, como as que dependem das ações da 25(OH)D sobre células alvo.

Concluimos que há fortes indícios de que o papel da vitamina D na manutenção da homeostase imune do hospedeiro ocorre, pelo menos em parte, de interações com a microbiota intestinal. Porém, análises longitudinais no NutriHS são desejáveis para investigar hipóteses levantadas no estudo atual.

7 REFERÊNCIAS

- Abegunde DO, Mathers CD, Adam T, Ortegon M, Strong K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet* 2007; 8370(9603):1929-1938.
- Adamczak DM, Nowak JK, Frydrychowicz M, Kaczmarek M, Sikora J. The Role of Toll-Like Receptors and Vitamin D in Diabetes Mellitus Type 1—A Review. *Scandinavian J Immunol* 2014; 80(2):75-84
- Alves M, Bastos M, Leitão F, Marques G, Ribeiro G, Carrilho F. Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. *Rev Port Endocrinol, Diab e Metab* 2013; 8(1):32-39.
- Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan TJ, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012; 338(6103):120-123.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473(7346):174–180.
- Assa A, Vong L, Pinnell LJ, Avitzur N, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation. *J Infect Dis* 2014; 210:1296-1305.
- Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2007; 167(16):1730-1737.
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JL. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(3):979-84.
- Bashir M, Prietl B, Tauschmann M, Mautner SI, Kump PK, Treiber G, et al. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *Eur J Nutr* 2015; 55:1479–1489.
- Barengolts E. Vitamin D and prebiotics may benefit the intestinal microbacteria and improve glucose homeostasis in prediabetes and type 2 diabetes. *Endocr Pract* 2013; 19(3):497-510.
- Bellia A, Garcovich C, D'Adamo M, Lombardo M, Tesauro M, Donadel G, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. *Inter Emergency Med* 2013; 8(1):33-40.
- Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Wetterslev J, Simonetti RG, et al. Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 7:CD007470.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; btu170.

Bora S, Ooi JH, Smith P, Patterson A, Cantorna M. Metabolomics reveals the impact of vitamin D on the microbiome (MUC4P. 856). *J Immunol* 2014; 192(1 Suppl):133-132.

Bora, S, Smith P, Patterson A, Cantorna M. Host vitamin D status is dependent on the microbiota (MUC9P. 747). *J Immunol* 2015; 194(1 Suppl):205-211.

Borba VZC, Vieira JGH, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro, M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int* 2009; 20(3):427-433.

Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008; 29(6):726–76.

Brasil. Indicadores de mortalidade. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2010/matriz.htm#mort>. 2010. Acesso em 04/10/2012.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1761-1772.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet–induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57(6):1470-1481.

Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(6):729–734.

Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D, et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr* 2009b; 90:1236-1243.

Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009a; 58(8):1091-1103.

Cantarel BL, Waubant E, Chehoud C, Kuczynski J, DeSantis TZ, Warrington J, et al. Gut microbiota in multiple sclerosis: possible influence of immunomodulators. *J Invest Med* 2015; 63(5):729-734.

Cantorna MT. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92(1):60-64.

- Cantorna MT. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc Nutr Soc* 2010; 69(03):286-289.
- Cantorna MT. IBD: Vitamin D and IBD: moving towards clinical trials. *Nature Reviews Gastroenterol Hepatol* 2016; 13:322-323.
- Cantorna MT, McDaniel K, Bora S, Chen J, James J. Vitamin D, immune regulation, the microbiota, and inflammatory bowel disease. *Exp Biol Med* 2014; 239(11):1524-1530.
- Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(6):1717S-1720S.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters W, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6(8):1621-1624.
- Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS-Biology* 2011; 9(12):e1001212.
- Caricilli AM, Saad MJ. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients* 2013; 5(3):829-851.
- Cerdá B, Pérez M, Pérez-Santiago JD, Tornero-Aguilera JF, González-Soltero R, Larrosa M. Gut microbiota modification: another piece in the puzzle of the benefits of physical exercise in health? *Front Physiol* 2016; 7:51.
- Ciubotaru I, Green SJ, Kukreja S, Barengolts E. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. *Transl Res* 2015; 166(5):401-411.
- Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004. 79(5):820-825.
- Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(4):894-899.
- Colditz GA, Hankinson SE. The Nurses' Health Study: lifestyle and health among women. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:388-396.
- Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35(8):1381-1395.
- De Castro LCG. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2011; 55(8):566.

- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(9):684-700.
- Derrien M, Van Baarlen P, Hooiveld G, Norin E, Müller M, de Vos WM. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 2011; 2:166.
- Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* 2016; 6:1-11.
- Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunol* 2011; 134(2):123-139.
- Dibaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(4):460-469.
- Evans DA, Hirsch JB, Dushenkov S. Phenolics, inflammation and nutrigenomics. *J Sci Food Agric* 2006; 86(15):2503-2509.
- Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS* 2013; 110(22):9066-9071.
- Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016; 352(6285):560-4.
- Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(5):342-357.
- de Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(33):14691-14696.
- Ferguson LR, Laing B, Marlow G, Bishop K. The role of vitamin D in reducing gastrointestinal disease risk and assessment of individual dietary intake needs: Focus on genetic and genomic technologies. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60(1):119-133.
- Folchetti LGD, da Silva IT, de Almeida-Pititto B, Ferreira SRG. Nutritionists' Health Study cohort: a web-based approach of life events, habits and health outcomes. *BMJ open* 2016; 6(8):e012081.
- Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among US adults. *Diabetes Care* 2005; 28(5):1228-30.

- Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007; 49(5):1063-1069.
- Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol* 2007; 8:5.
- Fu L, Yun F, Oczak M, Wong BY, Vieth R, Cole DE. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25 (OH) D] to vitamin D supplementation. *Clin biochemistry* 2009; 42(10): 1174-1177.
- Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery–induced weight loss links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 2010; 59(12):3049-3057.
- Ghanei L, Ziaee A, Rostami P, Oveisi S, Esmailzadehha N, Kazemifar AM, et al. Association of serum 25-hydroxyvitamin d levels and vitamin d dietary intake with metabolic syndrome: a case control study. *J Res Health Sci* 2015; 15(1):32-36.
- Gomez A, Petrzalkova KJ, Burns MB, et al. Gut microbiome of coexisting BaAka pygmies and Bantu reflects gradients of traditional subsistence patterns. *Cell Rep* 2016; 14(9):2142-2153.
- Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(15):6252-6257.
- Greer RK, Dong X, Moraes ACF, Zielke RA, Fernandes GF, Peremyslova E, et al. *Akkermansia muciniphila* mediates negative effects of IFN γ on glucose metabolism. *Nat Commun* 2016; 7:13329.
- Grupo de pesquisa de avaliação do consumo alimentar. <http://www.gac-usp.com.br/materiais-de-apoio.php>. Acesso em: 04/10/2012.
- Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2006.
- Harris SS, Dawson-Hughes B. Reduced sun exposure does not explain the inverse association of 25-hydroxyvitamin d with percent body fat in older adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8):3155-3157.
- Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, et al. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev* 2008; 66(Suppl 2):S98-S112.

- Herrmann M, Sullivan DR, Veillard A, McCorquodale T, Straub IR, Scott R, et al. Serum 25-Hydroxy Vitamin D: a predictor of macrovascular and microvascular complications in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 38(3):521-528.
- Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39(2):365-379.
- Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol* 2012; 76:315-325.
- Högler W. Complications of vitamin D deficiency from the foetus to the infant: One cause, one prevention, but who's responsibility? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29(3):385–398.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357(3):266-281.
- Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009; 19(2):73-78.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney, RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7):1911-1930.
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(6):1678S-1688S.
- Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005; 135(2):317-322.
- Hsu RY, Chan CH, Spicer JD, Rousseau MC, Giannias B, Rousseau S, Ferri LE. LPS-induced TLR4 signaling in human colorectal cancer cells increases β 1 integrin-mediated cell adhesion and liver metastasis. *Cancer Res* 2011; 71(5):1989-1998.
- Hyppönen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(3):860-868.
- Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington (DC): National Academies Press (US) 2011; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/> doi: 10.17226/13050
- Javaid MK, Crozier SR, Harvey NC, Gale CR, Dennison EM, Boucher BJ, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet* 2006; 367(9504):36-43.

- Jeong Y, Swami S, Krishnan AV, Williams JD, Martin S, Horst RL, et al. Inhibition of mouse breast tumor initiating cells by calcitriol and dietary vitamin D. *Mol Cancer Ther* 2015; 14:1951-1961.
- Jia F, Wang B, Shan L, Xu Z, Staal WG, Du L. Core symptoms of autism improved after vitamin D supplementation. *Pediatrics* 2015; 135(1):e196-e198.
- Jin D, Wu S, Zhang YG, Lu R, Xia Y, Dong H, et al. Lack of vitamin D receptor causes dysbiosis and changes the functions of the murine intestinal microbiome. *Clin Ther* 2015; 37(5):996-1009.
- Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Oral supplementation with probiotic L. Reuteri NCIMB 30242 increases mean circulating 25-hydroxyvitamin D: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Source J. Clin. Endocrinol. Metab* 2013; 98: 2944–2951.
- Jorde R, Sollid ST, Svartberg J, Schirmer H, Joakimsen RM, Njølstad I, et al. Vitamin D 20000 IU per week for five years does not prevent progression from prediabetes to diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(4):1647-1655.
- Juonala M, Voipio A, Pahkala K, Viikari JS, Mikkilä V, Kähönen M, et al. Childhood 25-OH vitamin D levels and carotid intima-media thickness in adulthood: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(4):1469-1476.
- Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients* 2015; 7(4):2839-2849.
- Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* 2009; 139(1):1-4.
- Kim HJ, Kang CK, Park H, Lee MG. Effects of vitamin D supplementation and circuit training on indices of obesity and insulin resistance in T2D and vitamin D deficient elderly women. *J Exerc Nutrition Biochem* 2014; 18(3):249.
- Kimball S, Fuleihan GEH, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4):339-414.
- Kola B. Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. *J Neuroendocrinol* 2008; 20:942–951.
- Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, Bissonnette M, and Li YC. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G208-216.

