

**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 Vidonsky 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: Prof^a 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 ($p\text{-trend} < 0,05$). *Prevotella* foi mais abundante (\log_2FC 1,67; $p < 0,01$), e *Haemophilus* and *Veillonella* menos abundantes (\log_2FC -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. Concluímos 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 -trend < 0.05). *Prevotella* was more abundant (\log_2FC 1.67; $p < 0.01$), and *Haemophilus* and *Veillonella* less abundant (\log_2FC -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 Conclusões.....	22
7 Referências	23

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 interações 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-hidroxitamina 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-hidroxitamina 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 (JAVAID 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 NFκB, 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 efectoras 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 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, Ortegón 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 JI. 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 immunomodulator. *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 Natl 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, Gleib 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 Nutr* 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.