- Lawson DE, Paul AA, Black AE, Cole TJ, Mandal AR, Davie M. Relative contributions of diet and sunlight to vitamin D state in the elderly. *BMJ* 1979; 2(6185):303-305.
- Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Stärkel P, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Nat Acad Sci* 2014; 111(42): E4485-E4493.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444(7122):1022-1023.
- Lichtenstein A, Ferreira-Júnior M, Sales MM, Aguiar FB, Fonseca LAM, Sumita NM, et al. Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. *Rev Assoc Med Bras* 2013; 59(5):495-506.
- Litonjua AA, Diane RG. Asthma and obesity: common early-life influences in the inception of disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(5):1075-1084.
- Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(5):1031–1035.
- Liu X, Pei C, Yan S, Liu G, Liu G, Chen W, et al. NADPH oxidase 1-dependent ROS is crucial for TLR4 signaling to promote tumor metastasis of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* 2015; 36(3):1493-1502.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; 15(12):1.
- Ly NP, Litonjua A, Gold DR, Celedón JC. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(5):1087–1094.
- Maeda SS, Borba VZ, Camargo MBR, Silva DMW, Borges JLC, Bandeira F, Lazaretti-Castro M. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Braz Arch Endocrinol Metab* 2014; 58(5): 411-433.
- Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 2011; 27(21):2957-2963.
- Mai V, McCrary QM, Sinha R, Gleit M. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr J* 2009; 8(1):49.
- Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res* 2014; 63(10):803-819.

- Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Karkeni E, Canault M, Amiot MJ, et al. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem* 2014; 25(10):1077-1083.
- Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunol* 2011; 12(1):5-9.
- Matsudo S, Araujo T, Matsudo V, et al. Questionário internacional de atividade física: estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Atividade Física e Saúde* 2001; 6(2):5-18.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.
- Meeker S, Seamons A, Maggio-Price L, Paik J. Protective links between vitamin D, inflammatory bowel disease and colon cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(3):933-948.
- Michos ED, Melamed ML. Vitamin D and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11(1):7-12.
- Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Rev Immunol* 2008; 8(9):685-698.
- Moraes ACF, Silva IT, Almeida-Pititto B, Ferreira SRG. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. *Braz Arch Endocrinol Metab* 2014; 58(4):317-327.
- Morales E, Guxens M, Llop S, Rodriguez-Bernal CL, Tardon A, Riano I, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy and infant neuropsychological development. *Pediatrics* 2012; 130(4):e913-e920.
- Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016; 7(3):189–200.
- Myles IA. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. *Nutr J* 2014; 13(61).
- Namba H, Saenko V, Yamashita S. Nuclear factor-kB in thyroid carcinogenesis and progression: a novel therapeutic target for advanced thyroid cancer. *Braz Arch Endocrinol Metab* 2007; 51(5):843-851.
- Neis EPJG, Dejong CHC, Rensen SS. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients*. 2015; 7(4):2930–2946.
- Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; 136:65–80.

Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC, et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(1):187-192.

Nie Y, Hu J, Yan X. Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015; 16(6):436-46.

Norman PE, Powell JT. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res* 2014; 114(2):379-393.

Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, Cantorna MT. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *J Nutr* 2013; 143(10):1679-1686.

Park S, Lee DH, Jeon JY, Ryu J, Kim S, Kim JY, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency and increased risk of breast cancer among Korean women: a case–control study. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 152(1):147-154.

Pedrosa MAC, Castro ML. Papel da vitamina D na função neuro-muscular. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(4):495-502.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118(2):511–521.

Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, et al. Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*. 2016; 534(7606):213-217.

Pfeifer M, Begerow B, Minne HW. Vitamin D and muscle function. *Osteoporosis Int* 2002; 13(3):187-194.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005; 146(3):1576-1587.

Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 217:133–139.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490(7418):55-60.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464(7285):59–65.

- Raftery T, Martineau AR, Greiller CL, Ghosh S, McNamara D, Bennett K, et al. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United Eur Gastroenterol J* 2015; 3(3):294–302.
- Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011; 60(10):1354-1362.
- Reis JP, von Mühlen D, Miller ER. Relation of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels with metabolic syndrome among US adults. *Eur J Endocrinol* 2008; 159(1):41–48.
- Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* 2015; 26:26050.
- Ryz NR, Lochner A, Bhullar K, Ma C, Huang T, Bhinder G, et al. Dietary Vitamin D3 deficiency alters intestinal mucosal defense and increases susceptibility to *Citrobacter rodentium* induced colitis 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(9):G730-G742.
- Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res* 2013;037.
- Salehpour A, Hosseinpanah F, Shidfar F, Vafa M, Razaghi M, Dehghani S, et al. A 12-week double-blind randomized clinical trial of vitamin D3 supplementation on body fat mass in healthy overweight and obese women. *Nutr J* 2012a; 11(1):78.
- Salehpour A, Shidfar F, Hosseinpanah F, Vafa M, Razaghi M, Hoshiarrad A, et al. Vitamin D 3 and the risk of CVD in overweight and obese women: a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 2012b; 108(10):1866-1873.
- Sanz Y, Olivares M, Moya-Pérez Á, Agostoni C. Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk. *Ped Res* 2014; 77(1-2):236-244.
- Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 2014; (63):727-735.
- Schuch, NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamin D and endocrine diseases. *Braz Arch Endocrinol Metab* 2009; 53(5):625-633.
- Segain JP, De La Blétière DR, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: Implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47:397–403.

- Shankar A, Sabanayagam C, Kalidindi S. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34(5):1114-1119.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:16731–16736.
- Sørensen IM, Joner G, Jenum PA, Eskild A, Torjesen PA, Stene LC. Maternal serum levels of 25-hydroxy-vitamin D during pregnancy and risk of type 1 diabetes in the offspring. *Diabetes* 2012; 61(1):175-178.
- Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008; 68(3):261-9.
- Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39(2):419-446.
- Tankou S, Bry L, Gerber G, Lin N, Glanz B, Cook S, et al. Effect of Vitamin D level in the gut microbiome of MS patients. *Neurology* 2015; 84(14 Suppl):P2-206.
- Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 2009; 10(3):167-77.
- Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and microbiota. *Gastroenterology* 2009; 136(5):1476-83.
- Topilski I, Flaishon L, Naveh Y, Harmelin A, Levo Y, Shachar I. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. *Eur J Immunol* 2004;34:1068.
- Van den Bogert B, Meijerink M, Zoetendal EG, Wells JM, Kleerebezem, M. Immunomodulatory properties of *Streptococcus* and *Veillonella* isolates from the human small intestine microbiota. *PloS One* 2014; 9(12):e114277.
- Veldman CM; Cantorna MT; DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374:334–338.
- Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. *Endocr Rev* 2015; 36(3):245-371.
- Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutri* 1999; 69(5):842-856.

- Villa CR, Comelli EM, Taibi A, Chen J, Sacco S, Ward WE. High maternal vitamin D status in utero through weaning beneficially affects the gut microbiota-bone axis in obese male mice. *FASEB J* 2016; 30(1 Supplement), 915-44.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117(4):503-511.
- Webb PM, de Fazio A, Protani MM, Ibiebele TI, Nagle CM, Brand AH, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and survival in women with ovarian cancer. *Am J Clin Nutr* 2015; 102(1):109-114.
- Weernink MG, Wijk RM, Groothuis-Oudshoorn CG, Lanting CI, Grant CC, Vlimmeren LA, et al. Insufficient vitamin D supplement use during pregnancy and early childhood: a risk factor for positional skull deformation. *Matern Child Nutr* 2016; 12(1):177-188.
- Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin gastroenterol* 2007; 23(1), 32-38.
- Weiss ST. Bacterial components plus vitamin D: the ultimate solution to the asthma (autoimmune disease) epidemic? *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(5):1128.
- Weiss ST, Litonjua AA. Vitamin D, the gut microbiome, and the hygiene hypothesis. How does asthma begin? *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(5):492-493.
- Wilson KM, Kasperzyk JL, Rider JR, Kenfield S, van Dam RM, Stampfer MJ, et al. Coffee consumption and prostate cancer risk and progression in the Health Professionals Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(11):876-884.
- Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 347(1):106-120.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334(6052):105-108.
- Wu S, Liao AP, Xia Y, Li YC, Li JD, Sartor RB, et al. Vitamin D receptor negatively regulates bacterial-stimulated NF- κ B activity in intestine. *Am J Pathol* 2010a; 177(2):686-697.
- Wu X, Ma C, Han L, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 2010b; 61:69-78.
- Yoon M-S. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. *Nutrients* 2016; 8(7):405.
- Yu S, Bruce D, Froicu M, Weaver V, Cantorna MT. Failure of T cell homing, reduced CD4/CD8 $\alpha\alpha$ intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut of vitamin D receptor KO mice. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105(52):20834-20839.

Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK., Riches DW, Goleva E. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* 2012; 188(5):2127-2135.

Zhao H, Zhang H, Wu H, Li H, Liu L, Guo J, et al. Protective role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC Gastroenterol* 2012; 12:57.

Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arc Dis Child* 2008; 93(6):512-517.

Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br J Nutr* 2005; 94(04):483–492.

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento Eletrônico

Prezado aluno,

Este termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) tem como finalidade esclarecê-lo a respeito dos objetivos, riscos e benefícios do presente estudo. Além disso, destaca que sua participação é livre e que sua privacidade será garantida em qualquer circunstância.

Ao clicar no botão “Consinto em participar” certifico que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito participar e concordo com os termos descritos no TCLE.

Título: Estudo de Saúde de Nutricionistas – Fase 1 da FSP-USP

Este Termo descreve a finalidade, os procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e advertências deste estudo. É importante para sua decisão sobre a participação no estudo que leia e compreenda as explicações dos procedimentos propostos abaixo.

Objetivo: Avaliar a associação de variáveis de composição corporal com biomarcadores de risco cardiovascular; analisar a composição da microbiota intestinal e sua associação com hábitos alimentares e com biomarcadores de risco cardiovascular.

Benefício: Para indivíduos incluídos no estudo será a investigação de fatores de risco e/ou proteção nutricionais para doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), bem como fatores consagrados e os pouco explorados na literatura.

Sua participação inclui:

- a) Responder questionário sobre saúde e ingestão alimentar via internet;
- b) Realizar avaliação antropométrica, de pressão arterial e da composição corporal pelo densitômetro de dupla emissão com fonte de raio-X (DXA). Este exame é um método inócuo e preciso e sua realização leva 15 minutos.
- c) Coleta de 30 ml de sangue com material descartável e pessoal treinado, após 12 horas de jejum;
- d) Obtenção de amostra de fezes.

A coleta de sangue e o recebimento da amostra de fezes serão realizados no Centro de Saúde da FSP, em dia e hora pré-agendados.

Risco: Este estudo é considerado de risco mínimo. A antropometria, bem como o DXA, não causa qualquer desconforto e não requerem preparo prévio. A coleta de sangue pode

raramente gerar um pequeno hematoma (manchas roxas) no local de punção, que, em geral, desaparecem após 3 a 5 dias.

Não haverá riscos para a integridade física, mental ou moral da sua pessoa. Todas as informações coletadas serão de caráter confidencial e utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

O consentimento está sendo pedido exclusivamente para a participação neste estudo. É garantida e respeitada a privacidade na divulgação dos resultados da pesquisa, e não haverá sua identificação.

Liberdade: É garantido o direito de desistir a qualquer momento da participação nesta pesquisa, sem qualquer prejuízo. Não haverá qualquer tipo de relação ou influência de sua participação no projeto em sua vida acadêmica.

Informações para Contato em Caso de Intercorrências

Estaremos à disposição para informá-lo(a) sobre os procedimentos, riscos e benefícios decorrentes da pesquisa, ou qualquer outra dúvida sobre o estudo.

Caso haja quaisquer dúvidas ou perguntas relativas ao estudo, você poderá entrar em contato em qualquer momento com a Dra. Isis Tande da Silva e Dra. Sandra Roberta G. Ferreira.

Telefones: 3061- 7705/7701 ou pelo e-mail: isistande@usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP/FSP

Telefones: 3061-7779 ou 3061-7742 e-mail: coep@fsp.usp.br

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, nº 715, Cerqueira César, São Paulo-SP, CEP:01246-904

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP/USP

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE SAÚDE DE NUTRICIONISTAS - FASE 1 (ESNUTRI 1) DA FSP-USP

Pesquisador: Isis Tande da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12455313.8.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 257.513

Data da Relatoria: 19/04/2013

Apresentação do Projeto:

ndn

Objetivo da Pesquisa:

ndn

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

ndn

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ndn

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ndn

Recomendações:

ndn

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas. Pela aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7742

E-mail: coep@fsp.usp.br

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 26 de Abril de 2013

Assinador por:
Claudio Leone
(Coordenador)

Anexo 3: Questionário Sociodemográfico e de Saúde

1. Avaliação Socioeconômica

1.1 Nome:_____ Identidade N°:_____

1.2 Número USP:_____

1.3 Período do curso:_____

1.4 Sexo: 1() M 2() F

1.5 Data de Nascimento:___/___/___

1.6 Endereço:_____ No:_____ Apto:_____

Cidade/Estado:_____ CEP:_____ Fone:_____ e-mail_____

1.7 Mora com a família: 1() Sim 2() Não

1.8 Cor de pele: 1() Branca 2() Negra 3() Parda 4() Amarelo 5() Outra

1.9 Renda familiar: 1() <1 SM – R\$622,0 2() 1 - 5 SM 3() 6 - 10 SM 4() >10 SM 5() Não sabe

1.10 Trabalha ou realiza estágio: 1() Sim , quantas horas diárias_____ 2() Não

2. Avaliação Clínica

2.1 Usa medicamento: 1() Anti-hipertensivo 2() Antilipemiante 3() Hipoglicemiante 4() Antidepressivo 5() Medicamento para emagrecimento 6() Anticoncepcional Outro: _____

2.2 Você apresenta alguma das doenças:

- Diabetes: 1() Sim, tipo _____ 2() Não - Hipertensão: 1() Sim 2() Não

- Dislipidemia: 1() Sim 2() Não -Outra:_____

2.3 Existe algum familiar com:

Diabetes 1() Sim 2() Não Quem?_____

Hipertensão 1() Sim 2() Não Quem?_____

Doença coronariana 1() Sim 2() Não Quem?_____

Obesidade 1() Sim 2() Não Quem?_____

AVC 1() Sim 2() Não Quem?_____

2.4 Segue alguma dieta específica: 1() Sim, finalidade: _____ 2() Não

2.5 Consumo de bebidas alcoólicas: 1() Nunca 2() 1 vez/mês 3() 2-4 vezes por mês 4() 2-3 vezes por semana 5() 4 ou mais vezes/semana

2.6 Fumo: 1() Não 2() Sim 3() Pgresso

2.7 Peso: _____kg

2.8 Altura: _____m

Anexo 4: Artigo científico

Manuscrito aceito para publicação no periódico ***Metabolism, Clinical and Experimental*** (protocolo número D- 16-00854R1) em 08/01/2017.

Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.007>

Gut microbiota interactions with the immunomodulatory role of vitamin D in normal individuals

Renata V. Luthold¹, Gabriel R. Fernandes², Ana Carolina Franco de Moraes³, Luciana G. D. Folchetti¹, Sandra Roberta G. Ferreira³

Short title: Vitamin D and gut microbiota

¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, SP, Brazil

² Oswaldo Cruz Foundation, René Rachou Research Center, Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author:

Sandra Roberta G. Ferreira

Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo – Avenida Dr. Arnaldo, 715 – São Paulo, SP – CEP 01246-904

Phone: 55 11 3061-7870

E-mail: sandrafv@usp.br

Keywords: vitamin D, gut microbiota, gram-negative bacteria, inflammation

ABSTRACT

Background: Due to immunomodulatory properties, vitamin D status has been implicated in several diseases beyond the skeletal disorders. There is evidence that its deficiency deteriorates the gut barrier favoring translocation of endotoxins into the circulation and systemic inflammation. Few studies investigated whether the relationship between vitamin D status and metabolic disorders would be mediated by the gut microbiota composition.

Objective: We examined the association between vitamin D intake and circulating levels of 25(OH)D with gut microbiota composition, inflammatory markers and biochemical profile in healthy individuals. **Methods:** In this cross-sectional analysis, 150 young healthy adults were stratified into tertiles of intake and concentrations of vitamin D and their clinical and inflammatory profiles were compared. The DESeq2 was used for comparisons of microbiota composition and the log2 fold changes (log2FC) represented the comparison against the reference level. The association between 25(OH)D and fecal microbiota (16S rRNA sequencing, V4 region) was tested by multiple linear regression. **Results:** Vitamin D intake was associated with its concentration ($r=0.220$, $p=0.008$). There were no significant differences in clinical and inflammatory variables across tertiles of intake. However, lipopolysaccharides increased with the reduction of 25(OH)D (p -trend <0.05). *Prevotella* was more abundant (log2FC 1.67, $p <0.01$), while *Haemophilus* and *Veillonella* were less abundant (log2FC -2.92 and -1.46, $p <0.01$, respectively) in the subset with the highest vitamin D intake (reference) than that observed in the other subset (first plus second tertiles). PCR ($r=-0.170$, $p=0.039$), E-selectin ($r=-0.220$, $p=0.007$) and abundances of *Coprococcus* ($r=-0.215$, $p=0.008$) and *Bifidobacterium* ($r=-0.269$, $p=0.001$) were inversely correlated with 25(OH)D. After adjusting for age, sex, season and BMI, 25(OH)D maintained inversely associated with *Coprococcus* ($\beta=-9.414$, $p=0.045$) and *Bifidobacterium* ($\beta=-1.881$, $p=0.051$), but significance disappeared following the addition of inflammatory markers in the regression models. **Conclusion:** The role of vitamin D in the maintenance of immune homeostasis seems to occur in part by interacting with the gut microbiota. The attenuation of association of bacterial genera by inflammatory markers suggests that inflammation participate in part in the relationship between the gut microbiota and vitamin D concentration. Studies with appropriate design are necessary to address hypothesis raised in the current study.

Keywords: Vitamin D, gut microbiota, gram negative bacteria, inflammation

1. INTRODUCTION

The primary source of vitamin D depends on the skin exposure to sunlight, and up to 20% come from dietary intake. It is still controversial whether the consumption of vitamin D-containing foods has a direct impact in determining its circulating levels^{1,2,3,4,5,6}. Vitamin D₂ (ergocalciferol) is found in yeast, mushrooms and some vegetables, while the vitamin D₃ (cholecalciferol) in animal-based foods. The latter is the one synthesized in the skin through the ultraviolet B radiation⁷. To be biologically active, vitamin D undergoes hydroxylations in the liver mediated by the 25-hydroxylase, and in the kidney by 1 α -hydroxylase. The 1,25(OH)₂D is recognized by its specific receptors (VDR) in various cells, mainly in the intestine to enhance calcium absorption, and in the bone to regulate skeletal homeostasis. Deranged absorptive or altered metabolic patterns result in disorders of calcium and phosphorus metabolism but, beyond these well-known roles, vitamin D disturbances have been involved in some other diseases.

Vitamin D plays important roles in innate and adaptive immune responses, cell cycle and metabolic processes, evidenced by the reported relationship between its deficiency and the prevalence of immune-mediated disorders, cancer and cardiometabolic diseases^{5,7,8,9,10}. An inverse correlation between its concentrations and the prevalence of obesity and type 2 diabetes mellitus was described^{11,12}. The findings of VDR in β cells, endothelium, cardiac myocytes and renin-producing cells suggest a role for vitamin D in these diseases^{13,14,15}. Also, there is evidence that inadequate vitamin D status increases inflammatory cytokines and reduces insulin sensitivity, which were described as pathophysiological links among the cardiometabolic diseases^{16,17}.

More recently, the gut microbiota-induced metabolic endotoxemia has been associated with increased cardiometabolic risk¹⁸. As vitamin D plays a significant role in modulating the immune system at the intestine, it is possible that its deficiency could deteriorate the gut barrier function favoring the translocation of endotoxins such as lipopolysaccharides (LPS) into the circulation. LPS are known to promote low-grade inflammation, which predisposes to insulin resistance^{19,20}. Numerous circulating biomarkers have been used to assess inflammation for clinical²¹ and research purposes^{22,23}.

Certain compositions of the gut microbiota have been associated with systemic inflammation and metabolic disturbances. Particularly, gram-negative bacteria, containing LPS in their outer layer, were shown to stimulate immune response and to provoke metabolic endotoxemia, while other genera, such as *Bifidobacteria*, to reduce endotoxemia¹⁸. Despite being gram-negative, *Akkermansia* was found to improve intestinal barrier function and to induce beneficial metabolic effects²⁴.

Vitamin D deficiency and the lack of VDR have been associated with intestinal dysbiosis and increased susceptibility to intestinal diseases^{25,26,27}. Few studies investigated whether the status of vitamin D would be contributing to disturbances of glucose metabolism by modulating the composition of the gut microbiota^{28,29,30}. Deepening the comprehension of underlying mechanisms of cardiometabolic diseases is desirable considering their impact on the mortality rates of populations.

The Nutritionists' Health Study (NutriHS) was designed to assess novel biomarkers and predictors of cardiometabolic outcomes³¹. This web-based observational cohort study of undergraduates and graduates from Brazilian nutrition colleges collected a variety of retrospective and prospective data. The NutriHS represents a unique opportunity to investigate relationships between nutrients and cardiometabolic outcomes, whose pathophysiology involves low-grade inflammation. A high-quality data collection should support these associations.

Facing the importance of the intestinal immune system to respond to microbial stimuli, and the immune modulatory role of vitamin D, we hypothesized that vitamin D status is associated with gut microbiota via low-grade inflammation. We examined the association between vitamin D intake and 25-hydroxyvitamin D concentration with fecal microbiota composition, inflammatory markers and biochemical profile in young adults, participants of the NutriHS.

2. METHODS

Details on the objectives, population, and protocol of the NutriHS³¹. Briefly, to be included in the NutriHS, individuals should be 18 years and older, undergraduate or graduate from Nutrition colleges; pregnancy was an exclusion criterion. For the current cross-sectional analysis, data from a convenience sample of the first 150 participants aged from 18 to 40 years, who had complete data on the variables of interest, were eligible. Exclusion criteria were antibiotics, probiotics, prebiotics or metformin use in the last six months, and diarrhea in the two weeks preceding the feces collection. The Research Ethics Committee of the School of Public Health of the University of São Paulo approved the NutriHS project. Electronic consent was obtained from all participants.

Volunteers were invited to fill online structured and validated questionnaires using the e-NutriHS system (www.fsp.usp.br/nutrihs). For the purpose of this study, sociodemographic, health and physical activity questionnaires, as well as food frequency questionnaire were considered. After completion of questionnaires, participants were invited to schedule a face-to-face visit for physical examination and collection of biological samples.

2.1. *Anthropometry and blood pressure measurements*

Trained personnel obtained all the measurements. Weight was measured with individuals wearing light clothing and no footwear, placed in a standing position on a digital scale with 200 kg capacity, accurate to the nearest 100 g. Height was measured using a wall stadiometer (precision 0.1 cm). Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. Waist circumference was obtained in the upright position, at the midpoint between the last rib and the iliac crest, using a flexible and inelastic tape with an accuracy of 0.1 cm.

Blood pressure was obtained after 5-minute rest in the sitting position, using an automatic device (Omron model HEM-712C, Omron Health Care Inc, USA). Three blood pressure measurements were taken and mean value of the last two measurements was considered. We considered the mean value of the last two, out of three blood pressure measurements. Mean blood pressure (BP) was calculated using the formula: diastolic BP + $1/3$ (systolic BP - diastolic BP)³².

2.2. *Lifestyle assessment: physical activity and diet*

The short version of the International Physical Activity Questionnaire previously validated^{33,34}, was used to assess physical activity. The level of total physical activity was presented in minutes per week.

Dietary data were collected using a validated food frequency questionnaire (<http://www.gac-usp.com.br/materiais-de-apoio.php>). The questions gather information on the eating habits of individuals in one year, identifying the usual individual portion of 102 food items. Participants were also asked about supplementation. Data were processed directly into e-NutriHS with the immediate calculation of the equivalent to daily diet and supply of data macro and micronutrients for food and total daily in agreement with the nutritional composition data from the USDA National Nutrient Database for Standard Reference (<http://ndb.nal.usda.gov/>). The amount of each food is transformed into equivalent grams per day. Total energy intake is provided in calories per day, while macronutrients in absolute or relative values to total energy, and micronutrients in an absolute amount per day. The Estimated Average Requirement, which considers adequate an intake ≥ 10 $\mu\text{g/day}$, classified the vitamin D intake³⁵.

Blood samples were collected after a 12-hour fasting. The lipid profile (total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides) was analyzed by enzymatic methods LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald equation. Plasma glucose was analyzed by the glucose oxidase method. Insulin resistance was estimated using homeostasis model assessment – HOMA-IR³⁶.

Cytokines (TNF- α , IL-6, IL-10, e-selectin and IFN- γ) were determined by Multiplex® system (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and LPS by ELISA (MyBioSource, San Diego, CA). High-sensitivity C-reactive protein and total 25(OH)D (Elecsys 2012, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) were measured by chemiluminescence. Limit of detection 25(OH)D assay was 3.0 ng/mL; intra- and inter-assay coefficients of variation were 3.3% and 9.9%, respectively. Categories of vitamin D status (sufficient, insufficient or deficient) was defined according to the Endocrine Society³⁵.

Fecal aliquots were maintained under refrigeration (6°C) within a maximum of 24 hours after collection and then were stored at -80°C until the gut microbiota analyses. DNA was extracted using the Maxwell® 16 DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA) and the protocol carried out in the Maxwell® 16 Instrument according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). Caporaso *et al.*³⁷ described the primers and workflow used to generate the amplicon from the V4 region from 16s rRNA gene. The amplicon library produced was sequenced on the Illumina MiSeq platform, according to the manufacturer's instructions. We used Qiime v1.8 to cluster the operational taxonomic units (OTU) and GreenGenes 13.5 database to assign taxonomy.

2.3. Statistical analysis

Descriptive data are expressed as means and standard deviations, medians and interquartile intervals, or percentages. The normal distribution of variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. When distributions were skewed, values were log-transformed, squared or inverse function used before analysis. Values in the tables were back-transformed to return to the original scale.

Vitamin D intake and 25(OH)D concentration were classified into tertiles for analysis. ANOVA (or Kruskal-Wallis when indicated) was used to compare clinical and inflammatory variables across tertiles. Bonferroni's *post-hoc* analysis was used to identify the differences. Pearson or Spearman coefficient was used for testing the correlations between vitamin D intake (adjusted for 1,000 kcal) or concentration (continuous variable) and other variables.

The DESeq2 package was used for comparisons of fecal microbiota composition. This package provides log₂ fold changes attributable to a given variable over the mean of normalized counts of OTUs. The log₂ fold changes represent the comparison against the reference level. If differences between groups are equal to zero, it indicates that there is no difference between the means of the groups. Only OTUs whose relative abundances were higher than 0.1%, and present in fecal samples of 80% of the participants were considered in the present. The OTU data at genera level were shown and were expressed as relative

abundance. Spearman coefficient tested correlations between 25(OH)D and genera abundance.

Multiple linear regression was used to analyze associations of 25(OH)D concentrations (dependent variable) with bacterial genus (independent variable of primary interest), adjusted for age, sex, seasonality and BMI. Further, inflammatory markers whose p-value was lower than 0.20 in univariate analysis were added, one-to-one, to the regression models, and were interpreted as explanatory variable.

Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 23 (IBM, Armonk, NY, USA), and R for microbiota analyses.

3. RESULTS

The sample was composed of 90.7% of women with a mean age of 24.9 ± 5.8 years and mean BMI of 23.6 ± 4.7 kg/m². Overweight or obesity was present in 28.5%; all participants denied hypertension or diabetes mellitus but four participants exhibited plasma glucose ≥ 100 mg/dL.

Eighty-one percent of the entire sample had low intake of vitamin D and its major sources were milk, dairy products and eggs. Mean 25(OH)D concentration was 23.9 ± 9.7 ng/mL; 24.0% were sufficient of vitamin D (≥ 30 ng/mL), 39.3% were insufficient (≥ 20 to 30 ng/mL) and 36.7% were deficient (< 20 ng/mL). Values were significantly lower when blood was collected during the spring compared to the other seasons (20.3 ± 8.0 versus 25.8 ± 10.0 ng/mL, $p = 0.01$). When 25(OH)D concentrations were compared according to BMI categories ($\geq$ or < 25 kg/m²) mean values did not differ.

Demographic and clinical data according to tertiles of vitamin D intake are depicted in Table 1. Participants from the third tertile of vitamin D intake were significantly older than the others. Values of demographic, clinical and biochemical data did not differ across tertiles of vitamin D intake. Mean 25(OH)D concentrations increased from the first to the third tertile (21.5 ± 9.0 versus 23.5 ± 10.0 versus 26.5 ± 9.6 ng/mL, respectively, $p = 0.013$). The mean value of LPS was higher in the second tertile of vitamin D intake with borderline significance. No differences in the mean concentrations of inflammatory markers were observed across tertiles.

Table 1. Number (percent in parenthesis) and means ($\pm$ standard deviation) or medians (interquartile range) of demographic and clinical data according to tertiles of vitamin D intake expressed in μg per day.

	Tertile 1 1.66 – 4.95	Tertile 2 4.97 – 7.18	Tertile 3 7.56 – 39.87	p-value
Women	48 (96)	45 (90)	43 (86)	0.224
Caucasians	32 (64)	37 (74)	31(62)	0.395
Income < 5 minimum wages	31 (62)	30 (60)	28 (56)	0.824
Age (years)	21 (20-26)	22 (21-27)	25 (22-30) ^c	0.004
Physical activity (min/week)	425 (145-885)	360 (123-667)	460 (176-1005)	0.585
Body mass index (kg/m^2) ^Ω	23.2 $\pm$ 4.2	22.8 $\pm$ 4.2	24.2 $\pm$ 4.0	0.116
Waist circumference (cm) ^ε	76.5 $\pm$ 12.6	76.0 $\pm$ 10.2	79.4 $\pm$ 9.9	0.084
Mean blood pressure (mmHg) ^{&}	84.3 $\pm$ 9.8	84.0 $\pm$ 9.2	82.5 $\pm$ 14.9	0.990
Plasma glucose (mg/dL)	82.1 $\pm$ 10.6	82.0 $\pm$ 7.3	81.1 $\pm$ 9.2	0.828
Insulin ($\mu\text{UI}/\text{mL}$)	8.8 (6.6-12.6)	9.0 (7.2-13.3)	8.9 (6.1-12.9)	0.569
HOMA-IR	1.8 (1.3-2.6)	1.9 (1.4-2.6)	1.7 (1.1-2.4)	0.536
Non-HDL cholesterol (mg/dL)	121.8 $\pm$ 31.7	117.4 $\pm$ 32.6	111.4 $\pm$ 29.8	0.269
25(OH)D (ng/mL) ^{&}	21.5 $\pm$ 9.0	23.5 $\pm$ 10.0	26.5 $\pm$ 9.6 [#]	0.013
Lipopolysaccharides (pg/mL) ^{&}	9.8 $\pm$ 4.6	11.9 $\pm$ 7.8	9.7 $\pm$ 4.1	0.055
C-reactive protein (mg/L)	3.0 (2.22-3.96)	2.7 (1.96- 3.42)	2.7 (2.06-3.58)	0.280
Interleukin-6 (pg/mL)	9.0 (6.72-11.73)	9.3(6.72-12.52)	9.7 (7.60-11.56)	0.715
Interleukin-10 (pg/mL)	4.1 (2.7-5.7)	4.4 (2.7-6.9)	3.7 (2.2-6.3)	0.571
Tumor necrosis factor- α (pg/mL)	42.0 (34.1-60.1)	45.7 (36.4-56.5)	46.5 (37.2-58.0)	0.597
E-selectin (pg/mL)	17.8 (11.5-24.4)	17.6 (12.6-23.3)	19.4 (13.0-24.8)	0.877
Interferon- γ (pg/mL)	0.3 (0.2-0.6)	0.3 (0.2-0.7)	0.3 (0.2-0.4)	0.517

ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test or Kruskal-Wallis test or Pearson's chi-squared test for frequencies.

[&]Log-transformed for analysis

^ΩInverse function for analysis

^εSquared for analysis

[#]p < 0.05 *versus* 1st tertile

^c p <0.05 *versus* 2nd tertile

Vitamin D intake, adjusted for 1,000 kcal, was significantly correlated to its serum concentration ($r = 0.220$, $p = 0.008$). Stratifying according to categories of 25(OH)D, no differences were observed across tertiles, although decreases in mean CRP, IFN- γ , and HOMA-IR values were observed with borderline significance. A significant trend of decreasing mean values of LPS was observed as the 25(OH)D tertiles are increased (Table 2).

Table 2. Number (percent in parenthesis) and means ($\pm$ standard deviation) or medians (interquartile range) of demographic and clinical data according to tertiles of 25(OH)D concentrations.

	Tertile 1 4.21 – 18.93 ng/mL	Tertile 2 18.93 – 26.48 ng/mL	Tertile 3 26.48 – 61.30 ng/mL	p-value
Women	44 (88)	43 (86)	49 (98)	0.087
Caucasians	31 (62)	34 (68)	35 (70)	0.677
Income < 5 minimum wages	30 (60)	32 (64)	27 (54)	0.592
Age (years)	22.0(20.0 -29.6)	24.0 (21.0-30.3)	23.0 (21-26.0)	0.240
Physical activity (min/week)	505 (157-990)	360 (127-685)	375 (163-732)	0.468
Body mass index ^Ω (kg/m ²)	23.4 $\pm$ 4.3	23.9 $\pm$ 4.2	22.8 $\pm$ 3.8	0.387
Waist circumference [€] (cm)	78.4 $\pm$ 13.1	78.8 $\pm$ 10.8	74.6 $\pm$ 8.3	0.162
Mean blood pressure ^{&} (mmHg)	85.2 $\pm$ 9.6	81.7 $\pm$ 14.4	83.8 $\pm$ 10.1	0.626
Plasma glucose (mg/dL)	82.5 $\pm$ 8.4	82.2 $\pm$ 9.9	80.6 $\pm$ 9.1	0.531
Insulin (μ UI/mL)	9.6 (7.8-13.2)	8.8 (6.1- 3.5)	8.4 (5.7-11.2)	0.124
HOMA-IR	1.9 (1.63-2.7)	1.9 (1.2-2.7)	1.6 (1.1-2.1)	0.080
Non-HDL cholesterol (mg/dL)	118.9 $\pm$ 36.4	109.9 $\pm$ 28.7	122.7 $\pm$ 27.9	0.107
Lipopolysaccharides ^{&} (pg/mL)	11.4 $\pm$ 7.7	10.3 $\pm$ 3.7	9.7 $\pm$ 5.1	0.092 [‡]
C-reactive protein (mg/L)	3.0 (2.6-4.1)	2.7 (1.9-3.6)	2.6 (2.1-3.4)	0.066
Interleukin-6 (pg/mL)	9.3 (6.9-12.9)	9.7 (7.1-12.2)	8.6 (6.7-10.4)	0.126
Interleukin-10 (pg/mL)	3.8 (2.6-6.5)	4.5 (2.8-6.3)	3.8 (1.9-5.5)	0.305
Tumor necrosis factor- α (pg/mL)	46.6 (36.8-57.5)	42.5 (35.8-61.3)	44.3 (35.8-52.9)	0.707
E-selectin (pg/mL)	19.1 (13.5-24.9)	17.3 (11.6-25.0)	16.4 (12.1-23.8)	0.394
Interferon- γ (pg/mL)	0.31 (0.2-0.7)	0.32 (0.2-0.7)	0.26 (0.2-0.4)	0.080

ANOVA or Kruskal-Wallis test or Pearson's chi-squared test.

[&]Log-transformed for analysis ^ΩInverse function for analysis [€]Squared for analysis

[‡]p trend = 0.038

Fecal microbiota of the entire sample was mainly composed of phyla *Firmicutes* (49.9%), *Bacteroidetes* (29.4%), *Verrucomicrobia* (9.3%), *Proteobacteria* (5.9%) and *Actinobacteria* (2.6%), as shown in Figure 1. The 15 most abundant genera were depicted in Figure 2.

Figure 1. Relative abundance of main phyla in the fecal microbiota of the entire sample.

Figure 2. Box-plot of the relative abundances of main genera in fecal microbiota. In X-axis, the 15 most common genera are depicted; the first capital letter represents the family, and genus name follows the underline symbol.

Significant differences ($p < 0.005$) in abundances of genera in feces from individuals belonging to the third tertile of vitamin D intake (panel A) and concentrations (panel B) in relation to those in the first and second tertiles are illustrated in Figure 3.

Figure 3. Log2 fold changes in mean reads of selected genera of the fecal microbiota of the sample studied, using the DESeq2 package. Third tertiles were compared to the sum of first and second. Genera were different at the level of $p < 0.005$. A red circle indicates that genus belongs to *Firmicutes*, a blue circle to *Bacteroidetes* and a yellow circle to *Proteobacteria*.

Panel A: Ratio of mean reads of the third tertile (reference) compared to the other tertiles of vitamin D intake. **Panel B:** Ratio of mean reads of the third tertile (reference) compared to other tertiles of 25(OH)D concentration.

Prevotella was more abundant (log2FC 1.67, $p < 0.01$), while *Haemophilus* and *Veillonella* were less abundant (log2FC -2.92, $p < 0.001$ and -1.46, $p < 0.01$, respectively) in the subset with the highest vitamin D intake than that observed in the other subset (first plus second tertiles). Regarding 25(OH)D concentration, *Megasphaera* was more abundant (logFC 3.11, $p < 0.001$), while *Haemophilus* and *Veillonella* less abundant (log2FC -3.53 and -2.78, $p < 0.001$, respectively) in the subset with the highest values.

Selected coefficients of correlations tested are exhibited in Table 3. Inflammatory variables were correlated to each other and to BMI. Also, CRP and E-selectin were inversely correlated to 25(OH)D concentration. Abundances of *Coproccoccus* ($r = -0.215$, $p = 0.008$) and *Bifdobacterium* ($r = -0.269$, $p = 0.001$) were inversely correlated to its concentration. Correlations of *Faecalibacterium* ($r = -0.143$, $p = 0.081$) and *Akkermansia* ($r = 0.093$, $p = 0.257$) to 25(OH)D did not reach statistical significance.

Based on the correlations showed on Table 3, we tested the association between 25(OH)D concentrations and some genera, using adjustments for age, sex, BMI and season (spring). Distinct models were built for each genus (*Faecalibacterium*, *Coprococcus* and *Bifidobacterium*), in which inflammatory variables (CRP, E-selectin and IFN- γ) were added as an explanatory pathway. Despite the non-significant correlation of *Akkermansia* and *Faecalibacterium* to vitamin D, these genera were included in the first model, which confirmed the lack of significant associations.

The independent association of spring with 25(OH)D levels remained in all the models. When bacterial genera were added (models 2), inverse associations with *Coprococcus* ($p = 0.045$) and *Bifidobacterium* ($p = 0.051$) were detected although with a borderline significance for the latter. Including inflammatory markers to these models, only CPR and E-selectin showed to be inversely associated with the vitamin. In models 3 (CRP-adjusted), the association of *Coprococcus* (model 3A, $p = 0.056$) but not that of *Bifidobacterium* genus (model 3B, $p = 0.035$) was weakened. In models 4 (E-selectin-adjusted), the association of *Coprococcus* with the 25(OH)D was significant (model 4A, $p = 0.034$) but not for *Bifidobacterium* (model 4B, $p = 0.073$). Despite no association of IFN- γ with the vitamin, its addition to models, confirmed that *Bifidobacterium* (model 5B, $p = 0.037$) but not *Coprococcus* ($p = 0.079$) was independently associated with the dependent variable.

Table 3: Selected correlation coefficients between clinical variables and abundances of most common genera in fecal microbiota. Pearson or Spearman correlation test used.

	25(OH)D	BMI	Mean BP	Glucose	Insulin	CRP	LPS	IL-6	IL-10	TNF- α	E-selectin	IFN- γ	Coproc	Bifidobac	Faecali	Akkerm
25(OH)D	1	-0.046	-0.047	-0.030	-0.126	-0.170*	-0.098	-0.122	-0.095	-0.065	-0.220**	-0.148 [#]	-0.215**	-0.269**	-0.143 [#]	0.093
BMI	-0.046	1	-0.263**	0.221**	-0.103	-0.133	-0.002	0.339**	0.232**	0.195*	0.231**	0.115	-0.056	0.120	-0.092	-0.048
Mean BP	-0.047	-0.263**	1	0.277**	0.164*	-0.204*	-0.135	0.110	0.040	-0.052	0.017	-0.007	0.016	0.158 [#]	0.117	-0.063
Glucose	-0.030	0.221**	0.277**	1	0.062	0.005	0.016	0.181*	0.028	0.120	0.178*	0.046	-0.049	0.026	0.030	-0.130
Insulin	-0.126	-0.103	0.164*	0.062	1	0.071	0.048	0.046	0.052	-0.080	-0.170*	-0.103	-0.052	0.082	0.057	-0.028
CRP	-0.170*	-0.133	-0.204*	0.005	0.071	1	0.078	-0.088	0.039	0.021	-0.173*	-0.042	0.107	-0.126	-0.013	-0.012
LPS	-0.098	-0.002	-0.135	0.016	0.048	0.078	1	-0.044	0.075	0.083	0.109	0.049	0.032	0.062	-0.136 [#]	0.046
IL-6	-0.122	0.339**	0.110	0.181*	0.046	-0.088	-0.044	1	0.500**	0.610**	0.306**	0.553**	-0.111	-0.034	0.134	-0.206*
IL-10	-0.095	0.232**	0.040	0.028	0.052	0.039	0.075	0.500**	1	0.420**	0.023	0.348**	-0.010	0.068	0.047	-0.203*
TNF- α	-0.065	0.195*	-0.052	0.120	-0.080	0.021	0.083	0.610**	0.420**	1	0.110	-0.602**	-0.101	-0.059	0.126	-0.110
E-selectin	-0.220**	0.231**	0.017	0.178*	-0.170*	-0.173*	0.109	0.306**	0.023	0.110	1	-0.143 [#]	-0.008	0.100	0.024	-0.018
IFN- γ	-0.148 [#]	0.115	-0.007	0.046	-0.103	-0.042	0.049	0.553**	0.348**	-0.602**	-0.143 [#]	1	-0.010	0.005	0.120	-0.118
Coproc	0.215**	-0.056	0.016	-0.049	-0.052	0.107	0.032	-0.111	-0.010	-0.101	-0.008	-0.010	1	0.119	0.135 [#]	0.005
Bifidobac	-0.269**	0.120	0.158 [#]	0.026	0.082	-0.126	0.062	-0.034	0.068	-0.059	0.100	0.005	0.119	1	0.026	-0.024
Faecali	-0.143 [#]	-0.092	0.117	0.030	0.057	-0.013	-0.136 [#]	0.134	0.047	0.126	0.024	0.120	0.135 [#]	0.026	1	-0.207*
Akkerm	0.093	-0.048	-0.063	-0.130	-0.028	-0.012	0.046	-0.206*	-0.203*	-0.110	-0.018	-0.118	0.005	-0.024	-0.207*	1

BMI, body mass index

BP, blood pressure

CRP, C-reactive protein

LPS, Lipopolysaccharides

IL, interleukin

TNF- α , tumor necrosis factor alpha

IFN- γ , interferon

gamma Coproc, *Coprococcus*

Bifidobac, *Bifidobacterium*

Faecali, *Faecalibacterium*

Akkerm, *Akkermansia*

* p < 0.05

** p < 0.01

[#] p < 0.10

Table 4. Coefficients (standard errors in parenthesis) of multiple linear regression models for the associations of log-transformed 25(OH)D concentrations with selected genera abundances, adjusted for several variables. “A” refers to *Coprococcus* genus and “B” to *Bifidobacterium* genus.

	Season (spring)	<i>Coprococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	C-reactive protein	E-selectin ^{&}	Interferon- γ ^{&}	R ²
Model 1	-0.207** (0.071)	-	-	-	-	-	0.082
Model 2-A	-0.210** (0.071)	-10.151* (5.024)	-	-	-	-	0.107
Model 2-B	-0.209** (0.072)	-	-1.794# (0.910)	-	-	-	0.082
Model 3-A	-0.208** (0.069)	-9.414# (4.887)	-	-0.074* (0.030)	-	-	0.140
Model 3-B	-0.203** (0.069)	-	-1.881* (0.882)	-0.080** (0.030)	-	-	0.145
Model 4-A	-0.209** (0.070)	-10.565* (4.936)	-	-	-0.169** (0.064)	-	0.147
Model 4-B	-0.204** (0.070)	-	-1.625# (0.899)	-	-0.157* (0.065)	-	0.140
Model 5-A	-0.210** (0.071)	-9.319# (5.270)	-	-	-	-0.007 (0.012)	0.108
Model 5-B	-0.200** (0.071)	-	-1.924* (0.914)	-	-	-0.016 (0.011)	0.116

*p < 0.05 **p < 0.01 #p < 0.10 &Log-transformed variables for analysis
 Model 1: adjusted for sex, age, body mass index and season Model 2: Model 1 plus genus
 Model 3: Model 2 plus C-reactive protein Model 4: Model 2 plus E-selectin
 Model 5: Model 2 plus interferon- γ

4. Discussion

We found that both vitamin D intake and 25(OH)D concentration are associated with the abundance of certain commensal genera in gut microbiota of the NutriHS participants. Our findings of a distinct proportion of genera according to vitamin D status may raise the hypothesis that its modulatory effect in intestinal immune cells could influence bacterial composition. A reduced immune response in vitamin D deficiency could augment competitive advantage of *Haemophilus* and *Veillonella*, found to be relatively more abundant in the subset of individuals with low compared to that of the highest intake and concentration of vitamin D. These gram-negative bacteria could explain higher LPS levels detected in this subset. On the other hand, a relatively small proportion of bacteria with beneficial effect – such as *Coprococcus* and *Bifidobacterium* genera – could activate intestinal immune response and

induce local inflammation, requiring compensatory anti-inflammatory pathways as those dependent of the 25(OH)D. Inverse association of inflammatory markers and 25(OH)D was detected. The results reinforce the role of vitamin D in the maintenance of immune system homeostasis, and we speculate that this occurs in part by interacting with the gut microbiota, although the study design precludes establishing cause-effect relationships.

A peculiarity of our study was the inclusion of healthy samples of young adults who have knowledge and skills in the nutrition field. We found that mean values of 25(OH)D increased across the tertiles of intake, as well as a direct correlation between these variables. There is no consensus regarding such relationship in literature and most studies did not show significant correlation^{1,2,3,4,5,6}. It is possible that we had been able to demonstrate such relationship due to the high reliability of the dietary data collected in the current sample of undergraduates and graduates in nutrition.

The clinical profile of the three subsets of participants stratified according to 25(OH)D concentration did not differ, although a worse cardiometabolic profile could be expected in those with vitamin D insufficiency or deficiency. In general, reports of inverse associations of vitamin D status with obesity and metabolic disturbances were conducted in older individuals^{12,38,39,40}. The demographic characteristics of our sample could explain the lack of associations between 25(OH)D and those variables. Nevertheless, higher LPS values were seen in the subset with the lowest 25(OH)D levels that could suggest an at-risk condition for metabolic endotoxemia. In fact, it was previously described that vitamin D-deficient mice, exposed to a bacterial pathogen, exhibited greater endotoxin translocation and inflammatory cytokines production⁴¹. As systemic pro-inflammatory environment is considered a pathophysiological basis for cardiometabolic diseases, all these findings seem coherent with studies in which vitamin D status was associated with manifestations of the metabolic syndrome^{12,38,39,40}. However, a recent prospective study did not support a protective effect of vitamin D supplementation⁴².

Interestingly, we found a significant inverse correlation of 25(OH)D with E-selectin and CRP concentrations, suggesting that even among healthy individuals, vitamin D status may ensure an anti-inflammatory condition. As a matter of fact, several studies have reported that 25(OH)D plays a significant role in the immune system, relating higher serum levels as well as higher consumption with lower low-grade inflammation^{43,44,45,46}. In animal models and humans, there is evidence that vitamin D modulate immune response reducing inflammation^{29,44,47}, which is in agreement with our findings of inverse correlations between 25(OH)D with CRP and E-selectin.

Our metagenomic analysis confirmed that *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were the most abundant phyla and that *Bacteroides* was the most common genus, according to other reports⁴⁸. An interesting finding in our sample was the relatively high abundance of *Akkermansia*; moreover, we detected an inverse correlation between this genus and glucose metabolism, and inflammatory biomarkers. The association is in agreement with previous studies showing that *Akkermansia muciniphila* is associated with favorable effects on metabolic and inflammatory profiles^{24,49}. In animal models, benefits of *A. muciniphila* on gut permeability, mucus layer thickness and metabolism in obesity and type 2 diabetes were demonstrated²⁴. Since our sample was composed of young individuals, with adequate body adiposity and healthy metabolic profile, a high proportion of this genus was not an unexpected finding.

DeSeq2 analyses provided relevant information about the ratio of some genera in one subset (reference) compared to other (first plus second tertiles). Independently of their abundance in the entire sample, we found that *Prevotella* was more prominent in the subset with highest vitamin D intake. In populations consuming a carbohydrate and fiber-rich diet, an increased abundance of *Prevotella* had already been described⁵⁰. The consumption of fibers verified in the participants of the NutriHS (29.5 ± 17.8 g/day, data not shown) was quite adequate, which could be contributing to the relatively high abundance of *Prevotella* genus. Previously, *Haemophilus* was associated with inflammatory bowel disease and with LPS levels, and *Veillonella* with increased inflammatory cytokines^{51,52}. These gram-negative bacteria with an outer layer of LPS were less prominent in our subsets with the highest vitamin D intake and with highest 25(OH)D; also, the lowest LPS concentration was found among those at the best vitamin D status. It is possible that participants of our study with a worse vitamin D status and reduced capacity of responding to *Haemophilus* and *Veillonella* could permit endotoxin translocation through the intestinal wall and trigger systemic inflammation. This speculation is supported by animal studies, in which vitamin D supplementation increased the expression of defensins and NOD2 genes, enhancing immune response against intestinal pathogens⁵³. It was also demonstrated that the 1,25(OH)2D3 induced the expression of junction proteins and strengthened the tight junction complex, improving the gut barrier²⁴. Additional mechanistic studies are needed to test such hypothesis and unravel the immunomodulatory capacities of these genera.

Considering the entire sample, the *Coprococcus* and *Bifidobacterium* maintained inversely associated with 25(OH)D concentration after adjustments. Both genera have been related to adequate BMI and glucose homeostasis, as well as butyrate production and anti-inflammatory actions^{54,55,56}. It is possible that the exposure to a high abundance of those bacteria could be attenuating immune response. Association of *Coprococcus* with vitamin D

status was described when this vitamin was supplemented for the treatment of immune-mediated diseases⁵⁶, but not in healthy individuals. In normal participants of our study, the finding of an inverse association of 25(OH)D with *Coprococcus* abundance could reflect their immune intestinal homeostasis and a stable systemic inflammatory state. To the best of our knowledge, no study showed an association of *Bifidobacterium* with vitamin D status. In our linear regression analyses, the attenuation or abolishment of the association of these genera with three different inflammatory markers suggests that inflammation may partially mediate the relationship between the vitamin concentration and microbiota. This is in agreement with reported evidence of its anti-inflammatory action⁵⁷ and with a pro-inflammatory state when vitamin D is lacking⁵⁸. VDR knockouts mice exhibited chronic inflammation in gastrointestinal tract even in face of a non-pathogenic microbiota. Despite controversies about a cause-effect relationship⁵⁹, there is a consensus that this vitamin is an important mediator of intestinal defenses against infectious agents⁶⁰.

Our study has limitations mainly related to its cross-sectional design. Despite being speculative, it was important to raise hypothesis to be tested in further studies regarding an emerging issue in the literature. The sample size was not small, and we had the strength of evaluating a broad range of variables for the assessment of the cardiometabolic risk profile. Our young nutritionists-based sample should have provided reliable dietary data, but led to a limitation related to its homogeneity in terms of dietary habits. These aspects limit generalizing findings to the general population. Investigation of older individuals and at higher risk levels are also needed to confirm our results. Considering the increased prevalence rates of vitamin D deficiency in populations nowadays, our study opens an innovative pathway to improve the comprehension of this scenario.

In summary, our study supported that a modulatory effect of vitamin D status in the intestinal immune system could influence commensal bacterial composition and vice-versa. A relative higher abundance of gram-negative genera, such as *Haemophilus* and *Veillonella*, may be facilitated by the low intake and/or concentration of vitamin D. Relatively small proportion of beneficial bacteria, such as *Coprococcus* and *Bifidobacterium*, could trigger immune response and inflammation, demanding anti-inflammatory actions as those dependent of the 25(OH)D. We concluded that the role vitamin D in the maintenance of immune homeostasis seems to occur in part by interacting with the gut microbiota. Further studies with appropriate design are desirable to address hypothesis raised in the current study.

Acknowledgements

Authors thank the NutriHS researchers and participants and to Capes and FAPESP for financial support.

Author contributions

Study design: SRGF. Study conduct, data collection: RVL, LGF, SRGF. Data analysis and interpretation: RVL, GRF, ACFM, LGF, SRGF. Drafting manuscript and revising manuscript content: RVL, GRF, ACFM, LGF, SRGF. Approving final version of manuscript: RVL, GRF, ACFM, LGF, SRGF.

Funding

This work was supported by a FAPESP - São Paulo Foundation for Research Support (grant number 2015/10045-7).

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(5):842-856.
- [2] Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC, et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(1):187-192.
- [3] Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005; 135(2):317-322.
- [4] Hyppönen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(3):860-868.
- [5] Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117(4):503-511. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706127>.
- [6] Salehpour A, Shidfar F, Hosseinpanah F, Vafa M, Razaghi M, Hoshirrad A, et al. Vitamin D 3 and the risk of CVD in overweight and obese women: a randomized controlled trial. *Br J Nutr* 2012; 108(10):1866-1873. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512000098>.
- [7] Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39(2):365-379.

- [8] Cantorna MT. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92(1):60-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.020>.
- [9] Michos ED & Melamed ML. Vitamin D and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11(1):7-12. <http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f2f4dd>.
- [10] Vaidya, A. Vitamin D and cardio-metabolic disease. *Metabolism - Clinical and Experimental* 2013; 62(12):1697.
- [11] Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 347(1):106-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.016>.
- [12] Kim HJ, Kang CK, Park H, Lee MG. Effects of vitamin D supplementation and circuit training on indices of obesity and insulin resistance in T2D and vitamin D deficient elderly women. *J Exerc Nutr Biochem* 2014; 18(3):249. <http://dx.doi.org/10.5717/jenb.2014.18.3.249>
- [13] Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004. 79(5):820-825.
- [14] Schuch, NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamin D and endocrine diseases. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009; 53(5):625-633.
- [15] Norman PE, Powell JT. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circulation research* 2014; 114(2):379-393. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301241>.
- [16] Herrmann M, Sullivan DR, Veillard A, McCorquodale T, Straub IR, Scott R, et al. Serum 25-Hydroxy Vitamin D: a predictor of macrovascular and microvascular complications in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 38(3):521-528.
- [17] Wellen KE & Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1111-1119.
- [18] Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(6):729–734. <http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282efdebb>.
- [19] Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS-Biology* 2011; 9(12):e1001212.
- [20] Moraes ACF, Silva IT, Almeida-Pititto B, Ferreira SRG. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2014; 58(4):317-327. <http://dx.doi.org/10.1590/0004-2730000002940>.

- [21] Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998; 98(8):731-733. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.98.8.731>.
- [22] Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Haller D, et al. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr* 2013; 109(S1):S1-S34. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512005119>.
- [23] Almeida-Pititto B, Ribeiro-Filho FF, Bittencourt MS, Lotufo PA, Bensenor I, Ferreira S. R. Usefulness of circulating E-selectin to early detection of the atherosclerotic process in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Diabetol Metab Syndr* 2016; 8(19). <http://dx.doi.org/10.1186/s13098-016-0133-9>.
- [24] Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS* 2013; 110(22):9066-9071. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219451110>.
- [25] Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, Bissonnette M, and Li YC. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G208-G216. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00398.2007>.
- [26] Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, Cantorna MT. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate–induced colitis. *J Nutr* 2013; 143(10):1679-1686.
- [27] Bashir M, Prietl B, Tauschmann M, Mautner SI, Kump PK, Treiber G, et al. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *Eur J Nutr* 2015; 55:1479–1489. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-015-0966-2>.
- [28] Mai V, McCrary QM, Sinha R, Glei M. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr J* 2009; 8(1):49. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-8-49>.
- [29] Ly NP, Litonjua A, Gold DR, Celedón JC. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(5):1087-1094. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.015>.
- [30] Ciubotaru I, Green SJ, Kukreja S, Barengolts E. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. *Trans Res* 2015; 166(5):401-411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.015>

- [31] Folchetti, LGD, da Silva IT, de Almeida-Pititto B, Ferreira SRG. Nutritionists' Health Study cohort: a web-based approach of life events, habits and health outcomes. *BMJ open* 2016; 6(8):e012081. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012081>.
- [32] Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2006.
- [33] Matsudo S, Araújo T, Marsudo V, Andrade D, Andrade E, Braggion G. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Rev Bras Ativ Fís Saúde* 2001; 6(2):05-18.
- [34] Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35(8):1381-1395. <http://dx.doi.org/10.1249/01.MSS.0000078924.61453.FB>.
- [35] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1911-1930. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2011-0385>.
- [36] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985, 28:412-419. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00280883>.
- [37] Caporaso JG, Lauber CL, Walters W, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6(8):1621-1624. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
- [38] Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007; 49(5):1063-1069. <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.087288>.
- [39] Shankar A, Sabanayagam C, Kalidindi S. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34(5):1114-1119. <http://dx.doi.org/10.2337/dc10-1203>.
- [40] Salehpour A, Hosseinpanah F, Shidfar F, Vafa M, Razaghi M, Dehghani S, et al. A 12-week double-blind randomized clinical trial of vitamin D3 supplementation on body fat mass in healthy overweight and obese women. *Nutr J* 2012; 11(1):78. <http://dx.doi.org/10.1201/b16308-3>.

- [41] Ryz NR, Lochner A, Bhullar K, Ma C, Huang T, Bhinder G, et al. Dietary Vitamin D3 deficiency alters intestinal mucosal defense and increases susceptibility to *Citrobacter rodentium* induced colitis 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(9): G730-G742.
- [42] Jorde R, Sollid ST, Svartberg J, Schirmer H, Joakimsen RM, Njølstad I, et al. Vitamin D 20 000 IU per week for five years does not prevent progression from prediabetes to diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(4):1647-1655. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2015-4013>.
- [43] Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Rev Immunol* 2008; 8(9):685-698. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2378>.
- [44] Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol* 2012; 76:315-325. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04261.x>.
- [45] Bellia A, Garcovich C, D'Adamo M, Lombardo M, Tesauro M, Donadel G, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. *Inter Emergency Med* 2013; 8(1):33-40. <http://dx.doi.org/10.1007/s11739-011-0559-x>.
- [46] Mellenthin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Völzke H, Nauck M, Hannemann A. Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population. *Metabolism - Clinical and Experimental* 2014; 63(8):1056-1062.
- [47] Cantorna MT, McDaniel K, Bora S, Chen J, James J. Vitamin D, immune regulation, the microbiota, and inflammatory bowel disease. *Exp Biol Med* 2014; 239(11):1524-1530. <http://dx.doi.org/10.1177/1535370214523890>.
- [48] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473:174–180
- [49] Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490(7418):55-60. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11450>.
- [50] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334(6052):105-108. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1208344>.
- [51] Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res* 2013;037. <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dst037>.

- [52] Van den Bogert B, Meijerink M, Zoetendal EG, Wells JM, Kleerebezem, M. Immunomodulatory properties of *Streptococcus* and *Veillonella* isolates from the human small intestine microbiota. *PloS one* 2014; 9(12):e114277. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0114277>.
- [53] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:16731–16736.
- [54] Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(4):894-899.
- [55] Wu X, Ma C, Han L, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 2010; 61:69-78. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9582-9>.
- [56] Cantarel BL, Waubant E, Chehoud C, Kuczynski J, DeSantis TZ, Warrington J, et al. Gut microbiota in multiple sclerosis. *J Invest Med* 2015; 63(5):729-734. <http://dx.doi.org/10.1097/JIM.0000000000000192>.
- [57] Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK., Riches DW, Goleva E. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* 2012; 188(5):2127-2135. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1102412>.
- [58] Cantorna MT. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc Nutr Soc* 2010; 69(03):286-289. <http://dx.doi.org/10.1017/S0029665110001722>.
- [59] Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res* 2014; 63(10):803-819. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-014-0755-z>.
- [60] Assa A, Vong L, Pinnell LJ, Avitzur N, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation. *J Infect Dis* 2014; 210:1296-1305. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu235>.

Anexo 5: Beta diversidade da microbiota intestinal da amostra estudada.

Tercis 1 + 2 Tercil 3

Anexo 7: Currículo Lattes do orientador

18/10/2016

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo)

English

Imprimir
currículo

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Eventos Orientações Bancas Citações +

Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1B - CA MD - Medicina

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6633883139386818>

Última atualização do currículo em 11/10/2016

Possui graduação em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (1981), mestrado em Medicina (Endocrinologia Clínica) pela Universidade Federal de São Paulo (1986) e doutorado em Medicina (Endocrinologia Clínica) pela Universidade Federal de São Paulo (1988). É professora titular na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e ocupa atualmente o cargo de Presidente da Comissão de Pós-Graduação desta Faculdade. É coordenadora do Departamento de Epidemiologia da Sociedade Brasileira de Diabetes, consultora médica e científica da Associação de Diabetes Juvenil, consultora médica e científica da Federação Nacional das Associações de Diabéticos, consultora ad hoc do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Tem bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq, nível 1-B. Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Medicina e Epidemiologia, atuando principalmente nos seguintes temas: diabetes mellitus, síndrome metabólica, hipertensão arterial, obesidade, nutrição e microbiota intestinal. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo

Nome em citações bibliográficas

FERREIRA, S. R. G.; Ferreira, Sandra R.; Ferreira, Sandra; Ferreira, Sandra R.G.; Ferreira, Sandra Roberta G.; Ferreira Vivolo, SRG; FERREIRA, Sandra Roberta Gouveia; FERREIRA, Sandra Roberta Gouvea; FERREIRA, Sandra R G; Ferreira, S.R.G.; FERREIRA, SANDRA R; FERREIRA, SANDRA R. G.; FERREIRA, SANDRA RG; VÍVOLO, SANDRA ROBERTA GOUVEA FERREIRA; Sandra Roberta Gouvea Ferreira

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Avenida Dr. Arnaldo, 715
Paraisópolis
01246-904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617705
Ramal: 218
Fax: (11) 30616601

Formação acadêmica/titulação

1986 - 1988

Doutorado em Medicina (Endocrinologia Clínica) (Conceito CAPES 5).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
Título: BLOQUEIO DOPAMINERGICO PERIFERICO COM DOMPERIDONE NO TRATAMENTO DA HIPOTENSÃO ORTOSTÁTICA DA NEUROPATIA DIABÉTICA., Ano de obtenção: 1988.
Orientador: MARIA TEREZA ZANELLA.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Neuropatia autonômica diabética; Bloqueio Dopaminérgico;; Hipotensão Ortostática...
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Endocrinologia.
Setores de atividade: Saúde Humana; Cuidado À Saúde das Pessoas.

1984 - 1986

Mestrado em Medicina (Endocrinologia Clínica) (Conceito CAPES 5).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
Título: ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS TESTES DE DILUIÇÃO RENAL NA SÍNDROME DE BARTTER., Ano de Obtenção: 1986.
Orientador: CLAUDIO ELIAS KATER.
Palavras-chave: Síndrome de Bartter;; Teste de Diluição Renal;; Reabsorção Fracional Distal de Cloreto...
Grande área: Ciências da Saúde

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4781167T2>

1/126

Anexo 8: Currículo Lattes do autor

18/10/2016

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Renata Vidonscky Luthold)

Imprimir
currículo

Dados gerais Formação Atuação Produções Eventos +

Renata Vidonscky Luthold

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7935862888356497>

Última atualização do currículo em 18/10/2016

Possui graduação em Nutrição pelo Centro Universitário São Camilo (2014). Foi bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq na Faculdade de Saúde Pública (USP). Atualmente é mestranda em Nutrição em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo, bolsista pela Capes. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Renata Vidonscky Luthold

Nome em citações bibliográficas

LUTHOLD, R. V.; VIDONSKY, R. L.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2015

Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, FSP - USP, Brasil.

Título: Vitamina D na modulação da microbiota intestinal: associações com os perfis inflamatório e cardiometabólico. Orientador: Sandra Roberta Gouveia Ferreira Vivolo.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2011 - 2014

Graduação em Nutrição.
Centro Universitário São Camilo, CUSC, Brasil.
Título: Os benefícios dos nutrientes e do controle do estado nutricional em pacientes oncológicos.
Orientador: Luciana Trindade.

2007 - 2009

Ensino Médio (2º grau).
Colégio Dante Alighieri, CDA, Brasil.

Atuação Profissional

Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP- USP, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestranda, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K8701108T7>